

Aus dem Med. Zentrum für Humangenetik
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Mutationsanalysen
bei
GLI3-Morphopathien

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität
vorgelegt von

Heike Heuer
aus Pforzheim

Marburg/Lahn, 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität

Marburg am 14 November 2002

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Correferent: Prof. Dr. Suske

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2. EINLEITUNG.....	5
2.1 Die Gestalt des Menschen	5
2.2 Extremitätenentwicklung und Dysmorphien	6
2.3 Das Greig Cephalopolysyndactyly Syndrom (GPCS) und andere Entwicklungsstörungen mit Mutationen im <i>GLI3</i> Gen	8
2.4 <i>GLI3</i> und Homologe im Tierreich	11
2.5 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	17
3. MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Chemikalien.....	18
3.1.2 Enzyme und Nukleotide.....	18
3.1.3 Verwendete Fertigsysteme.....	19
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	19
3.1.5 Geräte und Zubehör	20
3.2 Standardmethoden.....	21
3.2.1 DNA-Präparation aus Patientenblut	21
3.2.2 Standard-PCR	21
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	23
3.2.4 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)	23
3.2.4.1 Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele für die Mutationssuche	23
3.2.4.2 Silberfärbung der nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gele	24
3.2.5 Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen	25
3.2.6 Sequenzierung	25
3.2.6.1 PCR für die automatische Sequenzierung	25
3.2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gele für die automatische Sequenzierung.....	26
3.2.6.3 Auswertung der Sequenzanalysen	27

3.3 Amplifikation genomischer <i>GLI3</i>- Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
3.3.1 PCR-Bedingungen.....	27
3.3.2 Primer für die Amplifikation genomischer <i>GLI3</i> -Fragmente.....	29
3.4 Molekulargenetische Mutationssuche im <i>GLI3</i>-Fragment.....	32
3.4.1 Zusammenfassung der SSCA-Bedingungen.....	32
3.4.2 Fluoreszenz-Terminatoren- <i>Taq</i> Cycle-Sequenzierung für die Mutationidentifizierung	33
3.5 Patientenrekrutierung.....	34
4. ERGEBNISSE.....	37
4.1 Molekulare Mutationsanalysen mittels Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA).....	37
4.2 Identifizierung der Punktmutationen mittels Sequenzierung	38
4.2.1 Polymorphismen	39
4.2.2 Mutationen	43
5. DISKUSSION.....	47
5.1 <i>GLI</i>-Gene während der Extremitätenentwicklung und assoziierte Krankheitsbilder.....	47
5.2 Die Rolle von <i>GLI3</i> in der SHH-Signalkaskade und seine funktionellen Domänen.....	48
5.3 Mutationen im <i>GLI3</i>-Gen von GCPS Patienten und deren mögliche Auswirkungen auf die Funktion des Proteins.....	50
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
7. ABKÜRZUNGEN.....	69
8. PUBLIKATIONEN.....	71

9. ANHANG.....	72
9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	72
9.2 Lebenslauf.....	73
9.3 Danksagung.....	74
9.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	75

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS; MIM 175700) ist eine autosomal dominante Entwicklungsstörung, die durch Mutationen im *GLI3*-Gen bedingt wird.

Phänotypisch zeigt sich eine Kombination von Schädel- und Gesichtsdysmorphien mit Fehlbildungen der Extremitäten wie prä- und/oder postaxialer Polydaktylie der Hände, präaxialer Polydaktylie der Füße und Syndaktylien. Neben dem GCPS sind auch das Pallister-Hall-Syndrom (PHS; MIM 146510), die Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A; MIM 174200) und Typ A/B mit *GLI3*-Mutationen assoziiert.

Das *GLI3*-Gen ist auf dem Chromosom 7p13 lokalisiert und spielt als Transkriptionsfaktor unter anderem während der Extremitätenentwicklung eine Rolle.

Für diese Arbeit wurden als Probanden Patienten mit GCPS, mit Verdacht auf GCPS oder phänotypisch verwandten Syndromen herangezogen. Als molekulargenetische Methode kam für die Untersuchung der Patienten-DNA die nicht-radioaktive Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) zur Anwendung. Die Erhöhung der Fallzahlen sollte das Spektrum der *GLI3* Mutationen erweitern und ein besseres Verständnis über eine Genotyp-Phänotyp Korrelation zwischen der Position der Mutation und den GCPS Symptomen ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 9 Mutationen im *GLI3*-Gen klinisch gesicherter GCPS Patienten detektiert werden. Mindestens 4 der 9 Mutationen führen zu einem verkürzten Protein und somit vermutlich zu einem Verlust aller oder einiger Funktionen. In 3 weiteren Fällen scheint das GCPS durch Missense-Mutationen verursacht, die unterschiedliche Regionen des Gens betreffen und die DNA-Bindungs- oder die Transaktivierungskapazität des Proteins beeinträchtigen.

Bei der Betrachtung der Position der einzelnen Mutationen zeigt sich, dass sie über die gesamte kodierende Sequenz des *GLI3*-Gens verteilt sind. Somit lässt sich die Hypothese einer amerikanischen Gruppe, GCPS sei nur durch Mutationen bedingt, die den Verlust der DNA-bindenden Domäne verursachen, nicht bestätigen. Vielmehr sind hinsichtlich einer Korrelation zwischen Position der *GLI3* Mutation und beobachtetem Phänotyp weitere Erkenntnisse auf funktioneller Ebene (mRNA-Transkript und Proteinebene) notwendig.

2. EINLEITUNG

2.1 Die Gestalt des Menschen

Der Wassermann

Justinus Kerner (1826)

Ein fremder Jüngling in stolzem Kleid sich wandte bald zu der schönsten Maid,
Er reichte ihr dar die Hände zum Tanz, er setzte ihr auf's Haar einen meergrünen Kranz.

O Jüngling ! warum so kalt dein Arm? In Neckars Tiefen da ist's nicht warm

O Jüngling! warum so bleich deine Hand? In's Wasser dringt nicht der Sonne Brand!

Er tanzt mit ihr von der Linde weit. Laß Jüngling! horch, die Mutter mir schreit!

Er tanzt mit ihr den Neckar entlang: Laß Jüngling! weh! mir wird so bang!

Er faßt sie fest um den schlanken Leib. Schön Maid! du bist des Wassermanns Weib!

Schon früh wurden in Märchen, Sagen und Gedichten Figuren beschrieben, die von dem gewohnten menschlichen Äußeren abwichen. Vom "Normalen" ausgehend, konnten diese Gestalten keine Menschen sein, so dass man ihnen andere Namen gab: wie z.B. Zwerg, Riese oder Wassermann.

Es war einfach unvorstellbar, dass ein Wesen, das Häute zwischen den Fingern besaß, menschlichen Ursprungs sein sollte. Wenn Frauen solche Kinder gebären, musste die Ursache in der Hexerei oder Magie liegen.

1865 begann mit den Züchtungsexperimenten des Augustinermönches Gregor Mendel die Erforschung der Vererbung, aber es dauerte noch rund 40 Jahre bis die Gesetzmäßigkeiten auch beim Menschen systematisch analysiert und Erkrankungen - wie z.B. äußere Fehlbildungen - als erblich bedingt erkannt wurden. Weitere Erkenntnisschritte folgten, als 1915 Thomas H. Morgan die Chromosomentheorie der Vererbung begründete, 1944 Avery, McLeod und McCarty die DNA als Träger genetischer Information nachwiesen und schließlich 1953 die Frage nach der Struktur durch Watson und Crick beantwortet wurde. Die Humangenetik als eigenständige Disziplin entstand mit der wachsenden Zahl der Krankheiten und Erkenntnisse über ihre erbliche Zusammenhänge. Maßgeblich zur Systematisierung und Entwicklung der medizinischen Genetik trug die Einführung eines

Katalogs über die nach den Mendel'schen Gesetzmäßigkeiten vererbten Phänotypen beim Menschen durch Victor A. McKusick 1966 (McKusick-Katalog; gegenwärtig in der 11. Auflage, McKusick, 1994) bei.

2.2 Extremitätenentwicklung und Dismorphien

In der 4. Entwicklungswoche bilden sich die Extremitätenknospen, bestehend aus dem Oberflächenektoderm und einem Mesenchymkern, der im wesentlichen aus dem parietalen Mesoderm hervorgeht. Am distalen Rand der Knospe verdickt sich das Ektoderm zur Randleiste. Wechselwirkungen zwischen Randleiste und Mesenchym steuern das Längenwachstum der Extremitätenknospe (s.u.). Am Anfang der 6. Woche entsteht die Hand- bzw. Fußplatte. Durch Mesenchymverdichtung entwickeln sich die Finger bzw. Zehen. In der 7. Woche beginnt die Entwicklung der Muskulatur aus Myoblasten, deren Ursprung die Dermatome der Somiten sind. Mit der 8. Embryonalwoche ist die Ausbildung des hyalin-knorpeligen Skeletts aus mesenchymalen Anlagen abgeschlossen.

Vieles von dem heutigen Wissen über Extremitätenentwicklung ist das Ergebnis von Untersuchungen an Hühnern und Amphibien. Die Extremität wird in drei Achsen unterteilt: proximal-distal, anterior-posterior und dorsal-ventral. Die Expression spezifischer molekularer Signalproteine ist für die Achsenbildung verantwortlich und kann bestimmten Regionen der Extremitätenknospe zugeordnet werden (Innis und Mortlock, 1998; Hogan, 1999; Riddle und Tabin, 1999). Noch bevor diese sichtbar wird, ist ihre Position vorgezeichnet durch Signale der Hox Gene. Hox Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen. Durch die Bildung von FGF10 (Fibroblast Growth Factor) im intermediären Mesoderm, der die Expression von FGF8 im undifferenzierten Oberflächenektoderm induziert, beginnt die Entwicklung der Extremitätenknospe.

Die Randleiste (AER; apical ectodermal ridge) läuft entlang der anterior-posterior Achse und grenzt die dorsale von der ventralen Fläche ab. Sie ist für das kontinuierliche distale Wachstum verantwortlich und bildet FGFs, die das darunterliegende Mesoderm (PZ; progress zone) anregen (Innis und Mortlock, 1998). Die Position der AER wird durch den homeobox-enhaltenden Transkriptionsfaktor Engrailed-1 (En-1) und den Sekretionsfaktor Radical fringe (r-Fng) beeinflusst, der induzierende Faktor aus dem Mesoderm ist jedoch

nicht bekannt. Ein AER entsteht an der Grenze von r-Fng-exprimierenden und – nichtexprimierenden Zellen.

Die En-1 Expression im ventralen Ektoderm hemmt dort die Bildung von r-Fng, der deshalb nur im dorsalen Ektoderm exprimiert wird. Die Spezifizierung mesodermaler Zellen entlang der dorsal-ventralen Achse geschieht durch das Protein Lmx-1. Es wird im dorsalen Mesoderm gebildet, induziert durch Wnt-7a aus dem dorsalen Ektoderm. En-1 spielt wiederum als Regulator eine Rolle, so dass Wnt-7a nur dorsalseitig exprimiert wird (Johnson und Tabin, 1997).

Die ZPA („zone of polarizing activity“), die am postero-distalen Rand der Extremitätenknospe lokalisiert ist, beeinflusst die anterior-posterior Musterbildung. Die Polarisationsaktivität der ZPA wird von *Sonic hedgehog* (*Shh*), ein Vertebratenhomologon des *Drosophila* Segmentgens *hedgehog*, gesteuert (Riddle et al., 1993). Wechselwirkungen zwischen der ZPA und dem AER bestehen, da das Fehlen des AER zur Reduktion der Shh Expression und diese wiederum zur Aufrechterhaltung des AER durch die Induktion der FGF4-Synthese führt.

Die Shh Wirkung wird von vielerlei Mediatoren umgesetzt bzw. moduliert. Beispiele sind HOX Proteine (homeobox proteins [HoxD11, -12, -13]), BMPs (bone morphogenetic proteins), Transkriptionsfaktoren wie Patched (Ptc) und GLI Proteine (Innis und Mortlock, 1998; Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999).

Die Komplexität der Steuermechanismen zeigt die Anfälligkeit der Extremitätenentwicklung für Fehlbildungen. Die Mutation von - in der SHH Signalkette involvierten - Genen kann Folgen für den Phänotypen nach sich ziehen (siehe Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1 Beispiele für Gene der Extremitätenentwicklung (Polarisationsaktivität und A-P Musterbildung) und zusammenhängende Krankheitsbilder beim Menschen bei Mutationen im jeweiligen Gen

Gene	Funktion	Dysmorphien	Extremitäten Phänotyp
<i>SHH</i> <i>PTC</i>	sezerniertes Signalprotein SHH Rezeptor	HPE3 Gorlin-Goltz-Syndrom	kurze Fingerglieder Polydaktylie
δ -7 Sterol- Reduktase <i>BMP7</i>	xx sezerniertes Signalprotein	Smith-Lemli-Opitz	Polydaktylie, variable Defekte präaxiale Polydaktylie
<i>GLI2</i> <i>GLI3</i>	TF TF	GCPS PHS PAP-A	Polydaktylie, Syndaktylie Polydaktylie, Syndaktylie Polydaktylie, Syndaktylie
<i>CBP</i>	Co-Aktivator	Rubinstein-Taybi-Syndrom	breite Daumen u. Großzehen mit Verdopplung der Phalangen

SHH (*Sonic hedgehog*), *PTC* (*patched*), *BMP7* (*bone morphogenetic protein*), *CBP* (*creb-binding-protein*), xx defekter Cholesterol-Metabolismus beeinträchtigt evt. das post-translationale Prozessing von Shh, TF (Transkriptionsfaktor), HPE3 (Holoprosenzephalie; Menschen, die heterozygot sind, haben ein Holoprosenzephalon ohne Extremitätendefekte), GCPS (Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom), PHS (Pallister-Hall Syndrom), PAP-A (Postaxiale Polydaktylie Type A)
zusammengestellt aus: Innis und Mortlock, 1998; Manouvrier-Hanu *et al.*, 1999; i Altaba, 1999

Ein Beispiel dafür ist die GLI Proteinfamilie, bestehend aus GLI1, GLI2 und GLI3. Sie sind wichtige Modulatoren des Sonic hedgehog Signalwegs. Bisher wurden drei Syndrome Mutationen im Gen für den Transkriptionsfaktor GLI3 zugeordnet: Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS), Pallister-Hall Syndrom (PHS) und Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A). Diese Syndrome weisen überschneidende und spezifische phänotypische Manifestationen auf.

Der Vergleich der Phänotypen ist in Tabelle 2-2 dargestellt.

2.3 Das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GPCS) und andere Entwicklungsstörungen mit Mutationen im *GLI3*-Gen

Das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS, MIM 175700) wurde erstmals 1926 von Greig beschrieben (Greig, 1926). Es handelt sich um eine autosomal dominante Entwicklungsstörung mit unterschiedlich starker Ausprägung (Temtamy und McKusick, 1978). Im Bereich des Gesichtschädels finden sich Hypertelorismus, breite Stirn und eine breite Nasenwurzel. In einigen Fällen zeigte sich Makrozephalie und ein leichter

Hydrozephalus bei normaler geistiger Entwicklung. Die Extremitätenfehlbildungen setzten sich aus postaxialer Polydaktylie der Hände, präaxialer Polydaktylie der Füße, Duplikation der Daumen- und Halluxphalangen und Syndaktylien zusammen. Auch das Knochenalter ist gelegentlich erhöht.

Die Lokalisation der genetischen Ursache für das GCPS auf Chromosom 7p13 (Brueton *et al.*, 1988; Pettigrew *et al.*, 1991) erfolgte, nachdem bei mehreren Patienten Translokationen t(3;7) (p21.1;p13) (Tommerup und Nielsen, 1983; Krüger *et al.*, 1989), t(6;7) (p27;p13) (Pelz *et al.*, 1986) und Mikrodeletionen (7p12.3-7p14.2), (7p11.2-7p13) (Wagner *et al.*, 1990) beschrieben worden waren.

Als Kandidatengene für das GCPS kamen Ende der Achtziger-Anfang der Neunziger mehrere Gene in Frage (*T Zellrezeptor- γ* , *Interferon- β_2* , *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *Hox1.4* und *GLI3*) (Wagner *et al.*, 1990; Drabkin *et al.*, 1989).

Es zeigte sich jedoch, dass nur das *GLI3* Gen, das dem Genlokus 7p13 zugeordnet ist (Ruppert *et al.*, 1990), innerhalb der Region lag, in der die Translokationen/Deletionen von GCPS Fällen kartierten. Die Untersuchung mehrerer GCPS-Fälle ergab, dass Translokationen das *GLI3* Gen unterbrachen (Vortkamp *et al.*, 1991) und der Mechanismus der Haploinsuffizienz für das GCPS (Wagner *et al.*, 1990) entscheidend ist. Haploinsuffizienz bedeutet, dass zwei Kopien des Gens benötigt werden, um einen normalen Phänotypen auszubilden. Dosiseffekte scheinen vor allem dann eine Rolle zu spielen, wenn absolute Proteinkonzentrationen als Steuerungsmechanismen verwandt werden, was gerade in der Embryonalentwicklung oft der Fall ist (Fischer und Scambler, 1994).

1997 konnten erstmals Punktmutationen im *GLI3* Gen nachgewiesen werden, nachdem die gesamte genomische Struktur des Gens mit den endgültigen Exon-Intron-Grenzen identifiziert worden war (Wild *et al.*, 1997).

Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS; MIM 146510) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung und wurde erstmals 1980 als Symptomkomplex aus hypothalamischen Hämartomen, postaxialer Polydaktylie und Anusatresie beschrieben (Hall *et al.*, 1980). Es wurde auf Chromosom 7p13 kartiert und somit wurde *GLI3* zum Kandidatengen (Kang *et al.*, 1997a). Die Sicherung dieser Annahme erfolgte mit der Identifizierung von Mutationen im *GLI3*-Gen bei zwei an PHS erkrankten Familien (Kang *et al.*, 1997b).

Die Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) ist eine Form der Postaxialen Polydaktylie

(MIM 174200), die einem autosomal dominanten Erbgang folgt und durch das Vorhandensein eines Extra-Fingers oder -Zehs charakterisiert wird. Die Abgrenzung zur Postaxialen Polydaktylie Typ B (PAP-B) gelingt durch die vollständige Penetranz (Castilla *et al.*, 1973) und einen meist gut entwickelten, funktionellen Extra-Finger/-Zeh. Allerdings sind auch Individuen mit PAP-A und PAP-B beschrieben (Ventruto *et al.*, 1980). Durch Linkage-Analysen konnte die Region 7p15-q11.23 für die Erkrankung PAP-A eingegrenzt werden und *GLI3* kam nun als Kandidatengen in Frage (Radhakrishna *et al.*, 1997a). Nach der Detektion von Mutationen in *GLI3* erfolgte die Zuordnung, dass PAP-A neben GCPS und PHS durch *GLI3* Defekte verursacht wird (Radhakrishna *et al.*, 1997b).

Alle durch *GLI3* Mutationen verursachten Krankheitsbilder weisen neben spezifischen phänotypischen Merkmalen eine postaxiale Polydaktylie auf (Tabelle 2-2). Gemeinsam ist ebenfalls der dominante Erbgang mit kompletter Penetranz. Die Expressivität innerhalb von GCPS und PHS Familien ist allerdings variabel.

Radhakrishna und Mitarbeiter haben aufgrund der bisher fehlenden Genotyp-Phänotyp Korrelationen und der manchmal unklaren Grenzen der phänotypischen Charakterisierung vorgeschlagen, alle mit *GLI3* Mutationen assoziierten Syndrome kollektiv als *GLI3*-Morphopathien zu bezeichnen.

Tabelle 2-2 zeigt den Vergleich der Phänotypen von GCPS, PHS und PAP-A.

Tabelle 2-2 Vergleich der Phänotypen von GCPS, PHS und PAP-A

	GCPS	PHS	PAP-A
Hypertelorismus	xx		
breite Stirn	xx		
Kraniosynostosis	x		
Hypothalamisches Hamartom		xxx	
präaxiale Polydaktylie	xxx		
postaxiale Polydaktylie	xx	xx	xxx
zentrale Polydaktylie		xxx	
kutane Syndaktylie	xxx		
ossäre Syndaktylie	xx	xx	
viscerale Anomalien		x	

GCPS (Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom), PHS (Pallister-Hall-Syndrom), PAP-A (Postaxiale Polydaktylie Typ A)
modifiziert nach Biesecker 1998

2.4 *GLI3* und Homologe im Tierreich

Das erste bekannte Mitglied einer kleinen Familie von Transkriptionsfaktoren das *GLI* Gen wurde 1987 aus menschlichen Glioblastomzellen isoliert (Kinzler *et al.*, 1987).

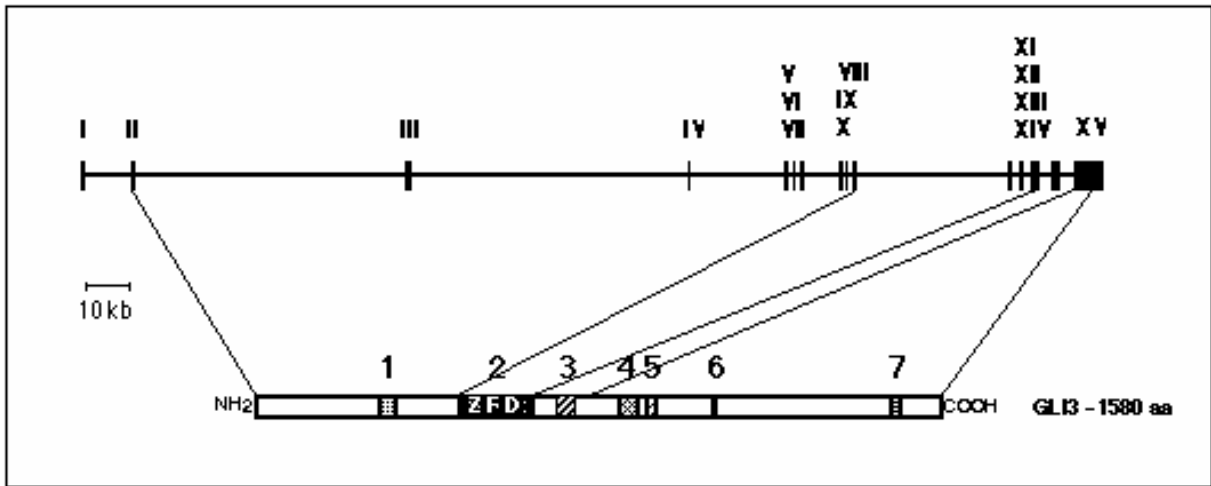
Neben *GLI1* (später *GLII*) gehören auch *GLI2* und *GLI3* dazu (Ruppert *et al.*, 1988). Alle Mitglieder der Familie erkennen eine 9 bp lange DNA-Bindungssequenz

[-TGGGTGGTC-] (Kinzler *et al.*, 1990). Die Proteine enthalten fünf Zinkfinger motive.

Zinkfinger sind eine fingerförmige DNA-bindende Struktur, die durch ein zentrales, in den meisten Fällen von zwei Cystein- und zwei Histidinresten (C₂/H₂-Finger) gebundenes Zn²⁺-Ion gebildet wird. Neben der Zinkfingerdomäne weisen *GLII*, *GLI2* und *GLI3* noch 6 weitere Regionen hoher Sequenzkonservierung auf (Ruppert *et al.*, 1990).

Beträchtliche Konservierung auf Aminosäureebene innerhalb dieser Regionen lässt sich auch bei den homologen Genen anderer Vertebraten insbesondere der Maus (*Gli1*, *Gli2* und *Gli3*) ableiten (Ruppert *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 1997; Thien *et al.*, 1996).

Die Struktur des *GLI3* Gens ist in Abb. 2-1 dargestellt. Die kodierenden Bereiche des *GLI3*-Gens sind auf 15 Exons verteilt. Als Kontrollregion dient eine etwa 2 kb große CpG-Insel, die das Gen im 5' Bereich flankiert und sich bis in das erste Exon erstreckt. Das Startcodon für die Translation ist im Exon II lokalisiert und umfasst die Nukleotide 43 bis 45. Exon I und Teile von Exon II gehören somit zum 5' untranslatierten Bereich. Das *GLI3*-Protein besteht aus 1580 Aminosäuren, und das Molekulargewicht beträgt etwa 190 kD (Ruppert *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995a; Jacobsen, 1996; Wild *et al.*, 1997).

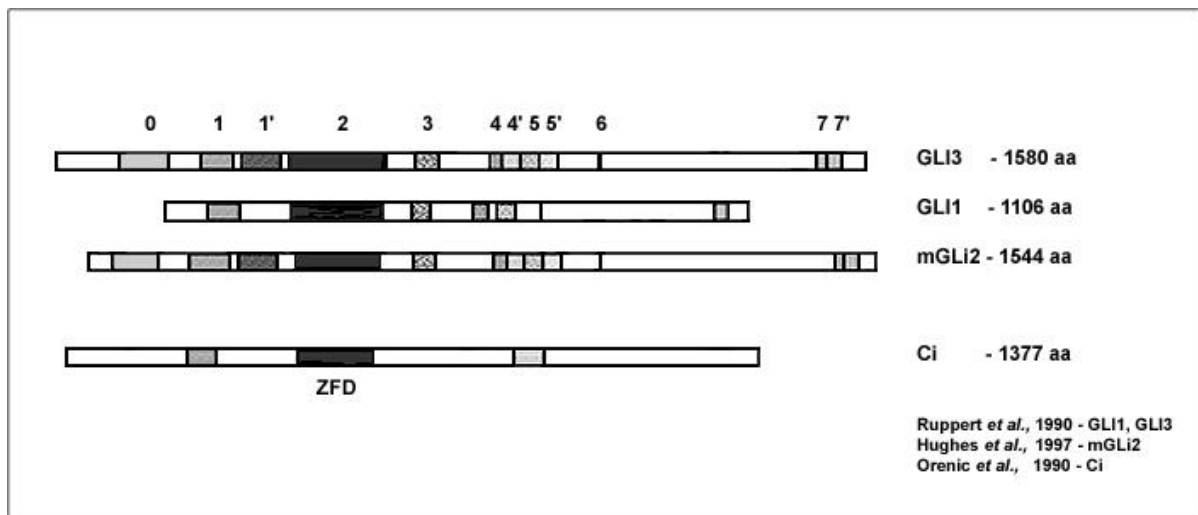
Abb. 2-1 Struktur des *GLI3* Gens

Die 15 Exons des *GLI3*-Gens sind als Striche gekennzeichnet und mit römischen Ziffern benannt (Exon I bis XV). Darunter sind die 7 stark konservierten Regionen (nach Ruppert *et al.*, 1990) als unterschiedlich gemusterte Balken im *GLI3*-Protein dargestellt. Die Zinkfingerdomäne ist mit ZFD bezeichnet.

Im Gegensatz zu den Vertebraten findet sich bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* nur ein *GLI* Homologon, das so genannte *Cubitus interruptus* (*Ci*) (Orenic *et al.*, 1990). Als Transkriptionsfaktor spielt *Ci* eine entscheidende Rolle im Hedgehog-Pathway (Alexandre *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1996). Dieser ist vor allem für die Regulierung der Extremitäten-, Flügel- und Augenentwicklung entlang der Anterior-Posterior-Achse verantwortlich (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

Die Abbildung 2-2 zeigt eine schematische Darstellung des *GLI3*-Proteins im Vergleich zu homologen Proteinen anderer Spezies.

Abb. 2-2 Schematische Darstellung des GLI3-Proteins im Vergleich zu homologen Proteinen anderer Spezies.



Die Abbildung zeigt das humane GLI3-Protein im Vergleich zu einigen ausgewählten Proteinen aus Mensch (GLI1), Maus (mGli2) und *Drosophila* (Ci).

Die stark konservierten 7 Regionen (nach Ruppert et al., 1990) sind verschieden gemustert.

Die Zinkfingerdomäne ist mit ZFD gekennzeichnet.

0 und x' bezeichnen weitere Regionen erhöhter Homologie zwischen GLI3 und GLI2.

Für die Funktionsanalyse von GLI3 sind die Homologen Ci (*Drosophila*) und Gli1, Gli2 und Gli3 (*Mus musculus* - Maus) hilfreich, da die hohe Konservierung der Zinkfingerdomäne ähnliche Aufgaben vermuten lässt (die Struktur des *GLI3* Gens siehe Abb. 2-1). Die Situation in Vertebraten ist im Vergleich zum Modellorganismus *Drosophila* wahrscheinlich komplexer, da das Zusammenwirken von GLI1, GLI2 und GLI3 für die Steuerung im Shh-Signalweg verantwortlich ist und nicht nur ein einzelnes Protein. Ebenfalls erschwerend wirkt, dass in höheren Vertebraten nicht nur der Sonic Hedgehog-Pathway bekannt ist sondern mindestens noch zwei weitere, benannt als Indian bzw. Desert Hedgehog-Pathway (Hammerschmidt, 1997).

Ci wirkt als Transkriptionsfaktor im Hedgehog-Pathway (Ohlen et al., 1997), der für die Anterior-Posterior-Achse in der *Drosophila*-Entwicklung maßgeblich ist und als Ziel die Expression der Segmentpolaritätsgene wie z.B. *decapentaplegic* (*dpp*) und *wingless* (*wg*) hat. Zellen des anterioren Kompartements exprimieren Ci, während diejenigen des posterioren engrailed (*en*) enthalten und das Hh-Protein absondern (Dominguez et al., 1996).

Für die Hh-Signaltransduktion in die Zelle sind zwei Membranproteine Smoothened (Smo) mit sieben Transmembrandomänen (van den Heuvel und Ingham, 1996) und Patched (Ptc) (Chen und Struhl, 1996) verantwortlich.

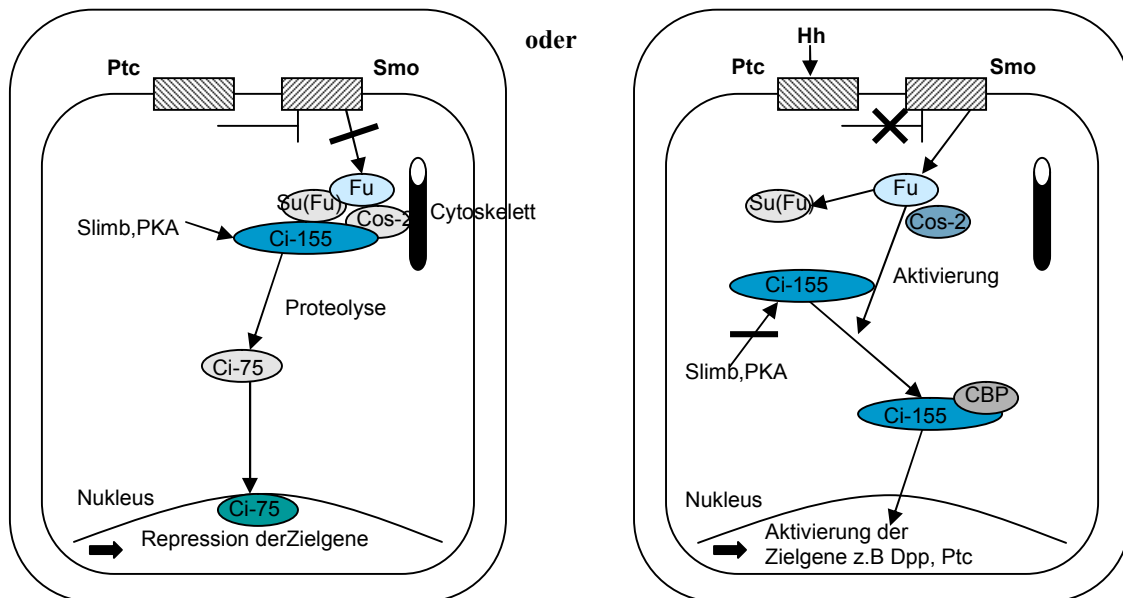
In Abwesenheit von Hh hemmt Ptc die Aktivität von Smo (Alcedo und Noll, 1997).

Zusammen mit der Proteinkinase Fused (Fu) und Suppressor of fused [Su(Fu)] bildet Ci einen zytoplasmatischen Komplex, der über das Protein Costal-2 (Cos-2) an den Mikrotubuli verankert ist. Dies führt zur Abspaltung eines aminoterminalen Fragments von 75 kDa (Ci-75), das im Nukleus als Repressor für Hh-Zielgene fungiert (Aza-Blanc *et al.*, 1997). Die Proteolyse erfolgt allerdings nur dann, wenn vorher eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) stattfindet (Chen *et al.*, 1998; Price und Kalderon, 1999). Unabhängig davon soll die Phosphorylierung auch die Transkriptionsaktivität des vollständigen Ci-Protein (Ci-155), das als Aktivator fungiert, inhibieren (Wang *et al.*, 1999). Als weiteres Protein, das die Proteolyse steuert und somit wie PKA negativ regulierend im Hh-Pathway wirkt, wurde Slimb (supernumerary limbs) beschrieben. Es weist nahe Verwandtschaft zu Cdc4p auf, einem Protein in knospender Hefe, das Zellzyklus-Regulatoren für die Degenerierung in der Ubiquitin/Proteasom-Kaskade markiert (Jiang und Struhl, 1998).

Wenn Hh an Ptc bindet, verhindert dies die Inhibierung von Smo durch Ptc (Chen und Stuhl, 1998; Murone *et al.*, 1999). Fu wird durch das Hh-Signal - ausgehend von Smo - aktiviert, so- dass die Dissoziation von Su(Fu) und Ci stattfindet. Zusätzlich löst sich Cos-2 von den Mikrotubuli. Es erfolgt dadurch keine Spaltung von Ci, und das Überwiegen von Ci-155 bewirkt nun die Aktivierung der Transkription der Hh-Zielgene (Alexandre *et al.*, 1996; Kalderon, 1997). Außerdem ist der Transkriptions-Coaktivator CBP (CREB binding protein) notwendig, der an einer Region des vollständigen Ci's bindet, die eine wichtige Aktivierungsdomäne enthält (Akimura *et al.*, 1997). Es ist allerdings noch nicht bekannt, wie Ci-155 als Aktivator wirkt, da es hauptsächlich im Cytosol und nicht im Nukleus nachweisbar ist. Man nimmt an, dass Fu die Umwandlung von Ci-155 in eine kurzlebige Form, die dann Transaktivierungskapazität besitzt, stimuliert (Ohlmeyer und Kalderon, 1998; Price und Kalderon, 1999).

In Abbildung 2-3 ist ein Modell des Hedgehog-Pathway in *Drosophila* dargestellt.

Abb. 2-3 Modell des Hedgehog-Pathway in *Drosophila*



In Abwesenheit von Hh (Hedgehog) hemmt Ptc (Patched) die Aktivität von Smo (Smoothened). Ci bildet mit der Kinase Fu (Fused) und Su(Fu) (Suppressor of fused) einen Komplex, der durch Cos-2 (ein Kinesin) an die Mikrotubuli bindet. Nach der Phosphorylierung durch PKA (Proteinkinase A) und mit der Hilfe von Slimb findet die Proteolyse von Ci zu einem 75kDA großen Fragment (Ci-75) statt, das im Nucleus als Repressor der Hh-Zielgene wirkt. Wird Hh sezerniert, bindet es an Ptc, Smo wird nicht inhibiert und sendet ein Signal an Fu. Dies bewirkt die Dissoziation von Ci und Su(Fu) und das Lösen von Cos-2 von den Mikrotubuli. Das vollständige Ci (Ci-155) wird wahrscheinlich durch Fu zusätzlich aktiviert. CBP (Transkriptions-Coaktivator) bindet an Ci-155 und dieses regt die Transkription der Hh-Zielgene (*Dpp* - decapentaplegic, *Wg* - wingless) an.

In Untersuchungen über die Expression der Gli-Proteine in Vertebraten konnten diese in vielen ektodermalen und mesodermalen Geweben nachgewiesen werden. Erstmals treten sie während der Gastrulation auf. Später ist die Expression der einzelnen *Gli*-Gene selektiver auf einzelne Regionen beschränkt. Allerdings gibt es auch sich überschneidende Bereiche. Inzwischen sind Teile der vielfältigen Aufgaben während der Embryogenese bekannt. Die *Gli*-Gene spielen in der ZNS-, Augen-, Nasen-, Magen-Darm-Trakt und der Lungenentwicklung eine Rolle. Besonders wichtig sind sie auch in der Skeletogenese, der Extremitätenentwicklung, vor allem während der Bildung der Extremitätenknospe, und für die Zahnentwicklung. Es zeigt sich, dass *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* essentiell für die korrekte Musterbildung sind (Schimmang *et al.*, 1992; Walterhouse *et al.*, 1993; Hui *et al.*, 1994; Marigo *et al.*, 1996; Mo *et al.*, 1997; Persengiev *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1998; Whitsett, 1998; Hardcastle *et al.*, 1998; Litingtung *et al.*, 1998).

Viele der Proteine im Hh-Pathway bei *Drosophila* sind auch als Orthologe in der Vertebraten Shh-Signalkaskade identifiziert worden. GLI3 wirkt sowohl als Repressor als auch als Aktivator im SHH-Signalweg. Untersuchungen an Maus Embryonen zeigte, dass Gli3 Shh negativ reguliert (Büscher *et al.*, 1997) und neuere Daten postulieren, dass hierfür, ähnlich wie bei Ci, ein N-terminales Fragment von GLI3 verantwortlich sei. Die CBP-Bindungsdomäne und die Transaktivierungsdomänen bieten einen Hinweis auf die Funktion von GLI3 als Aktivator (Dai *et al.*, 1999, Kalf-Suske *et al.*, 1999). Shh und PKA (Proteinkinase A) wirken regulierend. Experimentell zeigt sich, dass Shh positiv und Pka negativ auf die Transaktivierungsaktivität wirken und eine Region, die die CBP-Bindungsdomäne und die Phosphorylierungsstellen der cAMP-abhängigen Proteinkinase A enthält, für den Antagonismus eine Rolle spielt (Dai *et al.*, 1999).

GLI1 besitzt nur eine Aktivierungsdomäne und keine Schnittstelle für ein Repressorfragment. GLI3 aktiviert den *Gli1* Promotor. Daraus könnte sich folgende Kaskade ergeben: Shh bindet an Ptc. Smo, das nun nicht gehemmt wird, aktiviert hFu. Der cytoplasmatische Komplex bestehend aus GLI3, hSu(fu), hFu und Cos-2 löst sich von den Mikrotubuli und auch GLI3 und hSu(fu) dissoziieren. Der Transkriptions-Coaktivator CBP interagiert mit GLI3 und das vollständige Protein induziert die *GLI1*-Transkription durch Aktivierung des *Gli1* Promotors. Die Akkumulation von GLI1 führt wiederum zur Transkription von Shh-Zielgenen und wahrscheinlich des *Gli1* Gens selbst (Dai *et al.*, 1999).

In Abwesenheit von SHH würde, ähnlich wie bei Ci, die Abspaltung eines N-terminalen Fragments von GLI3 stattfinden und somit die Repression von SHH-Zielgenen (Wang *et al.*, 1999).

2.5 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

1991 wurde anhand von Translokationsbruchpunkten in der Region 7p13 bei Patienten mit Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom das *GLI3*-Gen als Kandidatengen identifiziert (Vortkamp *et al.*, 1991c). Die Etablierung der Exon-Intron-Grenzen von *GLI3* bildete die Basis, molekulargenetische Methoden für die Mutationssuche im *GLI3*-Gen anzuwenden.

1997 gelang der Nachweis, dass Punktmutationen im *GLI3*-Gen neben den vorher bekannten chromosomalen Aberrationen, wie Translokationen und Deletionen, Ursache für das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom sein können (Wild *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollte die nicht-radioaktive Einzelstrang-Konformations-Analyse als molekulargenetische Methode für die Untersuchung von Patienten-DNA angewendet werden. Als Probanden wurden Patienten mit GCPS, mit Verdacht auf GCPS oder mit phänotypisch verwandten Syndromen herangezogen.

Die Erhöhung der Fallzahlen soll ein besseres Verständnis über das Spektrum der *GLI3* Mutationen ergeben, das möglicherweise eine Genotyp-Phänotyp Korrelation zwischen der Position der Mutationen und GCPS-Symptomen ermöglicht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

40% Acrylamid PAGE	Pharmacia Biotech, Freiburg
2% Methylenbisacrylamid	Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose	GIBCO BRL, USA
Alconox	Aldrich, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (Typ 400)	Sigma Chemical Company, UK
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel-de Haen
Long Ranger Gel Solution 50%	FMC, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
10x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Wasser	
für Sequenzierung: HPLC	Mallinckrodt Baker, B.V.-Deventer-Holland
für PCR, SSCA: Ampuwa	Fresenius, Oberursel
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien für Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, in p.A.-Qualität bezogen. Nicht näher bezeichnete Chemikalien wurden von den folgenden Firmen geliefert: Amersham (Braunschweig), Gibco BRL (USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) und Roth (Karlsruhe).

3.1.2 Enzyme und Nukleotide

diverse DNA-Größenstandards	MBI Fermentas, Litauen
Proteinase K	Boehringer, Mannheim

3.1.3 Verwendete Fertigsysteme

ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, New Jersey/USA
AmpliTa [®] q DNA Labelling System `Ready-To-Go´ PCR Beads QIAquick Gel Extraktions Kit QIAquick PCR Purification Kit	Perkin Elmer, New Jersey/USA Amersham Pharmacia Biotech QIAGEN, Hilden QIAGEN, Hilden

3.1.4 Puffer und Lösungen

Agarosegelladepuffer	0,05% Xylencyanol (w/v) 15% Ficoll (w/v)
APS (w/v)	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O
RCL(red cell lysis)-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
SSCA-Ladepuffer I	95% Formamid deionisiert (v/v) 20 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylencyanol (w/v) 10% Glycerin
SSCA-Ladepuffer II	20 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylencyanol (w/v) 99% Glycerin Milli Q H ₂ O
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA pH 8,0
5x TBE-Puffer	5 M Tris-HCl 0,45 M Borsäure 100 mM EDTA pH 8,3
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

3.1.5 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
Brutschrank Typ T 5050	Heraeus, München
DNA Sequenzierer, Modell 373A	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA/RNA Photometer Gene Quant II	Pharmacia, Uppsala/Schweden
Dokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3	Herolab, St. Leon Rot
Electrophoresenetzgeräte: EPS 500/400	Pharmacia, Uppsala/Schweden
ST 504 D	Gibco BRL, USA
Gelelektrophoresesysteme:	
horizontal (verschiedene Modelle)	MWG - Biotech, Eberberg
vertikal (Hofer SE 600)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnetrührer Ikamag RO	Ikawerk, Staufen
pH-Meter CG 840	Schott, Hofheim a. Ts.
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen:	
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont, Dreieich
Thermocycler:	
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, New Jersey/USA
TRIO Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Thermostat Metallblock Techne DB 3	Techne, Frankreich
UV-Transilluminator UVT2035 (302nm)	Herolab, St. Leon Rot
Vortex Reax 2000	Heidolph, Hamburg
Waagen:	
Feinwaage AE 240	Mettler, Giessen/Schweiz
PM 2000	Mettler, Giessen/Schweiz
Wasserbäder:	
Typ 3042	Köttermann, Hänigsen
Typ 1083	GFL, Münster
Typ F 10 - CM	Julabo, Seelbach
2219 Multitemp II	LKB, Bromma/Schweden

3.2 Standardmethoden

3.2.1 DNA-Präparation aus Patientenblut

(modifiziert nach Ausubel *et al.*, 1994)

EDTA-Blut wurde bei -20°C eingefroren und anschließend nach Zugabe von 30-35 ml RCL(red cell lysis)-Puffer bei 4°C aufgetaut. Nach 15 min auf Eis wurden die Lymphozyten 10 min bei 4°C und 3000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Nach Verwerfung des Überstands folgte die Resuspendierung des Pellets mit 30 ml 4°C kaltem RCL-Puffer. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 5 ml SE-Puffer resuspendiert und 25 µl 10 mg/ml Proteinase K und 250 µl 10% SDS-Puffer zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Nach Zugabe von 5 ml SE-Puffer und 5 min Erwärmen bei 55°C wurden 2,5 ml 5 M NaCl dazugemischt und 15 min bei RT und 3000 rpm zentrifugiert. Dem Überstand wurde 96% - 20°C kalter Ethanol bis zum Gesamtvolumen von 45 ml zugefügt.

Nach leichtem Schwenken konnte nun der DNA-Faden herausgezogen und mit 70% Ethanol gespült werden. Die DNA wurde in 100-300 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

Die Konzentrations-Bestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die DNA-Lösungen wurden hierzu um den Faktor 50-200 verdünnt. Die Absorption bei 260 nm, bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm, ist gleich 1 bei einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Proteinkontaminationen lassen sich über den Quotienten $A_{260}:A_{280}$ (die Proteinextinktion liegt bei 280 nm) ermitteln. Dieser sollte bei 1,8 oder höher liegen.

3.2.2 Standard-PCR

(Ausubel *et al.*, 1994)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet bei der *in vitro*-Anreicherung von DNA - Segmenten Anwendung. Eine exponentielle Anhäufung des Amplifikats auf bis zu 10^7 -fach ist unter optimalen Bedingungen möglich. Bereitgestellt werden müssen kurze doppelsträngige Startersequenzen (Primer), Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs), eine definierte Zusammensetzung an Salzionen im Reaktionspuffer und eine hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase. Das Temperaturoptimum der *Taq* DNA-Polymerase liegt über 70°C.

Sie ist auch kurze Zeit bis zu 95°C stabil und toleriert dadurch die wiederholte Hitzedenaturierung zu einzelsträngigen DNA-Matrizen, ohne dass das Enzym inaktiviert wird. Die Polymerisierung des neuen DNA-Doppelstrangs erfolgt nach Anlagerung synthetischer Oligonukleotide an die denaturierte, einzelsträngige DNA, die der DNA-Polymerase als Startersequenzen dienen. Die kurzen Oligonukleotide, im Folgenden als Primer bezeichnet, stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz und sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge. Je nach Basenzusammensetzung und Länge ist die Anlagerungs(Annealing)-Temperatur festgelegt. Das Amplifikat ist um so spezifischer je höher die Schmelztemperatur des Primers und somit auch dessen Annealing-Temperatur liegt.

Der Ablauf der PCR-Reaktion ist im folgenden Schema dargestellt.

Initialdenaturierung	5 min bei 94°C
30 bis 35 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung	
Denaturierung	30 sec bei 94°C
Primeranlagerung	30 sec bei 55-65°C
Elongation	30 sec bei 72°C
Abschließende Synthese	3 min bei 72°C

Die Reaktionssätze wurden auf Eis pipettiert und stets eine Negativkontrolle ohne DNA ("Leerwert") mitgeführt. Es wurden für die PCR Thermocycler mit beheizbaren Deckeln verwendet, so dass kein Mineralöl zu Überschichtung benötigt wurde und die Ansätze auf 4°C nach Abschluß der Reaktion gekühlt werden konnten. Die PCR-Produkte wurden entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt analysiert.

Die spezifischen Primer und Hybridisierungstemperaturen sind unter Punkt **3.3** beschrieben.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Kontrolle wurden die PCR-Fragmente auf Horizontalgelen, die 0,025 µg/ml Ethidiumbromid enthielten, aufgetragen. Die verwendete Agarosekonzentration der Gele zur Auftrennung der 200-400 bp Fragmente betrug 2%.

Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit dem Agarosegelladepuffer gemischt und bei einer Spannung von 50-150 V aufgetrennt. Zur Analyse nach der Elektrophorese wurde ein UV - Transilluminator (302 nm) verwendet. Die photographische Auswertung erfolgte mittels des Herolab E.A.S.Y. Systems.

3.2.4 Einzelstrang- Konformations-Analyse (SSCA)

(modifiziert nach Orita *et al.*, 1989)

Die Einzelstrang-Konformations-Analyse (single strand conformation analysis = SSCA) dient der Detektion unbekannter Mutationen wie z.B. der Austausch einzelner Basen. Denaturierte, genspezifische PCR Produkte zeigen schon bei Punktmutationen unterschiedliche Laufverhalten in einem elektrischen Feld. Die Renaturierung in einem nichtdenaturierten Polyacrylamid-Gel führt zu dreidimensionalen Konformationszuständen der Einzelstränge, die sich dann in unterschiedlichen Laufhöhen verdeutlichen. Die Sensitivität der SSCA ist von folgenden Parametern abhängig: der PCR-Fragmentlänge (optimal unter 300 bp); dem GC-Gehalt der Sequenz; der Art und Lage der Mutation und der Verwendung unterschiedlicher Gel- und Laufkonditionen bei der Elektrophorese.

3.2.4.1 Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gele für die Mutationssuche

Für die Mutationssuche mittels der SSCA wurden nichtdenaturierende Vertikal-Polyacrylamid-Gele (Acrylamid = AA) in der Größe 14 cm x 16 cm x 0,075 cm hergestellt.

Die Zusammensetzung der AA-Gele und die Laufbedingungen sind unter 3.4.1 (Tabelle 3-3) beschrieben.

Die Glasplatten wurden mit aqua dest. und Isopropanol geputzt. Nach dem Gießen wurden Käbme in das Gel eingesetzt, die zuvor mit APS abgewischt wurden und zur Herstellung von 2,5 mm x 0,75 mm großen Taschen dienten. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 3 h wurde die Lauffront des Geles mit Laufpuffer gespült und 5 µl der denaturierten Proben aufgetragen. Die Proben setzten sich aus 3,5 µl des PCR-Produkts, 8 µl SSCA-Ladepuffer und 3,5 µl aqua dest. zusammen, falls die Agarose-Gelelektrophorese ein gutes Anreichern des Amplifikats während der PCR erwiesen hatte.

Bei schwacher Anreicherung wurden 7 µl des PCR-Produkts eingesetzt und kein aqua dest.. Die Laufdauer betrug je nach PCR-Fragment zwischen 15 bis 18 h.

3.2.4.2 Silberfärbung der nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gele

(Budowle *et al.*, 1991)

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach folgendem Schema behandelt:

5 min Waschschrift in	10% EtOH
	0,5% Essigsäure
10 min Oxidation in	1% Salpetersäure
Spülen mit aqua dest.	
20 min Färben mit	12 mM AgNO ₃
Spülen mit aqua dest.	
Entwicklung mit	280 mM Na ₂ CO ₃
	0,019% Formaldehyd
5 min Inkubation in	10% Essigsäure
	~ 10 ml Glycerin

Anschließend wurden die Gele in Folien verpackt, in Rahmen aufgespannt und über Nacht getrocknet.

3.2.5 Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen

Beim Auffinden von aberranten Banden wurden diese sowie die Wildtyp-Bande ausgestochen und jeweils mit 100 µl HPLC-H₂O überschichtet. Die Inkubation erfolgte einige Stunden bei 4°C zum Ablösen der Folie und anschließend über Nacht bei 37°C. Zur Reamplifikation wurden 3-5 µl dieses Eluats für die PCR-Reaktion verwendet.

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit nach Angaben des Herstellers.

3.2.6 Sequenzierung

Die von Sanger *et al.* (1977) als statistisches Kettenabbruch-Verfahren bekannte DNA-Sequenzierung erfolgt, indem 2'-Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) und 2'-3'-Dideoxynucleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs), denen eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt, als Substrat für die DNA-Polymerase eingesetzt werden. Die DNA-Polymerase baut bei der Synthese am freien 3'-Hydroxylende dNTPs ein. Wenn ddNTPs eingebaut werden, kommt es zu einem Kettenabbruch. Statistisch kann dies an jedem Nukleotid geschehen, so dass ein Gemisch von DNA-Strängen mit identischen 5'-Ende, aber variablen 3'-Enden entsteht (Sambrook *et al.*, 1989).

Für diese Arbeit wurde das ABI Prism Sequencing System verwendet.

3.2.6.1 PCR für die automatische Sequenzierung

Für die PCR wurde der Dye-Terminatoren-Mix von ABI Prism verwendet. Dieser enthält Ampli-Taq[®]-DNA-Polymerase, markierte ddNTPs, nichtmarkierte dNTPs und den benötigten Reaktionspuffer. Die ddNTPs sind mit verschiedenen Succinylfluoresceinen markiert: die Fluorescein-Farbstoffe JOE (grün) für ddATP und FAM (blau) für ddGTP; die Rhodamin-Farbstoffe TAMRA (gelb) für ddTTP und ROX (rot) für ddCTP (Smith *et al.*, 1985; 1886). Die *Taq* DNA-Polymerase hat den Vorteil, dass sie durch ihre Hitzestabilität ermöglicht, die Reaktion bei höheren Temperaturen durchzuführen und dadurch die Renaturierung des DNA-Doppelstrangs verhindert wird. Zusätzlich können auch geringere Mengen an Matrizen-DNA analysiert werden, da über mehrere Zyklen

denaturiert wird. Durch Absorptionsspektren, die weit genug auseinander liegen, entstehen bei Anregung durch Bestrahlung mit einem 488 nm-Argon-Laser vier photometrisch eindeutig erfassbare Einzelsignale. Ein Filtrerrad wird verwendet, da es dennoch zu Überlagerungen kommen kann, so dass die Farbstoffemissionen deutlicher voneinander abgegrenzt werden.

Das Filtrerrad A hat Bandbreiten von 540 nm, 560 nm, 580 nm und 600 nm. Eine mathematische Matrix, die berechnet wird, sorgt dafür, dass nur der Farbstoff mit maximaler Transmission angezeigt wird, falls trotz des Filtrerrads Überlagerungen entstehen.

3.2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gele für die automatische Sequenzierung

Für die Sequenzierung mit dem ABI 373A Sequenzierer wurden vertikale, 0,3 mm dicke, 6% ige Gele mit einer Auftrennlänge von 48 cm hergestellt. Die Zusammensetzung der Sequenziergele ist der Tabelle 3-1 zu entnehmen. Die Glasplatten wurden vor Gebrauch mit Alconox und deionisierten H₂O gesäubert und anschließend mit Isopropanol geputzt. Die Polymerisationszeit der Gele betrug mindestens 1,5 h. Anschließend wurden die Glasplatten in die Gelkammer von ABI eingespannt. Nach Spülen der Lauffront mit Laufpuffer wurde ein 0,3 mm Sägezahnkamm mit 36 Zähnen eingesetzt. Zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs erfolgte die Zugabe von Harnstoff zu den Proben. Nach einem Vorlauf von 1 h bei 38 W, 40 mA und 2500 V wurden von diesen 4 µl aufgetragen und in einem mindestens 10-stündigen Lauf analysiert. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-1 Zusammensetzung der denaturierenden Sequenziergele für den automatischen Sequenzierer

50% `LongRanger` (29:1) Gellösung (ml)	7,2
10x TBE-Puffer (ml)	6,0
ad H ₂ O (HPLC) (ml)	60
APS 10% (µl)	350
TEMED (µl)	15

50% `LongRanger` (29:1) Gellösung - 6% AA; 8,3 M Harnstofflösung

Tabelle 3-2 Laufbedingungen für die Sequenzierung

Laufpuffer	1x TBE
Leistung (W)	38
Spannung (V)	2500
Stromstärke (mA)	40
Laufzeit (h)	18
Temperatur (°C)	30

3.2.6.3 Auswertung der Sequenzanalysen

Zur Auswertung wurde die an den ABI 373A DNA Sequencer angegliederte Software, der Version 1.2.1 der Data Collection und die Sequencing Analysis Software (Version 2.1.1) verwendet. Die Bearbeitung der Sequenzen erfolgte in den MacIntosh-Anwendungen EditView (Version 1.0.1), PhotoshopAdobe (Version 3.0) und abschließend in Claris Impact (Version 2.0).

3.3. Amplifikation genomischer *GLI3*-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 PCR-Bedingungen

Für die Amplifikation der genomischen *GLI3*-Fragmente mittels PCR wurden 100 ng genomischer DNA der Patienten bzw. der Kontrollpersonen verwandt, denen dann Ready-To-Go™ PCR Beads beigefügt wurde. Diese enthalten ~1.5 U der *Taq* DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 bei Raumtemperatur), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM jedes dNTP und Stabilisator, BSA eingeschlossen. Zusätzlich wurden die Primer und, je nach DNA-Fragment, zur Optimierung Formamid zugefügt.

Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

‘Ready-To-Go’ PCR Beads
1 µl DNA (50 ng)
1 µl Primer forward und reverse (je 50 ng)
0 oder 1 µl Formamid
ad 25 µl aqua dest.

Tabelle 3-3 PCR-Bedingungen für Exon-Fragmente

Exon -Fragment	Annealing Temp.	Formamid	Cyclen
Ex II-1	60°C	/	32
Ex II-2	66°C	/	32
Ex III-1	61°C	/	32
Ex III-2	56°C	/	32
Ex IV	58 °C	/	32
Ex V-1	61°C	/	32
Ex V-2	61°C	/	32
Ex VI	62°C	/	32
Ex VII-1	62°C	/	32
Ex VII-2	56°C	/	32
Ex VIII-1	62°C	/	32
Ex VIII-2	66°C	/	32
Ex IX	61°C	/	32
Ex X	56°C	/	32
Ex XI	51°C	Formamid	34
Ex XII	59°C	/	32
Ex XIII-1	64°C	/	32
Ex XIII-2	65°C	/	32
Ex XIV-1	60°C	/	32
Ex XIV-2	60°C	/	32
Ex XIV-3	60°C	/	32
Ex XV-1	60°C	Formamid	32
Ex XV-2	57°C	Formamid	34
Ex XV-3	62°C	Formamid	32
Ex XV-4	65°C	Formamid	32
Ex XV-5	62°C	Formamid	34
Ex XV-6	65°C	Formamid	34
Ex XV-7	60°C	Formamid	32
Ex XV-8	63°C	Formamid	34
Ex XV-9	64°C	Formamid	33
Ex XV-10	64°C	/	34
Ex XV-11	63°C	Formamid	34
Ex XV-12	58°C	Formamid	34
Ex XV-13	63°C	Formamid	34
Ex XV-14	68°C	/	32
Ex XV-15	61°C	/	32
Ex XV-16	61°C	/	32
Ex XV-17	53°C	Formamid	34

3.3.2 Primer für die Amplifikation genomischer *GLI3*-Fragmente

In Tabelle 3-4 sind die verwendeten Primer aufgelistet, die die komplette translatierte *GLI3*-Region amplifizieren. Alle Primer wurden von der Firma Roth im 0,1 µM-Maßstab bezogen und in der, nach Angaben des Herstellers, entsprechenden Mengen von HPLC-H₂O für 15 min bei 68°C gelöst, um sie auch in den darauf folgenden Sequenzanalysen verwenden zu können.

Tabelle 3-4 Primer für die Amplifikation der *GLI3*-Exons

Exon	Größe der Exons in bp	Primer ^a	5'-3'- Sequenz der Primer ^b	Länge der Amplicons in bp	Position in cDNA bzw. Intronsequenz
II	166	ExIIfor1	AGA TGA CAG GTG AAG TGG AC	211	5' Intron
		ExIIrev1	CTC GCT CAC ATC TGT TCG AGT G		bis nt 93
		ExIIfor2	GAA GAC ATC ATG GAG GCC CAG	217	ab nt-10
		ExIIrev2	CGC TCA ATT CAC AAG GAA TGC		3' Intron
III	243	ExIIIfor1	CGA GAA TGA GAC CTA ATT GAT	293	5' Intron
		ExIIIrev1	CAT GGC AAA CAC CGT CCC		bis nt 333
		ExIIIfor2	CTT CAA CAT CGA GTG ACG AG	185	ab nt 224
		ExIIIrev2	CCA TAC CTC CTG AAC AAG TG		3' Intron
IV	106	ExIVfor	GTT GCT TTG TGA ATC GGA ATG	226	5' Intron
		ExIVrev	AGC CAG CAT CTC GTT CCA TTT C		3' Intron
V	206	ExVfor1	GAG ACA GCC ATA GCC TGT G	215	5' Intron
		ExVrev1	GAG CGG ATA TAG TCC ATG TAG		bis nt 617
		ExVfor2	CTA CGT ATC CGG ACC TGC	228	ab nt 497
		ExVrev2	AGG AGG CTG CAT GAT CTC		3' Intron
VI	147	ExVIfor	GAC TCT GAG ATG CCT CAA GA	264	5' Intron
		ExVIrev *	GCC ATT TCC CAA GAC TC		3' Intron
VII	202	ExVIIfor1	TGG TAT AGA GTC CAA CTG CA	215	5' Intron
		ExVIIrev1 *	GCT GAA GAG CTG CTA CGG		bis nt 989
		ExVIIfor2	GTC CAT ATC ACC ACT CTC CG	205	ab nt 901
		ExVIIrev2	GCA AAC AAG TGC TGA CAT TA		3' Intron
VIII	214	ExVIIIfor1	GTG TAC TTG TCT GAG CTC AGC	248	5' Intron
		ExVIIIrev1	CTG GAA TAG GCC TCT GTG TTG G		bis nt 1183
		ExVIIIfor2	CTC TCT CCA CAT GCA TCA GCA	216	ab nt 1065
IX	114	ExVIIIrev2	CAA CTG ACG TGG TGG CCT GC	265	3' Intron
		ExIXfor	TGC CCG AGT TGG CAA GG		5' Intron
		ExIXrev	GAC CCA AAG ACA CCA GTC TTG		3' Intron
X	141	ExXfor	CCT CCT GTT GTG TCT GAT TC	247	5' Intron
		ExXrev	GTC ACA GAG CTG TAA AGC TCG G		3' Intron
XI	150	ExXIfor *	TGA TGA ATA CGT TTC CAT TTG	231	5' Intron
		ExXIrev *	AAG GAC CCA AGT GTG CCT G		3' Intron

Tabelle 3-4 Primer für die Amplifikation der *GLI3*-Exons

Exon	Größe der Exons in bp	Primer ^a	5'-3'- Sequenz der Primer ^b	Länge der Amplicons in bp	Position in cDNA bzw. Intronsequenz	
XII	164	ExXIIfor	CGT GTT AGG CAT AAG CTG CTG	265	5' Intron	
		ExXIIrev *	CCT TAT GCA AGC TCC ATG CC		3' Intron	
XIII	291	ExXIIIfor1	CTT TTG GGA TGG GGC ATA GTC	246	5' Intron	
		ExXIIIrev1*	GAC CTG GAC TGT GAA TGG CTG		bis nt 1991	
		ExXIIIfor2	GCC CAG AGG CTC ATG TCA CC		ab nt 1898	
		ExXIIIrev2	GGC CTG CTG TGA AGT CAG AAG		3' Intron	
XIV	328	ExXIVfor1	CAT GAG CTC TCA TTA TTG GCT	239	5' Intron	
		ExXIVrev1	GTG GAA ATG GTT GAG TCC ATG		bis nt 2267	
		ExXIVfor2	CAT CAG CAA CTA TTC CAA CAG		223	ab nt 2157
		ExXIVrev2	CTA TGA GAG GAG AGA CCG CAG			bis nt 2425
		ExXIVfor3	CGG CAG GGA CCA AAT GGA TG		223	ab nt 2306
		ExXIVrev3	GGA CTG GTG GAG AAA CTA GC			3' Intron
XV	2570	ExXVfor1	GTG TAA GTC ATG CTC GAA GGG	198	5' Intron	
		ExXVrev1	GAG CTG ATG GTG CTG GCG C		bis 2567	
		ExXVfor2	CAA CAC CTG CAG CTT GGG TG		224	ab nt 2445
		ExXVrev2	CTC ACG TTC TGC GGC CGG C			bis nt 2669
		ExXVfor3	GCA GCC GCC GCT CCT CAG G		214	ab nt 2579
		ExXVrev3	GCC TTG AGG CGG TAC TGC TG			bis nt 2792
		ExXVfor4	CAT CTC CAC CGA CGC CTC		213	ab nt 2691
		ExXVrev4	CAC GCC AGG CTC GAG GGC			bis nt 2904
		ExXVfor5	CAA GTA CGC GGC TGC CAC		228	ab nt 2793
		ExXVrev5	GTC GCT GGC CCT CCT CAC G			bis nt 3021
XV		ExXVfor6	CCG AGG AGG TGC AGC GAC G	228	ab nt 2926	
		ExXVrev6	GCC GCG TGT AAT TCT GAA GCA C		bis nt 3154	
		ExXVfor7	CTC GTG TGC CGC GCT TCA G		238	ab nt 3056
		ExXVrev7	CTG CAC CAC GTC GTC CGG C		bis nt 3294	
XV		ExXVfor8	CAG CAT CAC CGA GAA CGT CAC	262	ab nt 3201	
		ExXVrev8	TGC TGC CCT CGG GGC AGG		bis nt 3463	
		ExXVfor9	CCA CGG GCC CGG TGA CTT TG		262	ab nt 336)
		ExXVrev9	CAG CAG GCC CGC TCC TCA AG			bis nt 3631
		ExXVfor10	CAA GTG TGG GCC GCG GCC	254	ab nt 3531	

Tabelle 3-4 Primer für die Amplifikation der *GLI3*-Exons

Exon	Größe der Exons in bp	Primer ^a	5'-3'- Sequenz der Primer ^b	Länge der Amplicons in bp	Position in cDNA bzw. Intronsequenz
XV		ExXVrev10	GGC TGC CTG TTG AGA CAG TTC		bis nt 3785
		ExXVfor11	CTT GAT GCT CCA CAA CAG CC	243	ab nt 3684
		ExXVrev11	CAC CAT GCT GCC AGC TGA CTC		bis nt 3927
		ExXVfor12	GCC TCA AAG CTG AAG AGC AC	244	ab nt 3832
		ExXVrev12*	CTT GGT AGA TGT TGA TGT GTG		bis nt 4075
		ExXVfor13	CGA CAG CAT GCA GCA CCC	271	ab nt 3997
		ExXVrev13	CAT TCA CCC TGC AGG TCT G		bis nt 4258
		ExXVfor14	CAG CCA TGT GCC AGC TTT G	260	ab nt 4150
		ExXVrev14	CTG TAG CAG GCA GCT GGC G		bis nt 4410
		ExXVfor15*	CTA TGA CCA AAC CGT GGG C	261	ab nt 4329
		ExXVrev15	GTT CTG AAT GAT ACT TGG GC		bis nt 4590
		ExXVfor16	GGT ACA GAT TGA CTT CGA TGC	276	ab nt 4503
		ExXVrev16*	GAT TTC CGT TGG TTG CAG TC		bis nt 4779
		ExXVfor17	GAG TTC TTT GCT GAC CTC	247	ab nt 4687
		ExXVrev17	CTC CCT AGA ATA CTT TAG G		3' untranslatierte Region

Die Tabelle enthält die Sequenzen der Primer für die Amplifikation der translatierten Exons des *GLI3*-Gens. Sie wurden Wild *et al.*, 1997 entnommen.

* kennzeichnet modifizierte Primersequenzen nach Kalff-Suske *et al.*, 1999.

^a Die Vorwärts-Primer tragen den Zusatz 'for', die Rückwärts-Primer den Zusatz 'rev', im Namen. Ihre Sequenz ist immer in 5'→3'-Richtung dargestellt.

^b Diese Spalte bezeichnet die Sequenz, aus der die Primer abgeleitet wurden. Die jeweilige Position des ersten und/oder letzten Nukleotids der Amplicons in der cDNA-Sequenz sind aufgelistet. Primer, die aus den 5' bzw. 3' gelegenen Intronsequenzen stammen, sind gesondert als solche ausgewiesen.

3.4 Molekulargenetische Mutationssuche im *GLI3*-Fragment

3.4.1 Zusammenfassung der SSCA-Bedingungen

Für die SSCA wurden 12% Polyacrylamid-Gele mit unterschiedlichen Gelpufferkonzentrationen verwandt. Für die Zusammensetzung siehe Tabelle 3-5

Tabelle 3-5 Zusammensetzung der nichtdenaturierten Polyacrylamid-Gele für die SSCA

12% AA (Acrylamid/Bis 49:1) - Lösung (ml)	12,6
5x TBE-Puffer (ml)	1,5/1,98/3,0/4,2
H₂O (Ampuwa) (ml)	ad 30
APS 10% (µl)	280
TEMED (µl)	18

Die Laufbedingungen für die SSCA sind in der folgenden Tabelle 3-6 aufgeführt.

Tabelle 3-6 Laufbedingungen für die SSCA

SSCA-Bedingungen für Exon-Fragmente in 12% Polyacrylamid-Gele					
	2 0°C		1 0°C		Gelpufferkonzentration
	Volt	Std.	Volt	Std.	TBE
ExIII1	150	16,5	350	16,5	0,5
ExIII2	150	16,5	200	16,5	0,25
ExIII1	150	16,5	350	16,5	0,25
ExIII2	150	16	200	16,5	0,25
Ex IV	150	16,5	250	16,5	0,5
Ex V1	150	16	250	16	0,25
Ex V2	150	16	250	16	0,25
Ex VI	150	18	250	18	0,25/0,5
Ex VII1	150	16	250	16	0,5
Ex VII2	150	17	250	17	0,25
Ex VIII1	150	17	250	17	0,25
Ex VIII2	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex IX	150	16,5	250	16,5	0,5
Ex X	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex XI	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex XII	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex XIII1	150	18	250	18	0,25/0,5
Ex XIII2	150	17	250	17	0,5
Ex XIV1	150	17	300	18	0,5

SSCA-Bedingungen für Exon-Fragmente in 12% Polyacrylamid-Gelen					
	2 0°C		1 0°C		Gelpuffer- konzentration
	Volt	Std.	Volt	Std.	TBE
Ex XIV2	150	17	250	17	0,25
Ex XIV3	150	17	250	17	0,5
Ex XV1	150	16,5	250	16	0,25/0,5
Ex XV2	150	17	250	16,5	0,25/0,5
Ex XV3	150	16	250	16	0,5
Ex XV4	150	16,5	250	16	0,5
Ex XV5	150	17	250	16	0,25/0,5
Ex XV6	150	17	250	16	0,5
Ex XV7	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex XV8	150	17	250	17	0,25
Ex XV9	150	16,5	250	15	0,5
Ex XV10	200	16,5	250	16,5	0,25/0,5
Ex XV11	150	15	150	16	0,33
Ex XV12	200	18	250	18	0,5
Ex XV13	250	16,5	250	17	0,7
Ex XV14	150	16,5	250	16,5	0,25
Ex XV15	200	18	300	18	0,25
Ex XV16	200	18	300	18	0,25
Ex XV17	150	16	250	16	0,25/0,5

3.4.2 Fluoreszenz-Terminatoren-*Taq* Cycle-Sequenzierung für die Mutationsidentifizierung

Zur Mutationsidentifizierung wurde die DNA der aberranten sowie der entsprechenden Wildtypbande, wie in 3.2.5 beschrieben, isoliert. Für einen 10 µl Sequenzreaktionsansatz wurden 2 bis 4 µl DNA-Eluat, 1 µl Primer (3,2 pmol) und 4 µl Ready-Reaction-Mix eingesetzt und mit HPLC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Denaturierungsphase bei 95°C für 3 min, folgten 25 Zyklen mit einer Denaturierungsphase für 10 sec bei 95°C, einer Anlagerungsphase für 5 sec bei 55°C und einer Synthesephase für 4 min bei 60°C. Abschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Nun konnten sie für die Sequenzierung, wie unter 3.2.1 beschrieben, aufgetragen werden.

In einigen Fällen wurde nicht die allelspezifische sondern eine Heterozygotensequenzierung durchgeführt. Als Matrize in einem 100 µl-PCR-Ansatz dienten dann 100 ng Patienten-DNA. Die Kontrolle erfolgte anschließend auf einem 1%igen Agarose-Gel und der restlich PCR-Ansatz mittels PCR Purifications Kit aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30 µl HPLC-H₂O aus den Säulchen eluiert. Die weiteren Schritte für den 10 µl Sequenzansatz sind oben beschrieben.

Die Überlagerung zweier Lasersignale an einer Position in der Sequenz kennzeichnet eine heterozygoten Sequenz. Putative Mutationen können dadurch identifiziert werden. Die Verifizierung erfordert jedoch den Vergleich von mindestens zwei Forward- und Reverse-Sequenzen.

3.5 Patientenrekrutierung

Für die Studie zur Mutationsanalyse im *GLI3*-Gen wurden 23 Personen mit Greig Cephalopolysyndaktylie, Verdacht auf GPCS und ein Patient mit PAP-A untersucht (siehe Tab.3-7). Zusätzlich wurde noch eine Patientengruppe einbezogen, die bereits zum Teil oder komplett mit herkömmlichen SSCA-Verfahren analysiert worden war und noch keine oder zu bestätigende Mutationsbefunde aufwies (siehe Tab.3-8).

Als Kontrollen wurden DNA von insgesamt 110 nichterkrankten, nichtverwandten deutschen Probanden verwendet, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr.med. Koch, Marburg, zur Verfügung gestellt wurden.

Das Probematerial und die bei dessen Auswertung erlangten personengebundenen Daten wurden mit Hilfe zufälliger Zahlenreihen verschlüsselt und gemäß gültigem Datenschutzgesetz gehandhabt. Jedem Patient wurde ein Informationsblatt und eine zu unterzeichnende Einverständniserklärung, die vorab von der Ethikkommission begutachtet worden war, ausgehändigt.

Tabelle 3-7 Patientengruppe I

Code	Probanden	Erkrankung	f/s	zusätzliche Fehlbildung	Karyotyp	Herkunft
E1	MR2208	V.a. GCPS	s	completer situs inversus;	NB	A.E. Czeizel M.D. Budapest, Ungarn
E2	MR2209	GCPS	NB		unauffällig	Dr. Brueton M.D. Harrow, England
E3	MR2210	GCPS	s		unauffällig	J. Verheij M.D. Groningen, Niederlande
F1	MR2211 MR2212 MR2213 MR2214 MR2215 MR2216 MR2217	PAP-A PAP-A PAP-A PAP-A PAP-A nicht betroffen PAP-A	f		NB	M.G.E.M. Ausems, M.D. Utrecht, Niederlande

Tabelle 3-7 Patientengruppe I

Code	Probanden	Diagnose	f/s	zusätzliche Fehlbildung	Karyotyp	Herkunft
E7	MR2223	komplexe Fehlbildung, u.a. Polysyndaktyly und andere typische Merkmale für GCPS	s	craniofaciale Dismorphien: Mikroretrogenie, Lippen-Kiefer-Spalte, innere Fehlbildungen: Asplenie, mittelständige Leber, Herz- u. Gefäßmissbildungen	unauffällig	Dr. Bartz Göttingen
E8	MR2224	GCPS	f		NB	Dr. Kotzot Zürich, Schweiz
F3	MR2252	GCPS				Prof. Schinzel, Dr. Castellan Bozen, Italien
	MR2253 MR2254 MR2255	nicht betroffen GCPS GCPS	f		unauffällig	
E9	MR2256	Ausschluß von GCPS	s	Aplasie des Corpus callosum + weitere Heterotropien im Hirnbereich	NB	Dr. Illies-Wilbrand Königsstein
E10	MR2261	GCPS	s		NB	Prof. Dr. Majewski Düsseldorf
F4	MR2266	GCPS				Dr. de Die-Smulders Maastrich, Niederlande
	MR2267	GCPS	f		NB	
	MR2268	GCPS				
E11	MR2270	GCPS	f		NB	Brunner, M.D. Nijmegen, Niederlande
E12	MR2271	GCPS	f		NB	Brunner, M.D. Nijmegen, Niederlande
E13	MR2272	GCPS	f		NB	Dr. Post, M.D. Nijmegen, Niederlande
E14	MR2273	GCPS	f		NB	Dr. Ishikiriyama, M.D. Chiba, Japan
E15	MR2274	V.a GCPS	N B	mentale Retardierung (IQ=50), hypoplastischer corpus callosum	NB	Dr. Hasegawa Shizuaka, Japan

Die Mutationsanalyse der Exons II-XIV wurde in 10 Fällen vorab von Frau D. Bornholdt im MZ für Humangenetik durchgeführt.

Tabelle 3-8 Patientengruppe II1. Fälle mit GCPS ähnelndem Phänotyp

Code	Probanden	Diagnose	f/s	zusätzl. Fehlbildung	Karyotyp	Herkunft
E16	MR2083	Acrocallosal Syndrom Ausschluss von GCPS	NB	/	unauffällig	Dr. med. Bach, Frankfurt/M
E17	MR2140	Pfeiffer Syndrom Ausschluss von GCPS	NB	Coronarnahtsynostose, Makrocephalus	unauffällig	Dr. Kreß, Würzburg

2. GCPS-Fälle oder Verdachtsfälle bis dato ohne Mutationsbefund

F5	MR2106	GPCS	f		unauffällig	Dr. med. Höhne, Halle
E18	MR2120	unkomplizierte Polydaktylie Typ I, V.a. GPCS	f		unauffällig	Dr. med. Burck- Lehmann, Köln
E19	MR2121	V.a. GPCS	NB	Macrocephalus, BNS- Krampfleiden	unauffällig	Dr. med. Reimer, Düsseldorf
E20	MR2142	GCPS	NB	Kryptorchismus	unauffällig	Dr. med. Burck- Lehmann, Köln

3. GCPS-Fälle und ein PHS-Fall: Untersuchung zum Ausschluss von zusätzlichen Mutationen zu den Kandidaten für Kausalmutationen

F6	MR2102	GPCS	f	/	unauffällig	Dipl. med. Herzog, Sangerhausen
F7	MR2116	GPCS	f	bilaterale Klinodaktylie d. 5. Fingers, Sprachstörungen	unauffällig	Dr. med. Barone, Catania, Italien
E21	MR2146	PHS	NB	/	unauffällig	Dr. Bottani, Genf, Schweiz

Phänotyp: f (familiär), s (sporadisch), NB (nicht bekannt)

Die Metaphase Chromosomen der Probanden in Patientengruppe II wurden vorab einer FISH-Analyse mit einer *GLI3*-spezifischen Sonde unterzogen (siehe Wild, A. Dissertation). Bei keinem der untersuchten Fälle, die durchwegs zytogenetisch unauffällig waren, ergab sich ein Hinweis einer *GLI3* Deletion.

4. ERGEBNISSE

4.1 Molekulare Mutationsanalyse mittels Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA)

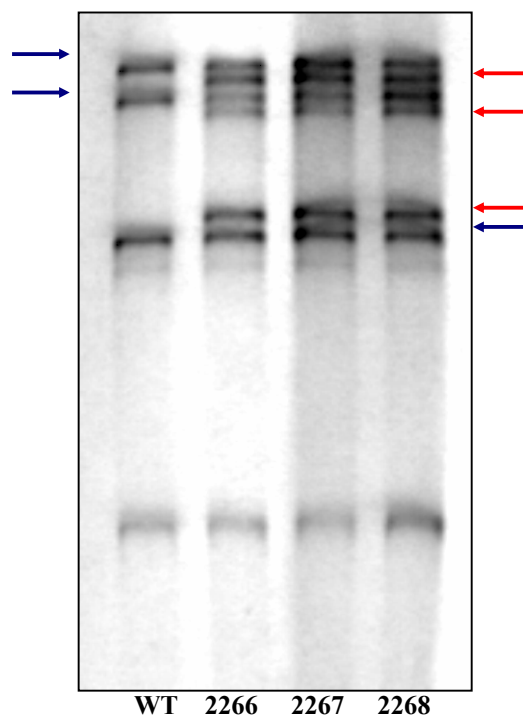
Die SSCA-Analyse ist eine geeignete Methode, um Basenaustausche, kleine Deletionen und Insertionen im kodierenden Bereich des GLI3-Gens (siehe auch Abbildung 4-1) zu detektieren. Durch das unterschiedliche Laufverhalten der Exon-Fragmente im elektrischen Feld, wenn Abweichungen in der Basensequenz vorhanden sind, entstehen Bandenmuster, die sich von denen der Kontrollpersonen unterscheiden. Um die Nachweissensitivität der SSCA-Analysen zu erhöhen, wurden unterschiedliche Gel- und Laufbedingungen verwandt (siehe 3.4.1 Zusammenfassung der SSCA-Bedingungen). Es zeigte sich, dass einige Mutationen unter mehreren Bedingungen, andere nur unter einer zu sehen waren.

Bei der Mutationssuche im GLI3-Gen wurden im ersten Durchgang nur betroffene Patienten der Patientengruppe I und II (siehe Tabelle 3-7 und 3-8) und eine gesunde Kontrollperson analysiert. Wenn sich ein aberrantes Bandenmuster zeigte und weitere erkrankte sowie nicht-erkrankte Familienmitglieder zur Verfügung standen, wurde zusätzlich eine SSCA-Analyse mit der Patienten-DNA und der der Familienmitglieder durchgeführt. Diese erlaubte dann erste Annahmen über die Bedeutung der vorliegenden Sequenzvariante. Zum Beispiel deutet die Präsenz aberranter Banden ausschließlich in betroffenen Familienmitgliedern auf eine Mutation in diesem Bereich des GLI3 Gens hin. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, ob das Ergebnis einen Polymorphismus, d.h. das Vorkommen von wenigstens zwei oder mehreren Allelen mit signifikanter Frequenz in einer Population, oder eine Mutation darstellt, wurden Kontrollanalysen mit 110 nichterkrankten, nichtverwandten deutschen Probanden durchgeführt. Hinweis auf eine Mutation war das Negativergebnis bei der Suche der aberranten Bande(n) bei den Kontrollpersonen. Wenn schon Polymorphismen in dem jeweiligen Exon-Fragment bekannt waren, wurde das Bandenmuster des Patienten mit denen der Kontrollpersonen verglichen. Während ein identisches Bandenmuster das Vorhandensein eines Polymorphismus dokumentiert, deutet ein einzigartiges Bandenmuster des Patienten auf eine ursächliche Mutation hin.

Die gefundenen aberranten Bandenmuster, die Polymorphismen und Mutationen darstellen, sind in Tabelle 4-1, bzw. Tabelle 4-2 wiedergegeben.

Eine exemplarische Darstellung eines SSCA Befundes wird anhand des Elektropherogrammes des Fragments Ex XV-14 in einer Familie mit drei Betroffenen in zwei Generationen (F4) in Abb. 4-1 gezeigt.

Abbildung 4-1 Exemplarische Darstellung eines SSCA Befundes anhand eines Elektropherogrammes des Fragments Ex XV-14



Die erste Spur zeigt das Bandenmuster der Normalkontrolle (WT), die folgenden die der Probanden MR2266, MR2267 und MR2268 der Familie 4. Die aberranten Banden sind mit roten Pfeilen, die Wildtypbanden der Kontrolle mit blauen gekennzeichnet.

Abschließend wurde eine Sequenzanalyse zur Bestätigung des Verdachts auf eine Mutation oder auch zur genaueren Analyse eines Polymorphismus durchgeführt.

Die gefundenen Sequenzvarianten sind in Tabelle 4-1 bzw. 4-2 wiedergegeben.

4.2. Identifizierung der Punktmutationen mittels Sequenzierung

Zum Nachweis, ob sich hinter einer aberranten DNA-Bande tatsächlich eine Sequenzveränderung verbarg und welche Mutation oder welcher Polymorphismus zu beschreiben waren, wurde zunächst eine allelspezifische Sequenzanalyse durchgeführt. Dabei diente, die aus dem Gel ausgestochene aberrante Bande, als Matrize für die PCR. Durch den Vergleich der Sequenz mit der einer Normalkontrolle konnte der Schluss auf einen oder mehrere Basenaustausch(e), Deletion oder Insertion gezogen werden. Um Einbaufehler der *Taq* DNA-Polymerase ausschließen zu können, wurden jeweils zwei Forward- und Reverse-Sequenzanalysen mit den entsprechenden Primern vollzogen. Des Weiteren erfolgte eine Heterozygotensequenzierung nach Amplifikation beider Allele aus der Gesamt DNA des Patienten.

4.2.1 Polymorphismen

Bei der Betrachtung der abweichenden Banden bei den SSCA-Ergebnissen von den Exon-Fragmenten II-1, II-2, III-2, IV, V-1, V-2, VII-1, IX, XI, XV-4, XV-5, XV-6, XV-7, XV-12, XV-13, XV-16 zeigte sich, dass es sich um Polymorphismen handeln muss, da diese Banden auch unter den Kontrollpersonen zu finden waren.

Bei den Fragmenten **II-1** und **II-2** konnte der Polymorphismus, der auf einer G→A Transition an Position 39 der cDNA-Sequenz beruht, bei weiteren Probanden nachgewiesen werden. Er hat keine Auswirkungen auf Proteinebene, da das neuentstandene Triplet AAA ebenfalls für die Aminosäure Lysin codiert. Es handelt sich hier um einen Polymorphismus im kodierenden Bereich von *GLI3*, der mit einer Häufigkeit von 11% auftritt.

Bei dem Fragment **III-2** zeigte sich das aberrante Bandenmuster sowohl bei zwei Probanden (MR2106, MR2146) als auch bei zwei Kontrollpersonen aus n=200. Ursache dafür ist eine G→A Transition am 341. Nukleotid der cDNA. Dadurch wird ein Arginin-Rest gegen einen Lysin-Rest an Position 114 der Aminosäuresequenz ausgetauscht.

Da eine nichtbetroffene Person der F5 ebenfalls das aberrante Bandenmuster aufwies, wurde dieser Nukleotidaustausch nicht als rare Variante sondern als Polymorphismus eingeordnet.

Bei dem Fragment **IV** fand sich bei einem Proband (MR2142) und drei Kontrollpersonen dasselbe aberrante Bandenmuster. Die gefundene Transition G→A (c.368-19) hat allerdings keine Auswirkungen auf Aminosäureebene, da sie in einem Intron außerhalb der Spleißstellen-Konsensussequenz liegt.

Bei den Fragmenten **V-1** und **V-2** wurde der bekannte Polymorphismus, der der Transition G→A an Position 547 der cDNA mit der Folge eines Austauschs von Alanin gegen Tyrosin auf Aminosäureebene bei den Probanden MR2083, MR2102, MR2103, MR2121, MR2140, MR2146 entspricht, gefunden. Auch einige andere Probanden zeigten diese aberranten Banden, wurden aber nicht weiter untersucht.

Bei dem Fragment **VII-1** war bei den Probanden MR2121, MR2220, MR2221, MR2223, MR2253 und M2272 ein aberrantes Bandenmuster zu sehen. Dieses zeigte sich auch bei 23 von 102 Normal-Kontrollen. Die Sequenzierung ergab eine Transition C→T in Position 900 der cDNA. Das neu entstandene Triplet TCT codiert ebenfalls für die Aminosäure Serin.

Bei dem Fragment **IX** fand sich bei MR2210 und MR2224 ein Polymorphismus, der sich auch bei 3 aus n=42 Normalpersonen zeigte. Es handelte sich um eine Transversion C→G (c.1356+11) in einem Intron. Außerdem wurde der bekannte Polymorphismus, T→G Transversion in Position 1320 der cDNA mit dem Aminosäureaustausch einer Asparaginsäure gegen eine Glutaminsäure (D440E), bei MR 2106 bestätigt.

Bei dem Fragment **XI** zeigte sich beim Probanden MR2223 sowie bei 4 von n=28 Kontrollpersonen eine Transition C→T in Position 1509 der cDNA. Die Aminosäure Asparagin in Position 503 bleibt erhalten. (AAC und AAT = N)

Bei dem Fragment **XV-4** erwies sich die aberrante Bande bei MR2223, M2271 und M2272 als Transversion G→C in Position 2826 der cDNA ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. (CCG und CCC = P). Dasselbe Bandenmuster ließ sich auch bei 3 von n=18 Normalkontrollen nachweisen.

Bei dem Fragment **XV-5** zeigten sich in der SSCA verschiedene Bandenmuster, die allerdings jeweils bei mehreren Probanden und Kontrollpersonen zu sehen waren und deshalb nicht sequenziert wurden.

Bei dem Fragment Ex **XV-6** konnten drei verschiedene Polymorphismen nachgewiesen werden: eine Transition T→C in Position 2993 der cDNA , die einen Aminosäureaustausch L→P bewirkt, einen Austausch von GC→TT in Position 3083 und 3084 der cDNA mit der Folge eines Austauschs von S→I und eine Transition G→A in Position 3001 der cDNA, so dass aus G→S wird. Der Proband MR2209 zeigte die beiden ersten Polymorphismen. Wegen der Komplexität des erhaltenen Bandenmusters wurden die nicht durch Sequenzierung bestätigten Probanden nicht aufgeführt.

Bei dem Fragment Ex **XV-7** zeigte sich bei dem Probanden MR2209 sowie bei 5 von n=42 Kontrollpersonen ein Polymorphismus, der nicht sequenziert wurde.

Bei dem Fragment **XV-12** verbargen sich hinter den aberranten Banden 3 verschiedene Polymorphismen.

Bei den Probanden MR2223, M2270 und M2271 fanden sich die Transition C→T in der Position 4020 der cDNA, die keine Veränderungen auf der Aminosäureebene hervorruft (CCC und CCT = P) und die Transition G→A in der Position 4007 mit dem entsprechenden Aminosäureaustausch von Glycin gegen Glutaminsäure in Position 1336. In 13 von n=105 Normalkontrollen zeigte sich dasselbe Bandenmuster.

Beim Probanden MR2213 konnte die Transition C→T in Position 4071 der cDNA ohne Aminosäureänderung (TAC und TAT = Y) bestätigt werden. Die drei Polymorphismen zusammengenommen haben eine Häufigkeit von 13% in der Normalpopulation.

Bei dem Fragment **XV-13** zeigte sich bei MR2213, MR2220 und MR2223 ein Bandenmuster, welches sich so auch bei 3 von n=23 Normalkontrollen darstellte, so dass von einem Polymorphismus ausgegangen werden muss, dessen Sequenz aber nicht charakterisiert wurde.

Bei dem Fragment **XV-16** ließ sich eine Transition C→T in Position 4609 der cDNA-Sequenz mit einem Aminosäureaustausch von Arginin gegen Cystein in Position 1537 beim Probanden MR2223 nachweisen. 12 von n=100 Kontrollpersonen besaßen dasselbe Bandenmuster.

In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der SSCA und der Sequenzanalysen für die gefundenen Polymorphismen in den einzelnen Exon-Fragmenten des *GLI3*-Gens zusammengefasst.

Tabelle 4-1 Zusammenfassung der gefundenen Polymorphismen

Exon-Fragment	Polymorphismus (nt Position in cDNA)	Auswirkung auf die Aminosäuresequenz	Probanden mit jeweiligen Polymorphismen	SSCA-Bedingungen	Frequenz
ExII-1	c.39G>A	K13K	MR2116; MR2120;	12% bei 10°C u.20°C	11%
ExII-2	c.39G>A	K13K	MR2116; MR2120;	12% bei 10°C u.20°C	11%
ExIII-2	c.341G>A	R114K	MR2106; MR2146	12% bei 20°C	1%
ExIV	c.368-19G>A	keine, da in Intron	MR2142	12% bei 10°C	3%
ExV-1	c.547G>A	A183T	MR2083; MR2102; MR2121; MR2140; MR2146;	12% bei 10°C u.20°C	13%
ExV-2	c.547G>A	A183T	MR2083; MR2102; MR2121; MR2140;	12% bei 10°C u.20°C	13%
ExVII-1	c.900C>T	S300S	MR2121; MR2220; MR2221; MR2223; MR2253; MR2272	12% bei 15°C	22%
ExIX	c.1356+11 C>G	keine, da in Intron	MR2210; MR2224	12% bei 20°C	7%
	c.1320T>G	D440E	MR2106	12% bei 10°C	5%
ExXI	c.1509C>T	N503N	MR2223; MR2271; MR2272	12% bei 10°C	14%
ExXV-4	c.2826G>C	P942P	MR2223; MR2271; MR2272	12% bei 20°C	14%
ExXV-5	N.B.		MR2261	12% bei 10°C u. 20°C	N.B.
ExXV-6	c.2993T>C c.3083-84GC>TT	L998P S1028I	MR2209	12% bei 10°C u. 20°C	N.B.
	c.3015C>T	A1005A	MR2261	12% bei 10°C u. 20°C	N.B.
ExXV-7	N.B.		MR2209	12% bei 20°C	N.B.
ExXV-12	c.4020C>T	P1340P	MR2223; MR2271; MR2272	12% bei 20°C	
	c.4007G>A	G1336E	MR2223; MR2270; MR2271	12% bei 20°C	13%
	c.4071G>T	Y1357Y	MR2213	12% bei 10% u. 20%	
ExXV-13	N.B.		MR2213; MR2220; MR2223	12% bei 10°C	N.B.
ExXV-16	c.4609C>T	P1537C	MR2223	12% bei 10°C	12%

In der Tabelle sind die identifizierten Polymorphismen im kodierenden Bereich von *GLI3* aufgelistet. In den entsprechenden Spalten sind das Exon-Fragment mit der Position des Nukleotidaustausches in der cDNA-Sequenz und die Auswirkung auf der Aminosäureebene dargestellt (Nomenklatur nach Antonarakis *et al.*, 1998). Die nicht auf Sequenzebene bestimmten Polymorphismen wurden ohne cDNA-Position aufgeführt (N.B.; nicht bestimmt). In der Spalte mit den Probanden wurden diejenigen, die in ExII-1, ExII-2, ExV-1, ExV-2, ExXV-5, ExXV-6 Polymorphismen aufwiesen, aber nicht näher sequenziert wurden, nicht berücksichtigt.

Die gefundenen Polymorphismen konnten nicht nur in den aufgeführten Probanden, sondern auch in einigen der 110 untersuchten Normalkontrollen identifiziert werden. In den letzten zwei Spalten sind die SSCA-Bedingungen angegeben, unter denen die aberranten Banden beobachtet wurden und die Frequenz der Polymorphismen in der Normalpopulation.

4.2.2 Mutationen

In neun Fällen zeigten sich nach der SSCA-Analyse und den Polymorphismuskontrollen aberrante Bandenmuster, denen krankheitsverursachende Mutationen zugrunde liegen könnten, da sie nur bei betroffenen Patienten zu finden waren. Durch Sequenzierung wurden folgende Mutationen identifiziert: drei 'Missense'-Mutationen d.h. ein Austausch einer Aminosäure, eine 'Frameshift'-Mutation d.h. eine Verschiebung des Leserasters durch Addition (Insertion) oder Deletion von einem oder mehreren Nukleotiden, drei 'Nonsense'-Mutationen, die die Entstehung eines Stopcodons bewirken, eine Deletion eines einzigen Codons ('in frame' Deletion) und eine 'Spleiß'-Mutation.

In Tabelle 4-2 ist eine Zusammenfassung dieser Mutationen wiedergegeben.

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der gefundenen Mutationen

Code	Probanden	Exon II-XV	Mutation nt Position in cDNA-Sequenz	Mutation auf Proteinebene	Mutationstyp
F2	MR2219	ExXI	c.1559G>A Transition	C520Y	Missense
F3	MR2252	ExXV-4	c.2776- 2778delCAG	Q926del	'in frame' Deletion
	MR2254	"	"		'in frame' Deletion
	MR2255	"	"		'in frame' Deletion
F4	MR2266	ExXV-14	c.4183C>T Transition	Q1395X (UAG; Amber)	Nonsense
	MR2267	"	"		Nonsense
	MR2268	"	"		Nonsense
E4	MR2220	ExVII-2	c.924delC	M309X (UGA; Opal)	Frameshift bei Codon 308
E5	MR2221	ExXI	c.1543T>G Transversion	C515G	Missense
E6	MR2222	ExX	c.1497+2T	möglicherweise auslassen des Exons 10; 'skipping'	Spleißmutation
E11	MR 2270	ExXIII-2	1990C>T Transition	R667X (UGA; Opal)	Nonsense
E12	MR 2271	ExXI	c.1630A>T	K544X	Nonsense
E13	MR2272	ExXV-16	c.4576A>G	S1526G	Missense

In den ersten Spalten sind die Codenamen mit den entsprechenden Identifikationsnummern der Probanden angegeben. Die Position der Mutationen bezieht sich auf die publizierte cDNA-Sequenz (Ruppert *et al.*, 1990; Accession No. M34366), die Nomenklatur auf Antonarakis *et al.*, 1998.

Etwa die Hälfte der Mutationen (die 3 Nonsense- und eine Frameshift- sowie möglicherweise die Spleiß-Mutation) führen zu einem stark verkürzten Protein. Das vorzeitige Stopcodon ist mit einer Ausnahme (Q1395X) in der N-terminalen Hälfte des GLI3 Proteins lokalisiert.

Zwei der 3 Missense-Mutationen sind in der Zinkfingerdomäne angesiedelt. Der dritte Aminosäureaustausch ist im äußersten C-terminalen Bereich des GLI3 Proteins (S1526G) identifiziert worden. Die 'in frame' Deletion einer Aminosäure (Q926del) erfolgt in der so genannten Region 5, die Homologie mit anderen GLI Familienmitgliedern aufweist.

Tabelle 4-3 Prozentualer Anteil der Mutationen u. Polymorphismen an der Gesamtzahl der GCPS-Fälle

Anzahl	Fälle	Mutationen	Polymorphismen
Patientengruppe I	n=15	n=9	n=21
		60%	140%

In die Berechnung wurden nur die klinisch gesicherten GCPS-Fälle der Patientengruppe I einbezogen. Die Anzahl der Polymorphismen setzt sich aus allen gefundenen Ergebnissen in Exon II-XV zusammen (siehe Tabelle 4-1). In der Patientengruppe II wurden im Vergleich zur Studie Wild (Dissertation 1998) keine weiteren Befunde detektiert.

In knapp der Hälfte der klinisch gesicherten GCPS-Fälle konnte unter den gewählten SSCA-Bedingungen keine Mutation gefunden werden wie in Tabelle 4-3 dargestellt. Die in dieser Probandengruppe detektierten Polymorphismen sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Bedingt durch die Untersuchungsmethode werden nur Polymorphismen im kodierenden Bereich und in den nahe angrenzenden Intronsequenzen detektiert. Im Schnitt werden mindestens 1,4 *GLI3* Polymorphismen per diploidem Genom beschrieben. Daher wurden Bandenmuster, die in den Normalkontrollen häufig vorkamen, nicht durch Sequenzierung charakterisiert.

Tabelle 4-4 GCPS-Probanden ohne Mutation

Code	Probanden	Erkrankung	Exon II-XV	Mutationstyp
E2	MR2209	GCPS	XV-6 L998P	konservativer AS-Austausch
			XV-6 S1028I	nicht-konservativer AS-Austausch
E3	MR2210	GCPS	IX c.1356+11 C>G	Intron
E8	MR2224	GCPS	IX c.1356+11 C>G	Intron
E13	MR2272	GCPS	VII-1 S300S	stumm
			XV-12 P1340P	stumm
			XV-12 G1336E	nicht-konservativer AS-Austausch

Bei den Probanden E1 (MR 2208) und E9 (MR2256) mit Verdacht auf GCPS konnte dieses Syndrom weder bestätigt- es wurde keine ursächliche Mutation detektiert- noch ausgeschlossen werden, da, wie oben beschrieben, auch bei klinisch gesicherten GCPS-Fällen nicht grundsätzlich Befunde im *GLI3*-Gen zu finden waren. In den SSCA-Untersuchungen zeigten sich nur einige Polymorphismen. Der Patient F1 (MR2213), bei dem es sich um eine postaxiale Polydaktylie Typ A handelt, wies mehrere Polymorphismen, aber keine Mutation auf. Bei E7 (MR2223), einem Patient mit komplexen Fehlbildungen u.a. mit für das GCPS typischen Merkmalen, zeigten sich multiple über das gesamte *GLI3*-Gen verteilte Polymorphismen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5 Probanden ohne klinisch gesichertes GCPS

Code	Probanden	Erkrankung	Exon II-XV	Mutationstyp
F1	MR2213	PAP-A	XV-12 Y1357Y	stumm
E7	MR2223	komplexe Fehlbildung	VII-1 S300S	stumm
		u.a. typische	XI N503N	stumm
		GCPS-	XV-4 P942P	stumm
		Merkmale	XV-12 P1340P	stumm
			XV-12 G1336E	nicht-konservativer AS-Austausch
			XV-16 P1536C	nicht-konservativer AS-Austausch

Nicht charakterisierte Polymorphismen sind nicht in der Tabelle aufgeführt.

5. DISKUSSION

5.1 *GLI*-Gene während der Extremitätenentwicklung und assoziierte Krankheitsbilder

Für die Ausbildung der Extremitäten sind zahlreiche Gene verantwortlich, die einzeln bestimmte Schritte während der Entwicklung steuern und gleichzeitig in ihrer Aktivität interagieren. Dies ermöglicht das zeitgleiche Wachstum der Extremität in die proximo-distale, anterior-posteriore und dorso-ventrale Richtung (Riddle and Tabin, 1999).

Sonic Hedgehog (SHH) spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung der anterior-posterior Polarität der Extremitäten. Neben einigen anderen Proteinen sind die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 an der SHH Signaltransduktion beteiligt (Ruiz i Altaba, 1997; 1999). Sie gehören zu einer Familie von Zinkfingerproteinen, die fünf Zinkfinger enthalten und eine 9 bp lange DNA-Bindungssequenz [-TGGGTGGTC-] erkennen (Kinzler *et al.*, 1990). Des Weiteren gibt es noch 7 Regionen der GLI-Proteine, die in ihrer Sequenz hoch konserviert sind (Ruppert *et al.*, 1990).

Während der Gastrulation können sie erstmals nachgewiesen werden.

Im Entwicklungsverlauf beschränkt sich die Expression der einzelnen *GLI*-Gene, dann selektiver auf ektodermale und mesodermale Gewebe. Dies weist auf spezifische Funktionen von GLI1, GLI2 und GLI3 hin, wobei auch Überschneidungen angenommen werden (Schimmang *et al.*, 1992; Hui *et al.*, 1994; Mo *et al.*, 1997).

Dem *GLI3*-Gen wurden inzwischen mehrere Krankheitsbilder zugeordnet, die neben spezifischen phänotypischen Merkmalen eine postaxiale Polydaktylie aufweisen. Es handelt sich hier um das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom (GCPS, MIM 175700), das Pallister-Hall-Syndrom (PHS, MIM 146510) und die Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A, eine Form der Postaxialen Polydaktylie, MIM 174200).

Vortkamp und Mitarbeiter zeigten, dass bekannte Translokationen und Mikrodeletionen bei GCPS-Patienten (Tommerup and Nielsen, 1983; Krüger *et al.*, 1989) in 7p13 mit dem Genlocus für das *GLI3*-Gen übereinstimmen (Vortkamp *et al.*, 1991). Nachdem die gesamte genomische Struktur des Gens mit den endgültigen Exon-Intron-Grenzen entschlüsselt worden war, wurden bei weiteren GCPS Fällen Punktmutationen im *GLI3*-Gen entdeckt (Wild *et al.*, 1997).

Mit einem Molekulargewicht von etwa 190 kD besteht das GLI3-Protein aus 1580 Aminosäuren. Die kodierenden Bereiche des *GLI3*-Gens sind auf 15 Exons verteilt.

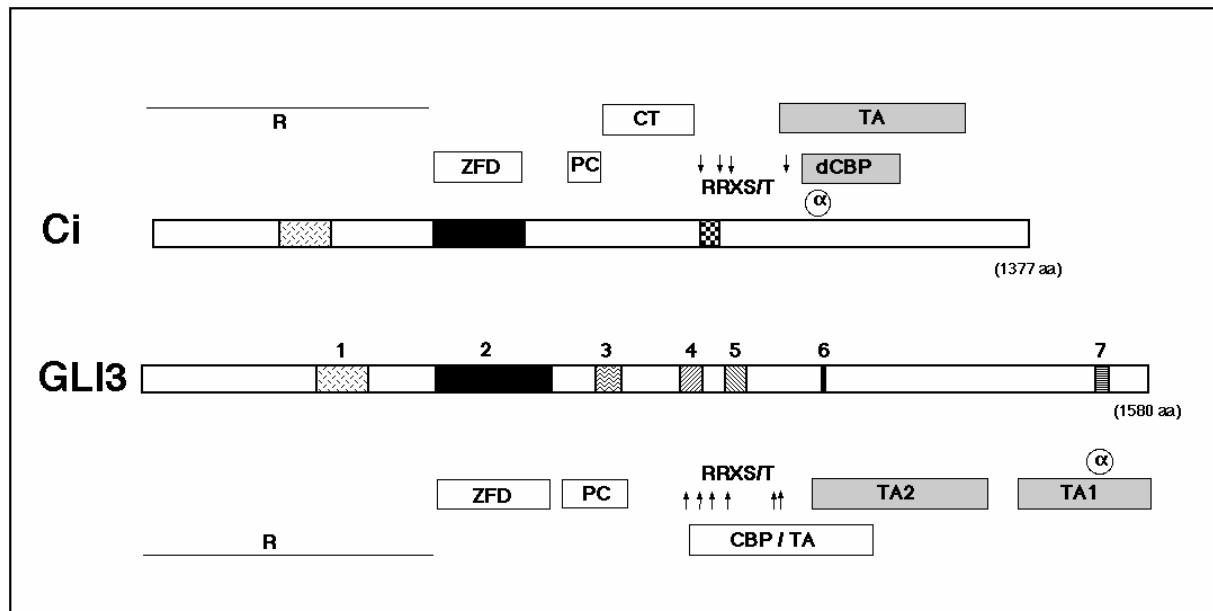
Eine etwa 2 kb große CpG-Insel, die das Gen im 5' Bereich flankiert und sich bis in das erste Exon erstreckt, dient als Kontrollregion. Das Startcodon für die Translation ist im Exon II lokalisiert und umfasst die Nukleotide 43 bis 45. Somit gehören Exon I und Teile von Exon II zum 5' untranslatierten Bereich (Ruppert *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995a; Jacobsen, 1996; Wild *et al.*, 1997).

5.2 Die Rolle von GLI3 in der SHH-Signalkaskade und seine funktionellen Domänen

Durch den strukturellen Vergleich der GLI-Proteine und Homologer im Tierreich - wie z.B. Ci von *Drosophila melanogaster* - lassen sich häufig Arbeitshypothesen bezüglich ihrer Funktion und die Rolle bestimmter Domänen ableiten und überprüfen.

Homologien in der Sequenz und den funktionellen Domänen zwischen Ci (*Drosophila*) und GLI3 sind in Abbildung 5-1 dargestellt.

Abbildung 5-1 Homologien in der Sequenz und der Funktion von *Drosophila* Ci und dem humanem GLI3 Protein



Das Ci Protein und das GLI3 Protein sind als Balken dargestellt. Die schraffierten Boxen innerhalb von GLI3 repräsentieren die 7 hochkonservierten Regionen zwischen den GLI Proteinen (Ruppert *et al.*, 1990). Sie sind mit arabischen Ziffern gekennzeichnet, beispielsweise Region 2, die Zinkfingerdomäne. Das Ci Protein zeigt neben der Zinkfingerdomäne zwei weitere Regionen mit einer beträchtlichen Identität auf Aminosäureebene zu GLI3; die N-terminale mit der mit 1 bezifferten in GLI3 und die C-terminale mit der Region von GLI3, die zwischen dem C-terminalen Ende von Region4 und dem N-terminalen Ende von Region5 liegt (Aminosäuren 872-913). Die kürzlich für die Funktion identifizierten Strukturen sind über jedem Protein eingezeichnet. Für Ci: die Repressor und Aktivator Region (R und TA) (Alexandre *et al.*, 1996), eine α - Helix-Region (Yoon *et al.*, 1998; Orenic *et al.*, 1990), die dCBP-bindende Region (dCBP) (Akimura *et al.*, 1997), die Proteinkinase A Phosphorylierungsstellen (RRXS/T) (Chen *et al.*, 1998) und die Regionen für proteolytische Spaltung und für die cytoplasmatische Anheftung (PC und CT) (Aza-Blanc *et al.*, 1997). Für GLI3: zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen TA₁ (Aminosäuren 1376-1580) und TA₂ (Aminosäuren 1044-1322) (Kalff-Suske *et al.*, 1999), die Transaktivierungs- und CBP-Bindungsregionen (TA/CBP), die Proteinkinase A Phosphorylierungsstellen zwischen Aminosäure 846-1006 und der Bereich, der für proteolytische Spaltung postuliert wird (PC) (Dai *et al.*, 1999). Eine α - Helix-Region liegt in Bereich 7.

Folgende Rolle wird zur Zeit für GLI3 in der SHH-Signalkaskade angenommen:

In Abwesenheit von SHH dient GLI3 als Repressor. Ein N-terminales Fragment wird von GLI3 abgespalten und wirkt im Nucleus als Repressor. Anregend auf die Spaltung wirkt die Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (Büscher *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000). In Abwesenheit von SHH würde die Spaltung verhindert und das vollständige GLI3-Protein als Aktivator wirken.

Für GLI3 sind die zwei benachbarten Transaktivierungsdomänen (TA₁ und TA₂) sowie eine Domäne für den Transkriptions-Coaktivator CBP (CREB binding protein) im C-terminalen Bereich bekannt (Dai *et al.*, 1999; Kalff-Suske *et al.*, 1999).

Eine Transaktivierungsdomäne (TA₂) weist eine Überschneidung mit der CBP-bindenden Domäne auf, so dass angenommen werden kann, dass die Transaktivierung über CBP vermittelt wird. In der am weitesten C-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne (TA₁) vermuteten bereits Ruppert *et al.* eine α -helikale Region (Ruppert *et al.*, 1990).

Diese Struktur weist Ähnlichkeiten mit bekannten sauren Aktivierungsdomänen auf. Die zentral liegende Zinkfingerdomäne (ZFD), die an spezifische DNA Sequenzen bindet, ist zwischen den GLI-Proteinen hochkonserviert.

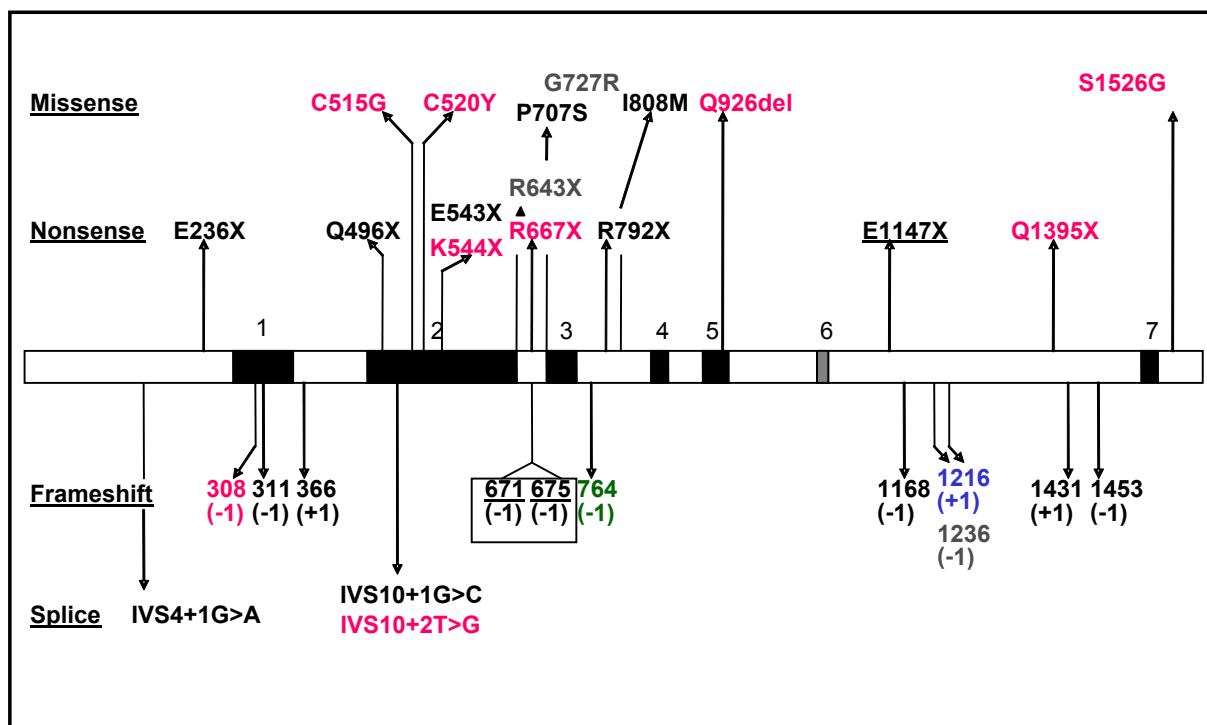
Im N-terminalen Bereich des Proteins wurde eine inhibitorische Aktivität postuliert, die aber noch nicht näher zugeordnet werden konnte (Dai *et al.*, 1999).

5.3 Mutationen im *GLI3*-Gen von GCPS Patienten und deren mögliche Auswirkungen auf die Funktion des Proteins

Die Annahme, dass Mutationen im *GLI3*-Gen für das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom verantwortlich sind, wird durch den Nachweis von Spleiß-, Frameshift-, Missense- und Nonsense-Mutationen in zahlreichen klinisch gesicherten GCPS Fällen unterstrichen.

Abbildung 5-2 bietet eine Übersicht aller bisher bekannten GCPS Mutationen.

Abbildung 5-2 Übersicht aller bisher bekannten *GLI3* Mutationen von GCPS-, PHS-, PAP-A- und PAP-A/B-Fällen



Zusammenfassung der bisher bekannten *GLI3* Mutationen von GCPS-, PHS- und PAP-A-Fällen. Das *GLI3* Protein ist schematisch wie in Abbildung 5-1 dargestellt. Die Art der Mutationen ist auf der linken Seite bezeichnet. Die Position der Mutationen ist nach der Nomenklatur von Antonarakis *et al.*, 1998 im 'single letter code' aufgeführt. Die Anzahl der insertierten bzw. deletierten Nukleotide der 'frameshift' Mutationen steht in Klammern.

Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen sind farblich rot, diejenigen der Referenz Kalff-Suske *et al.*, 1999 blau gekennzeichnet;

Wild *et al.*, 1997 (GCPS: Q496X, P707S); Kang *et al.*, 1997 [PHS: 671(-1) u. 675(-1)];

Radhakrishna *et al.*, 1997 [PAP-A: 764(-1)];

Radhakrishna *et al.*, 1999 [PAP-A/B: R643X; G727R; 1236(-1); PHS: E1147X].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 9 weitere Mutationen im *GLI3*-Gen klinisch gesicherter GCPS Patienten detektiert werden. Sie sind in Abbildung 5-2 farblich rot gekennzeichnet. Bei der Betrachtung der Position der einzelnen Mutationen zeigt sich, dass sie über die gesamte kodierende Sequenz des *GLI3*-Gens verteilt sind. Somit lässt sich die Aussage, GCPS sei nur durch Mutationen bedingt, die den Verlust der DNA-bindenden Domäne verursachen (Biesecker, 1997), nicht bestätigen.

Mindestens 4 der 9 Mutationen führen zu einem verkürzten Protein. In 3 weiteren Fällen scheint das GCPS durch Missense Mutationen verursacht, die unterschiedliche Regionen des Gens betreffen. Vermutlich führen die Veränderungen des Proteins zu einem Verlust aller oder einiger Funktionen. Mit Ausnahme der Mutationen, die die DNA-bindende Zinkfingerdomäne betreffen, sind allerdings ohne zusätzliche Experimente keine eindeutigen Schlüsse zu ziehen, welche Funktion nun tatsächlich verloren geht. Etwa die Hälfte der detektierten Mutationen liegt im C-terminalen Bereich.

Die Nonsense Mutation R667X befindet sich zwischen Region 2 und 3 nahe der ZFD, lässt diese aber intakt. Der Biesecker-Hypothese (Biesecker, 1997) zufolge müsste dies zu PHS führen. Der Phänotyp ist klinisch jedoch eindeutig ein GCPS und kein PHS.

Die 'in frame' Deletion Q926del liegt in der hochkonservierten Region 5. In diesem Bereich zwischen den Aminosäuren 846-1006 werden sechs Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A angenommen [RRXS/T Konsensus], die bei der Spaltung des *GLI3* Proteins zur Repressorform eine Rolle zu spielen scheinen (Wang *et al.*, 2000). Möglicherweise hat die Deletion des Glutaminrestes Auswirkungen auf die Proteinfaltung und -stabilität.

Die Nonsense Mutation Q1395X ist innerhalb der Transaktivierungsdomänen TA₁ (AS 1376-1580) (Kalff-Suske *et al.*, 1999) lokalisiert, so dass diese dem verkürzten Protein teilweise fehlt. Da auch Mutanten mit vollständiger TA₂ einen GCPS Phänotyp aufweisen, ist anzunehmen, dass sowohl TA₂ als auch TA₁ für die Aktivierung von Zielgenen benötigt werden, trotz der Fähigkeit der TA₂ Domäne, unabhängig von TA₁ Promotor-transkriptionelle Aktivierung zu vermitteln (Kalff-Suske *et al.*, 1999).

Auch die Missense Mutation S1526G liegt innerhalb von TA₁ und beeinflusst somit eventuell die Rolle von GLI3 als Aktivator.

Mutationen, die zu C-terminal verkürzten Proteinen führen, mögen die These unterstützen, dass die Transaktivierungsdomänen für Funktion des GLI3 Proteins in der SHH-Signalkaskade notwendig sind. Eine weitere Deutungsmöglichkeit ist ein dominant-negativer Effekt auf Wildtypproteine des nicht betroffenen Allels und/oder anderer GLI Proteine, indem ihre Bindungsstellen durch die veränderten GLI3 Proteine besetzt werden. Die Fähigkeit zur Repression oder als Repressor zu agieren dürfte nicht beeinflusst sein (Kalff-Suske *et al.*, 1999).

Die anderen 5 detektierten Mutationen betreffen den N-Terminus oder die ZFD von GLI3. Translationsprodukte, denen die Fähigkeit, DNA zu binden, fehlt, entbehren jeglicher Möglichkeit diejenigen Aufgaben, die ihnen in der SHH-Signalkaskade zugeschrieben werden, zu erfüllen. Somit könnten GCPS Fälle mit solchen Mutationen in der ZFD Nullmutanten für GLI3 sein, was mit dem Mechanismus der Haploinsuffizienz, der für dieses Krankheitsbild angenommen wird, vereinbar wäre.

Für Mutationen in der ZFD ist auch ein Effekt auf andere vermutete Funktionen des GLI3 Proteins denkbar. Beispielsweise interagieren Smad Proteine, die in der TGF- β -Signalkaskade eine Rolle spielen, mit einer Region des Maus Gli3, die sich der ZFD anschließt und mit ihr teilweise überlappt (Liu *et al.*, 1998).

Die Frameshift Mutation M309X bedingt möglicherweise den Verlust aller bekannten funktionell wichtigen Regionen inklusive der DNA-Bindungsdomäne.

Die Mutation IVS10+2T>G, die das GT der 5' Spleiß-Stelle des Introns 10 verändert, könnte zu einem GLI3 Protein ohne oder mit verminderter DNA-Bindungsfähigkeit führen je nach aberrantem Spleißmuster. 'Exon skipping' (Überspringen des Exons) würde eine 'in frame' Deletion des Exons 10, das den ersten Zinkfinger kodiert, bedingen. Obwohl dieser nicht direkt am DNA Kontakt beteiligt ist, werden ihm Protein-Protein-Interaktionen mit dem zweiten Zinkfinger zugeschrieben (Pavletich und Pabo, 1993), so dass die Stabilität oder Spezifität der Bindung an die DNA-Erkennungssequenz beeinträchtigt

würde. Auch eine Verkürzung des Proteins durch das veränderte Spleißmuster wäre denkbar.

Die Missense Mutationen C515G und C520Y betreffen den ersten bzw. zweiten Cysteinrest des 2. Zinkfingers. Die Cysteinreste sind für die tetraedrale Koordination der Zinkatome verantwortlich. In bakteriell exprimierten Zinkfingerpeptiden mit diesen Mutationen ist die DNA-Bindung im Vergleich zum Wildtyp-Peptid vollkommen zerstört (M. Wessling; persönliche Mitteilung).

Die Nonsense Mutation K544X befindet sich im H-C Link (Sequenz, durch die das C-terminale Histidin eines Zinkfingers mit dem N-terminalen Cystein des folgenden verbunden ist) zwischen dem zweiten und dritten Zinkfinger. Dies führt zu einem Protein, dem drei der fünf Zinkfinger motive fehlen und das dadurch wahrscheinlich unfähig ist, spezifisch DNA zu binden.

Bei der Deutung, wie sich Mutationen, die ein vorzeitiges Stopcodon verursachen, auf die Funktion des GLI3 Proteins auswirken, ist noch ein weiterer Aspekt einzubeziehen. Der Annahme entgegen folgt diesen Mutationen nicht zwangsläufig die Synthese verkürzter Proteine. Ein Teil der Nonsense-Transkripte wird von der Zelle erkannt und effizient über einen Weg, der als 'nonsense-mediated mRNA decay' (NMD) bezeichnet wird, abgebaut (Culbertson, 1999; Frischmeyer und Dietz, 1999; Hentze und Kulozik, 1999).

Dieser Überwachungsmechanismus ist unter Eukaryoten allgegenwärtig und soll den Organismus vor den dominant-negativen oder 'gain-of-function' Effekten der verkürzten Proteine schützen, die sich sonst ergeben würden, wenn die Nonsense-Transkripte stabil wären.

Wie die Zelle ein vorzeitiges Stopcodon von einem normalen unterscheidet und, wo und wie dieser Vorgang stattfindet, ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Ein Erkennungsmerkmal scheint das Vorhandensein mindestens eines Introns jenseits des Nonsensecodons zu sein. Nonsense-Transkripte von Minigenen ohne Introns entgehen meist dem NMD. Dem so genannten 'translational translocation'-Modell nach nimmt man an, dass das kodierende Potential eines Transkripts bei der Passage durch die Kernporen interpretiert wird noch bevor die 3' Prozessierung abgeschlossen ist.

Ob der Mechanismus des 'NMD' für bestimmte *GLI3* Mutationen operativ ist, müsste durch eine genaue Analyse der vorhandenen mRNA Spezies in *GLI3* exprimierenden Zellen bestimmt werden. Für diese Fragestellung geeignete Fibroblastenkulturen der Patienten liegen in den seltensten Fällen vor und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Ob *GLI3* Mutationen, die die Einführung eines vorzeitigen Stops bedingen, dem 'NMD' unterliegen, hat möglicherweise weite Auswirkungen auf die Genotyp-Phänotyp Korrelation. Würde ein Transkript mit einer relativ weit 5' liegenden Stopmutation (z.B. Q1395X) dem Abbau zugeführt, müsste die Mutation nicht als die partielle Inaktivierung bestimmter Funktionen angesehen werden sondern als komplette Nullmutation.

Die Betrachtung der *GLI3* Mutationen einer großen Anzahl von GCPS-Fällen zeigt, dass der Phänotyp entgegen der These von Biesecker (Biesecker, 1997) nicht nur durch die Veränderung der DNA-Bindungsaktivität verursacht wird. Dem GCPS scheint ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionen des *GLI3* Proteins zugrunde zu liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in 9 von 15 GCPS-Fällen Mutationen innerhalb kodierender Regionen des *GLI3*-Gens detektiert werden. Bedingt durch fehlende experimentelle Aussagen (z.B. bzgl. NMD) sowie durch intrafamiliäre und teilweise sogar intraindividuelle phänotypische Variabilität lassen sich zur Zeit kaum Aussagen über Genotyp-Phänotyp Korrelationen für GCPS Symptome und *GLI3* Mutationen treffen. Gründe dafür mögen stochastische Effekte, modifizierend wirkende Faktoren in der SHH-Signal-kaskade und Paralogie sein.

Für die GCPS-Fälle, bei denen keine Mutation im *GLI3*-Gen gefunden wurde, gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Die verwandte Screening-Methode und Bedingungen erlauben zwar eine hohe aber sicher nicht hundertprozentige Detektionsrate. Mutationen, die eine Veränderungen des *GLI3* mRNA Levels bewirken, der für die normale zeitliche und räumlich Entwicklung notwendig ist, bleiben bei der jetzigen Mutationssuche unberücksichtigt. Möglicherweise wird ein gewisser Teil der GCPS Fälle durch Mikrodeletionen innerhalb der > 250 kb großen *GLI3*-Genregion hervorgerufen. Größere Deletionen wurden häufig zytogenetisch (Tab. 3-6 und 3-7) und in manchen Fällen sogar

durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ausgeschlossen (Patientengruppe II: siehe Tab. 3-7). Zusätzlich ließen sich Deletionen über die Heterozygotität an bekannten polymorphen Stellen innerhalb der codierenden *GLI3* Region ausschließen (z.B. bei den Exon-Fragmenten V-1 und V-2 an Position c.547G>A liefert sie einen nützlichen Polymorphismus). Außerdem orientiert sich die Mutationsdetektion an der klinischen Diagnose. Bei diagnostizierten GCPS Fällen beträgt die Aufdeckungsrate 60% (Kalff-Suske *et al.*, 1999 und diese Arbeit, Tab. 4-3). Bezieht man nur familiäre GCPS Fälle über mehrere Generationen ein, erhöht sich diese Rate erheblich (Kalff-Suske, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Mutationen im *GLI1*- oder *GLI2*-Gen aufgrund zur Zeit nicht aufgeklärter Redundanzen phänotypisch in GCPS Symptomen äußern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erhöhung der Fallzahlen das Spektrums von *GLI3*- Mutationen bei GCPS ergänzt und erweitert hat (siehe Abb. 5-2). Hinsichtlich einer Korrelation zwischen Position der *GLI3* Mutation und beobachtetem Phänotyp sind weitere Erkenntnisse auf funktioneller Ebene (mRNA-Transkript und Proteinebene) notwendig.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alcedo, J. and Noll, M. (1997).

Hedgehog and its patched-smoothed receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface.

Biol. Chem. **378**: 583-590.

Alexandre, C., Jacinto, A. and Ingham, P.W. (1996).

Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the Cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins.

Genes Dev. **10**: 2003-2013.

Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D.-X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H. and Ishii, S. (1997).

Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling.

Nature **386**: 735-738.

Antonarakis, S.E. and the Nomenclature Working Group (1998).

Recommendation for a Nomenclature System for Human Gene Mutations.

Hum. Mutat. **11**: 1-3.

Ausem, M.G.M., Ippel, P.F. and de Renardel, P.A.W.A. (1994).

Greig cephalopolysyndactyly syndrome in a large family: a comparison of the clinical signs with those described in the literature.

Clin. Dysmorph. **3**: 21-30.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994).

"Current Protocols in Molecular Biology".

Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

Baraitser, M., Winter, R.M. and Brett, E.M. (1983).

Greig cephalopolysyndactyly: report of 13 affected individuals in three families.

Clin. Genet. **24**: 257-263.

Biesecker, L.G. (1997).

Strike three for GLI3.

Nature Genet. **17**: 259-260.

Biesecker, L.G. (1998).

Lumping and splitting: molecular biology in the genetics clinic.

Clin. Genet. **53**: 3-7.

- Brueton, L.A., Huson, S.M., Winter, R.M. and Williamson, R.** (1988).
Chromosomal localisation of a developmental gene in man: direct DNA analysis demonstrates that Greig cephalosyndactyly maps to 7p13.
Am. J. Med. Genet. **31**: 799-804.
- Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. and Rüter, U.** (1997).
Evidence for genetic control of *Sonic hedgehog* by *Gli3* in mouse limb development.
Mech. Devel. **62**: 175-182.
- Büscher, D. and Rüter, U.** (1998).
Expression profile of *Gli* family members and *Shh* in normal and mutant mouse limb development.
Dev. Dyn. **221**: 88-96.
- Castilla, E., Paz, J.E., Mutchinick, O., Munoz, E., Giorgiutti, E. and Gelman, Z.** (1973).
Polysyndactyly: a genetic study in South America.
Am. J. Hum. Genet. **25**: 405-412.
- Chen, Y., Gallaher, N., Goddman, R.H. and Smolik, S.M.** (1998).
Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 2349-2354.
- Chen, Y. and Struhl, G.** (1996).
Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog.
Cell **87**: 553-563.
- Chen, Y. and Struhl, G.** (1998).
In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of Hedgehog receptor complex.
Development **125**: 4943-4948.
- Chotai, K.A., Brueton, L.A., van Herwerden, L., Garrett, C., Hinkel, G.K., Schinzel, A., Mueller, R.F., Speleman, F. and Winter, R.M.** (1994).
Six cases of 7p deletion: clinical, cytogenetic and molecular studies.
Am. J. Med. Gen. **51**: 270-276.
- Clarren, S.K., Alvord, E.C. and Hall, J.G.** (1980).
Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus, and postaxial polysyndactyly - A new syndrom?
Part II: Neuropathological considerations.
Am. J. Med. Genet. **7**: 75-83.
- Culbertson, M.R.** (1999).
RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer.
Trends Genet. **15**: 74-80.

Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. and Ishii, S. (1999). Sonic hedgehog-induced activation of the gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* **274**: 8143-8152.

Dean, M. (1996b). Polarity, proliferation and the hedgehog pathway. *Nature Genet.* **14**: 245-247.

Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E. and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science* **272**: 1621-1625.

Drabkin, H., Sage, M., Helms, C., Green, P., Gemmill, R., Smith, D., Erickson, P., Hart, I., Ferguson-Smith, A., Ruddle, F. and Tommerup, N. (1989). Regional and physical mapping studies characterizing the Greig polysyndactyly 3;7 chromosome translocation, (3;7)(p21.1;p13). *Genomics* **4**: 518-529.

Dracopoli, N.C., Haines, J.L., Korf, B.R., Morton, C.C., Seidman, J.G., Moir, D.T. and Smith, D.R. (Ed.) (1994). Current Protocols in Human Genetics. John Wiley & Sons, New York.

Fisher, E. and Scambler, P. (1994). Human haploinsufficiency - one for sorrow, two for joy. *Nature Genet.* **7**: 5-7.

Frischmeyer, P.A. and Dietz, H.C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1893-1900.

Fryns, J.P., (1993). Apparent Greig cephalopolysyndactyly and sinus node disease. *Am. J. Med. Genet.* **45**: 38-40.

Gemmill, R.M., Varella-Garcia, M., Smith, D.I., Erickson, P., Golembieski, W., Miller, Y., Coyle-Morris, J., Tommerup, N. and Drabkin, H.A. (1991). A 2.5-Mb physical map within 3p21.1 spans the breakpoint associated with Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Genomics* **11**: 93-102.

Gollop, T.R. and Fontes, L.R. (1985). The Greig cephalopolysyndactyly syndrome: report of a family and review of the literature. *Am. J. Med. Gen.* **22**:59-68.

- Hall, J.G., Pallister, P.D., Clarren, S.K., Beckwith, J.B., Wiglesworth, F.W., Fraser, F.C., Cho, S., Benke, P.J. and Reed, S.D. (1980).**
Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus, and postaxial polydactyly - a new syndrome?
Part I: Clinical, causal, and pathogenetic considerations.
Am. J. Med. Genet. **7**: 47-74.
- Hall, J.G. (1990).**
Could Acrocallosal syndrome and Greig syndrome affect the same developmental gene?
Am. J. Med. Genet. **36**: 368.
- Hammerschmidt, M., Bitgood, M.J. and McMahon, A.P. (1996).**
Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo.
Genes Dev. **10**: 647-658.
- Hammerschmidt, M., Brook, A. and McMahon, A.P. (1997).**
The world according to hedgehog.
Trends Genet. **13**: 14-21.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. and Sharpe, P.T. (1998).**
The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants.
Development **125**: 2803-2811.
- Hayashi, K. (1991).**
PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA.
PCR Meth. Appl. **1**: 34-38.
- Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1999).**
A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay.
Cell **96**: 307-310.
- Hill, R. and Van Heyningen, V. (1992).**
Mouse mutations and human disorders are paired.
Trends Genet. **8**: 119-120.
- Hogan, B.L.M. (1999).**
Morphogenesis.
Cell **96**: 225-233.
- Hughes, D.C., Allen, J., Morley, G., Sutherland, K., Ahmed, W., Prosser, J., Lettice, L., Allan, G., Mattei, M.-G., Farrall, M. and Hill, R.E. (1997).**
Cloning and sequencing of the mouse Gli2 gene: localization to the *Dominant hemimelia* critical region.
Genomics **39**: 205-215.

Hui, C. and Joyner, A.L. (1993).

A mouse model of Greig cephalopolysyndactyly syndrome: the *extra-toes* mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene.

Nature Genet. **3**: 241-246.

Hui, C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R. and Joyner, A.L. (1994).

Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during post-implantation development.

Dev. Biol. **162**: 402-413.

Innis, J.W. and Mortlock, D.P. (1998).

Limp development: molecular dysmorphology is at hand.

Clin. Genet. **53**: 337-348.

Jiang, J. and Struhl, G. (1998).

Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathway by the F-box/WD40-repeat protein Slimb.

Nature **391**: 493-496.

Johnson, D.R. (1967).

Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse.

J. Embryol. Exp. Morphol. **17**: 543-581.

Johnson, D.L. and Tabin, C. (1995).

The long and short of hedgehog signaling.

Cell **81**: 313-316.

Johnson, D.L. and Tabin, C.J. (1997).

Molecular models for vertebrate limb development.

Cell **90**: 979-990.

Kalderon, D. (1997).

Hedgehog signalling: Ci complex cuts and claps.

Curr. Biol. **7**: 759-762.

Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E.-M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C.M., Ausems, M.G.E.M., Barone, R., Herzog, A., Heutink, P., Homfray, T., Gillissen-Kaesbach, G., König, R., Kunze, J., Meinecke, P., Müller, D., Rizzo, R., Strenge, S., Superti-Furga, A. and Grzeschik, K.-H. (1999).

Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.

Hum. Mol. Genet. **9**: 1769-1777.

Kang, S., Allen, J., Graham, J.M.Jr. Grebe, T., Clericuzio, C., Patronas, N., Ondrey, F., Green, E.D., Schaffer, A., Abbott, M. and Biesecker, L.G. (1997a).

Linkage mapping and phenotypic analysis of autosomal dominant Pallister-Hall syndrome.

J. Med. Genet. **34**: 441-446.

- Kang, S., Graham, J.M.Jr., Haskins Olney, A. and Biesecker, L.G.** (1997b).
GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome.
Nature Genet. **15**: 266-268.
- Kang, S., Rosenberg, M., Ko, V.D. and Biesecker, L.G.** (1997).
Gene structure and allelic expression assay of the human *GLI3* gene.
Hum. Genet. **101**: 154-157.
- Kinzler, K.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Trent, J.M., Law, M.L., O'Brien, S. J., Wong, A.J. and Vogelstein, B.** (1987).
Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma.
Science **236**: 70-73.
- Kinzler, K.W., Ruppert, J.M., Bigner, S.H. and Vogelstein, B.** (1988).
The GLI gene is a member of the Krüppel-related zinc finger proteins.
Nature **223**: 371-374.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.** (1990).
The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome.
Mol. Cell. Biol. **10**: 634-642.
- Krüger, G., Götz, J., Kvist, U., Dunker, H., Erfurth, F., Pelz, L. and Zech, L.** (1989).
Greig syndrome in a large kindred due to reciprocal chromosome translocation t(6;7)(q27;p13).
Am. J. Med. Gen. **32**: 411-416.
- Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H. and Chiang, C.** (1998).
Sonic hedgehog is essential to foregut development.
Nature Genet. **20**: 58-61.
- Liu, F., Massagué, J. and Ruiz i Altaba, A.** (1998).
Carboxy-terminally truncated GLI3 proteins associated with Smads.
Nature Genet. **20**: 325-326.
- Manouvrier-Hanu, S., Holder-Espinasse, M. and Lyonnet, S.** (1999).
Genetics of limb anomalies in humans.
Trends Genet. **15**: 409-417.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A. and Tabin, C.J.** (1996).
Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development.
Dev. Biol. **180**: 273-283.
- Mo, R., Freer, A.M., Zinyk, D., Crackower, M.A., Heng, H.H.-Q., Chik, K.W., Shi, X.-M., Tsui, L.-C., Cheng, S.H., Joyner, A.L. and Hui, C.-C.** (1997).
Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development.
Development **124**: 113-123.
- Moore, G.E.**, (1995).
Molecular genetic approaches to the study of human craniofacial dysmorphologies.
Int. Rev. Cytol. **158**: 215-277.

Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M. and Hui, C. (1998).

Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus.
Nature Genet. **20**: 54-57.

Murone, M., Rosenthal, A. and Sauvage, F.J. (1999).

Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex.
Curr. Biol. **9**: 76-84.

Ohlmeyer, J.T. and Kalderon, D. (1997).

Dual pathway for induction of wingless expression by protein kinase A and Hedgehog in *Drosophila* embryos.
Genes Dev. **11**: 2250-2258.

Ohlmeyer, J.T. and Kalderon, D. (1998).

Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator.
Nature **396**: 749-753.

Orenic, T.V., Slusarski, D., Kroll, K.L. and Holmgren, R.A. (1990).

Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus
Dominant of *Drosophila*.
Genes Dev. **4**: 1053-1067.

Perler, F.B. (1998).

Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function and evolution.
Cell **92**: 1-4.

Perrimon, N. (1995).

Hedgehog and Beyond.
Cell **80**: 517-520.

Persengiev, S.P., Kondova, I.I., Millette, C.F. and Kilpatrick, D.L. (1997).

Gli family members are differentially expressed during the mitotic phase of spermatogenesis.
Oncogene **14**: 2259-2264.

Pettigrew, A.L., Greenberg, F., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1991).

Greig syndrome associated with an interstitial deletion of 7p: confirmation of the localization of Greig syndrome to 7p13.
Hum. Genet. **87**: 452-456.

Platt, K.A., Michaud, J. and Joyner, A.L. (1997).

Expression of the mouse Gli and Ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice.
Mech. Dev. **62**: 121-135.

Price, M.A. and Kalderon D. (1999).

Proteolysis of cubitus interruptus in *Drosophila* requires phosphorylation by protein kinase A.
Development **126**: 4331-4339.

Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H.S., Patel, U.C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Singh, D., Blouin, J.-L., Solanki, J.V., Grzeschnik, K.-H. and Antonarakis, S.E. (1999).

The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV (PPD-IV) and postaxial polydactyly type-A/B (PAP-A/B); no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations.

Am. J. Hum. Genet. **65**: 645-655.

Radhakrishna, U., Blouin, J.-L., Mehenni, H., Patel, U.C., Patel, M.N., Solanki, J.V. and Antonarakis, S.E. (1997a).

Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis.

Am. J. Hum. Genet. **60**: 597-604.

Radhakrishna, U., Wild, A., Grzeschik, K.-H. and Antonarakis, S.E. (1997b).

Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A.

Nature Genet. **17**: 269-271.

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E. and Tabin, C. (1993).

Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA.

Cell **75**: 1401-1416.

Riddle, R.D. and Tabin, C. (1999).

Wie Arme und Beine entstehen.

Spektrum der Wissenschaft **9**: 62-68.

Ruiz i Altaba, A. (1997).

Catching a Gli-mouse of Hedgehog.

Cell **90**: 193-196.

Ruiz i Altaba, A. (1999).

Gli proteins and Hedgehog signaling in development and cancer.

TIG **15**: 418-425.

Ruppert, J.M., Kinzler, K.W., Wong, A.J., Bigner, S.H., Kao, F.T., Law, M.L., Seuanez, H.N., O'Brien, S.J. and Vogelstein, B. (1988).

The GLI-Krüppel family of human genes.

Mol. Cell. Biol. **8**: 3104-3113.

Ruppert, J.M., Vogelstein, B., Arheden, K. and Kinzler, K.W. (1990).

GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity.

Mol. Cell. Biol. **10**: 5408-5415.

Ruppert, J.M., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1991).

The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A.

Mol. Cell. Biol. **11**: 1724-1728.

- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H.** (1999).
Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.
Development **126**: 3915-3924.
- Sauer, F. and Jäckle, H.** (1993).
Dimerization and the control of transcription by Krüppel.
Nature **364**: 454-457.
- Schimmang, T., Lemaistre, M., Vortkamp, A. and Rüther, U.** (1992).
Expression of zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt).
Development **116**: 799-804.
- Schimmang, T., van der Hoeven, F. and Rüther, U.** (1993).
Gli3 expression is affected in the morphogenetic mouse mutants add and Xt.
Prog. Clin. Biol. Res. **383A**: 153-161.
- Schinzel, A.** (1982).
Editorial comment: Acrocallosal syndrome.
Am. J. Med. Gen. **12**: 201-203.
- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. and Kronberg, T.B.** (1995).
Analysis of cubitus interruptus regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks.
Development **121**: 1625-1635.
- Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W. and Stone, E.M.** (1993).
The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base substitution.
Genomics **16**: 325-332.
- Shin, S.H.**, (1999).
GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila* Cubitus interruptus protein functions and localization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 2880-2884.
- Slusarski, D.C., Motzny, C.K. and Holmgren R.** (1995).
Mutations that alter the timing and pattern of cubitus interruptus gene expression in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **139**: 229-240.
- Sobetzko, D., Eich, G., Kalff-Suske, M., Grzeschik, K.-H. and Superti-Furga, A.** (2000).
Boy with syndactylies, macrocephaly, and severe skeletal dysplasia: not a new syndrome, but two dominant mutations (GLI3 E543X and COL2A1 G973R) in the same individual.
Am. J. Med. Genet. **90**: 239-242.
- Sommer, A., Young-Wee, T. and Frye, T.** (1983).
Previously undescribed syndrome of craniofacial, hand anomalies, and sensorineural deafness.
Am. J. Med. Genet. **15**: 71-77.

Stone, D.M., Murone, M., Luoh, S., Ye, W., Armanini, M.P., Gurney, A., Phillips, H., Brush, J., Goddard, A., deSauvage, F.J. and Rosenthal A. (1999).

Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli.

J. Cell Sci. **122**: 4437-4448.

Tabin, C.J. (1991).

Factors: toward molecular models for limb development.

Cell **66**: 199-217.

Tajbakhsh, S. and Spörle, R. (1998).

Somite development: constructing the vertebrate body.

Cell **92**: 9 -16.

Tommerup, N. and Nielsen, F. (1983).

A familial reciprocal translocation t(3;7)(p21.1;p13) associated with the Greig polysyndactyly-craniofacial anomalies syndrome.

Am. J. Med. Gen. **16**: 313-321.

Topp, J. (1997).

Funktionelle Charakterisierung des Kandidatengens für das Greig Cephalopolysyndaktylie Syndrom, GLI3.

Diplomarbeit im Studiengang Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg.

van den Heuvel, M. and Ingham P.W. (1996).

smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling.

Nature **382**: 547-551.

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Vortkamp, A. and Rüther, U. (1993).

Molecular linkage of the morphogenetic mutation add and the zinc finger gene Gli3.

Mamm. Genome **4**: 276-277.

Ventruto, V., Theo, G., Celona, A., Fioretti, G., Pagano, L., Stabile, M. and Cavaliere, M.L. (1980).

A and B postaxial polydactyly in two members of the same family.

Clin. Genet. **18**: 342-347.

von Ohlen, T., Lessing, D., Nusse, R. and Hooper, J.E. (1997).

Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2404-2409.

Vortkamp, A. (1991a).

Molekularbiologische Charakterisierung von Differenzierungsmutanten (Greig-Syndrom) beim Menschen.

Dissertationsarbeit, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.

- Vortkamp, A., Thias, U., Gessler, M., Rosenkranz, W., Kroisel, P.M., Tommerup, N., Krüger, G., Götz, J., Pelz, L. and Grzeschik, K.-H. (1991b).**
A somatic cell hybrid panel and DNA probes for physical mapping of human chromosome 7p.
Genomics **11**: 737-743.
- Vortkamp, A., Gessler, M. and Grzeschik, K.-H. (1991c).**
GLI3 zinc finger gene interrupted by translocation in Greig syndrome families.
Nature **352**: 539-540.
- Vortkamp, A., Franz, T., Gessler, M. and Grzeschik, K.-H. (1992).**
Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (Xt).
Mamm. Genome **3**: 461-463.
- Vortkamp, A., Gessler, M., Le Paslier, D., Elaswarapu, R., Smith, S. and Grzeschik, K.-H. (1994).**
Isolation of a yeast artificial chromosome contig spanning the Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) gene region.
Genomics **22**: 563-568.
- Vortkamp, A., Heid, C., Gessler, M. and Grzeschik, K.-H. (1995a).**
Isolation and characterization of a cosmid contig for the GCPS gene region.
Hum. Genet. **95**: 82-85.
- Vortkamp, A., Gessler, M. and Grzeschik, K.-H. (1995b).**
Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein.
DNA and Cell. Biol. **14**: 629-634.
- Wagner, K., Kroisel, P.M. and Rosenkranz, W. (1990).**
Molecular and cytogenetic analysis in two patients with microdeletion of 7p and Greig syndrome: hemizygoty for PGAM2 and TCRG genes.
Genomics **8**: 487-491.
- Walterhouse, D., Ahmed, M., Slusarski, D., Kalamaras, J., Boucher, D., Holmgren, R. and Innaccone, P. (1993).**
Gli, a zinc finger transcription factor and oncogene, is expressed during normal mouse development.
Dev. Dyn. **196**: 91-102.
- Wang, B.; Fallon, J.F. and Beachy, P.A. (2000).**
Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb.
Cell **100**: 423-434.
- Wang, G., Wang, B. and Jiang, J. (1999).**
Protein kinase A antagonizes Hedgehog signaling by regulating both the activator and repressor forms of Cubitus interruptus.
Genes. Dev. **13**: 2828-3837.

White, M., Carvalho, M., Derse, D., O'Brien, S.J. and Dean, M. (1992).
Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms.
Genomics **12**: 301-306.

Whitsett, J. (1998).
A lungful of transcription factors.
Nature Genet. **20**: 7-8.

Wild, A. (1998)
Molekularbiologische Charakterisierung des Zinkfingergens *GLI3* und seiner Mutationen bei erblichen Entwicklungsstörungen
Dissertationsarbeit, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.

Wild, A., Kalff-Suske, M., Vortkamp, A., Bornhold, D., König, R. and Grzeschik, K.-H. (1997).
Point mutations in human *GLI3* cause Greig syndrome.
Hum. Mol. Genet. **6**: 1979-1984.

Williams, P.G., Hersh, J.H., Yen, F.F., Barch, M.J., Kleinert, H.E., Kunz, J. and Kalff-Suske, M. (1997).
Greig cephalopolysyndactyly syndrome: altered phenotype of a microdeletion syndrome due to the presence of a cytogenetic abnormality.
Clin. Genet. **52**: 436-441.

Winter, R.M. (1988).
Malformation syndromes: a review of mouse/human homology.
J. Med. Genet. **25**: 480-487.

Winter, R.M. and Huson, S.M. (1988).
Greig cephalopolysyndactyly syndrome: a possible mouse homologue (Xt-extra toes).
Am. J. Med. Gen. **31**: 793-798.

7. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
AA	Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinder-Serum-Albumin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFR</i> -Gen	Epidermal Growth Factor Receptor-Gen
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaare
Mb	Megabasenpaare
MIM	Identifikationsnummer im Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten (MIM= Mendelian Inheritance in Man; McKusick <i>et al.</i> , 1994)
min	Minute
$\mu\text{l}/\mu\text{M}$	Mikroliter/Mikromolar
mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
Mt	Mutante
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
OD	Optische Dichte
p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SSCA	Single strand conformation analysis = Einzelstrang-Konformations-Analyse
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquatus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen- diamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Upm _{max}	Maximale Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
Vol	Volumen
% v/v	Volumenprozent
Wt	Wildtyp
% w/v	Gewichtsprozent
YAC	yeast artificial chromosome

Standardabkürzungen, die gemäß den Autoreninformationen des European Journal of Biochemistry ohne Definition gebraucht werden können, sind nicht angegeben.

8. PUBLIKATIONEN

Grzeschik, K.-H., Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H.
Mutations affecting different functional motifs of GLI3 associated with Greig
cephalopolysyndactyly syndrome.
American Society of Human Genetics, San Francisco (USA), November 1999.

**Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E.-M., Bornholdt, D.,
Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C.M., Ausems, M.G.E.M., Barone, R., Herzog, A.,
Heutink, P., Homfray, T., Gillessen-Kaesbach, G., König, R., Kunze, J., Meinecke, P.,
Müller, D., Rizzo, R., Streng, S., Superti-Furga, A. and Grzeschik, K.-H.** (1999).
Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
Hum. Mol. Genet. **9**: 1769-1777.

**Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Heuer, H., Engel, H., Castellan, C.,
de Die-Smulders, C., Brunner, H.G., Dyack, S., Fuchs, S., Matthijs, G.
and Grzeschik, K.-H.** (2000).
GLI3 mutations in Greig cephalopolysyndactyly syndrome and Pallister-Hall syndrome.
Hum. Genet., on line submission.

9. Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität zu Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Arnold; Aumüller; Barth; Basler; Baum; Beato; Bertalanaffy; Bien; Bolm; Cetin; Christiansen; Czubayko; Daut; Feuser; Fruhstorfer; Gemsa; Geus; Gotzen; Gressner; Griss; Gröne; Grzeschik; Habermehl; Happle; Hasilik; Hellinger; Hesse; Hofmann; Joseph; Kaiser; Kern; Kleine; Klenk; Klose; Koch; Koolman; Kretschmer; Krieg; Kroll; Kuhn; Lang; Lange; Lennartz; Maisch; Moll; Moosdorf; Mueller; Neubauer; Oertel; Rehder; Remschmidt; Röhm; Rothmund; Schachtschabel; Schäfer; Schmidt; Schnabel, Schüffel; Schulz; Schulze; Schwarz; Seifart; Seitz; Seyberth; Slenczka; Steininger; Sturm; Vohland; Voigt; v. Wichert; Weihe; Werner; Westermann; Wilhelm.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Heike Heuer
Geburtsdatum:	26.01.1976
Geburtsort:	Pforzheim
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule in Hardt
1986 – 1995	Gymnasium in Schramberg
	Abschluss: allg. Hochschulreife

Universitätsausbildung

09.1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
09.1997	Ärztliche Vorprüfung
09.1998	1. Staatsexamen
03.2001	2. Staatsexamen
04.2002	3. Staatsexamen

Famulaturen

1998	Innere Medizin im Ev. Krankenhaus Oberhausen
1999	Gynäkologie und Geburtshilfe im Ev. Krankenhaus Oberhausen
2000	Praxis für Allgemeinmedizin in Marburg

Praktisches Jahr

Innere Medizin, Universitätsklinikum Marburg
Allgemein- und Unfallchirurgie,
Universitätsklinikum Marburg
Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Marburg

9.3 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik danke ich für Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, diese Arbeit am Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg durchzuführen und für seine freundliche Betreuung.

Frau Dr. Martha Kalff-Suske danke ich für die intensive und liebevolle Betreuung, für die Korrektur meiner Manuskripte, die anregenden Ratschläge und das jederzeit offene Ohr für weitergehende Fragen.

Frau Dorothea Bornholdt danke ich für Zeit und Geduld bei der Einarbeitung in die Labormethoden, für die Hilfe bei der DNA-Extraktion und die wertvollen Ratschläge in Bezug auf die Dokumentation der Ergebnisse und nicht zuletzt für viele kompetente Tips in „Notfällen“.

Frau Martina Wessling danke ich für die vielen Stunden freundschaftlicher Zusammenarbeit und ihr liebevolles Aufmuntern in einer anstrengenden Zeit.

Herrn Hartmut Engel danke ich für die Hilfe beim Sequenzieren der DNA und der Konvertierung der Bilder.

Frau Dr. Anja Wild danke ich für die wegberreitende Funktion ihrer Dissertation, mit der sie die Grundlage für diese Arbeit geschaffen hat.

Frau Prof. Dr. Manuela Koch danke ich für die Bereitstellung der Kontroll-DNA.

Danken möchte ich auch der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Manuela Koch für die nette und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Allen Patienten und Familien möchte ich für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an den Untersuchungen danken.

Besonders danke ich meinen Eltern, die immer hinter mir gestanden und meinen Werdegang in Liebe begleitet haben.

Ein herzliches Danke auch an meine Zweitfamilie Goebel, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert.

Ganz herzlich danke ich Margret und Kurt Baumgartner, die schon so viele Jahre meine liebevollen und treuen Wegbegleiter sind.

Ein Dankeschön auch an meine Freunde für ihre Geduld und das liebevolle „Da-sein“.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Mutationsanalysen bei GLI3-Morphopathien“

im Med. Zentrum für Humangenetik unter Leitung von Prof. Dr. K.-H. Grzeschik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Grzeschik, K.-H., Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H.
Mutations affecting different functional motifs of GLI3 associated with Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
American Society of Human Genetics, San Francisco (USA), November 1999.

Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E.-M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C.M., Ausems, M.G.E.M., Barone, R., Herzog, A., Heutink, P., Homfray, T., Gillessen-Kaesbach, G., König, R., Kunze, J., Meinecke, P., Müller, D., Rizzo, R., Streng, S., Superti-Furga, A. and Grzeschik, K.-H. (1999).
Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome.
Hum. Mol. Genet. 9: 1769-1777.

Kalff-Suske, M., Wessling, M., Bornholdt, D., Heuer, H., Engel, H., Castellan, C., de Die-Smulders, C., Brunner, H.G., Dyack, S., Fuchs, S., Matthijs, G. and Grzeschik, K.-H. (2000).
GLI3 mutations in Greig cephalopolysyndactyly syndrome and Pallister-Hall syndrome.
Hum. Genet., on line submission.

Marburg, den

