

**Forschungszentrum Karlsruhe**

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6461

Spezifizierung der Körperachsen:  
Die Rolle von Homeobox-Transkriptionsfaktoren der  
*gooseoid* und *Pitx*-Genfamilien während der  
frühen Embryogenese der Wirbeltiere

Axel Schweickert

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
2000

# **Spezifizierung der Körperachsen: Die Rolle von Homeobox-Transkriptionsfaktoren der *gooseoid* und *Pitx*-Genfamilien während der frühen Embryogenese der Wirbeltiere**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Axel Schweickert**

Karlsruhe

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.1999

Referent: PD Dr. M. Blum

1. Korreferent: Prof. Dr. P. Herrlich

2. Korreferent: PD Dr. H. Steinbeisser

# Zusammenfassung

Die antero-posteriore, dorso-ventrale und Links-Rechts-Achse des Wirbeltierbauplans wird früh in der Embryonalentwicklung festgelegt. Transkriptionsfaktoren vom Homeobox-typ spielen in allen Phasen der Achsenentwicklung eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurden zwei Homeobox-gene, *gooseoid* und *Pitx2*, untersucht, die an der Entstehung von Körperachsen ursächlich beteiligt sind.

In den 20er Jahren identifizierten Hans Spemann und Hilde Mangold in Amphibienembryonen die dorsale Urmundlippe als Organisator der Gastrulation und somit der Achsenentwicklung. In den klassischen Transplantations-experimenten konnten sie nachweisen, dass verpflanztes Organisator-Gewebe in Empfängerembryonen eine komplette neue Körperachse induzieren konnte. Das Homeoboxgen *gooseoid* (*gsc*) wird im Organisator der Wirbeltiere exprimiert, und besitzt in Fehl-expressionsexperimenten ebenfalls eine Achsen-induzierende Eigenschaft. Die gezielte Inaktivierung des *gsc* Gens in der Maus resultiert jedoch nicht in einem Achsendefekt. Um eine komplementierende Genaktivität in der *gsc* Nullmutante nachzuweisen wurde im Rahmen der Dissertation ein zweites *gsc* Gen (*gsc2*) in der Maus kloniert. In der Expressionsanalyse konnte jedoch keine *gsc2* Transkription im Organisator von Gastrulaembryonen detektiert werden. Dies schloss *gsc2* als komplementierende Genaktivität in der *gsc* Nullmutante aus.

Die Links-Rechts Achse der Wirbeltiere ist charakterisiert durch die asymmetrische Lage der inneren Organe, Herz, Lunge und Gastrointestinaltrakt (Situs solitus). In der Embryonalentwicklung können drei Phasen der Lateralität-entstehung unterschieden werden. 1. Bruch der bilateralen Symmetrie. 2. Asymmetrische Genexpression in Organisator und Seitenplattenmesoderm (SPM). 3. Asymmetrische Organmorphogenese. Das Homeoboxgen *Pitx2* dient als Mediator zwischen dem *TGF $\beta$*  ähnlichen Wachstumsfaktor *nodal* im linken SPM und der asymmetrischen Organmorphogenese, und vermag in Missexpressionen in Frosch und Huhn den Situs umzukehren. In dieser Arbeit wurden zwei *Pitx2* Isoformen im Frosch *Xenopus leavis* kloniert und analysiert. Nur *Pitx2A*, nicht *Pitx2B*, war asymmetrisch im linken SPM, Herz und Darm exprimiert, und spezifisch durch *nodal* induziert. *Pitx2A* stellt somit die linke Isoform dar, welche funktionell in der Entstehung von Lateralität beteiligt ist. Funktionelle Experimente lassen darauf schließen, dass *Pitx2A* in einer negativen Rückkopplungsschleife die *nodal* Expression im linken SPM beendet, um zeitgleich durch Autoinduktion seine eigene Expression sicherzustellen. Zusätzlich wird in dieser Arbeit die embryonale Expression der *Pitx2* Isoformen und von *Pitx1* in *Xenopus* beschrieben.

# Specification of body axis: The role of homeobox transcription factors of the *gooseoid* and *Pitx* gene families during early vertebrate embryogenesis

## Abstract

The vertebrate body axes antero-posterior, dorso-ventral and left-right are determined during early embryogenesis. In all phases of axis development transcription factors of the homeobox family play a pivotal role. In this work two important homeobox genes in axis formation, *gooseoid* and *Pitx2*, were analysed.

In the early 20<sup>th</sup> century Hans Spemann und Hilde Mangold identified the upper dorsal blastopore lip as the amphibian organiser of gastrulation. Their classical experiments showed that the transplantation of organiser tissue into a host embryo induced the formation of a complete secondary axis. The homeobox gene *gooseoid* (*gsc*) is expressed in all vertebrate organisers and has an axis-inducing potential in misexpression experiments. Targeted inactivation of the *gsc* gene in the mouse did not however result in any axis defects. To investigate the postulated compensatory gene activity in the *gsc* mutant, a second *gsc* gene (*gsc2*) was cloned. The expression analysis could not however detect any *gsc2* transcription in the organiser of gastrulating mouse embryos. *gsc2* therefore is not the compensating gene activity in the *gsc* null mutant.

The vertebrate left-right axis is characterised by the asymmetric position of the inner organs such as heart, lung and gastrointestinal tract. During embryogenesis the development of laterality can be divided into three phases. 1. Breakage of bilateral symmetry. 2. Asymmetric gene expression in the organiser and lateral plate mesoderm (LPM). 3. Asymmetric organ morphogenesis. The homeobox gene *Pitx2* serves as a mediator between *nodal*, a *TGF $\beta$*  like growth factor, in the left LPM and the asymmetric organ morphogenesis. Misexpression of *Pitx2* in chick and frog leads to inversion of the organ situs. In this work two *Pitx2* isoforms were cloned and analysed in the frog *Xenopus laevis*. Only the *Pitx2A* isoform, not *Pitx2B*, was asymmetrically expressed on the left side of the LPM, heart and gut, and was specifically induced by *nodal*. *Pitx2A* is therefore the left isoform which is functionally involved in the development of laterality. Functional experiments suggest that *Pitx2A* acts in a negative feedback loop to end *nodal* expression in the left LPM, and that *Pitx2A* maintains its own transcription in a positive autoregulatory feedback loop after the downregulation of *nodal*. Additionally this work presents the embryonic expression patterns of *Pitx2* isoforms and *Pitx1* in *Xenopus*.

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Klassische Experimente	1
1.2 Entwicklungsgenetik	5
1.3 Homeoboxgene	7
1.4 Die dorso-ventrale Achse	9
1.5 <i>gooseoid</i>	11
1.6 Die Links-Rechts Asymmetrie der Wirbeltiere	13
1.6.1 Klassische Studien	14
1.6.2 Die Entstehung von Lateralität während der Embryogenese	16
1.6.2.1 Phase 1: Bruch der embryonalen Symmetrie	16
1.6.2.2 Phase 2: Die Links - Rechts Signalkaskade bei Huhn, Maus und Frosch	19
1.6.2.3 Phase 3: Asymmetrische Organogenese von Herz und Darm	22
1.6.3 Das Homeoboxgen <i>Pitx2</i> : Mediator zwischen asymmetrischem <i>nodal</i> Signal im linken Seitenplattenmesoderm und asymmetrischer Organmorphogenese	23
1.6.4 Ziele der Arbeit	25
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
2.1 Klonierung eines <i>gooseoid</i> ( <i>gsc</i> ) verwandten Gens der Maus	25
2.2 Klonierung, Expressionsanalyse und Regulation des Homeoboxgens <i>Pitx2</i> während der Entwicklung der Links-Rechts Asymmetrie	31
2.2.1 Klonierung des Homeoboxgens <i>Pitx2</i> im Frosch <i>Xenopus laevis</i> und Zebrafisch	31
2.2.2 Vergleichende Expressionsanalyse von <i>Pitx2A</i> , <i>Pitx2B</i> und <i>Pitx1</i> während der Froschentwicklung von der Gastrula bis zur Kaulquappe	36
2.2.2.1 Klebdrüse	38
2.2.2.2 Stomodäum-Hypophyse	40
2.2.2.3 Auge	41
2.2.2.4 Gehirn	41

2.2.2.5	Seitenplattenmesoderm.....	43
2.2.2.6	Darm.....	44
2.2.2.7	Herz.....	45
2.2.3	Konservierte asymmetrische Expression von <i>Pitx2</i> im linken Seitenplattenmesoderm der Wirbeltiere.....	46
2.3	Funktionelle Analyse von <i>Pitx2</i> .....	47
2.3.1	<i>Pitx2</i> und Klebdrüse.....	47
2.3.1.1	Phänotypische Analyse von <i>Xenopus</i> -Kaulquappen nach <i>Pitx2</i> Missexpression.....	47
2.3.1.2	Klebdrüseninduktion durch <i>Pitx2A</i> und <i>Pitx2B</i> im animalen Polkappentest.....	49
2.3.2	Die Rolle der <i>Pitx2</i> Isoformen bei der Entstehung der Links-Rechts Achse.....	51
2.3.2.1	<i>Pitx2</i> und die linke Signalkaskade.....	51
2.3.2.2	Induktion von <i>Pitx2A</i> , aber nicht <i>Pitx2B</i> durch <i>nodal</i> und <i>activin</i> .....	54
2.3.2.3	Repression von <i>Xnr1</i> durch <i>Pitx2</i> im linken Seitenplattenmesoderm und im Polkappentest.....	57
2.3.2.4	Induktion von <i>Pitx2A</i> spezifischer Transkription nach ektopischer Expression von <i>Pitx2B</i> im Embryo und im animalen Polkappentest.....	59
2.3.2.5	Autoinduktion von <i>Pitx2A</i> .....	62
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
3.1	Das zweite <i>gooseoid</i> Gen ( <i>gsc2</i> ) der Maus.....	64
3.2	<i>Pitx2</i> in <i>Xenopus laevis</i> : Expression und Funktion der verschiedenen Isoformen.....	66
3.2.1	Die <i>Pitx</i> Genfamilie und Entwicklung der Klebdrüsen.....	66
3.2.1.1	Klebdrüseninduktion durch <i>Pitx2</i> Missexpression.....	69
3.2.1.2	<i>Pitx1</i> und Klebdrüse.....	71
3.2.1.3	Was lässt sich für die Klebdrüsenentwicklung ableiten?.....	72
3.2.2	Stomodeum-Hypophysen-Anlage.....	72
3.2.3	<i>Pitx1</i> .....	73

3.2.4	Das Homeoboxgen <i>Pitx2</i> und die Entstehung der Links-Rechts Asymmetrie.....	74
3.2.4.1	<i>Pitx2</i> Isoformen und die Links-Rechts Kaskade.....	74
3.2.4.2	Activin und die Links-Rechts Kaskade.....	75
3.2.4.3	<i>Pitx2A</i> / <i>Pitx2B</i> Protein-Funktionen.....	77
3.2.4.4	<i>Pitx2</i> und Krankheit.....	80

#### **4. Material und Methoden ..... 82**

4.1	Behandlung von Nukleinsäuren.....	82
4.1.1	Photometrische Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren.....	82
4.1.2	Ausfällung von Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen.....	82
4.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele.....	82
4.2	Präparationen von DNA.....	83
4.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	83
4.2.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	83
4.2.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem DNA Purifikation Kit Easy Pure (Biozym).....	84
4.3	Präparation von RNA.....	84
4.3.1	Extraktion von RNA aus Froschembryonen und animalen Polkappen mit dem PeqGOLD TriPure Kit (Peqlab).....	84
4.4	Klonierungstechniken.....	85
4.4.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	85
4.4.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	85
4.4.3	Subklonierung von PCR Produkten mit dem TOPO Cloning Kit (Invitrogen).....	85
4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	86
4.5.1	Standart PCR-Protokoll.....	86
4.5.2	Modifiziertes PCR-Protokoll.....	86
4.5.3	Semiquantitative RT-PCR.....	87
4.5.4	PCR-Oligos: DNA-Sequenz, Produktlänge und Hybridisierungsbedingungen.....	87

4.6 Markierung von DNA mit Radionukleotiden.....	88
4.6.1 „random priming“ von doppelsträngiger DNA.....	88
4.7 Durchsuchung einer Phagen cDNA Bibliothek.....	89
4.7.1 Vorbereitung der Wirtsbakterien.....	89
4.7.2 Ausplattieren und Titerbestimmung.....	89
4.7.3 Hybridisierungs- und Waschbedingungen.....	89
4.7.4 Plattieren der cDNA-Bibliothek.....	90
4.7.5 Filterabzüge: Transfer von Phagen auf Nylon-Filter (Hybond+, Amersham).....	90
4.7.6 Denaturierung und Fixierung der Phagen-DNA auf Nylonfilter.....	90
4.7.7 Hybridisierung und Identifikation von positiven Klonen.....	90
4.7.8 Rescreening.....	91
4.7.9 Subklonierung mit dem Lambda Zap II Phagen System.....	91
4.8 Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Didesoxymethode.....	92
4.9 Transkription von Nukleotidsequenzen.....	93
4.9.1 Erst-Strang-Synthese mit der SUPERSCRIPT II Rnase H <sup>-</sup> Reversen Transkriptase (GIBCO).....	93
4.9.2 Transkription von Plasmid-DNA zur Herstellung Digoxigenin markierter RNA.....	94
4.9.3. Radioaktive Markierung von <i>gsc2</i> und <i>gsc</i> RNA durch in vitro Transkription.....	94
4.9.4 <i>Pitx2A</i> und <i>Pitx2B</i> mRNA Synthese für <i>Xenopus</i> Injektionen.....	95
4.10 In situ Hybridisierung.....	95
4.10.1 In situ Hybridisierung im Ganzpräparat.....	95
4.10.2 Radioaktive In situ Hybridisierung an Gewebeschnitten.....	96
4.10.2.1 Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Glasfärbegestellen.....	96
4.10.2.2 Isolierung und Fixieren von Embryos.....	96
4.10.2.3 Einbetten von Embryos und Anfertigen von histologischen Schnitten.....	96
4.10.2.4 Vorbehandlung der Gewebeschnitte (Prähybridisierung).....	97
4.10.2.5 Hybridisierungsreaktion.....	97



4.10.2.6	Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte.....	98
4.10.2.7	Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion.....	98
4.10.2.8.	Entwickeln, Färben und Auswerten der Schnitte.....	99
4.11	<i>Xenopus laevis</i> ; Embryologische Methoden.....	99
4.11.1	In vitro Fertilisation und Embryo Kultivierung.....	99
4.11.2	Explantation und Kultivierung animaler Polkappen.....	99
4.11.3	mRNA- und DNA Vektor - Injektionen.....	100
<b>5.</b>	<b>Material.....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>109</b>

# 1. Einleitung

Die Embryonalentwicklung von der befruchteten Eizelle über die Gastrulation (Entstehung der Keimblätter: Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) zu einem reifen Organismus ist geprägt von der positionsabhängigen Differenzierung von Organen und Geweben entlang der Körperachsen. Das Ziel der experimentellen Embryologie ist es, die zeitlichen und örtlichen Mechanismen aufzuzeigen, die dieser Achsenentwicklung zu Grunde liegen. Die molekulare Entwicklungsbiologie bedient sich hierfür der Identifikation und der Analyse von embryonal aktiven Genen.

## 1.1 Klassische Experimente

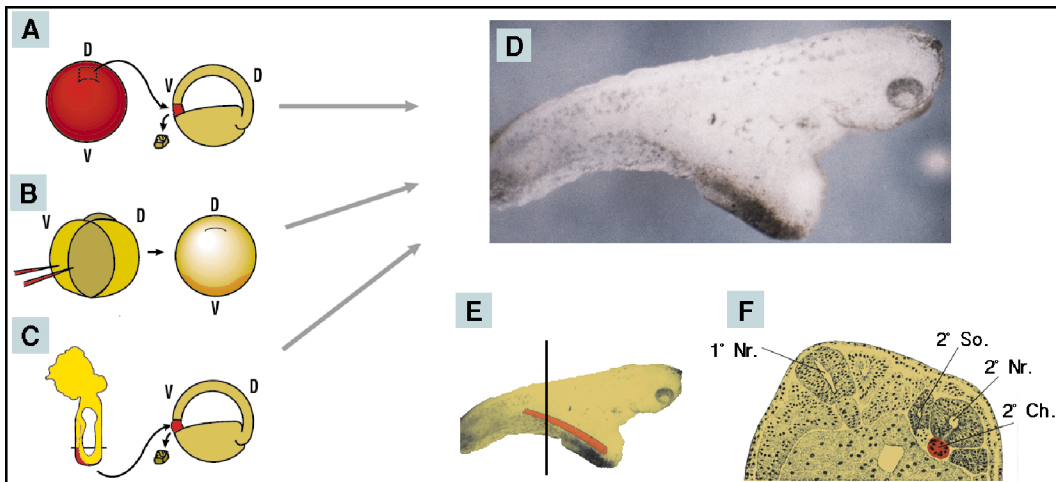
Die Beschreibung der Normalentwicklung ist eine Voraussetzung für die Interpretation von experimentellen Manipulationen. Drei klassische experimentelle Ansätze werden im folgenden dargestellt, die für das Verständnis der Achsenentwicklung von herausragender Bedeutung sind. Im einzelnen sind dies die Aufklärung des Anlageplans des Amphibienembryos durch Vogt und die Identifizierung der für die Achsenentwicklung wichtigen Signalzentren durch Spemann und Nieuwkoop.

## **Vogt**

Vogt analysierte bei mehreren Amphibienarten (Axolotl und Molch) das Entwicklungsschicksal verschiedener embryonaler Regionen während der Gastrulation (Vogt, 1929). Dazu applizierte er Agarstückchen, welche mit Vitalfarbstoffen (z.B. Neutral Rot) saturiert waren, auf äussere Bereiche der Embryonen und färbte sie somit an. Die Position der Färbungen wurden während der Gastrulation und der späteren Entwicklung verfolgt, identifiziert und in einer Anlagen-Karte zusammengefasst. Vogt konnte so nachweisen, dass nur bestimmte dorsale Regionen der animalen Hemisphäre des Prägastrula-Embryos zu neuralem Gewebe differenzierten, während sich die ventralen Anteile hauptsächlich zu Oberflächenektoderm entwickelten. Desweiteren identifizierte er eine zwischen dem animalen und vegetativen Pol liegende, äquatoriale Region, die mesodermale Randzone, welche in dorso-ventraler Abfolge die Anlagen des embryonalen Stützgewebes (Chorda dorsalis), der Somiten und des lateralen Mesoderms darstellte (Vogt, 1929).

## **Spemann**

In den klassischen manipulativen Experimenten von Hans Spemann und Hilde Mangold gelang es in den 20er Jahren, die dorsale Urmundlippe von Amphibien als einen Organisator für die Gastrulation zu identifizieren (Abb.1 und 3, Spemann und Mangold, 1924). Die dorsale Urmundlippe wird erkennbar durch die beginnende Invagination der dorsalen mesodermalen Randzone (des zukünftigen prächordalen bzw. chordalen Mesoderms). Spemann's Experimente, in denen dorsale Urmundlippen von Gastrulae isoliert und in die ventrale Randzone von Empfängerembryonen transplantiert wurden, führten zur Ausbildung sekundärer Körperachsen (Abb.1). Das transplantierte Organistorgewebe differenzierte sich in diesen sekundären Achsen herkunftsgemäß und zellautonom zu embryonalem Stützgewebe (Chorda dorsalis), während Neuralrohr und Somiten induziert wurden, das heisst aus Wirtsgewebe entstanden (Abb.1).



**Abb.1 Der Spemann-Organisator und die Entstehung der Körperachsen.**

Siamesische Zwillingsskualquappen (D; E) entstehen nach (A) Transplantation der oberen Urmundlippe (Spemann Organisator, rot) auf die ventrale Seite des Empfängerembryos (grün); (B) Mikroinjektion von *goosecoid* mRNA (rot) in ventrale Zellen eines 4 Zell-Froschembryos (grün); (C) Transplantation des Maus-Knotens (rot), in einen Frosch-Empfängerembryo (grün). (E) Schematische Darstellung der Zwillingsskualquappe. Das embryonale Stützgewebe (Chorda dorsalis; Ch.) der Sekundärachse, das sich herkunftsgemäß aus der transplantierten dorsalen Urmundlippe entwickelt, ist rot gezeichnet. (F) Histologischer Schnitt (Schnittebene durch Linie markiert). Der Organisator induziert im Wirtsgewebe Neuralrohr (Nr.) und Somiten (So) der Sekundärachse (2°). D, dorsal; V, ventral; 1° Nr., Neuralrohr der primären Körperachse.

Die Entdeckung dieser, nicht zellautonomen Effekte der neuronalen Induktion und mesodermalen Musterbildung war die Basis zur Entwicklung des Organisator-Konzepts der Gastrulation (Hamburger, 1988). Demnach erfüllt der Organisator vier Hauptfunktionen: 1. Der Organisator differenziert sich zu dorsalem Mesoderm, wie zum Beispiel Kopfmesoderm und Chorda dorsalis. 2. Der Organisator dorsalisiert angrenzendes Mesoderm zu einer mehr lateralen Identität (Somiten). 3. Der Organisator dorsalisiert angrenzendes Ektoderm zu Neuroektoderm. 4. Der Organisator initiiert die Gastrulationsbewegungen.

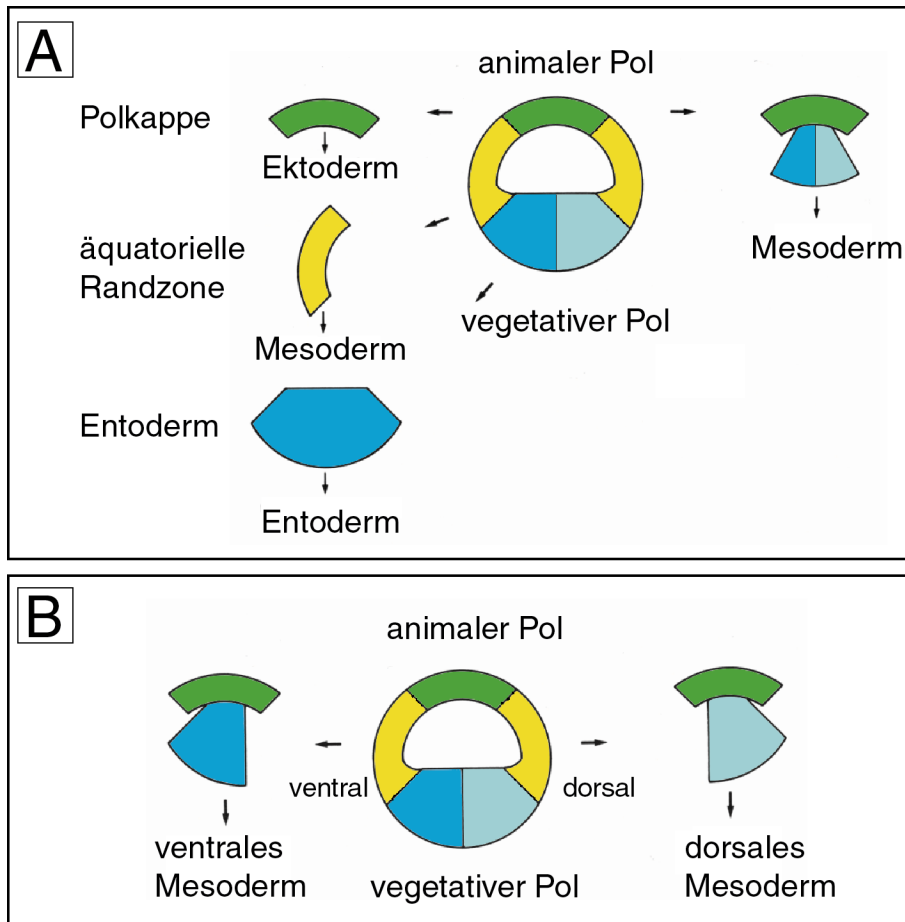
Desweiteren konnten Spemann und Mangold durch gleichgeartete Experimente Unterschiede in der induktiven Potenz von frühen und späten dorsalen Urmundlippen nachweisen. Der, zum Beginn der Gastrulation aktive, frühe Organisator konnte komplette sekundären Achsen mit Köpfen induzieren, der späte, während der Gastrulation aktive Organisator hingegen nur unvollständige Zwillingssachsen ohne Kopfstrukturen. Daraus schloss Mangold (1933) auf die Existenz von einem Kopf- und einem Rumpforanisator, die in der frühen Gastrula in der dorsalen Urmundlippe überlappten. Der Spemann-Organisator stellt somit ein Gewebe dar, welches die Entwicklung der dorso-

ventralen, antero-posterioren Achse massgeblich steuert. Da diese Achsen notwendig sind, um die linke bzw. rechte Körperseite des Embryos festzulegen, spielt der Organisator vermutlich auch hier eine wichtige Rolle.

## **Nieuwkoop**

In einer Reihe von Experimenten in den 60er Jahren untersuchte Pieter Nieuwkoop die Entstehung der mesodermalen Randzone, d.h. unter anderem die des Organisators. Er beobachtete, dass sich explantierte und kutivierte animale, äquatorielle bzw. vegetative Regionen eines Blastulaembryos, der Anlagekarte entsprechend, zu ektodermalen, mesodermalen bzw. endodermalen Geweben entwickelten (Abb. 2 A). Fügt er jedoch animale und vegetative Explantate zusammen (Sandwichexperiment), so differenzierte sich die animale Region zu Mesoderm, das sowohl dorsale als auch ventrale Identität besass (Abb. 2 B). Eine Kombination von animaler Region mit dorsalen vegetativen Blastomeren führte zu ausschliesslicher Induktion von dorsalem Mesoderm.

Aus diesen Ergebnissen folgerte Nieuwkoop, dass die mesodermale Randzone durch induktive Signale des vegetativen Pols gebildet wird. Darüber hinaus besitzen dorsale vegetative Blastomere die Potenz, dorsales Mesoderm und somit den Spemann-Organisator zu induzieren (Nieuwkoop, 1969; 1973; 1977). Die dorso-vegetative Region mit Organisator-induzierender Eigenschaft wird nach ihrem Entdecker Nieuwkoop-Zentrum genannt.



**Abb. 2 Mesoderm- und Spemann Organisator Induktion durch Entoderm des vegetativen Pol.**

- (A) Die Kultivierung isolierter Blastulabereiche führt zur Gewebedifferenzierung gemäss der Anlage Karte. Im „Sandwich“ induziert das Entoderm des vegetativen Pols eine mesodermale Differenzierung des Polkappengewebes. Das induzierte Mesoderm besitzt sowohl ventrale (z.B. Blut) als auch dorsale (Chorda dorsalis) Identität.
- (B) Das ventrale Entoderm induziert im „Sandwich“ Experiment ausschliesslich ventrales Mesoderm, während das dorsale Entoderm (Nieuwkoop Zentrum) die animale Polkappe zu organisatorspezifischem, dorsalen Mesoderm transformiert.

## 1.2 Entwicklungsgenetik

Die 20-er Jahre waren von einem Disput gekennzeichnet, der die Rolle von Genen in der Embryonalentwicklung betraf. Die europäischen Embryologen lehnten im Gegensatz zu den amerikanischen Genetikern die Vorstellung, dass Gene die Embryonalentwicklung kontrollierten, ab. Sie konnten sich nicht vorstellen wie Chromosomen, die in jeder Zelle identisch vorhanden sind, für die Entstehung verschiedener und sich verändernden Zelltypen verantwortlich sein könnten. Thomas Hunt Morgan, der ursprünglich ebenfalls diese Meinung vertrat, konnte jedoch an Hand von *Drosophila* Mutationen nachweisen, dass

Faktoren, die die Entwicklung von Augenfarbe, Körperfarbe, Flügelform und Geschlecht regulierten, gemeinsam X-chromosomal vererbt wurden. Jedoch der Beweis, dass frühe Entwicklungsprozesse, beispielsweise die Gastrulation, durch Gene gesteuert sind, war damit nicht erbracht (Gilbert, 1987).

In den 40er Jahren suchten amerikanische Wissenschaftler daher Mutationen, welche die frühe Phase der Embryonalentwicklung beeinträchtigten. Salome Gluecksohn-Schoenheimer schloss aus der Analyse der Mausmutante *Brachyury*, dass die posterioren Defekte des Embryos durch das axiale Mesoderm verursacht wurden (Gluecksohn-Schoenheimer, 1938). Es sollte noch 50 Jahre dauern bis das *Brachyury* Gen kloniert und dessen Funktion für die Mesodermentstehung und die Morphogenese der Chorda dorsalis nachgewiesen war (Herrmann et al., 1990).

Heutzutage liefert die Kombination aus experimenteller Embryologie mit den Techniken der molekularen Entwicklungsgenetik die Möglichkeit, Wirkketten und Signalkaskaden in Entwicklungsprozessen aufzuklären. Dies zeigt sich exemplarisch in der weit fortgeschrittenen Aufklärung der antero-posterioren Achsenentwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster*, einem Meilenstein der modernen Embryologie. Die Entwicklung der antero-posterioren Polarität hat ihren Ursprung in der Positionierung von maternalen Boten RNAs an verschiedenen Regionen des Fliegeneies. Die Proteine dieser Maternaleffektgene diffundieren durch das Ei, bilden Proteingradienten aus und aktivieren bzw. reprimieren bestimmte zygotische Gene. Die Transkriptionsfaktoren *bicoid* und *hunchback* bestimmen so die Entwicklung von anterioren Strukturen, während *nanos* und *caudal* den posterioren Teil des Embryos festlegen. Abhängig von den gebildeten Proteingradienten der Maternaleffektgene werden zygotische Segmentierungsgene zunächst in breiteren, dann in immer kleineren Bereichen transkribiert, welches durch komplexe aktivierende und reprimierende Interaktionen der beteiligten Gene erreicht wird (Johnston und Nüsslein-Vollhard, 1992). Die Segmentierungsgene definieren Polarität und Anzahl der Körpersegmente. Desweiteren regulieren sie

die zur eigentlichen Bestimmung der Identität und Reihenfolge der Körpersegmente notwendigen homeotischen Gene.

Diese Gene sind Transkriptionsfaktoren der Homeobox-Klasse. Da diese Gene für die Spezifikation von Körperteilen verantwortlich sind, führen Mutationen teilweise zu bizarren Phänotypen. William Bateson nannte sie 1894 „Homeotische Mutanten“. Eine dominante Mutation im *Antennapedia* Gen führte dazu, dass am Kopf von *Drosophila* anstatt Antennen Beine entstehen (Gilbert, 1997).

Die Daten der *Drosophila* Forschung bestätigten exemplarisch die allgemeine genetische Theorie der Entwicklung, wonach Entwicklungsprozesse auf Wirkungen und Wechselwirkungen von Genen basieren.

### 1.3 Homeoboxgene

Homeoboxgene codieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch eine 60 Aminosäuren umfassende DNA Bindedomäne, die sog. Homeodomäne, charakterisiert ist. Die Homeodomäne faltet sich in 3  $\alpha$ -Helices, wobei die dritte die DNA-Erkennungshelix darstellt. Das konservierte 4 Basen Erkennungsmotiv TAAT kommt in den meisten Homeodomänen-Bindesequenzen vor, wobei die Selektivität in den 3' benachbarten Basenpaaren liegt. Das direkt nach dem TAAT Motiv folgende Basenpaar wird von der Aminosäure 50 der Erkennungshelix erkannt. Mutationsanalysen an *bicoid* bzw. *Anttenapedia* Homeodomänen Proteinen zeigten, dass Lysin bzw. Glutamin an Position 50 der Homeodomäne für die Selektivität verantwortlich sind. Das Lysin der *bicoid* bzw. das Glutamin der *Anttenapedia* Homeodomäne erkennt G in GC bzw. A in AT Paaren. So führt ein Aminosäureaustausch an Position 50 der *bicoid* Homeodomäne von Lysin zu Glutamin dazu, dass das mutierte *bicoid* Protein *Anttenapedia* Bindesequenzen erkennt (Hanes und Brent, 1991).



Homeoboxgene kommen in allen eukaryotischen Organismen vor und besitzen wichtige Funktionen in allen Entwicklungsvorgängen. So bestimmen Homeoboxgene die Geschlechtstypisierung bei Hefe (Wolberger et al., 1991) und die Blütenmusterbildung bei Pflanzen (Williams, 1998).

In der Achsenentwicklung der Invertebraten und Vertebraten spielen Homeoboxgene eine herausragende Rolle. Die homeotischen Effektorgene mit ihrer determinierenden Funktion in der antero-posterioren Achsenentwicklung (siehe oben) sind Beispiele hierfür. Der Klonierung der acht homeotischen Gene in *Drosophila* folgte die Identifizierung ihrer genomischen Position. Alle fanden sich in 2 Abschnitten auf Chromosom 3 wieder, der als homeotischer Komplex (*HOM-C*) bezeichnet wird. Der *Anntenapedia* Komplex umfasst fünf, der *Bithorax* Komplex drei Homeoboxgene. Verblüffenderweise waren die Gene innerhalb des *HOM-C* Komplexes in der gleichen Abfolge arrangiert, in der sie zeitlich und räumlich entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert werden. So wird das Homeoboxgen *labial*, welches im *HOM-C* Komplex das äusserste 3' liegende Gen darstellt, am frühesten und im anteriorsten Teil des Embryos exprimiert, während das äusserste 5' Gen, *AbdB*, zu einem späteren Zeitpunkt die posteriore Entwicklung des Abdomens bestimmt. Diese räumliche und zeitliche Kolinearität von genomischer Position und Expressionsort wurde ebenfalls in den vier *HOM-C* Komplexen (*HoxA - HoxD*) der Maus nachgewiesen (Boncinelli et al., 1988; McGinnis und Krumlauf, 1992).

Desweiteren zeigen die homeotischen Homeoboxgene von Fliege und Maus grosse Homologien sowohl in den Homeodomänen als auch in der Regulation. Beispielsweise vermag ein *Drosophila Deformed* Enhancerelement in transgenen Mäusen, das korrekte Expressionsmuster des maushomologen Gens wiederzugeben (Awgulewitsch und Jacobs, 1992; Malicki et al., 1992). *HOM-C* Komplexe sind innerhalb der Tierstämme weit verbreitet und stellen vermutlich die genetische Grundlage von der antero-posterioren Achsenentwicklung im gesamten Tierreich dar. Die „runder Plattwurm“ (roundish flatworm) Hypothese geht sogar davon aus, dass ein Vorläuferorganismus, aus dem vor ca. 500 Millionen Jahren in der kambrischen Radiation, die Tierstämme hervorgingen, einen *HOM-C* Komplex besass (Gerhart und Kirschner, 1997).

## 1.4 Die dorso-ventrale Achse

Die dorso-ventrale Achsenentwicklung der Wirbeltiere wird ebenfalls von Homeoboxgenen kontrolliert. Die klassischen Experimente von Spemann und Nieuwkoop lassen sich nun anhand von differenzieller Genexpression nachvollziehen. Die Entstehung der dorso-ventral Achse im Frosch beginnt im Amphibienei. Es besitzt bereits eine animale-vegetative Achse, die durch die maternale Lagerung von Dotterproteinen am vegetativen Pol gebildet wird. Die Festlegung der dorso-ventralen Achse geschieht mit der Befruchtung durch das Spermium in der animalen Polregion. Die dorsale Seite entsteht in etwa auf der, dem Eintrittspunkt des Spermiums, gegenüberliegenden Seite. Eine Voraussetzung hierfür ist eine ca 30° Verschiebung der äusseren, mikrotubulireichen Rindenschicht des Eicytoplasmas (Cortex) gegenüber dem inneren Cytoplasma.

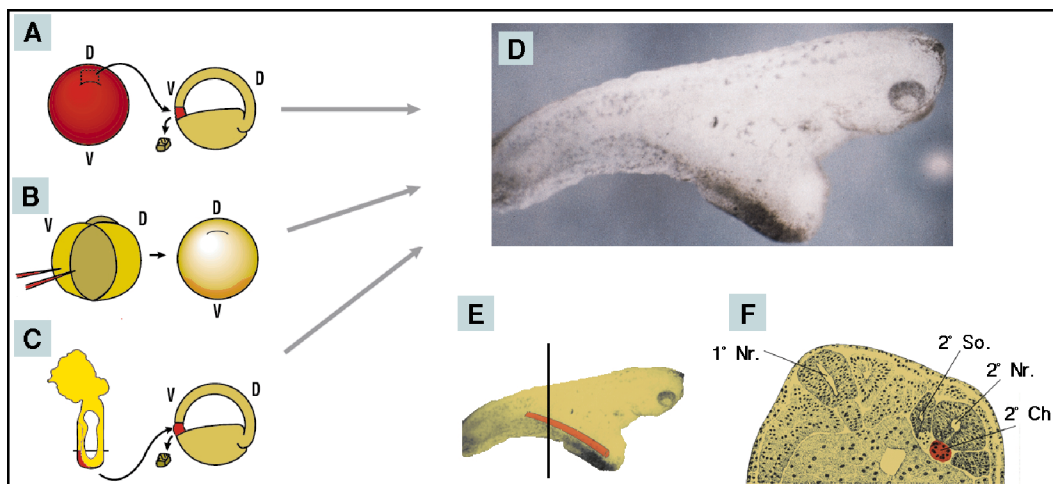
Als Folge der Rotation akkumuliert, durch einen unbekanntem Mechanismus, *β-catenin* in den dorso-ventralen Zellkernen (Moon und Kimmelman, 1998). *β-catenin* ist ein multifunktionelles Protein, das einerseits an der Zellmembran als Anker für Cadherine dient, im Cytoplasma mit dem Tumorsuppressor *APC* (Adenomatous polyposis coli) interagiert, und das andererseits ein Transkriptionsfaktor vom *HMG* Typ (High Mobility Group) im *Wnt*-Signaltransduktionsweg darstellt. Auf der dorso-vegetativen Seite aktiviert *β-catenin* vor der Gastrulation direkt die Transkription der Homeoboxgene *Siamois* und *Twin*. Diese Homeodomänen-Proteine induzieren nun ihrerseits Organisator-spezifische Gene, wie zum Beispiel das Homeoboxgen *gooseoid*. *β-catenin*, *Siamois* und *Twin* können nach ventraler Fehlexpression eine zweite, ektopische Achse induzieren. Die frühe dorsal-vegetative Lokalisation von *β-catenin* und die darauffolgende Induktion von *Siamois* und *Twin* stellt vermutlich die molekulare Wirkkette dar, die via Nieuwkoop-Zentrum den Spemann-Organisator entstehen lässt (Moon und Kimmelman, 1998).

Die sekretierten Wachstumsfaktoren *noggin*, *chordin* und *follistatin* sind die molekulare Basis der nicht zellautonomen Spemann-Organisatorfunktionen. Diese vom Organisator sekretierten Stoffe antagonisieren die Wirkung von *BMP* Proteinen, (Bone Morphogenetic Proteins) welche Wachstumsfaktoren vom *TGF $\beta$*  Typ sind. *BMP2* und *BMP4* werden sowohl im Ektoderm als auch im Organisator benachbarten Mesoderm exprimiert. Sie besitzen eine antineurale bzw. ventralisierende Wirkung auf Ektoderm und Mesoderm, welches im letzteren Fall durch die direkte Aktivierung der Homeoboxgene *Xvent1* und *Xvent2* erreicht wird (Gawantka et al., 1995; Onichtchouk et al., 1998). Die Organisator-Signalstoffe *noggin*, *chordin* und *follistatin* verhindern dies, indem sie eine direkte Bindung mit den *BMP* Molekülen eingehen und somit eine Rezeptorinteraktion verhindern (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Sasai et al., 1994; Sasai et al., 1995; Piccolo et al., 1996; Fainsod et al., 1996).

Die neuralisierende bzw. dorsalisierende Potenz des Organisators ist demnach kein instruktives Ereignis, sondern eine permissive Folge der Hemmung des *BMP* Signaltransduktionsweges. Dies beweist auch die dorsalisierende und neuralisierende Wirkung eines fehlexprimierten dominantnegativen *BMP* Rezeptors. Die Regulation der Transkription von *noggin*, *chordin* und *follistatin* ist somit eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Organisatorfunktion. Für das *chordin* Gen konnte nachgewiesen werden, dass das Homeoboxgen *gooseoid* für dessen transkriptionelle Aktivierung mitverantwortlich ist (Sasai et al., 1994).

## 1.5 *gooseoid*

*gooseoid* (*gsc*) war das erste klonierte Organisator-spezifische Homeoboxgen (Blumberg et al., 1991; Cho et al., 1991). *gsc* gehört zur *bicoid* Klasse von Homeodomänen Proteinen, die wie in Abschnitt 1.3 beschrieben ein Lysin an Position 50 der Erkennungshelix besitzen. *gsc* wurde in allen Wirbeltier-Modellorganismen identifiziert (Blum et al., 1992; Izpisua-Belmonte et al., 1993; Stachel et al., 1993; Schulte-Merker et al., 1994; Blum et al., 1994), und zeigt trotz unterschiedlicher Anatomie der jeweiligen Gastrula-Embryonen eine konservierte organisatorspezifische Expression im dorso-anterioren Mesoderm (Abb. 3).



**Abb. 3 Schema des Frosch-Organisator und der homologen Struktur in der Maus.**

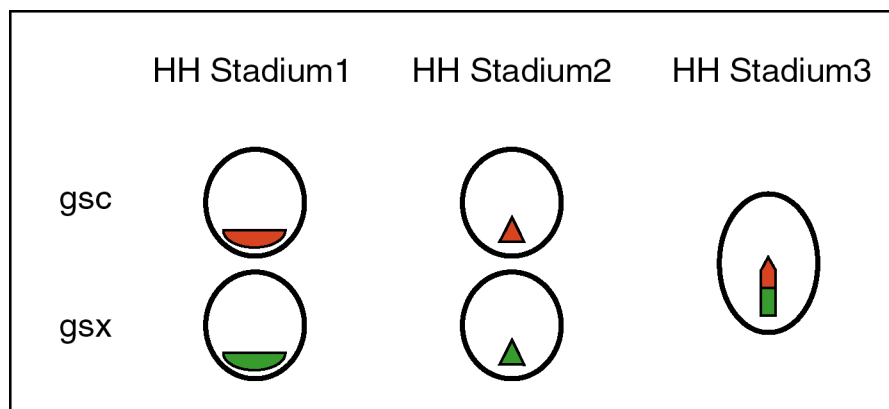
- (A) In der sphärischen frühen Frosch-Gastrula beginnt die Invagination des Mesentoderm an der dorsalen Seite des Embryos. Die dorsale Urmundlippe (Spemann Organisator / rot) ist erkennbar. Das zukünftige Mesoderm liegt in der lateralen Randzone (hell grün) zwischen dem Ektoderm des animalen (grün) und dem Dotterentoderm des vegetalen Pols.
- (B) Die zylinderförmige Mausgastrula bildet auf der posterioren Seite den Primitivstreifen (pink) und an dessen Ende den Knoten aus. Wie die dorsale Urmundlippe exprimieren die Knotenzellen *gooseoid* und wandern schließlich anterior (Pfeile) um die Prächordalplatte zu bilden. Extraembryonale Gewebe der Maus sind nicht gezeigt.

Ventrale Fehlexpression von *gsc* in *Xenopus* führt zur Induktion einer zweiten Körperachse (Abb. 1). Dies beweist, dass das *gooseoid* Protein ausreichend potent ist einen ektopischen Organisator auszubilden, der die Gastrulation initiiert und fortführt. Zellmarkierungsexperimente zeigten, dass in der durch *gsc* induzierten Körperachse die *gsc* exprimierenden Zellen durch Zellmigration die Gastrulation einleiteten, sich autonom zu prächordalen Mesoderm differenzierten

und zusätzlich benachbarte Zellen in die dorsale Achse rekrutierten (Abb. 1; Niehrs et al., 1993). Im ganzen erinnerte die Achseninduktion durch *gsc* stark an die klassischen Transplantationsexperimente der dorsalen Urmundlippe von Spemann. Dies lässt vermuten, dass *gsc* ein zentrales Gen der Gastrulation darstellt.

Darüberhinaus konnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus von *gsc* auf seine eigene Expression festgestellt werden, was auf eine stringente Kontrolle der Dosis dieses potenten Proteins schließen lässt (Danilov et al., 1998). Eine Inaktivierung des *gsc* Gens in der Maus sollte somit schwerwiegende Gastrulationsdefekte zeigen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die *gsc* Nullmutante zeigte nur craniofaziale Defekte, die ihren Ursprung in der zweiten Phase der *gooseoid* Expression während der Organogenese hatte (Yamada et al., 1995; Rivera-Perez et al., 1995; Zhu et al., 1998). Damit musste ein Kompensationsmechanismus für den Verlust des *gsc* Gens angenommen werden.

Ein zu *gsc* verwandtes Gen mit einer während der Gastrulation überlappenden Expression könnte das Fehlen eines frühen Phänotyps in der *gsc* Mausmutante erklären. Die Klonierung und Analyse eines zweiten Gens vom *gooseoid* Typ im Huhn (*gsx*) untermauerte diese Möglichkeit (Lemaire et al., 1997). Abb. 4 zeigt schematisch die Expressionsdomänen von *gsc* und *gsx* in der frühen Huhn-Gastrula.



**Abb. 4 Koexpression von *gsc* und *gsx* in der frühen Huhn Gastrula.** Die Kollersche Sichel ist eine Struktur die am posterioren Ende des Prägastrula Embryos (HH Stadium1) entsteht. Sie stellt einen frühen Organisator der Gastrulation dar und koexprimiert *gsc* und *gsx*. Am Beginn der Gastrulation (HH Stadium2) exprimiert der Primitivstreifen *gsc* und *gsx*, während später (HH Stadium3) die Transkriptionsdomänen sich trennen. *gsc* ist nun im anterioren, *gsx* im posterioren Primitivstreifen exprimiert. (nach Lemaire und Kessel, 1997)

Die morphologisch erkennbare Koller`sche Sichel markiert vor dem eigentlichen Beginn der Gastrulation den posterioren Pol des Embryos, und hat vermutlich auch eine Gastrulation-induzierende Eigenschaft. *gsc* und *cgsx* sind dort und im frühen Primitivstreifen der Gastrula koexprimiert. In etwas späteren Stadien der Gastrulation trennen sich die Expressionsdomänen in einen posterioren, *cgsx* positiven, und einen anterioren, *gsc* positiven Teil (Abb.3). Zum Zeitpunkt des identifizierbaren Hensen`schen Knotens, dem Spemann-Organisator des Huhns, lässt sich dort nur *gsc* Expression nachweisen, während *gsx* im Neuroektoderm transkribiert wird (Lemaire et al.,1997). Aus der Sicht der *gsc* Nullmutante könnte *cgsx* während der frühen Gastrulation der kompensierende Faktor sein. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, ein *cgsx*-homologes Gen in der Maus zu klonieren und mögliche Kompensationsmechanismen zu überprüfen.

## 1.6 Die Links-Rechts Asymmetrie der Wirbeltiere

In der Embryonalentwicklung der Wirbeltiere werden Herz, Lunge und der Gastrointestinaltrakt asymmetrisch entlang der links-rechts Achse positioniert. So nehmen Herz, Milz und Magen der Säugetiere eine links-, die Leber eine rechtsgerichtete Lage ein. Desweiteren stellt die Aufwindung von Dünn- und Dickdarm mit einem rechts liegenden Blinddarmfortsatz, und die unterschiedliche Anzahl von Loben der Lungenflügel beider Seiten eine asymmetrische Lagebeziehung dar (Moore und Persaud, 1993). Die asymmetrische Anordnung der Organe wird als *situs solitus* bezeichnet. Beim Menschen tritt in 1 von 10000 Geburten eine komplette Inversion der Organlage (*situs inversus*) auf, die keinerlei Gesundheitsschäden nach sich zieht. Anatomen war seit langem bekannt, dass Situsinversionen in eineiigen und siamesischen Zwillingen vorkommen. Schwerwiegende Folgen gibt es im Falle von Heterotaxie, wenn Herz- und Darm-Situs (*situs cordis* und *situs viscerum*) in einer gegensätzlichen Lateralität angelegt werden (Burn, 1991; Bowers et al., 1996; Kosaki und Casey, 1998).

Erste aussagekräftige embryologische Experimente zur Entstehung der Lateralität des Wirbeltierbauplans wurden wiederum von Spemann und seinen Mitarbeitern an Amphibien durchgeführt. In drei experimentellen Ansätzen wurden Lateralitätsdefekte beobachtet.

### **1.6.1 Klassische Studien**

Zum einen konnte Spemann Situsinversionen in, durch komplette bzw. partielle Ligaturen von Molchembryonen experimentel erzeugten, normalen bzw. siamesischen Zwillingen beobachten (Spemann, 1904). In einer weiteren Studie wiesen Spemann und Falkenberg (1919) nach, dass bei solchen Schnürungsexperimenten nur der rechte Zwilling in Bezug auf Lateralität beeinflussbar war und in ca. 50% der Fälle zu einer Situsinversion führte.

Die Erzeugung von Situsinversionen von einzelnen Amphibienembryonen gelang Spemann (1906), indem er den mittleren Teil einer Neuralplatte entfernte, das Explantat um 180° rotierte, und so in die Wunde einsetzte, dass die rechte und linke Seite vertauscht waren. Nach 5 bis 15 Tagen konnte in fast allen manipulierten Embryonen eine komplette Situsinversion von Herz und Darm beobachtet werden. Spemanns Experimente und Ergebnisse wurden von Meyer wiederholt und bestätigt (Meyer, 1913). Darüberhinaus bemerkte Meyer, dass das Gewebe, welches rotiert wurde, nicht die Herzanlage beinhaltete, die in einer ventralen Position entsteht. Meyer schloss daraus, dass ein Mediator aus der rotierten Region die Positionsinformation zur Herzanlage übermitteln musste, während für die beobachtete Darminversion solch ein Mediator nicht notwendig war, da ein Teil des Explantates gastro-intestinales Vorläufergewebe beinhaltete (Meyer, 1913).

Spemann erklärte die Ergebnisse der Zwillings- und Inversionsexperimente mit einer intrinsisch festgelegten linksseitigen Biegung des Gastrointestinaltraktes, die besonders ausgeprägt im mittleren und experimentell rotierten Abschnittes sei. Demnach führte die Rotation des Explantates sekundär zu einer Inversion des gesamten Darmabschnitts. Da die Herzanlage von der Operation nicht betroffen war, vermutete Spemann, dass die asymmetrische

Herzenwicklung von der des Darmes abhängig war (Spemann und Falkenberg, 1919). Die zufällige Situs-Festlegung des rechten Zwillings wäre demnach die Folge einer natürlich bevorzugten linksseitigen Darmwindung des linken Zwillings, die der des rechten Zwillings entgegenwirkt.

Eine andere Interpretation der Ergebnisse von Spemann und Meyer folgerte Hedwig Wilhelmi aus ihren Experimenten. In von ihr durchgeführten Schnürungsexperimenten beobachtete sie einige Situsinversionen, die nicht das Resultat von Zwillingsentstehung waren (Wilhelmi 1921). Wilhelmi vermutete, dass in diesen Fällen durch die Schnürung ein Teil der linken Seite des Embryos entfernt wurde. Um die Beobachtung zu überprüfen, entfernte sie linksseitig kleine Regionen von Gastrula- und frühen Neurula-Embryonen. Während in der Gastrula linke Ablationen zu der Entwicklung von normalen Embryonen führte, vermochten linksseitige Ablationen an frühen Neurula Embryonen in wenigen Fällen vollständige Situsinversion hervorzubringen (Wilhelmi, 1921). Hedwig Wilhelmi folgerte „Situs inversus [...] erklärt sich dadurch, dass die linke Seite des Keimes etwas hat, was die rechte Hälfte nicht hat“, und dass wenn dieser linke Einfluss fehlt, die Windung des Darms zufällig zur rechten oder linken Seite erfolgte (Wilhelmi, 1921). Spemann`s Entdeckung des Organisatorphänomens verhinderte weitergehende Untersuchungen zur Entstehung der Lateralität. Diese wurden wieder in den letzten zehn Jahren experimentell aufgenommen.



## 1.6.2 Die Entstehung von Lateralität während der Embryogenese

Die Entstehung der Wirbeltierlateralität während der Embryonalentwicklung lässt sich prinzipiell in drei zeitlich aufeinander folgende Phasen unterteilen. Phase 1 ist geprägt vom Bruch der ursprünglichen bilateralen Symmetrie von Gastrula- bzw. Neurula-Embryonen. Phase 2 wird durch asymmetrische Genexpression im Bereich des Primitivknotens und des Seitenplattenmesoderms charakterisiert, die zu asymmetrischen Organmorphogenese in Phase 3 führt.

### 1.6.2.1 Phase 1: Bruch der embryonalen Symmetrie

Naiv gesehen ist die rechte bzw. linke Seite des Embryos mit der Festlegung der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse ebenfalls angelegt. Positionsspezifische Organentwicklung fordert jedoch eine molekulare Determination der beiden Körperhälften. Bisher konnten weder Ort, Zeitpunkt, noch ein molekularer Mechanismus der initialen rechts- bzw. linksseitigen Determination des Wirbeltierembryos experimentell aufgeklärt werden. In einer theoretischen Betrachtung postulierten Brown und Wolpert (1990) ein chirales Molekül, das die Entstehung von rechter bzw. linker Achse mit der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse koppelt. Ein solches Molekül könnte möglicherweise membranständig am gerichteten Transport von Wirkstoffen und deren rechts- bzw. linksseitigen Akkumulation beteiligt sein. Tatsächlich konnte bei der Entstehung der frühen *Xenopus* Lateralität eine Mitwirkung von Gap-junctions, die einen direkten cytoplasmatischen Kontakt zwischen Nachbarzellen herstellen, nachgewiesen werden (Levin und Mercola, 1998).

Die von Spemann beobachtete Situsinversionen in experimentell erzeugten Zwillingen deutet auf eine sehr frühe Determinierung der lateralen Achsen hin. Neuere Analysen, in denen Doppelachsen durch Missexpression von Organisator - Genen (zum Beispiel *gooseoid*; siehe 1.5) erreicht wurde, entsprachen weitgehend Spemann's Beobachtung von der Randomisierung des Situs im rechten Zwilling (Nascone und Mercola, 1997). Die Induktion einer Doppelachse im Frosch mit *siamois* und  $\beta$ -*catenein*, Genen, denen eine Funktion

im Nieuwkoop-Zentrum zugewiesen wird, führte in 100% der rechts induzierten Zwillingen zu *situs solitus* (Nascone und Mercola, 1997). Der maternal exprimierte *TGF $\beta$*  ähnliche Wachstumsfaktor *Vg1*, dem ebenso eine Funktion im Nieuwkoop Zentrum (Kessler und Melton, 1995) zugeschrieben wird, konnte, nach Injektion in rechte laterale vegetative Blastomeren, den Situs zu 100% invertieren (Hyatt and Yost, 1998). *Vg1* RNA wird während der Oogenese synthetisiert und ist gleichmässig in der vegetativen Hemisphere von Ei und frühem Embryo lokalisiert (Rebagliati et al., 1985). Das Protein wird zunächst als inaktive Vorstufe gebildet, die zur Aktivierung eine proteolytische Abspaltung benötigt. Es bleibt abzuwarten, ob tatsächlich eine spezifische linksseitige Aktivierung von *Vg1* die linke Achse determiniert (Hyatt et al., 1996). Die Eigenschaften von *siamois*,  *$\beta$ -Catenin* und *Vg1* in den genannten Experimenten, deuten aber auf eine wichtige Funktion des Nieuwkoop-Zentrums in Bezug auf die Lateralitätsentwicklung hin.

In der Maus gibt es zwei Mutationen, *iv* und *inv*, die vermutlich an einem frühen Punkt der Lateralitätsentwicklung wirken. Die *iv* Mauslinie zeigt eine zufällige Ausprägung des Situs (Hummel und Chapman, 1959), während *inv* Mäuse einen 100% *situs inversus* aufweisen (Yokoyama et al., 1993). Die Klonierung der mutierten Gene brachte jedoch keinen grossen Fortschritt bei der Identifizierung des die links-rechts Asymmetrie bestimmenden molekularen Mechanismus. Das *inv* Genprodukt, welches *inversin* benannt wurde, codiert für ein grosses Protein mit unbekannter Funktion (Morgan et al., 1998; Mochizuki et al., 1998). Im Falle von *iv* war ein axonemales Dynein, das sog. „left-right dynein“ (*Ird*), mutiert (Supp et al., 1998), welches am Tag 7.5 der Embryonalentwicklung spezifisch, aber nicht asymmetrisch, in den ventral gelegenen Zellen des Knotens exprimiert ist.

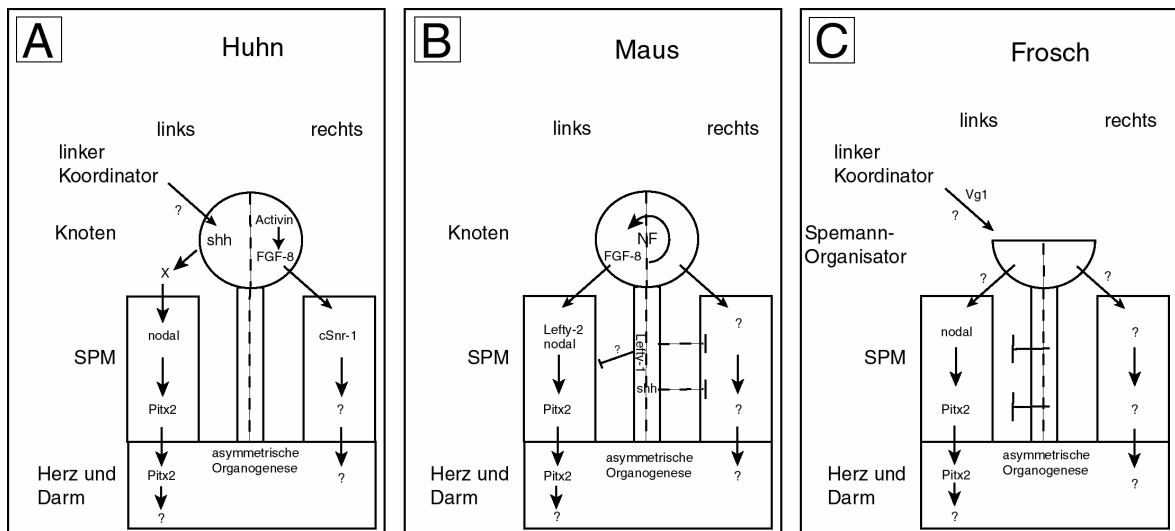
Die ventralen Zellen des Knotens, wie die der Chorda dorsalis und der Prächordalplatte, tragen Monocilia (Suklik et al., 1994). Anhand des menschlichen Kartagener Syndroms, welches durch unbewegliche Cilien und ein häufiges Auftreten von Situsinversionen charakterisiert ist (Afzelius et al., 1995), liess sich eine mögliche Rolle von Cilien in der Lateralitätsentwicklung ableiten. In einer Studie von Nonaka et al., (1998) konnte gezeigt werden, dass

die Knotencilien gegen den Uhrzeigersinn rotieren und eine links gerichtete Flüssigkeitsbewegung (sog. Nodal Flow in Abb. 5 B) verursachten. Darüberhinaus fanden sich in Mäusen nach gezielter Inaktivierung von *KIF3B*, einem Motorprotein der Kinesinfamilie, keine Cilien im Knoten und randomisierter Situs (Nonaka et al., 1998). Das selbe traf für Mäuse mit inaktiviertem *HFH-4*, einem Transkriptionsfaktor aus der Forkheadfamilie, zu (Chen et al., 1998). Der aus diesen Daten folgenden Hypothese nach sollte die, durch die Monocilien des Knotens ausgelöste, linksgerichtete Flüssigkeitsbewegung sekretierte Wachstumsfaktoren spezifisch auf die linke bzw. rechte Seite des Knotens verteilen und somit als frühestes Ereignis die Lateralität festlegen.

Ein Nachweis der Kausalität von „Nodal Flow“ und Lateralität muss jedoch noch erbracht werden. So müsste zum Beispiel in der *inv* Mausmutante die Fließrichtung der Knotenflüssigkeit rechtsgerichtet sein. Zusätzlich kann der „Nodal Flow“ als ein allgemeingültiger Mechanismus für den Bruch der bilateralen Symmetrie in der frühen Wirbeltier-Neurula ausgeschlossen werden. Denn während andere Säugetier- und Huhnembryonen in dem frühen Neurula-Knoten Monocilia besitzen, trifft dies für die homologe Struktur im Frosch *Xenopus laevis*, die späte dorsale Urmundlippe, nicht zu (König und Hausen, 1993; Hausen, Max-Planck-Institut Tübingen, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Argument gegen die generelle Bedeutung des „Nodal Flow“ war der experimentelle Nachweis eines linken Koordinators ausserhalb des Huhnknotens, der für die asymmetrische linksseitige Expression des Wachstumsfaktors *shh* im Knoten in der zweiten Phase der Lateralität-entstehung verantwortlich war (Abb. 5 A; Pagan-Westphal und Tabin, 1998). Eine Verwendung verschiedener Mechanismen für den Bruch der bilateralen Symmetrie kann innerhalb der Wirbeltier Klassen jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da neuere Studien molekulare Unterschiede klar belegen (siehe unten).

### 1.6.2.2 Phase 2: Die Links - Rechts Signalkaskade bei Huhn, Maus und Frosch

Phase 2 der embryonalen Lateralitätsentwicklung wird durch asymmetrische Genexpression in Knoten, Seitenplattenmesoderm und Mittellinie charakterisiert. In dieser Phase stellt das Huhn das bestuntersuchte Modellsystem dar, in dem linke und rechte Gene beschrieben wurden. Bei den Genprodukten handelte es sich meist um Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Die linke Kaskade im Huhn (Abb. 5A) wird durch eine linksseitige Expression des Wachstumsfaktors *sonic hedgehog (shh)* im Knoten eingeleitet. Das linke *shh* Signal führt über einen unbekanntes Faktor X zur spezifischen Induktion von *nodal*, einem Wachstumsfaktor vom *TGF $\beta$*  Typ, im linken Seitenplattenmesoderm (Harvey, 1998; Levin, 1998; Ramsdell und Yost, 1998). In der rechten Kaskade hemmt das sekretierte, *TGF $\beta$*  ähnliche Protein, *Activin  $\beta$ B* eine mögliche *shh* Expression im rechten Knoten und induziert dort über den *Activin Rezeptor IIA* die Expression des Wachstumsfaktors *FGF8*. Das *FGF8* Protein bewirkt eine Repression der *nodal* Transkription im rechten Seitenplattenmesoderm und ermöglicht dort die Expression des Zinkfingertranskriptionsfaktors *cSnR-1* (chick snail related 1, Isaac et al., 1997; Boettger et al., 1999). In funktionellen Studien wurde die tatsächliche Wirksamkeit der Kaskadenkomponenten auf die asymmetrische Achsenentwicklung überprüft. Fehlexpressionen von *shh* und *nodal* bzw. *Activin $\beta$ B* und *FGF8* auf der rechten bzw linken Seite des Huhnembryos vermochten die Lage des Situs zu ändern (Levin et al., 1995; Boettger et al., 1999). Mit spezifischen *cSnR-1* Antisense Oligos konnte die Translation der *cSnR-1* mRNA auf der rechten Seite von Huhnembryonen unterbunden werden, was zu Randomisierung der Herzschleifenbildung führte (Isaac et al., 1997).



**Abb. 5 Vereinfachtes Schema der, an der Lateraltäts-Kaskade, beteiligten Gene bei Huhn, Maus und Frosch.**

In allen drei Modellorganismen sind *nodal* bzw. *Pitx2* in dem Seitenplattenmesoderm (SPM) und *Pitx2* während der asymmetrischen Organogenese exprimiert (A, B, C). Zielgene von *Pitx2* sind unbekannt. Eine wichtige Funktion in der Lateraltätsentwicklung ist für die Mittellinie (Chorda dorsalis und Boden der Neuralplatte) von Maus (z.B. *Lefty-1*) und Frosch nachgewiesen worden. Links-rechts Signale in der Gastrulation sind unbekannt (Frosch) oder bei Huhn und Maus verschieden. Eine durch Cilien verursachte links gerichtete Flüssigkeitsbewegung im Organisator (NF; nodal flow) wurde bis jetzt nur in der Maus beobachtet (B). Der Vergleich der Genexpression von links-rechts bestimmenden Wachstumsfaktoren im Organisator (Knoten) zwischen Maus und Huhn erscheint spiegelbildlich. Während im Huhn *sonic hedgehog* ein die linke Seite determinierendes Gen ist (A), reprimiert es in der Maus die Expression von *nodal* und *Pitx2* im rechten Seitenplattenmesoderm (B). In der Maus (B) scheint der *Fibroblasten Wachstumsfaktor 8* die linke, im Huhn (A) die rechte Kaskade zu bestimmen. (Details und Referenzen siehe Text.)

Die im Huhn aufgeklärte Kaskade kann nicht ohne weiteres auf Maus oder Frosch übertragen werden, da keine asymmetrische Expression von *shh*, *Activin $\beta$ B*, *Activin Rezeptor IIA* und *FGF8* im Knoten bzw. in der dorsalen Urmundlippe nachweisbar war. Die, im Huhn stromabwärts von *shh* liegenden Gene *nodal* und *Pitx2* (siehe unten 1.6.3) zeigten hingegen eine konservierte Expression im linken Seitenplattenmesoderm in allen untersuchten Wirbeltierspezies. Ausserdem konnten bis heute in Maus und Frosch keine Gene der rechten Kaskade isoliert werden, die ein asymmetrisches Expressionsmuster zeigten. Eine Beteiligung von *shh* bzw. *FGF8* an der Entstehung der Lateraltät in der Maus wurde anhand der gezielten Inaktivierung des *shh* bzw. *FGF8* Genes nachgewiesen, die in beiden Mutanten zu Lateraltätsdefekten, wie zum Beispiel abnormaler Herzdrehung führte. Überraschenderweise war die Expression der linken Marker *nodal* und *Pitx2* in der *shh* Mausmutante überwiegend bilateral (Izraeli et al., 1999; Meyers und Martin, 1999), während in der *FGF8* Nullmutante keine Transkription von *nodal*

und *Pitx2* detektierbar war (Meyers und Martin, 1999). Dies bedeutet, dass das im Huhn die linke Körperseite bestimmende Gen *shh* in der Maus eine gegensätzliche, also rechte Funktion ausübt. *FGF8* hingegen legte im Huhn die rechte Achse und in der Maus die linke Achse fest (Abb. 5 A, B). Dieser Widerspruch konnte im Mausembryo auch funktionell durch rechte und linke Fehlexpression von *shh* und *FGF8* reproduziert werden (Meyers und Martin, 1999). Im Frosch *Xenopus laevis* durchgeführte Misexpressionsexperimente mit *shh* führten, wie im Huhn, zu einer Transkription von *nodal* im rechten Seitenplattenmesoderm (Sampath et al., 1997) was auf eine, allerdings unbewiesene, linke Kaskadenfunktion von *shh* bei den Amphibien schliessen lässt. Ob dieser gegensätzlichen Verwendung von *shh* und *FGF8* in der frühen lateralen Achsenfestlegung in Huhn und Maus grundlegende mechanistische Unterschiede zwischen Vögeln und Säugern zugrunde liegen ist nicht klar.

#### Die Rolle der dorsalen Mittellinie bei der Entstehung der Links-Rechts Asymmetrie

Es wird diskutiert, dass die rechtseitige Funktion von *shh* in der Lateralitätentstehung in der Maus kein im Knoten lokalisierter Effekt sei. Die rechte Funktion sei eine, durch die Mittellinienexpression von *shh* ausgehende, spezifische Reprimierung von *nodal* im rechten Seitenplattenmesoderm (Meyers und Martin, 1999; Abb.5 B). Tatsächlich wurde für die Mittellinie (Chorda dorsalis und Bodenplatte der Neuralrinne) eine wichtige Rolle in der Rechts-Links Entwicklung nachgewiesen. Die experimentelle Entfernung der Mittellinienstrukturen aus *Xenopus* Neurulaembryonen führte zu einer bilateralen Expression von *Xnr1* (*Xenopus nodal related 1*), was auf eine, linke Signale abweisende Barrierenfunktion der Mittellinie schliessen liess (Abb. 5 C) (Lohr et al., 1997; Ramsdell und Yost, 1998).

Eine molekulare Untermauerung der Barrieren-Theorie erbrachte die Klonierung des Wachstumsfaktors vom *TGF $\beta$*  Typ *Lefty1* in der Maus. Während das verwandte *Lefty2* -Gen asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm exprimiert wurde, fanden sich die *Lefty1* Transkripte in der linken Bodenplatte der Neuralrinne (Abb. 5 B). Die gezielte Inaktivierung des *Lefty1* Gens führte,

wie die Mittellinien-Ablation im Frosch, zu bilateraler *nodal* Expression und zu einem linken Isomerismus der Organe in mutierten Mäusen (Meno et al., 1998).

Eine mögliche mechanistische Erklärung für die Barrierenwirkung von *Lefty1* lieferte das zu *Lefty1* strukturell stark verwandte Gen *antivin* im Zebrafisch. Die *TGF $\beta$*  Familie von Wachstumsfaktoren ist strukturell durch die Anwesenheit des sog. Cystein-Knotens charakterisiert. Die Anordnung dieser sechs Cysteine im Protein erlaubt u.a. die Dimerisierung der *TGF $\beta$*  Moleküle, welches eine Voraussetzung für die Aktivierung der Rezeptoren darstellt. Im *antivin* Protein fanden sich, wie bei *Lefty*, nur fünf Cysteine, und die Strukturanalyse zeigte, dass die Dimerisierungsdomäne nicht existierte (Thiesse und Thiesse, 1999), so dass Rezeptorbindung des *antivin* Monomers nicht zu einer Rezeptoraktivierung führt. *antivin* zeigte tatsächlich im Rahmen der Mesoderminduktion bei Zebrafisch eine den *TGF $\beta$*  Signaltransduktionsweg hemmende Repressoreigenschaft (Thiesse und Thiesse, 1999). Falls dieser Mechanismus ebenfalls für *Lefty1* zutrifft, könnte *Lefty1* eine Ausbreitung von linken *TGF $\beta$*  Signalen (z.B. *nodal*) über die Mittellinie verhindern.

#### 1.6.2.3 Phase 3: Asymmetrische Organogenese von Herz und Darm

Im letzten Stadium der Lateralitätsentstehung vollführen die ursprünglich linearen Organe Herz und Darm eine Schleifenbildung, die die Organe in ihre asymmetrische Lage bringt. Räumlich begrenzte Aktivitäten im Herz und Darm von Transkriptionsfaktoren (Herz: *eHAND*, *dHAND*, Srivastava et al., 1995), sowie von Komponenten der extrazellulären Matrix (*flectin*, Tsuda et al., 1996) und des Cytoskelets (*Aktin*, *Desmin* und *Cytokeratine*, Itasaki et al., 1989; Schaart et al., 1989; Price et al., 1996) wurden berichtet. Eine Beteiligung dieser Faktoren bei der Schleifenbildung konnte durch genetische Manipulationen nachgewiesen werden (Itasaki et al., 1991; Srivastava et al., 1995). Der molekulare Mechanismus dieser asymmetrischen Morphogenese ist jedoch nicht klar. Jedoch konnte in letzter Zeit die Frage wie die transiente asymmetrische Genexpression in Phase 2 zu positionsgerechter Organentwicklung in Phase 3 führt erhellt werden. Das Homeoboxgen *Pitx2* konnte als ein Mediator von linker Positionsinformation zwischen Phase 2 und 3 identifiziert werden.

### **1.6.3 Das Homeoboxgen *Pitx2*: Mediator zwischen asymmetrischem *nodal* Signal im linken Seitenplattenmesoderm und asymmetrischer Organmorphogenese.**

*Pitx2* zählt zur bicoid Familie der Homeoboxtranskriptionsfaktoren (Gehring et al., 1994). Gene dieser Gruppe haben wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung von Insekten bis zu Wirbeltieren (De Robertis et al., 1992; Klein und Li, 1999). Die Klonierung und Analyse von *Pitx2* Genen aus *Drosophila*, Mensch, Maus, Huhn und *Xenopus* liess auf die Beteiligung von *Pitx2* an einer Reihe von Entwicklungsvorgängen schliessen (Semina et al., 1996; Mucchielli et al., 1996; Vorbrüggen et al., 1997; Kitamura et al., 1997; Gage und Camper, 1997; Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999). Bei Mensch und Maus wurden zudem drei verschiedene *Pitx2* Isoformen beschrieben, die sich im N-terminalen Abschnitt des Proteins unterscheiden (Arakawa et al., 1998).

Neben den in der Literatur beschriebenen Funktionen in der Augen-, Hypophysen - und Zahnentwicklung (Mucchielli et al., 1996; Semina et al., 1996; Drouin et al., 1998) spielt *Pitx2* eine wichtige Rolle in der Entstehung der Links-Rechts Achse von Wirbeltieren. Für *Xenopus*, Huhn, Maus und Zebrafisch konnte eine konservierte Expression im linken Seitenplattenmesoderm nachgewiesen werden (Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999 und diese Arbeit, siehe Abb.13 und 14). Die konservierte Kolo-kalisation von *Pitx2* mit *nodal* im linken Seitenplattenmesoderm der Wirbeltiere liess auf eine Interaktion dieser Faktoren schliessen. Die *Pitx2* Expressions-Analyse von Embryonen der *iv* Mausmutante, die eine zufällige Lage des Organsitus aufweist, unterstrich dies. Im linken Seitenplattenmesoderm von *iv* Embryonen fanden sich vier verschiedene *Pitx2* Expressionsmuster, entweder normal, nur rechts, bilateral oder keine. Dies entsprach sowohl qualitativ als auch quantitativ dem beobachteten *nodal* Expressionsmuster in *iv* Embryonen (Campione et al., 1999). Ein zeitlicher Vergleich der Expressionsmuster von *Pitx2* und *Xnr1*, dem *nodal* Homolog, im Seitenplattenmesoderm des Frosches, gab Hinweise



auf die Interaktionsart. Es zeigte sich, dass *Xnr1* bereits in Stadium 19 Neurula Embryonen asymmetrisch exprimiert wurde (Lustig et al., 1996; Blum et al., 1999), während *Pitx2* mRNA erstmals in Stadium 25/26 Kaulquappen asymmetrisch im Seitenplattenmesoderm detektierbar war (Campione et al., 1999, Blum et al., 1999). Die zeitliche Abfolge der Expressionsmuster im Frosch legte eine Induktion von *Pitx2* durch *nodal* im linken Seitenplattenmesoderm nahe. Tatsächlich konnte ektopische *Pitx2* Expression durch rechtsseitige Missexpression von *nodal* in Huhn und Frosch Embryonen beobachtet werden (Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999). Zusammenfassend plazieren diese Analysen *Pitx2* stromabwärts von *nodal* in der Phase II der links-rechts Kaskade.

Zeitliche und räumliche Vergleiche von *Pitx2* und *nodal* in Maus, Frosch und Huhn wiesen auf eine weitergehende Funktion von *Pitx2* hin. So fand sich linksseitige *Pitx2* Expression im Herz vor und während der Schleifenbildung, während *nodal* im Herz nie nachweisbar war. Desweiteren war *nodal* nur transient im linken Seitenplattenmesoderm exprimiert, im Unterschied zu *Pitx2*, dessen Expression zunächst im linken Seitenplattenmesoderm und später während der asymmetrischen Morphogenese des Magen-Darmtraktes, auch ohne *nodal*, erhalten blieb. Die rechtsseitige Missexpression von *Pitx2* in Xenopus- und Huhn-Embryonen resultierte in Inversion des Herz- und Darm-Situs, sowie in fehlerhafter Organogenese (Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999). Somit könnte *Pitx2* ein Mediator sein, der das linke *nodal*-Signal im Seitenplattenmesoderm mit der asymmetrischen Organogenese verbindet, und als linke Positionsinformation die Herz und Darmentwicklung festlegt.

#### **1.6.4 Ziele der Arbeit**

- a) Der Nachweis einer *gsc* kompensierenden Genaktivität in der Maus durch Klonierung und Analyse eines *gsx* homologen Gens.
- b) Die Untersuchung der Regulation des *Pitx2* Gens in *Xenopus laevis* während der Links-Rechts Entwicklung.
- c) Die Untersuchung der Rolle der *Pitx2* Isoformen bei der Lateralitätsentstehung.

## **2. Ergebnisse**

### **2.1. Klonierung eines *gooseoid (gsc)* verwandten Gens der Maus.**

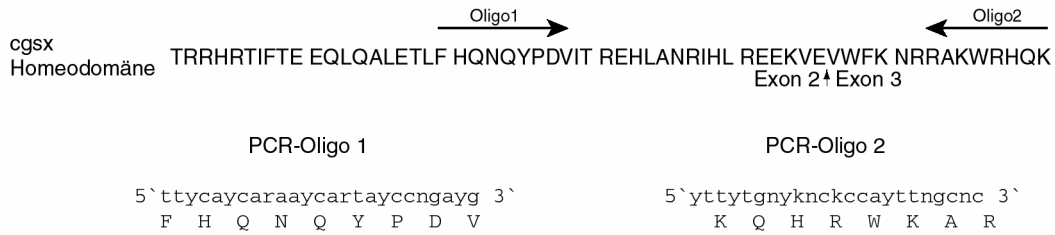
Die konservierte Expression im Wirbeltierorganisor, sowie die Fähigkeit zur Induktion ektopischer Achsen (De Robertis et al., 1994), legten eine wichtige Funktion von *gooseoid (gsc)* bei der Entstehung der Körperachsen nahe. Gezielte Inaktivierung von *gsc* in der Maus führte jedoch zu keiner Störung der Achsenbildung (Yamada et al., 1995; Rievera-Perez et al., 1995). Dieser Befund sprach für eine Komplementation der *gsc* Funktion durch eine verwandte Genaktivität. Im Huhn wurde mit *cgx* ein *gooseoid* verwandtes Gen beschrieben (Lemaire et al., 1997). Von anderen Labors verwendete Standardmethoden der Durchsuchung von Mausgenbibliotheken mit einer *cgx* (Huhn *cgx*) Sonde, schlugen fehl (Michael Kessel, MPI Göttingen persönliche Mitteilung). Als alternativer Ansatz wurde daher eine Klonierung mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) versucht. Da wichtige Funktionen, wie z.B. DNA Bindespezifität, von der Aminosäuresequenz der Homeodomäne abhängen (Gehring et al., 1994), wurde dort ein hoher Grad an Homologie zwischen Huhn und Maus angenommen.

Basierend auf der Aminosäuresequenz der *cgsx* Homeodomäne wurden eine Reihe von PCR Oligos entworfen. Um möglichen Speziesunterschieden in der Verwendung des genetischen Codes Rechnung zu tragen, wurden degenerierte Oligos konstruiert, die jede Codonverwendung berücksichtigten. Funktionalität, Spezifität und Reaktionsbedingungen wurde in PCR Kontrollexperimenten an *cgsx* und Maus *gsc* DNA getestet (nicht gezeigt). Ein genomischer, 5 Kilobasen umfassender *cgsx* Klon, freundlicherweise von Juan Carlos Izpisua-Belmonte (Salk Institut, San Diego) zur Verfügung gestellt, diente als Positivkontrolle in den PCR Reaktionen.

In einer ersten umfangreichen Versuchsreihe wurde eine Vielzahl von PCR-Produkten kloniert, die sich nach Sequenzierung als Artefakte herausstellten (nicht gezeigt). Als Template wurde RNA von E7.5 und E12.5 Mausembryonen, genomische Maus DNA sowie RNA von Di-Methyl-Sulfoxid behandelten P19 Zellen eingesetzt, die in der Northern Analyse mit einer *gsc* Sonde zwei Banden zeigte (nicht gezeigt). Durch eine Abänderung des Standard PCR Protokolls, die eine erleichterte Hybridisierung der eingesetzten Oligos erlaubte (siehe Material und Methoden), konnte ein genomisches, 750 bp grosses PCR Fragment mit den Oligos 1 und 2 amplifiziert werden (Abb. 6 A, B).

Die Klonierung und Sequenzierung ergab, dass das PCR Fragment für eine partielle Homeodomäne codierte, die zu *gsc* und *cgsx* verwandt war (Abb. 6 B). Die bei *gsc* und *cgsx* konservierte Lage des Introns (Abb. 6 A, B) und das Vorhandensein eines konservierten Lysins an Position 50 der Homeodomäne liessen den Schluss zu, dass es sich um ein zweites *gsc* Gen der Maus handelte (*gsc2*).

A



B

gsc2 PCR Fragment

10 30 50  
TACAGAACCAGTATCCCGACGTAGGCACACGCGAACGCTTGGCGGTCCGCATCCGCCTGC  
Q N Q Y P D V G T R E R L A V R I R L R  
70 90 110  
GAGAGGAGCGCGTGGAGGTGGGTGTTTCAGCCCGACGCTGGAGGCCAACTCCGGCGCCAC  
E E R V E  
130 150 170  
TCTTATTTTCAAAGACCGACCTTCCAGAAAGGGGCTTCAACTCGTAGCCGGCTACACTGA  
190 210 230  
AGGGAGACCCCTATGATCACTCGATGAGGGCGCGGGCCGGTTCTTCCAGCACGTTATT  
250 270 290  
TGGGTGTCCTTGAAC TGAAGAGGTCAAGAGTCGTTTTCTTTGACTTTGTCCGGCTCCC  
310 330 350  
CAGTTTCCCTGATGATGAAATGCACGTTTGTTCCTGCCCCAGATGTGAGAAAGTTAAGA  
370 390 410  
AATGTTCAAATCTAGTCAGGCATAGTGGCATGTATCTGTAATCCCAACCCCTGGGGGATG  
430 450 470  
GAGGCTGGATCATGAGTTCATCAAAGTCAGTCTCCTCACACAGTAAGAAGCCGCTAGCC  
490 510 530  
ACCTAGGTTACAAGGAGGAGAGGTGGGGTGGGAAGAAGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGA  
550 570 590  
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGCGCCTGAGCCTGGGCTCAGGCTGGGAAAGTGTG  
610 630 650  
TGAGGGAAGGAGGTGTCAGATCCATTACCTACCTCCATTGAAGCCTACCACCTAGCC  
670 690 710  
CTTCCAAAGTCTTTGGATGATGGATCCTTGGGGCCTGAGCTGTCTTGGTCTCCCTCCTC  
730 750  
CTCAGGCTGGTTCAGAACC CGCCGGCAAAGTGGCGACACCAAAG  
V W F K N R R A K W R H Q K

C

gsc2 codierende Region

10 30 50  
ATGGCGACTGCAGGCAGCGCGCCAGCCGAGGGACCCGGCGACCCCTGCCCTTTCTCC  
M A T A G S A A S R R D P G R P C P F S  
70 90 110  
ATCGAGCACATCCTCTCCAGCCTGCCGGAGCGCAGGCCCGCGACGCGGCCACCGCAGCCC  
I E H I L S S L P E R R P A T R P P Q P  
130 150 170  
GTCGGTGGTGGAAACCCGCGGAGCTAGACGAACCCGAGGCGCCGTTCCCGCTGCTCCT  
V G G R N P A E L D E P E A P V P A A P  
190 210 230  
TGCGCCTGCTGCTGCTGCAACCCGCGGCTGCGACCCGCGGAACCCGGAGACATCG  
C A C C C C C N P R A A T R G T P E T S  
250 270 290  
TCCGGGCGGGCTTGCGGCTGGCGTGGCCGCTGAGGTTGGCGCCCGCCACGCCCTCTCCC  
S G P G L R L A W P L R L A P A T P S P  
310 330 350  
TTGACGGCGCTAGAGCAGGCTCCCGGCGCTGACTGGCACGAGCGGCCCGGCCCCGAG  
L T A P R A G S P A L T G T S G P G P Q  
370 390 410  
AGGCGCACCGCGGCCACCCTACCATCTTCAGCGAGGAGCAGTGCAGGCGCTCAGGCA  
R R T R R H R T I F S E E Q L Q A L E A  
430 450 470  
CTCTTCGTACAGAACCAGTATCCCGACGTAGGCACACGCGAACGCTTGGCGGTCCGCATC  
L F V Q N Q Y P D V G T R E R L A V R I  
490 510 530  
CGCCTGCGAGAGGAGCGCGTGGAGGTCTGGTTCAAGAACC CGCGCAAAGTGGCGACAC  
R L R E E R V E V W F K N R R A K W R H  
550 570 590  
CAAAAGCGTCTTCTCATCGAGGCTCCTGCCTGGGACTAAGAAAACCTCCCAAGGAGAT  
Q K R A S S S R L L P G T K K T P K E S

TGTTGA  
C \*

Homologie zu engrailed Repressions-Domäne  
Homeodomäne

**Abb. 6 Klonierung eines *goosecoid* verwandten Gens in der Maus.**

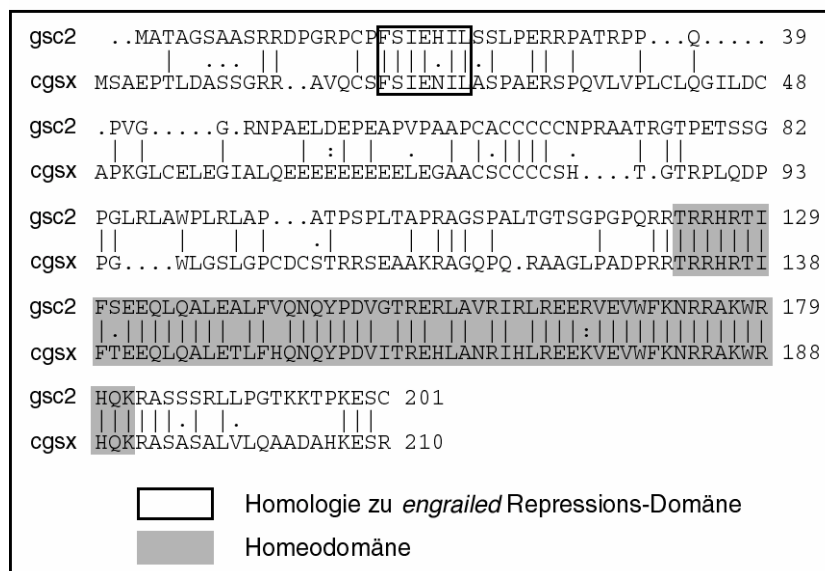
- (A) PCR Oligo Design. Basierend auf der Aminosäuresequenz der Huhn *gsx* Homeodomäne [cgsx-HD] wurden degenerierte Oligos erstellt. Oligo1 war 128-fach und Oligo2 64-fach degeneriert. An Positionen, an denen der genetische Code für Aminosäuren alle Basenkombinationen ermöglicht, wurden Inosin Nukleotide (n) eingebaut. y = C oder T, r = A oder G; k = G oder T; n = Inosin. Der Pfeil in der Homeodomänensequenz deutet die Position von Intron 2 im *cgsx* Gen an.
- (B) DNA- und Aminosäuresequenz des amplifizierten Fragmentes.  
Als Basis der Reaktion diente genomische Maus DNA. Die Aminosäuresequenz und die Lage des Introns deuten auf ein *goosecoid* verwandtes Gen hin.
- (C) Die Codierende DNA- und Aminosäuresequenz von *gsc2* umfasst 606 Basenpaare und kodiert für 201 Aminosäuren.

An diesem Punkt der Arbeit wurde im Rahmen des Genomprojekts der gesamte *gsc2* Locus von Maus und Mensch publiziert (Galili et al.;1997; Gottlieb et al.;1997). Galili et al. identifizierten genomische Mausequenzen, die synthetisch zu der bei DiGeorge Patienten deletierten minimalen kritischen Region waren, während Gottlieb et al. diese Region am Menschen untersuchten. Um eine längere In situ Hybridisierungsprobe zu erhalten wurde, basierend auf den veröffentlichten Sequenzdaten, mit PCR die kodierenden Abschnitte von *gsc2* aus genomischer DNA kloniert (nicht gezeigt). Das *gsc2* (oder *goosecoid-like gsc1*, Galili et al.;1997; Gottlieb et al.;1997.) Gen besteht aus 3 Exonen und kodiert für ein aus 201 Aminosäuren bestehendes Protein (nicht gezeigt und Abb.6 C). Die Homologie von *gsc2* und *gsc* beschränkte sich auf die Homeodomäne (Abb. 7), die Exon/Intron Struktur sowie eine sieben Aminosäuren umfassende Domäne am N-Terminus, die Ähnlichkeiten zu einer Repressionsdomäne von *Drosophila engrailed* aufwies (Abb. 6 C, Smith and Jaynes, 1996).

<b>cgx</b>	TRRHRTIFTEEQLQALETFLHQNQYPDVITREHLANRIHLREEKVEVWFKNRRAKWRHQA
	.                                             :
<b>gsc2</b>	TRRHRTIFSEEQLQALEALFVQNQYPDVGTRELRILREERVEVWFKNRRAKWRHQA
	. :         :                 : .
<b>gsc</b>	KRRHRTIFTDEQLEALENLFQETKYPDVGTREQLARKVHLREEKVEVWFKNRRAKWRRAQK

**Abb. 7 Vergleich der Homeodomäne der *goosecoid*-verwandten Gene *cgxs* (Huhn) und *goosecoid* (Maus) mit *gsc-2* (Maus).**  
Die Ähnlichkeiten bzw. Identitäten im paarweisen Aminosäurevergleich betragen: *gsc/gsc2* = 85% bzw. 75%, *cgx/gsc2* = 88% bzw. 86%, *cgx/gsc* = 85% bzw 77%. | = identische Aminosäuren, : = gleiche chemische Eigenschaften . = ähnliche chemische Eigenschaften

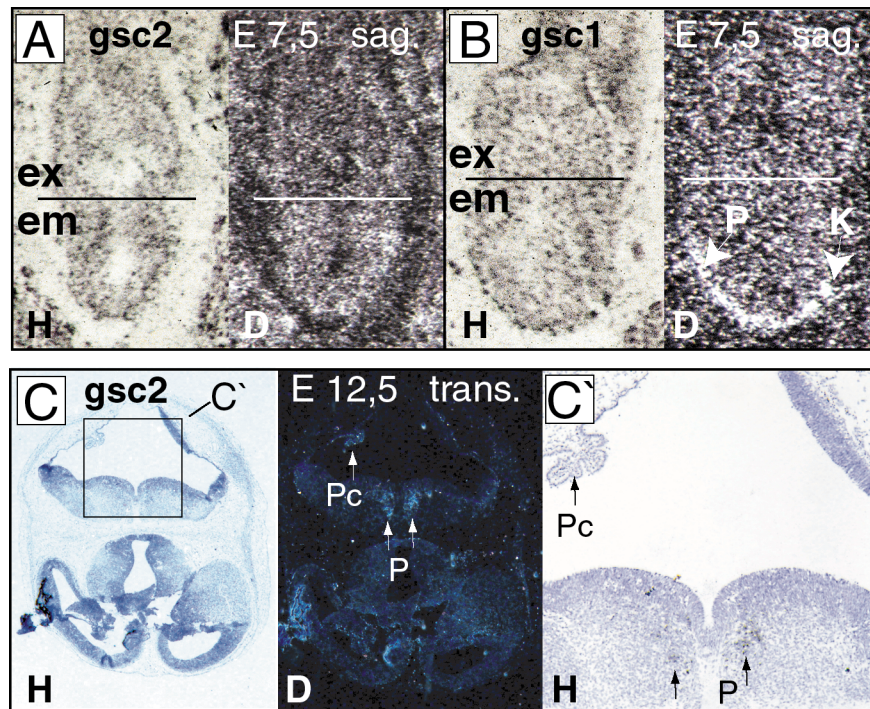
Ein paarweiser Vergleich der Homeodomänen von *gsc*, *gsc2* und Huhn *cgx* zeigte, dass in Bezug auf biochemischen Eigenschaften der kodierten Aminosäuren der Grad an Ähnlichkeit zwischen *gsc* und *gsc2* (85%) bzw. *cgx* und *gsc2* (88%) nicht signifikant verschieden war (Abb. 7). Eine nähere Verwandtschaft von *cgx* zu *gsc2* als zu *gsc* könnte aus der Anzahl der identischen Aminosäuren innerhalb der Homeodomäne geschlossen werden (86% zu 75%; Abb.6). Der Vergleich der gesamten Proteinsequenz von *gsc2* und *cgx* erbrachte eine Homologie von lediglich 55% (Abb. 8). Zur Klärung der Frage, ob es sich bei *gsc2* und *cgx* dennoch um homologe Gene handelte, wurde eine *gsc2* Expressionsanalyse durchgeführt. Insbesondere sollte ein *gsc* komplementierendes Gen während der Gastrulation aktiv sein.



**Abb. 8 Vergleich der Aminosäuresequenzen von *gsc-2* und *gsx*.** Die 55% Homologie beruht weitgehend auf Ähnlichkeiten in der Homeo- und der *engrailed* Domäne. | = identische Aminosäuren, : = gleiche chemische Eigenschaften . = ähnliche chemische Eigenschaften

Die Analyse des *gsc2* Expressionsmusters durch In situ Hybridisierung erwies sich als schwierig, da die zunächst als Sonde verwendeten codierenden Sequenzen einen hohen GC Gehalt (70 %) aufwiesen. Daher wurde ein Fragment, bestehend aus Exon 3 und der 3' untranslatierten Region (580 Basenpaare), mit PCR aus genomischer DNA kloniert (nicht gezeigt). Eine *gsc2* Expression zum Zeitpunkt der Gastrulation (E6,5 und E7,5) konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt und Abb. 9 A). Als Positivkontrolle für die technische Durchführung diente *gsc* (Abb. 9 B). Positive Signale für eine *gsc2* Transkription fanden sich im Gehirn von 12,5 Tagen alten Mausembryonen in

der sich entwickelnden Pons des Mesencephalon und im Plexus choroideus des vierten Ventrikels. (Abb.8C). Von anderen Arbeitsgruppen wurden weitere Expressionsorte publiziert, wie zum Beispiel im rostralen Vorderdarm (E8,5)(Saint-Jore et al.;1998) oder primordiale Stammzellen (E9,5 bis 12,5)(Galili et al.; 1998). Diese konnten in der vorliegenden Analyse nicht bestätigt werden.



**Abb.9 Keine gsc2 Expression während der Gastrulation der Maus.** Expressionsanalyse durch radioaktive *In situ* Hybridisierung von histologischen Schnitten.

- (A) Sagitaler Schnitt eines E7.5 Embryos hybridisiert mit gsc2. Es konnte keine gsc2 spezifischen Signale detektiert werden.
- (B) Sagitaler Schnitt eines E7.5 Embryos hybridisiert mit gsc1. Als positive Kontrolle, für die technische Durchführung des Experimentes diente eine goosecoid Probe. Sie zeigt das gsc Expressionsmuster in Prächordal-Platte [P] und Knoten [K].
- (C) Transversaler Schnitt durch das Gehirn eines E12.5 Embryos. gsc2 spezifische Expression findet sich in Pons [P] und Plexus choroideus [Pc]. (Pfeile). (C') zeigt die Silberkörner im Hellfeld.  
H, Hellfeld; D, Dunkelfeld; em, emryonal; ex, extraembryonal.

Aus der Sequenz- und Expressionsanalyse (Abb. 6 - 8) folgte, dass es sich bei gsc2 nicht um das cgsx Homolog handelte. Die fehlende gsc2 Expression während der Gastrulation legt nahe, dass dieses Gen nicht die gesuchte gsc komplementierende Genaktivität darstellt. Weitere Versuche mit PCR ein cgsx homologes Gen der Maus zu klonieren führten bisher nicht zum Erfolg.

## **2. 2 Klonierung, Expressionsanalyse und Regulation des Homeoboxgens *Pitx2* während der Entwicklung der Links-Rechts Asymmetrie**

Auf der Suche nach *gsc*-verwandten Genen der Maus wurde das Homeoboxgen *Pitx2* aus P19 Teratokarzinomzellen kloniert (Campioni et al., 1999). Dieses Gen war asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm und Herz exprimiert (Campioni et al., 1999). Um die *Pitx2* Regulation und Funktion aufzuklären habe ich das *Xenopus Pitx2* Gen kloniert. Der Modellorganismus *Xenopus* eignet sich, um Fragen der Lateralitätsentstehung durch Missexpressionsexperimente im Kontext des Embryos zu analysieren. Bereits im 4-Zellstadium wird die dorso-ventral Achse festgelegt. Zusätzlich bildet die animal-vegetative Achse des Froscheies eine Art von anterior-posterior Achse, was dazu führt, dass linke und rechte Seite des Embryos klar unterscheidbar sind.

### **2.2.1 Klonierung des Homeoboxgens *Pitx2* im Frosch *Xenopus laevis* und Zebrafisch**

Zur Klonierung von *Pitx2* in *Xenopus* wurden  $10^6$  Phagenklone einer Neurula cDNA Genbibliothek (Stadium 18) unter reduzierter Stringenz mit einer Maus cDNA Sonde durchsucht (siehe Material und Methoden 4.7). 16 positive Klone wurden isoliert. Darunter fanden sich drei verschiedene Transkripte, die Homologie zu Mausgenen zeigten. Zwei davon waren *Pitx2* Klone, die unterschiedliche Isoformen repräsentierten. Der dritte Typ von Klonen war die *Xenopus* Version des *Pitx1* Gens. Die Sequenzen der cDNA Klone sind mit Translation in Abb. 10 A-C dargestellt. Die *Pitx2* Isoform, mit dem grössten offenen Leseraster (327 Aminosäuren; Abb. 9A) wurde *Pitx2A*, die mit dem kürzeren (317 Aminosäuren; Abb. 9B) *Pitx2B* genannt. Eine dritte, bei Mensch, Huhn und Maus identifizierte *Pitx2* Isoform (*Pitx2BΔ*; siehe unten und Abb.12) wurde in diesem Screen nicht gefunden und konnte auch in RT-PCR Experimenten während der Froschentwicklung nicht nachgewiesen werden. Die *Xenopus Pitx1* cDNA codiert für ein 306 Aminosäuren grosses Protein (Abb. 10



C). Die *Pitx2B* bzw. *Pitx1* cDNA Klone waren unvollständig und stromaufwärts bzw. stromauf- und stromabwärts der translatierten Region mit ribosomalen RNA Sequenzen fusioniert (nicht gezeigt).

**A**

**XPitx2A**

```

10   30   50
GGCAGCGTGGGTCCTCAGTGCCTGTTGGTGGTAGTGAATAGATGACAGCTCCCTGTGCGA
70   90   110
AGTGTGAGCCCTGGATAGTGTGACCTCTTGTGCGCAGGTGACACCTCTTTAAATGCTCC
130   150   170
TGACAGATCTCTAGGAGATTTCTCTCACTCAGCTGAGCAAGCGATGAGGAGCTCAGC
190   210   230
AGCCTTCTATTATACATGTTGTGAGCACCAGTGCAGACTACATGTAGAGCTGACTACTCA
250   270   290
CGAGCCTTGTGTCTCATACATCCCTGCTGGCCATCACTTGGAGCTCAGTAGTAGTGTCA
310   330   350
TTGAATCCATTTGGAGCTTTGGGCGCTTTCAITCAAGTTCTCTGATTTATTTGGACITTTGA
370   390   410
TATTTTGTGAGCTACTGTACTGTACCCAGCATCTCCATGAACTCTATGAAAGAGCC
                               M N S M K E F
430   450
TTTACATTTGATCACTGCTGGGATGATGTGCTGCAAGTCTTCCATCAACACCA
L H L D H L A G S R V A A A S S H H H H
490   510
CCATCACTACCCAGCACAGAGAGCTCTTGTATCCATGGCCTCCTCATTTGGGTCA
H H H Q H Q T V T L V S M A S S L G Q Q
550   570   590
CGGCTTGGGAGTGTAAAGTCAAGCTAGAGTGCATACCATCTCTGACACCTCAGCCCC
R S G E C K R L E V H T I S D T S S F
610   630   650
AGACATCGAGATTAAGACAAAGTCAACAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
D T A D K D K S H Q T K N E D S T D D
670   690   710
TCCCTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
F S K K R Q R R Q R T H F T S Q L Q Q
730   750   770
GGAGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
E L E A T F Q R N R Y F D H S T R E I
790   810   830
CGCATGTGAGCAACTCTAGCAGAGCCAGAGTCAAGGTGCTGTGTTAAAGATCGAGGGC
A V W T N L T E A R V R V W F K N R A
850   870   890
CAGTGGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
K W R K R E R N Q Q A E L C K N G F G P
910   930   950
CGAGTTCAATGATGAGTCAGCAGCAATGTCAGCTACCCGAGTTACTGTGACAGAA
Q F N Q L M Q P Y D D M Y P S Y V N N
970   990   1010
CTGGCAGCCAGGGGCTTCAAGCTCTCTCTCACTAGAGCTTCCCTCTCTCA
W A A K G L T S A S L S T R S F F F N
1030   1050   1070
TTTCAATGATGAGTCAGCAGCAGCAGTGTGTTCTCCCTCCACTTCAATTT
S M N V N P L S S Q S M F S S P N S I S
1090   1110   1130
TTCATGAGTGTCTCTCCAGTGTCCCTCCCTGTATCTGGTCCAGGCCTG
S M S M S S G M V P S A V T G V F G S G
1150   1170   1190
TTTAAATGTGATGAAATTAAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
L N S L N N L N N L S N P S L N T A V P
1210   1230   1250
AAGTGGTGTCCCTCCAGTGTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
T S A C P Y A P P T P P Y V Y R D T C N
1270   1290   1310
CTCCAGTGTCCCTCCAGTGTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCC
S S L A S L R L K A K Q H S S F G Y A T
1330   1350   1370
CGTTCAGACCCAGGATCACTCAGGCTGTCGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
V Q T P G S N L S A C Q Y A V D R P V *
1390   1410   1430
ATACCTGTGATGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
1450   1470   1490
CGCTCAATCACATCACTGGTCACTCCAAAGAGAATGACAAGAGAGAGAGAGAGAG
1510   1530   1550
AAGCCTTAATTCATTTTATTTCCAGGGGATGCTCCAGTGAATCAACAGAGCATTT
1570   1590   1610
TTAATCTTAAAGATATAAATTTGGCCACAAAGAGCTGGAGCTGTATTTAATATTT
1630   1650   1670
TTGGCTTGAATTTTTTTTTATCTTAACTCAACAAAGCTCAAAAGAGAGAGAG
1690   1710   1730
GCTGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
1750   1770   1790
ATATCTTTACAGTGTATATACACATTAGGCTTGTAGAGTAAGAGCTCAACGAAAGC
1810   1830   1850
CGAGCAAGAGAGATGATATATAAACAAGAGATGATGATTTTAAAGAGAGAG

```

**B**

**XPitx2B**

```

10   30   50
CCGAAATCGCAGCAGCTGCTCATCTCCAGCTGGAGCTCCCAGCACCGGGTTCTTGGA
70   90   110
TATGTGCTGGGTTGTCTCCCTTTGCTGTGATGTTCCTTTCTTATGCTTCTTGTGT
130   150   170
TGCCACACCAAAGTGCCTCAGGATTTCTGTGACAGAGAAAGCAGAGGGCAGAAAGC
190   210   230
AGCGGAATCTACTAATGTCACCGGTAACAGAGTAGGACAGCACTGCCGAAATCG
                               M D S N C R K L V
250   270   290
TGACAACCTGTGTCACTAGGAGTGCAGCCCTCGCGAGTGGAGTGTCTTTCTTAAG
T T C V Q L G V Q P S A V E C L F S K E
310   330   350
AGTCTGATATGAAGAGGAGGGGTTTCTGTGCTCAGATGAGAACCCAAAGCCAAAG
S D H K K G G F S A A D G T E G N R K E
370   390   410
AAACTGGAAGAGAGTGTAGCCGATTCACCAAGATGGAGTATGATAAGAACAAAGCC
T G R R F S R I H S G S D K D K S H Q
430   450   470
AGAGCAAGAGAGAGGACAACTGACAGATGATCCCTCCGAAAGAGAGAGAGAGAG
S K H E D H S T D P S K K K K R Q R R Q
490   510   530
AGAGACTCACTTCCAGCTCAGCAGCTGAGGAGTGAAGAGAGAGATTCAGAGAATC
R T H F T S Q Q L Q E L E A T F Q R N R
550   570   590
GTTTACCCGAGATGTCACAGAGAGAGAAAGTCCAGATGAGTGTGAGTGTGAGGAG
Y P D M S T R E E T A A V W T H L T E A R
610   630   650
GAGTGTAGGTTTGGTTAAGAACCCAGGAGCAGAGTGTGAAGAGAGAGAGAGAGAC
V R Y W F P K N R R K K R K E R N H Q Q
670   690   710
AACTGTAGCTGTCAAAAGGCTTTGGCCCGGAGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
T E L C R H G G F S F Q F N G L M Q P Y D
730   750   770
ATGATATGATCCCAAGTTACTGTGACCAACTGAGGACCAAGGGCTGACTGACGCT
D N Y P S V S Y N N W A T K G L T S A S
790   810   830
CTGTGCTCAGTCAAGGCTTCCTTCTCAATTTCTAATGTGATGATGATGATGATGAT
L S T K S P F P P N S M N V N F L S Q Q
850   870   890
AGAGTATGCTTCTTCCCTTCCATTTCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCC
S N F S S P N S L S S H S N S S M V P
910   930   950
CTCTGCTTCTTCTGAGTCCAGGCTGTGTTAATGATGATGATGATGATGATGATGAT
S A V T G V P G S G L N S L N L N L N L
970   990   1010
TGAGCAAGTCTTCCCTCAATCTCACTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
S N P S L N T A V E T S A C P Y A P P T
1030   1050   1070
CACTCCCTGTGTCAGAGAGACATCACTCACTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
P P Y V Y R D T C N S S L A S L R L K A
1090   1110   1130
CCAGGCACTGATCTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
K Q H S S F G Y V Q N P G S N L S A C Q
1150   1170   1190
AATGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG
Y A V D R P V *
1210   1230   1250
TCTGTGATGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGT
1270   1290   1310
AATGAGCAAGAGGAACTGAGAGAACCTAATTCATTTTTTATCAGCGGATGCTCT
1330   1350   1370
GCAGTGAACTCAACAGACTTTTTTAATCTTGAAGAATAAATTTGGCACCAAGAGC
1390   1410   1430
TGAGCTGTGATTTTAAATTAATTTTGGTGAATTTTTTTTTTAACTAAATTAACCA
1450   1470   1490
TCAAAGCTCAAAAAGGAGCTGATATATATATATATATATATATATATATATATAT
1510   1530   1550
ATTTTTAAGAAAGTGTCTTCAATCTTTAAGTGTATATATATATATATATATATAT
1570   1590   1610
AGAGTAAGACTGAAAAGAGCCAGAGAGAGAGTATATAATAAAGAGAGAGAGCAT
1630   1650   1670
GTATTTTAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG

```

**C**

**XPitx1**

```

10   30   50
ATGTGATTCCTTTAAGAGAGCTATGAAATTTGGAAAAGTTCCTGAGAGTGTAAAGACCAG
M D S F K G A M N L E R L P E S L R P Q
70   90   110
CTCTCCACAGACATGCCCAGAGTTCTCATTTGAGAGATCACTGAAGCCAGGATCCC
P S H D M A T S F H L Q R S S E A R D P
130   150   170
ATGSAATCTCAGCCAGTGTCTCTGATACGTAAAGTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
M D N S A S E S S D T E I V E K E R T G
190   210   230
GAGCCAAAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
E P K G E D G N G D P F S K K K K Q R R
250   270   290
CAAAGGACTCACITTCAGCCAGCAGCTCAGGAGCTGAGGCCACATTTCCAGAGGAAC
Q R T H F T S Q Q L Q E L E A T F Q R N
310   330   350
CGATCTCAGACATGACATGAGAGAGAGAGATTCCTGTATGAGCAATCTGAATGAAGC
R Y F E D M S M R E E I A V W T N L T E A
370   390   410
AGGGTCAAGGTTGTTCAAGAACCCGCGAGCCAGTGGAGGAGAGAGAGAGAGAGAG
R V K V W F K N R R A K W R K R E R N Q
430   450   470
CAGATGGACTGTGTGAGAAGTGTACTGTCCGAGTTCAGCGGCTCACTGAGCCGCTC
Q M B L C K N G Y V P Q F S G L Q P Y
490   510   530
GAGGAGATGTAGCAGAGTACCCCAACAGCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
D E H Y A G Y P Y H N W A T K S L T P A
550   570   590
CCCTCTCCACAGAGAGTCCCTTCTCAACTCCATGAGTCCCTTGTCTCCAGCTCC
P L S T K S F T F F N S H S P L S Q S
610   630   650
ATATGCTCCGCCCCAGCTCTCTCTTCCATGAGAGTCCCTCAGGATGTGTGACTCT
M F S G F S S M S M S H P S S M G H S
670   690   710
GGGTTGCGAGCATGGCCAGCTCCAGCTCAATAACATCAATAACCTGAACACATCAG
A V P G M A N S S L N N I N N L H I S
730   750   770
GGCTTCCTCCACTGAGCAGTCTCTCTACTGTGCTCCCTGATGAGCCCTGGTCTCC
G S S L N S A M S S L N T G C P Y S F P
790   810   830
CCCTACAGGTTTACCGGAGACTTGTACTCCAGTCTGGCAGCTGAGAGCTGAAATCC
P Y T V Y P D T C T G S L A S L L K S
850   870   890
AAGCAGCATCCACCTGCGTACAGAGCTCAGAGCCCGGCTCCAGCTCAATGCTC
R Q H S T F G Y S M S S P L S H A
910   930   950
TGCCAATTAAGATGTATAGACTCCCCGCGCCAGCGCTGCTCCGTGAGACTCTCA
C Q Y H S S
970   990   1010
CATGGAACCAACAAATTTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

```

**D**

**ZbPitx2**

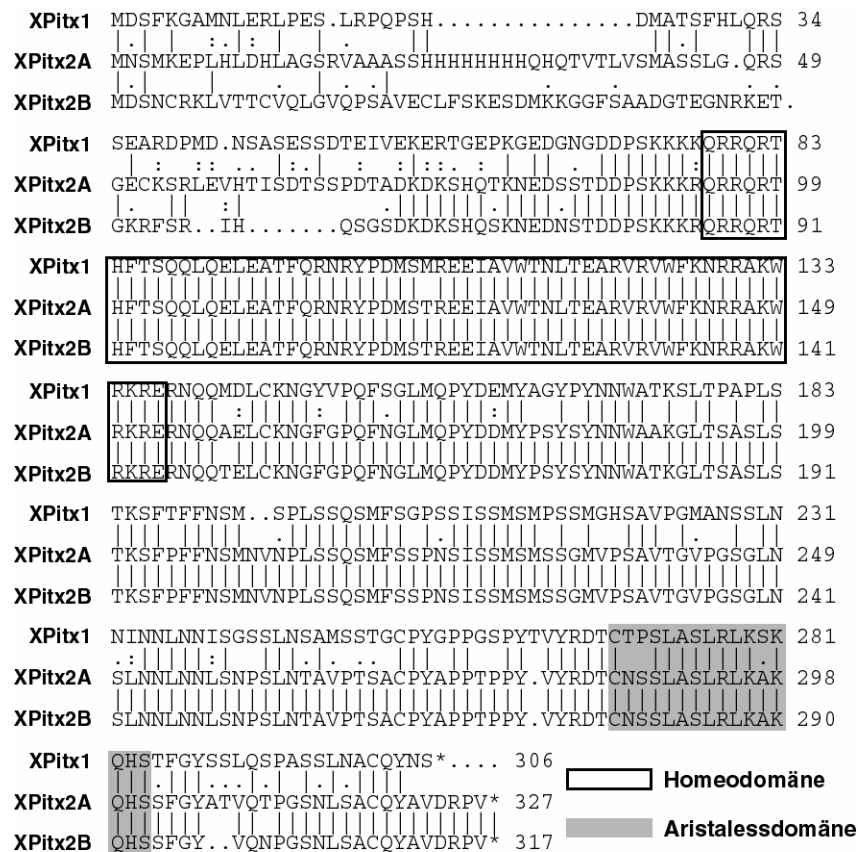
```

10   30   50
GAGGATCGTCCAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
E D P F S K K K R R Q R T H F T S S Q Q
70   90   110
TTACAGGAAGTGTGAGCCACTTTTTCAGAGGAATCTATCCGCACTGTGACATGAG
L Q E L E A T F Q R N R Y P D M S T R E
130   150   170
GAGAATGGCGTTTGTGAAGAAATTTACAGAGAGCAGAGTCCGAGTGTGTGTGATGAG
E I A V W T N L T E A R V R V W F K N R
190   210   230
CGGGCAAAATGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
R A K W R K R E R N Q Q A E L C K N G F
250   270   290
GGCCCTCAATCAAAGCACTTATGAGCCTTAAGATGATATGATATGATATGATATG
G P Q F N G L M Q Z Y D D M Y P S Y T Y
310   330   350
GACAACCTGGCTGCAAGGGACTCACTGCTGCTCTCTCTCTCAACAAGCTTCTCCCT
D N W V A K G L T S A S L S T K S F P P F
370   390   410
TTCAATCCATGAGTGTCAATCCGTCTCTCCAGTGTCTCTGCTCAGTGTCTCTCAC
F N S M N V N P L S S Q T M F S P N S
430   450   470
ATCTCTCAATGAGAGTGTCTCCAGTGTGTCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTG
I S S S M S S S S M S V P S A V T G V P G
490   510   530
TCAAGTTTAAAGAGTGTCAATCAACTGAAATCAACTGAGCAACCTCCTAAATTCGG
S S L N S L N L N L N N L N S N P S L N S G
550   570   590
GTTCGACCGGTGCTGCTTACCGCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
V P T F A C P Y A P P T F P Y V R D T
610   630   650
TGTAACTCAGCTTTCGAGCTGAGACTCAAGAGCAAGCA
C N S S L A S L R L R K A

```

**Abb. 10 Pitx cDNA Klone aus Xenopus und Zebrafisch**  
**(A) Xenopus Pitx2 Isoform A (1853 bp / 327 Aminosäuren)**  
**(B) Xenopus Pitx2 Isoform B (1638 bp / 317 Aminosäuren)**  
**(C) Xenopus Pitx1 (1015 bp / 306 Aminosäuren)**  
**(D) Zebrafisch Pitx2 PCR Fragment (641bp / 215 Aminosäuren)**

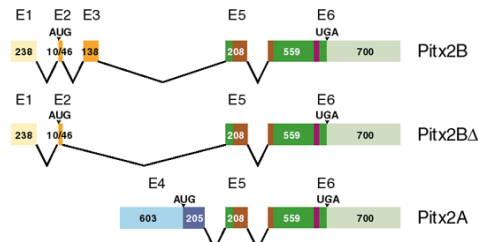
Der Proteinvergleich zwischen *Pitx2A* und *Pitx2B* zeigte, dass sich die beiden Isoformen im aminoterminalen Teil unterschieden, während die übrige Aminosäuresequenz, welche die Homeodomäne beinhaltet, nahezu identisch war (Abb.11). Die Aufklärung des *Pitx2* Genlocus in der Maus zeigte, dass die *Pitx2A* cDNA aus den Exonen 4-6 bestand, während die *Pitx2B* cDNA die Exone 1-3 sowie 5 und 6 beinhaltet (Abb.12 A und B; und Schweickert et al., 1999). Die gemeinsamen Exone 5 und 6 enthielten die Homeodomäne sowie die sog. Aristalessdomäne, eine 14 Aminosäuren umfassende Region unbekannter Funktion, die sich in einer Reihe von Homeoboxgenen wiederfindet (Abb.11 und 12; Semina et al., 1998; ten Berge et al., 1998).



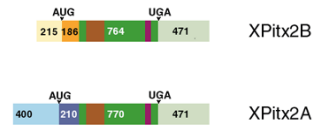
**Abb. 11 Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xenopus Pitx1*, *Pitx2A* und *Pitx2B*.** (erstellt mit dem Computerprogramm GAP)

Die *Pitx2* Isoformen unterscheiden sich in ihren N-Termini (siehe auch Abb.11). Die klonierten *Pitx2* Isoformen stammen von verschiedenen Allelen des tetraploiden Frosches *Xenopus*, was aus den wenigen Abweichungen im konstanten Teil (4 und 2 Aminosäuren weniger in *Pitx2B*) ersichtlich wird. *Pitx1* ist zu den *Pitx2* Isoformen zu ca 70% ähnlich, wobei die ersten 63 Aminosäuren des N-terminalen Teil des Proteins weitgehend unterschiedlich sind. Ab Aminosäure 64 ist *Pitx1* zu 75% identisch mit *Pitx2*. Bis auf zwei Aminosäuren sind die Homeodomänen von *Pitx1* und *Pitx2* identisch. | = identische Aminosäuren, : = gleiche chemische Eigenschaften, . = ähnliche chemische Eigenschaften.

A

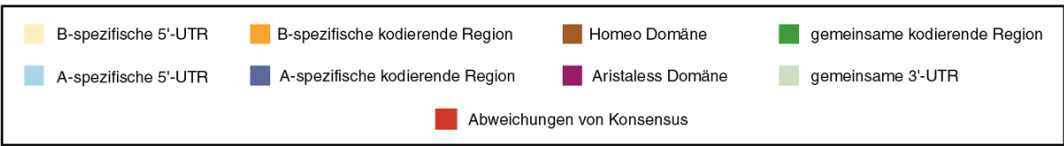


B



C

Huhn Pitx2A	MsCMKdPLsLEr1gAGnnKLCssppsSssSSSSCHH	100
Mensch Pitx2A	MNCMKGPLHLEHrAAG•TKL•••••SavSSSSCHH	
Frosch Pitx2A	MNsMKePLHLdHLAg•••••srvaasShhhhhHH	
Maus Pitx2A	MNCMKGPLLEHrAAGTKL•••••SaasSpfCHH	
Huhn Pitx2BΔ	MEsNCRKLVsACVQL•••••	
Mensch Pitx2BΔ	METNCRKLVsACVQL•••••	
Maus Pitx2BΔ	METNCRKLVsACVQL•••••	
Mensch Pitx2B	METNCRKLVsACVQLGvQPAAVECLFSKdSEIKKVEFT•••••DspEsRKEaASSKfFPRQHPGAN	
Frosch Pitx2B	MdsNCRKLVtctvQLGvQPAAVECLFSKdSEIKKVEFT•••••DspKsRKEsASSKfFPRQHPGAN	
Maus Pitx2B	METNCRKLVsACVQLGvQPAAVECLFSKdSEIKKVEFT•••••DspKsRKEsASSKfFPRQHPGAN	
Maus Pitx2B	METNCRKLVsACVQLGvQPAAVECLFSKdSEIKKVEFT•••••DspKsRKEsASSKfFPRQHPGAN	
Konsensus	METNCRKLVsACVQLGvQPAAVECLFSKdSEIKKVEFT---DSP-SRKE-ASSK-FPRQHPGANMNCMKGPLLEH-AAG-TKL-----S-SSSSCHH	
<b>Exon 2↑ Exon 3</b>		
Huhn Pitx2A	qQpALAMaTaLAPGQaRSLSLeaAKHRLEVHTI SDTSSPEAAEKsKsQGGKsEdaGpEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	200
Mensch Pitx2A	pQ•pLlAMASVlAPGQPR•SLDSsKHRLEVHTI SDTSSPEAAEKDKSQQGKNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Frosch Pitx2A	ghqtvt1lvSmasslqgRsg••ecKsRLEVHTI SDTSSPDtAdKDKShqTKNEDsstdDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Maus Pitx2A	pQ•ALAMASVlAPGQPR•SLDSsKHRLEVHTI SDTSSPEvAEKDKGqQGGKNEdVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Huhn Pitx2BΔ	•••••EKsKsQGGKsEdaGpEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Mensch Pitx2BΔ	•••••EKDKSQQGKNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Maus Pitx2BΔ	•••••EKDKGqQGGKNEdVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Mensch Pitx2B	•••••EKDKSQQGKNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Frosch Pitx2B	•••••dKDKShqsKNEdNstDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Maus Pitx2B	•••••EKDKGqQGGKNEdVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Maus Pitx2B	•••••EKDKGqQGGKNEdVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Fisch Pitx2	•••••EDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
Konsensus	-Q-ALAMASVlAPGQPRsSLDSsKHRLEVHTI SDTSSPEAAEKDKSQQGKNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQLELATFQRNRYPDMSTREEIAV	
<b>Exon 4↑ Exon 5</b>		
Huhn Pitx2A	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	300
Mensch Pitx2A	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Frosch Pitx2A	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Maus Pitx2A	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Huhn Pitx2BΔ	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Mensch Pitx2BΔ	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Maus Pitx2BΔ	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Mensch Pitx2B	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Frosch Pitx2B	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Maus Pitx2B	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Fisch Pitx2	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
Konsensus	WTNLTEARVRVWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPPFNsMNVNPLsSQSMFSPPNIsSM	
<b>Exon 5↑ Exon 6</b>		
Huhn Pitx2A	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSnPSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsAC	397
Mensch Pitx2A	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Frosch Pitx2A	SMSSgMVPsAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSnPSLntAVPTsACPYPAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYAVQLPgSNLsACQYAVDRPV	
Maus Pitx2A	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Huhn Pitx2BΔ	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSnPSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Mensch Pitx2BΔ	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Maus Pitx2BΔ	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Mensch Pitx2B	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Frosch Pitx2B	SMSSgMVPsAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSnPSLntAVPTsACPYPAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGY••VQNPgSNLsACQYAVDRPV	
Maus Pitx2B	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	
Fisch Pitx2	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSnPSLntAVPTsACPYPAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAK	
Konsensus	SMSSSMVPSAVTGVPGSSLNSLNNLNNLSsPNSLNSAVTPACPYAPPTPPYVYRDTcNSSLASLRLKAKQHS SFGYASVQNPASNLsACQYAVDRPV	



D

XPitx2	3' UTR	AAAGGCTGTATATATATATATATATATTGAAATGTCAAATTAATTTTATAAAAAACAGTTGTCTCTT
MPitx2	3' UTR	AATGACTGAAAGGATGTATATATATATATCGAAATGTCAAATTAATTTTATAAAAAACAGTTGTCTAGT
XPitx2	3' UTR	CATATCTTTACAGTGTAAATACACACATATAGGCTTGAGAGTAAAGCATGCAAAACGAAAGCC
MPitx2	3' UTR	ACTATCAGCAGAGTGTTTTTAA...AGGCTAGGCTTTAAAATAAAGCATGTTATACAGAATCA
XPitx2	3' UTR	.....CAGCAAGAAGATGTATATAATAAA
MPitx2	3' UTR	GTTAGGATTTTCGCTTCGAGCAAAAGGATGTATATACTAAA

### Abb. 12 Pitx2 Isoformen der Wirbeltiere

(A) Zusammensetzung der *Pitx2* Isoformen in der Maus (E, Exon).

(B) Schematische Darstellung der *Xenopus Pitx2* Isoformen.

Start [AUG] and Stop [UGA] Codone sind durch Pfeilspitzen markiert. Zahlen benennen die Länge der Sequenzen in Basenpaaren.

(C) Protein Vergleich der Wirbeltier *Pitx2* Isoformen.

Die Exon-Intron Grenzen sind unterhalb der Konsensus Sequenz angedeutet. Zur Konsensus Sequenz identische Aminosäuren sind in Grossbuchstaben, abweichende mit rot markierte Kleinbuchstaben dargestellt. Um die Isoformen optimal vergleichend auflisten zu können, wurden Punkte [•] in die Sequenzen eingesetzt.

Die aminoterminalen Teile der A und B Isoformen zeigten keine Homologie während die Homeodomäne in allen Fällen identisch war. Unterschiede zwischen den Spezies finden sich hauptsächlich in den N - terminalen Teilen der Proteine. Die Sequenzen wurden der EMBL Datenbank von folgenden Publikationen entnommen: Gage and Camper, 1997 (Maus *Pitx2B* und *Pitx2BD*), Arakawa et al., 1998 (Mensch *Pitx2A*, *Pitx2B* and *Pitx2BD*, und Maus *Pitx2A*), Logan et al., 1998 (Huhn *Pitx2BD*), St. Amand et al., 1998 (Huhn *Pitx2A*).

(D) Hohe Konservierung in einem 169 Basenpaar Fragment in der 3' untranslatierten Region von Maus [*MPitx2* 3' UTR] und *Xenopus* [*XPitx2* 3' UTR].

Der Verleich wurde erstellt mit dem Computerprogramm GAP (Wilconson computer package software).

Eine Proteinanalyse aller bekannter Wirbeltier-*Pitx2* Sequenzen (Abb.12 C) zeigte, dass signifikante Speziesunterschiede nur im Isoform-bestimmenden N-terminalen Bereich auftraten, während die konstanten Regionen ein sehr hoher Konservierungsgrad kennzeichnete. Eine regionale, zwischen Maus und *Xenopus Pitx2* konservierte DNA Sequenz konnte in der 3' nicht codierenden Region nachgewiesen werden (Abb.12 D). Die 5' untranslatierten Bereiche zeigten keine Homologien (nicht gezeigt). Die klonierten *Pitx2A* und *Pitx2B* cDNAs zeigten geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz der gemeinsamen von Exon 5 und 6 codierten Region. Neben 4 Aminosäureaustauschen zeigte die *Pitx2B* Sequenz eine Deletion von 2 Aminosäuren in der Nähe des Carboxyterminus. Dies wies auf unterschiedliche *Pitx2* Allele hin, was durch den tetraploiden Chromosomensatz des *Xenopus* Genoms erklärt werden kann (Abb. 11 und 12).

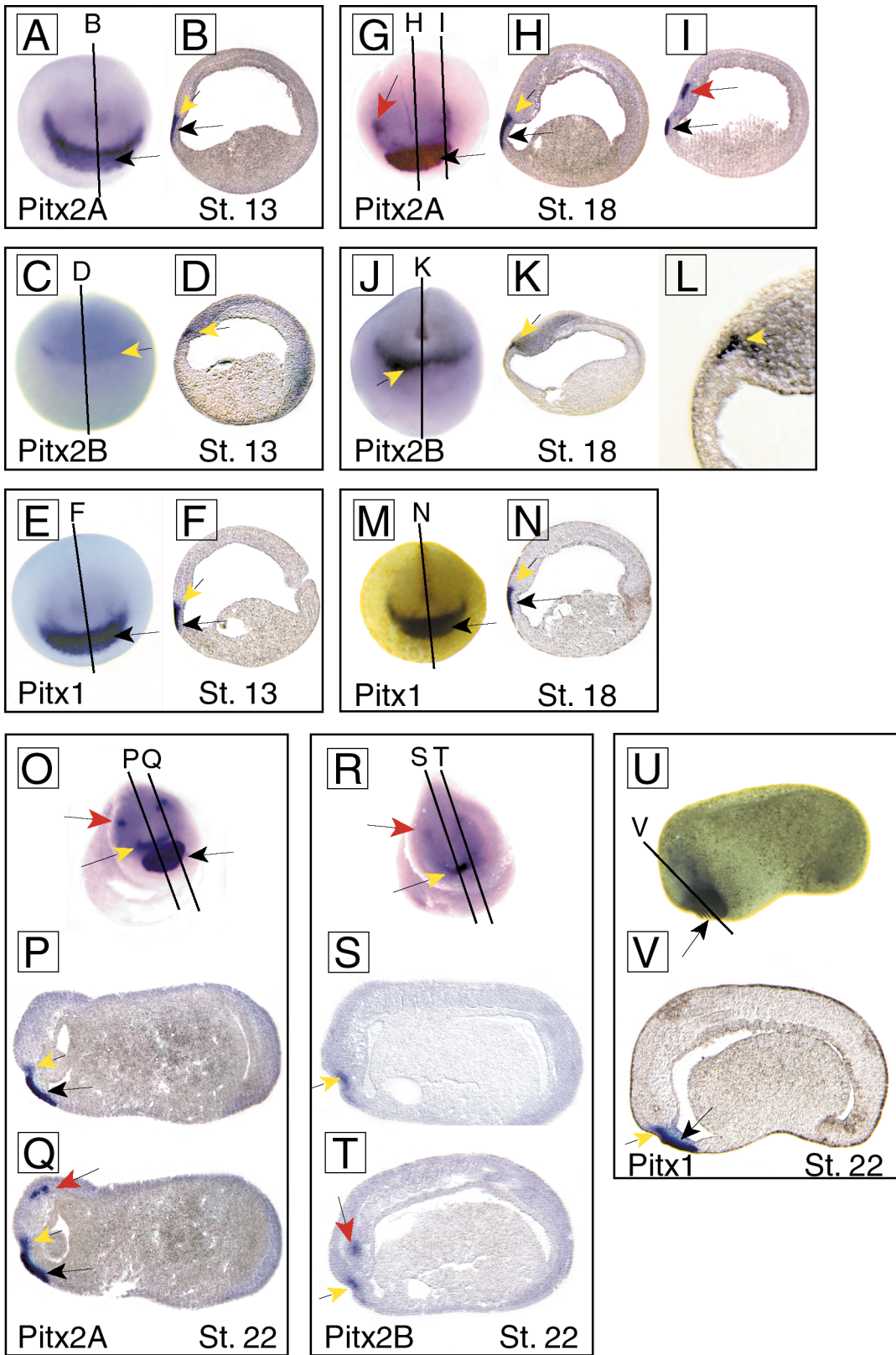
Ein Proteinvergleich von *Pitx1* zu den *Pitx2* Isoformen ergab eine hohe Homologie (70%), wobei die Homeodomäne bis auf 2 Aminosäuren identisch war, und wiederum die aminoterminalen Bereiche am stärksten divergierten (Abb.11). Diese grosse Ähnlichkeit zu *Pitx2* erklärte die Klonierung von *Pitx1* unter den reduzierten Stringenzbedingung des Screens.

Da es im Zebrafish viele Lateralitäts- und Herzmutanten, die sich für die genetische Analyse der links-rechts Kaskade anbieten, wurde in einem weiteren Ansatz versucht das *Pitx2* Gen aus Zebrafisch zu klonieren. Basierend auf den konstanten *Pitx2* Proteinabschnitten der Wirbeltiere wurden degenerierte Oligos entwickelt. Durch RT-PCR Experimente konnte ein 641 bp langes Zebrafisch *Pitx2* Fragment isoliert und kloniert werden (Abb.10 D; Material und Methoden). Die Sequenzanalyse des Zebrafisch Fragmentes bestätigte den hohen Grad der Konservierung (Abb.12 C).

### **2.2.2 Vergleichende Expressionsanalyse von *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* während der Froschentwicklung von der Gastrula bis zur Kaulquappe**

Zur Analyse der differenzielle Genexpression der *Pitx2* Isoformen während der Froschentwicklung wurden, unter Verwendung der unterschiedlichen 5' cDNA Regionen von *Pitx2A* und *Pitx2B*, isoformspezifische Sonden kloniert (Material und Methoden 4.5.4). Expression wurde in *Xenopus*-Embryonen definierter Entwicklungsstadien durch nicht radioaktive In situ Hybridisierung im Ganzpräparat analysiert.

In der frühen Gastrula (Stadium 10.5) konnte weder durch In situ Hybridisierung noch durch RT-PCR eine *Pitx2* bzw. *Pitx1* Transkription nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Durch die höhere Sensitivität eines radioaktiven RT-PCR Experiments lies sich *Pitx2A* und *Pitx1*, nicht jedoch *Pitx2B* mRNA im Stadium 11 bis 11.5 (Gastrula) detektieren (Abb. 21 B Ko). Die Abbildungen 13 - 15 zeigen die Ergebnisse dieser In situ Analyse von der späten Gastrula (Stadium 13) bis zu 3 Tagen alten Kaulquappe (Stadium 38). Zusammen mit *Pitx1* zeigten die *Pitx2* Isoformen ab Stadium 13 (Neurula) bis zur Kaulquappe (Stadium 38) ein komplexes, teilweise überlappend und teilweise exclusives Expressionsmuster. Im folgenden werden die erhobenen Daten nicht chronologisch sondern für Organsysteme getrennt dargestellt.



- ← Klebdrüse-Anlage
- ← Neuralleisten-Zellen
- ← Stomodeum-Hypophysen-Anlage

**Abb. 13 Vergleichende Expressionsanalyse von *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* während der frühen Froschentwicklung (Stadium 13 - 22).**

In der Klebdrüsenanlage werden *Pitx2A* und *Pitx1* koexprimiert, und in der Stomodeum-Hypophysen-Anlage finden sich alle drei untersuchten mRNAs.

Embryos der Stadien 13(A)-(F), 18 (G) - (N) und 22 (O) -(V) wurden mittels der *In situ* Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf das Expressionsmuster von *Pitx2A* (A, B, G - I, O - Q), *Pitx2B* (C, D, J - L, R - T) und *Pitx1* (E, F, M, N, U, Z) untersucht. Linien deuten die ungefähre Lage der Sagittalschnitte an, Embryos bis auf (U) in Frontalansicht gezeigt.

(A - F) Stadium 13 (frühe Neurula).

schwarze Pfeile = Klebdrüsenanlage; gelbe Pfeile = Stomadeum-Hypophysen-Anlage

(G - N) Stadium 18 (späte Neurula).

Zusätzlich zu Klebdrüsen und Stomadeum-Hypophysen-Anlage fand sich eine *Pitx2A*

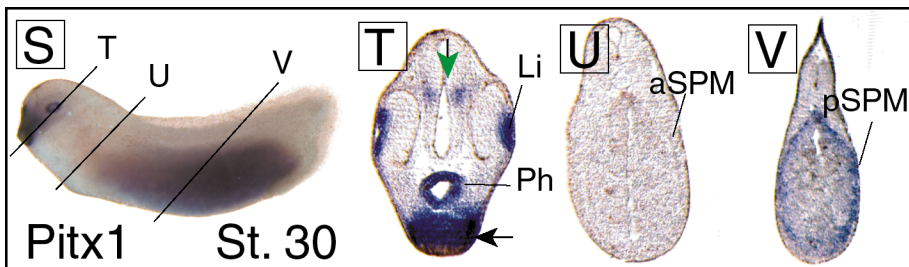
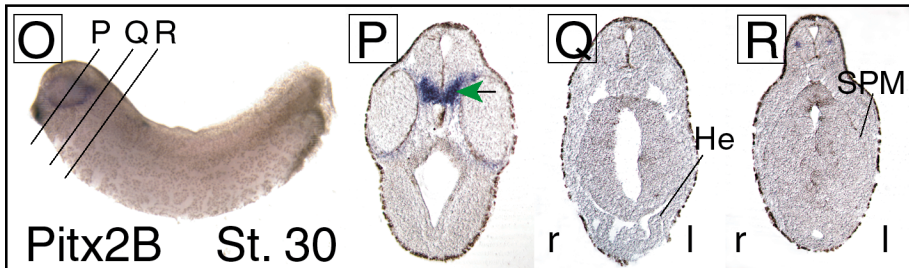
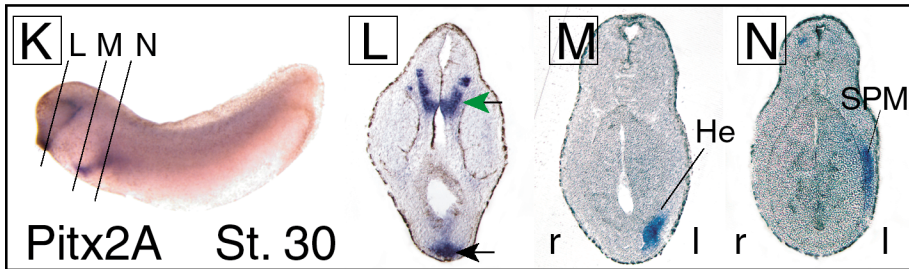
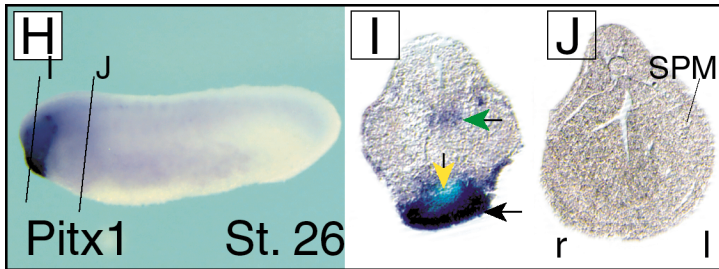
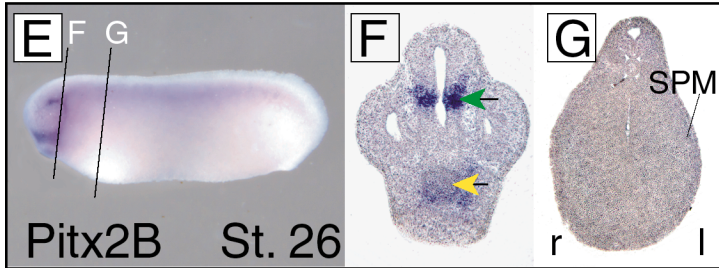
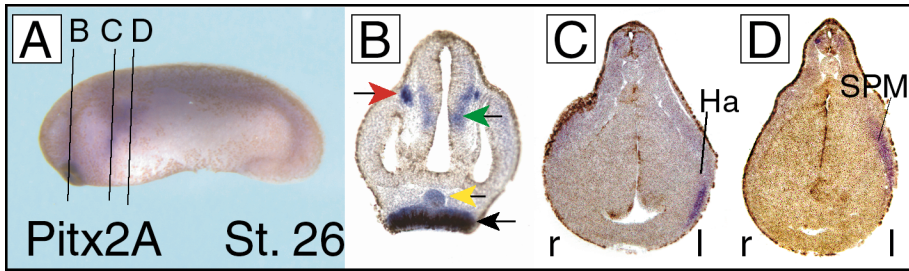
Transkription in cranialen Neuralleisten (rote Pfeile in G und I). Zur Verdeutlichung der

*Pitx2B* Expression in der Stomadeum-Hypophysen Anlage dient die Vergrößerung des in (K) gezeigten Schnittes in (L).

(O - V) Stadium 22 (frühe Kaulquappe).

### 2.2.2.1 Klebdrüse

Die Klebdrüse ist ein Organ, welches, dem noch nicht schwimmfähigen *Xenopus*-Embryo ab Stadium 28, erlaubt sich mittels sekretierter klebriger Muccopolysaccheride an Bodensubstrat zu haften. Die Klebdrüse entwickelt sich als die am weitesten anterior gelegene Struktur des Embryos. Sie wird während der Gastrulation durch Organisationsignale determiniert, und stellt somit dorsales Gewebe dar. Die Klebdrüse ist ein transientes embryonales Organ welches in späteren Kaulquappen-Stadien (ab dem Stadium 44) degeneriert (Nieuwkoop und Faber, 1967). Eine erste, schwache regionalisierte Expression von *Pitx2A* und *Pitx1* konnte in der Klebdrüsenanlage von späten *Xenopus* Gastrulaembryonen (Stadium 12) festgestellt werden (nicht gezeigt). Ab Stadium 13 fand sich starke Expression von *Pitx2A* und *Pitx1* zunächst in der Anlage der Drüse (Abb.13 A-N). Diese Expression blieb in der aktiven Drüse erhalten (Abb. 13 - 15). *Pitx2B* wurde zu keinem Zeitpunkt in der Klebdrüse gefunden. Histologische Schnitte der untersuchten Embryonen bestätigten die Koexpression der Transkripte in den selben Zellpopulationen.



- ← Klebdrüse
- ← Neuralleisten-Zellen
- ← Stomodeum-Hypophysen-Anlage
- ← ventrales Mittelhirn



**Abb. 14 Vergleichende Expressionsanalyse von *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* während der frühen Froschentwicklung (Stadium 26 - 30).**

Embryos der Stadien 26(A - J) und 30 (K - V) wurden mit der *In situ* Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf das Expressionsmuster von *Pitx2A* (A - D, K, N), *Pitx2B* (E - G, O - R) und *Pitx1* (H - I, S - V) untersucht. Embryos zeigen die linke Körperseite. Linien deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

- (A - J) Kaulquappe Stadium 26. Nur die *Pitx2A* Isoform ist asymmetrisch in der linken Herzanlage [Ha] und in dem linken Seitenplattenmesoderm [SPM] exprimiert (A, C und D). *Pitx2B* oder *Pitx1* Transkription war im SPM nicht erkennbar (E, G, H und J). Positive Signale aller drei Sonden konnten in einem ventralen Teil des Mittelhirns (grüne Pfeile in B, F und I) und der sich entwickelnden Stomodeum-Hypophysen-Anlage (gelbe Pfeile in B, F und I) detektiert werden. Die Klebdrüse zeigte weiter *Pitx2A* und *Pitx1* Expression (schwarze Pfeile in B und I).
- (K - V) Kaulquappe Stadium 30. Die *Pitx2A* Isoform und nicht *Pitx2B* war im linken Herzmyocardium (M bzw. Q) und im linken SPM (N bzw. R) exprimiert. Die Koexpression von *Pitx2B* Isoform mit *Pitx2A* und *Pitx1* wurde erneut im ventralen Teil des Mittelhirns detektiert (grüne Pfeile in L, P und T). Neben der Klebdrüse (T) zeigte die *Pitx1* Sonde positive Signale in der Augenlinse, Pharynx (T) und in dem posterioren Seitenplattenmesoderm (pSPM) während der anteriore Teil negativ blieb (U und V).

#### 2.2.2.2 Stomodeum-Hypophyse

In der Mundregion gerät das Entoderm des Kopfdarms in direkten Kontakt mit der ektodermalen Mundbucht (Stomodeum). Aus dem Ektoderm des Stomodeums formt sich eine Austülpung, die später den Vorderlappen der Hypophyse bildet. Die Auflösung der aneinandergrenzenden ekto- und entodermalen Gewebe führt zur Mundöffnung.

Die beiden *Pitx2* Isoformen sowie *Pitx1* mRNA konnten in der Stomodeum-Hypophysen Anlage ab Stadium 13 in Neurula Embryonen und später in der sich differenzierenden Hypophyse nachgewiesen werden (Abb. 13-15). *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* stellen somit die frühesten bekannten Marker für die Stomodeum-Hypophysen Entwicklung dar.

Das Ektoderm eines frühen Froschembryos ist in zwei Lagen angelegt, einer äusseren epithelialen- und einer inneren sog. sensorischen Schicht. In *Xenopus laevis* bildet sich die Stomodeum-Hypophysen Anlage aus sensorischem Ektoderm, das anterior zum Neuroektoderm liegt (Nieuwkoop und Faber, 1967). In den Neurula Stadien 13 und 18 war die *Pitx2B* Expression auf die sensorische Ektodermschicht begrenzt (Abb. 12 D und K, L), während sich *Pitx2A* und *Pitx1* Transkription auch in der darüberliegenden epithelialen Ektodermschicht befand (Abb. 13 B, H und F, N).

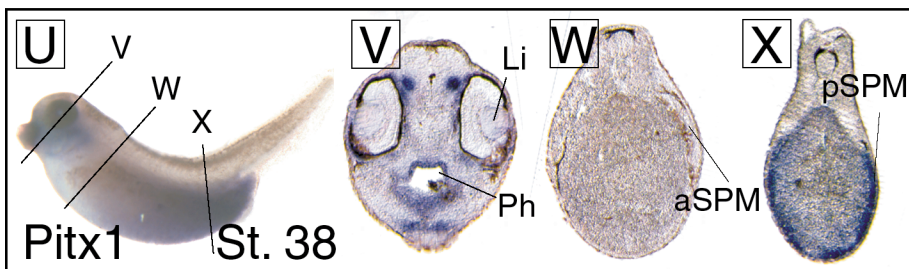
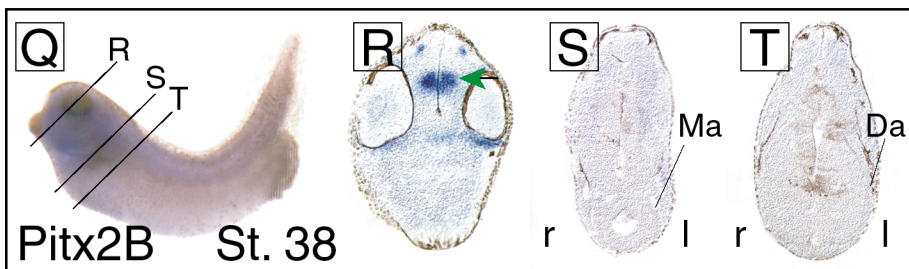
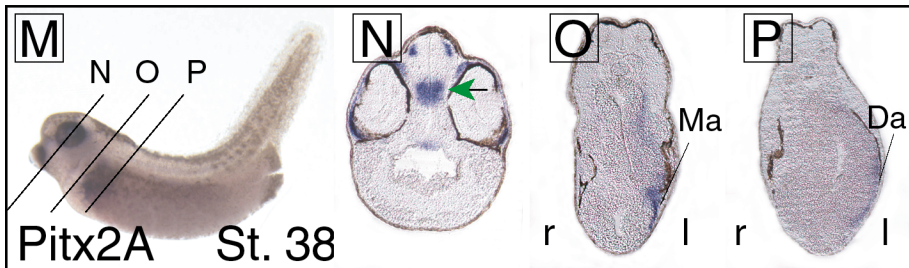
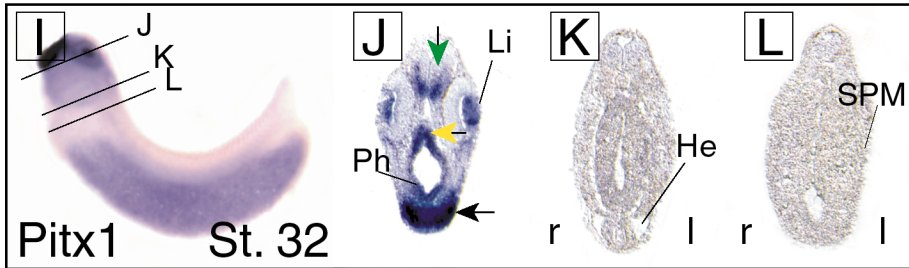
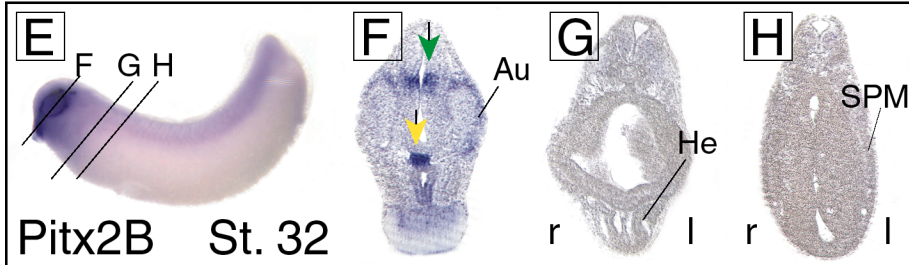
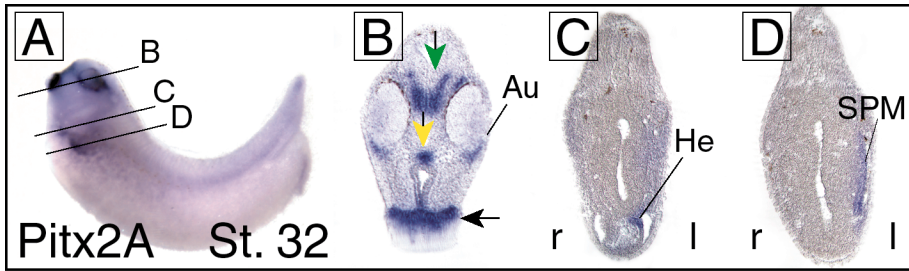
Eine *Pitx1* spezifische Expressionsdomäne konnte in Kaulquappen ab Stadium 30 in dem, der Mundbucht benachbarten, Pharynx detektiert werden (Abb. 14). In späteren Stadien beschränkte sich die *Pitx1* Expression auf die dorsalen und ventralen Pharynxbereiche (Abb. 15).

#### 2.2.2.3 Auge

In cranialen Neuralleistenzellen konnte bei späten Neurulaembryonen (Stadium 18) *Pitx2A* und bei frühen Kaulquappen (Stadium 22) zusätzliche *Pitx2B* Expression beobachtet werden (Abb.13), während *Pitx1* mRNA dort zu keinem Zeitpunkt nachweisbar war (Abb.13-15). *Pitx2A* und *Pitx2B* Transkription fanden sich in späteren Stadien zunächst dorsal zur Augenanlage (Abb. 14 B und nicht gezeigt) und schliesslich um das Auge herum in den sich entwickelnden Augenmuskeln (Abb. 15). Transiente *Pitx1* Expression konnte in Stadium 30 und 32 Embryonen während der Differenzierung der Linse des Auges beobachtet werden (Abb.14 S, T und 15 I, J).

#### 2.2.2.4 Gehirn

Das sich formende Gehirn lässt sich morphologisch in mehrere Regionen abgrenzen. Die anteriorste Hirnstruktur, das Vorderhirn (Prosencephalon) unterteilt sich in zwei Bereiche, das anteriore Telencephalon und das Diencephalon. Caudal schliessen sich Mittelhirn (Mesencephalon) und Nachhirn (Rhombencephalon) an. Die ab Stadium 26 beobachtete, überlappende Transkription von *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* befand sich in einer ventralen Domäne des Mittelhirns, die direkt an das Diencephalon grenzt (Abb. 14 und 15). In der Maus wurde neben der *Pitx2* Expression im Mittelhirn auch im Diencephalon Transkripte beschrieben (Mucchielli et al., 1996). Ob dies auch für *Xenopus laevis* gilt konnte durch die transversale Schnittebene nicht festgestellt werden. Während im Mittelhirn mRNA der *Pitx2* Isoformen in Froschembryonen des Stadium 38 nachgewiesen wurde, fand sich dort keine *Pitx1* Transkription. Neue Expressionsorte der *Pitx2* Isoformen und von *Pitx1* konnten im Stadium 38 im dorsalen Bereich des Mittelhirn detektiert werden, die jedoch auf Grund des Fehlens von detaillierter, deskriptiver Literatur nicht identifizierbar waren.



- ← Klebdrüse
- Hypophysen-Anlage
- ventrales Mittelhirn

**Abb. 15 Vergleichende Expressionsanalyse von *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* während der Froschentwicklung (Stadium 32 - 38).**

Embryos der Stadien 32(A - L) und 38 (M - X) wurden mittels der In situ Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf das Expressionsmuster von *Pitx2A* (A - D, M - P), *Pitx2B* (E - H, Q - T) und *Pitx1* (I - L, U - X) untersucht. Die Embryonen zeigen die linke Körperseite. Linien deuten die ungefähre Lage der gezeigten transversalen Schnitte an.

(A - L) Kaulquappe Stadium 32. Asymmetrische *Pitx2A* Transkription war auf der linken Herzseite [He] (A und C) und im linken Seitenplattenmesoderm [SPM] (A und D) zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnten keine *Pitx2B* bzw. *Pitx1* mRNA im Herzen (G bzw. K) oder im SPM (H bzw. L) nachgewiesen werden. Kolo-kalisation der drei Transkripte fand sich im Mittelhirn (grüne Pfeile), Augenmuskeln [Au] und in der Hypophysenanlage (gelbe Pfeile B, F und J). Spezifische *Pitx1* Domänen waren Linse [Li] und Pharynx [Ph] (T), während die Klebdrüse neben *Pitx1* auch *Pitx2A* exprimierte (schwarze Pfeile in B und J).

(M - X) Kaulquappe Stadium 38. In der Organogenese von Magen [Ma] und Darm [Da] beschränkte sich die *Pitx2A* Expression auf die linke Seite (M, O und P). Die *Pitx2B* Isoform war dort nicht zu finden (S und T). Die Spezifität der *Pitx2B* Probe zeigte sich in der Koexpression mit *Pitx2A* im Mittelhirn (N und R), wobei neben der medialen eine zusätzliche dorsale Expressionsregion auftrat. Die mediale Gehirn- und die Linsenexpression von *Pitx1* wurde nicht mehr entdeckt, während Pharynx [Ph] und eine nicht identifizierte Gehirnregion positive Signale aufzeigten (V). *Pitx1* war stark im posterioren Seitenplattenmesoderm [pSPM] und Entoderm expremiert (U und X), fehlte aber in der anterioren Region (W).

#### 2.2.2.5 Seitenplattenmesoderm

Das Seitenplattenmesoderm trennt sich während der Entwicklung des Embryos in ein inneres, splanchnisches und ein äusseres, unterhalb des Ektoderms liegendes somatisches Blatt. Das splanchnische bzw. somatische Blatt bilden in der Embryonalentwicklung u.a. Teile der Darmwand bzw. Körperwand und Extremitätenanlagen. Zwischen diesen Blättern bildet sich das Coelom, das sich später in Perikard-, Pleural- und Peritonealhöhle gliedert. In der Links-Rechts Achsenentwicklung dient das Seitenplattenmesoderm als Signalzentrum für die asymmetrische Organmorphogenese. Im Unterschied zu *Xnr1* (Lustig et al., 1996; Blum et al., 1999) war das linke Seitenplattenmesoderm von Stadium 22 Embryonen negativ für beide *Pitx2* Isoformen und für *Pitx1*. Im linken Seitenplattenmesoderm konnte erst in Stadium 26 Kaulquappen asymmetrische *Pitx2A*, aber keine *Pitx2B*, Expression nachgewiesen werden (Abb. 14, 15). Die *Xnr1* Expression im linken lateralen Mesoderm wird zum Stadium 30 stark reduziert, und ist im Stadium 32 beendet (Lustig et al., 1996; Lohr et al., 1997). Im Stadium 32, nach Auftrennung des lateralen Mesoderms in Somatopleura und Splanchnopleura beschränkte sich die *Pitx2A* Expression auf das innere, splanchnische Blatt, während *Pitx2B* weiterhin nicht zu detektieren war (Abb. 15).

Die *Pitx1* Expression im Seitenplattenmesoderm zeigte eine antero-posteriore Asymmetrie. In Stadium 30 und in späteren Embryonen wurde nur in posterioren Bereichen *Pitx1* mRNA um den Darm herum detektiert, der anteriore Teil des Seitenplattenmesoderm hingegen war negativ (Abb.14 und 15). Im Frosch konnte im Gegensatz zu publizierten Mausdaten keine Kolokalisierung von *Pitx2* und *Pitx1* Transkripten im Seitenplattenmesoderm beobachtet werden (Abb. 13, 14). Vielmehr reduzierte sich die im Stadium 30 ca. die Hälfte des Embryos umfassende *Pitx1* Expression über mehrere Entwicklungsstadien hinweg auf eine kleine posteriore Seitenplattenmesoderm-Domäne (Abb. 14, 15 und nicht gezeigt).

#### 2.2.2.6 Darm

In der asymmetrischen Magen-Darm Morphogenese von Maus und Huhn wurde linksseitige *Pitx2* Expression berichtet (Logan *et al.*, 1998; Meno *et al.*, 1998; Piedra *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998; Campione *et al.*, 1999). In *Xenopus laevis* ist die asymmetrische Positionierung des Magens mit starken Verschiebungen verbunden. Zunächst erfolgt eine Verlagerung der Magen-Anlage zur linken Seite, um dann in späteren Stadien in eine transversale Lage zu gelangen (Nieuwkoop und Faber, 1967). Gemäss der von anterior zu posterior fortschreitenden Entwicklung der Wirbeltiere, beginnt im Frosch die Schleifenbildung des Darmstraktes später als die des Magens. In Stadium 45 Embryonen bildet der Darm eine gegen den Uhrzeiger gewundene Spirale.

Während der frühen Magendrehung konnte eine linke asymmetrische Expression der *Pitx2A* Isoform beobachtet werden. Die Magenanlage zeigte keine *Pitx2B* oder *Pitx1* Transkription (Abb. 15). In der, zur Magenanlage dorsal gelegenen Speiseröhre konnte ebenfalls eine asymmetrische linksseitige *Pitx2A* Expression nachgewiesen werden (Abb. 15O). Vor Ausbildung der Schleife wurde *Pitx2A* mRNA asymmetrisch in entodermalen und mesodermalen Bereichen des Darms detektiert (Abb. 15P). *Pitx2B* Transkription wurde im Darm nicht beobachtet (Abb. 15T).

### 2.2.2.7 Herz

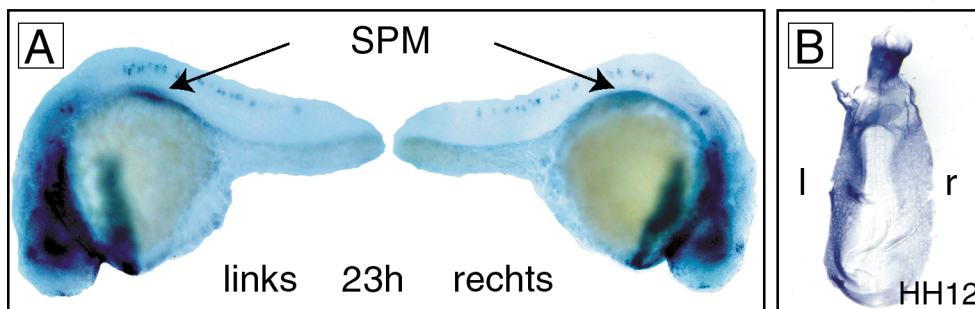
Das kardiogene Mesoderm wird während der *Xenopus* Gastrulation zunächst bilateral angelegt. In Embryonen des Schwanzknospen-Stadiums (ab Stadium 19) ist das kardiogene Mesoderm in einer anterior-ventralen Position, der Herzanlage, fusioniert. Die tatsächliche Entwicklung des Herzens beginnt mit der Differenzierung des Herzschauchs (Endocard) (Stadium 28). Das angrenzende Mesoderm verdickt sich und bildet zunächst einen sog. myoepikardialen Mantel aus dem das muskuläre Myocard entsteht. Das lineare Froschherz vollzieht schliesslich asymmetrische Schleifenbildung und zeigt zum Stadium 36 eine S Form (Nieuwkoop und Faber, 1967; Hausen und Riebesell, 1991; Fishman und Chien, 1997).

Bevor sich der endocardiale Herzschauch differenziert fand sich *Pitx2A* im linken kardiogenen Mesoderm (Abb.14). *Pitx2B* bzw. *Pitx1* Expression im Herzen war zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung nachweisbar (Abb. 14, 15 und nicht gezeigt). Später (Stadium 30 und 32) lokalisierte die asymmetrische *Pitx2A* Transkription im linken myocardialen Teil des linearen Herzens (Abb.14, 15).

Die Expressionsmuster belegen, dass nur die *Pitx2A* Isoform an der Entstehung der Lateralität beteiligt ist, und dass *Pitx2A* somit tatsächlich der Mediator zwischen Signalen des linken Seitenplattenmesoderm und asymmetrischer Organmorphogenese ist.

### 2.2.3 Konservierte asymmetrische Expression von *Pitx2* im linken Seitenplattenmesoderm der Wirbeltiere

Asymmetrische *Pitx2* Expression im linken Seitenplattenmesoderm und in der linken Herzanlage wurde in Maus, Huhn (siehe auch Abb. 16 B) und Frosch beschrieben (Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; St. Amand et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999). Der Zebrafisch ist in Bezug auf Lateralitätsentwicklung ein interessanter Modellorganismus, da aus den gross angelegten Mutageneseprojekten eine Fülle von Fischmutanten zur Verfügung stehen. Speziell die Herzmутanten sind interessant, da das Zebrafisch-Herz, im Unterschied zu anderen Wirbeltierherzen transient eine linke Schleife bildet („jogging“) bevor es die typische nach rechts ausgerichtete S-Form annimmt (Chen et al., 1997). Die Untersuchung des *Pitx2* Expressionsmusters in Lateralitätsmutanten könnte Hinweise auf *Pitx2* Funktionen geben.



**Abb. 16 Asymmetrische Expression von *Pitx2* in dem linken Seitenplattenmesoderm von Zebrafisch und Huhn.**

Partielle Zebrafisch und Huhn *Pitx2* Fragmente wurden durch PCR aus cDNAs der Stadien 24h (Zebrafisch) und HH12 (Huhn) kloniert (siehe Abb. 10, Text und Material und Methode) und als Sonde für die In situ Hybridisierung Analyse verwendet.

(A) Beispiel eines 23 Stunden alten Zebrafisch Embryos in linker und rechter lateraler Ansicht. Die *Pitx2* Expression war beschränkt auf das linke Seitenplattenmesoderm [SPM]. Die In situ Hybridisierung wurde von Frauke van Beber (MPI Tübingen) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

(B) Dorsale Ansicht eines Huhnembryos im Stadium 18 (HH18). *Pitx2* Transkription im linken SPM und Darm. l, links; r, rechts.

Im Rahmen einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Pascal Haffter (MPI Tübingen) wurde ein Zebrafisch (Zb) *Pitx2* Fragment durch RT-PCR kloniert (Abb. 10 D) und dessen Expressionsmuster analysiert. *ZbPitx2* war asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm eines 23 Stunden alten

Embryos exprimiert (Abb. 16 A). Dies war ein weiterer Hinweis auf eine generelle, hochkonservierte Bedeutung für *Pitx2* in der Entstehung von Wirbeltierlateralität. Eine *Pitx2* Expression im Fischherzen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Frauke van Bebber, MPI Tübingen, persönliche Mitteilung).

## 2.3 Funktionelle Analyse von *Pitx2*

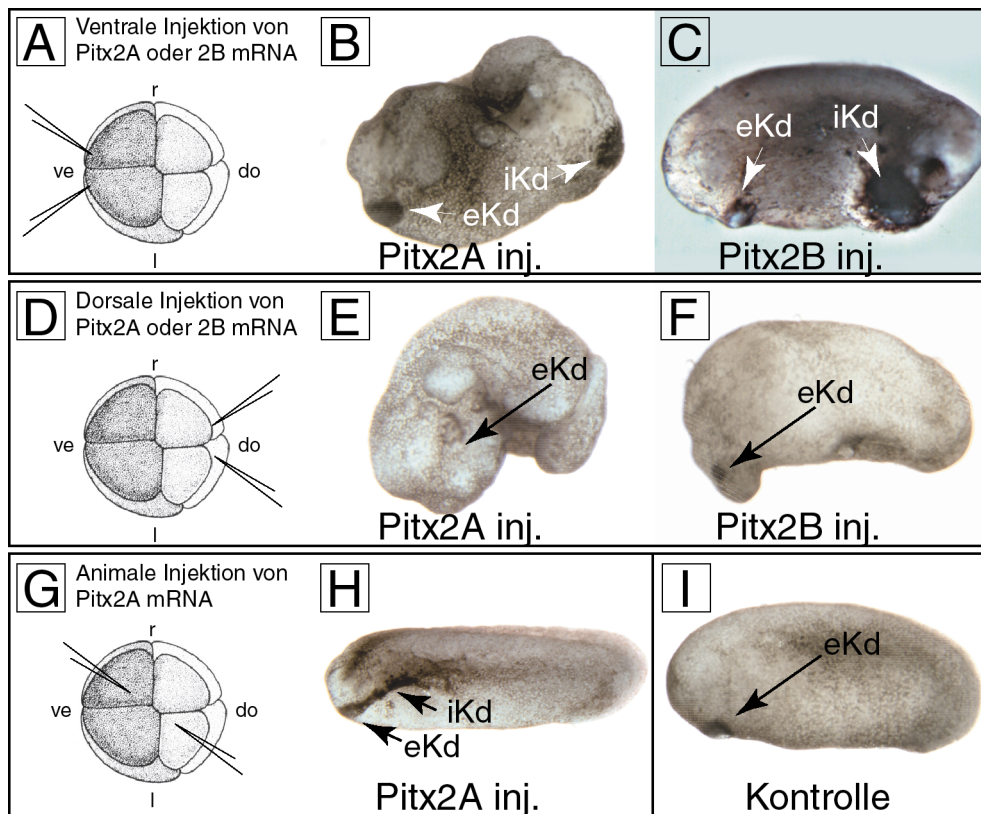
### 2.3.1 *Pitx2* und Klebdrüse

Eine der Expressionsdomänen von *Pitx2* war die Klebdrüse (Campione et al., 1999). Die isoformspezifische Analyse ergab, dass wie im Fall der Rechts-Links Entwicklung nur die *Pitx2A* Isoform in der Klebdrüse exprimiert wurde. Um die Rolle der *Pitx2* Isoformen während der Klebdrüsenentwicklung aufzuklären, wurden Fehlexpressionsexperimente durchgeführt.

#### 2.3.1.1. Phänotypische Analyse von *Xenopus*-Kaulquappen nach *Pitx2* Missexpression

Embryonen im 4-8 Zellstadium wurden mit synthetischer *Pitx2A* oder *Pitx2B* mRNA bilateral in ventrale bzw. dorsale Blastomeren injiziert. Bilaterale Injektionen in die animale Polregion wurden nur mit mRNA der *Pitx2A* Isoform durchgeführt (Abb.17 A, D, G). Im Stadium 20 wurden die experimentellen Embryonen fixiert und analysiert. Ventrale Missexpression von *Pitx2A* und *Pitx2B* mRNA induzierte ektopische Klebdrüsen (Abb.17 B, C), die phänotypisch anhand ihrer Klebrigkeit und der starken Pigmentierung identifiziert wurden. Ektopische Klebdrüseninduktion konnte auch durch *Pitx2A* mRNA Injektion in den animalen Pol erzielt werden.





**Abb. 17 Misexpression von *Pitx2* Isoformen induzieren ektopische Klebdrüsen.**

Synthetische *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* mRNA (150 pg) wurde in ventrale (A), dorsale (D) oder animale (G) Regionen von 4-8 zelligen Embryonen injiziert. Die phänotypische Analyse erfolgte im Stadium 20. Ein Kontrollembryo ist in (I) gezeigt.

(A - C) Ventrale Injektionen von *Pitx2A* (B) und *Pitx2B* (C) induziert funktionsfähige Klebdrüsen auf der Ventralseite.

(D - F) Dorsale Injektionen von *Pitx2A* (E) und *Pitx2B* (F) führt zu abberanter Gastrulation. Die antero-posteriore Musterbildung ist stark beeinträchtigt. Während eine endogene Klebdrüse identifizierbar war, fehlten andere Kopfstrukturen wie z.B. Augenanlage.

(G +H) Animale Injektion von *Pitx2A* induziert funktionsfähige Klebdrüsen. (*Pitx2B* nicht gemacht)

(I) Kontrollembryo Stadium 20.

eKd endogene Klebdrüse; iKd induzierte Klebdrüse; [ve] ventral; [do] dorsal; [r] rechts; [l] links.

Während dieses Ergebnis für die *Pitx2A* Isoform mit deren Expression in der Klebdrüsenanlage übereinstimmte, traf das für die *Pitx2B* Isoform, die ausschliesslich in der Stomodeum-Hypophysen Anlage zu finden war, nicht zu (Abb.13).

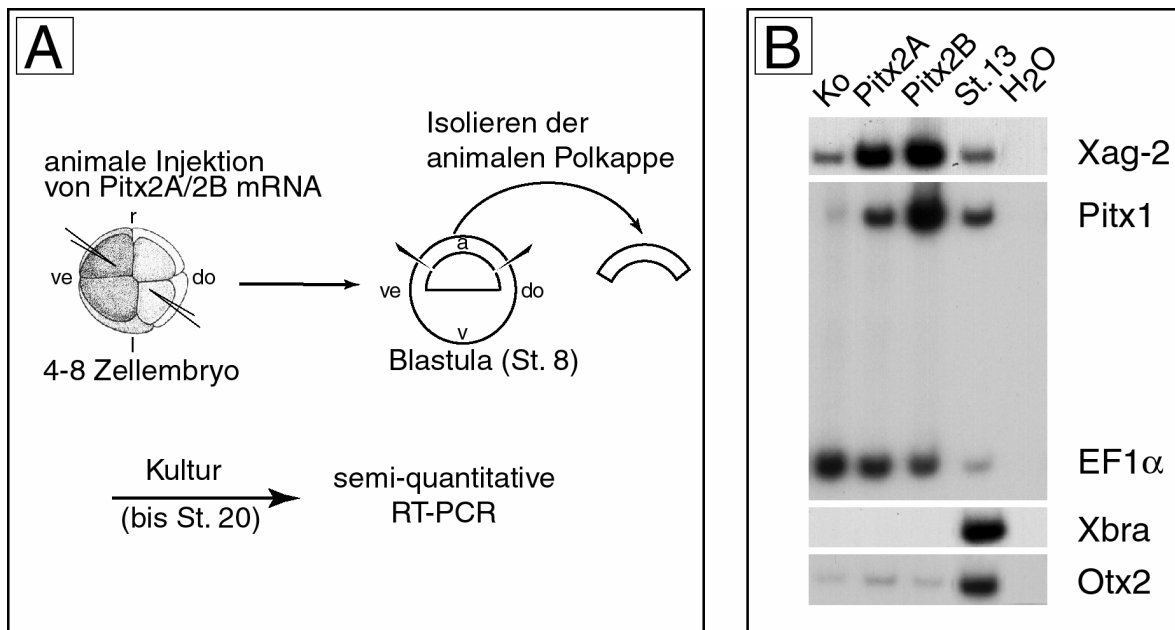
Nach dorsaler Missexpression beeinträchtigten beide *Pitx2* Isoformen stark die Gastrulation und führten zu ähnlichen Missbildungen. Häufig fanden sich auf der ventralen Körperseite entodermale Dotterreste, die normalerweise während der Gastrulation von Ektoderm umschlossen werden (nicht gezeigt). Oft liessen sich ausser einer im Vergleich zu Kontrollembryonen schwach ausgebildeten Klebdrüse keine Kopfstrukturen identifizieren (Abb.17 E, F).

Ventrale bzw. dorsale Missexpression von *Pitx1*, das in der Klebdrüse ebenfalls stark transkribiert wird (Abb.13) resultierte wie die Fehlexpression der *Pitx2* Isoformen in ektopischer Klebdrüsenbildung bzw. Gastrulationsdefekten (nicht gezeigt).

#### 2.3.1.2 Klebdrüseninduktion durch *Pitx2A* und *Pitx2B* im animalen Polkappentest

Durch RT-PCR liess sich die Klebdrüseninduktion im animalen Polkappentest anhand von Markergenen qualitativ und quantitativ analysieren. Synthetische *Pitx2A* und *Pitx2B* mRNA wurde in die animale Region von 4-8 Zellembryonen injiziert. Die im Blastula Stadium isolierten animalen Polkappen wurden solange kultiviert bis Kontrollembryonen Stadium 20 erreichten und dann durch RT-PCR analysiert. Die mit *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* injizierten Polkappen wiesen schon phänotypisch durch starke Pigmentierung und Klebrigkeit auf eine Klebdrüseninduktion hin.

Diese Beobachtung konnte auf molekularer Ebene durch die Induktion des klebdrüsenspezifischen Markers *Xag-2* (Aberger et al., 1998) bestätigt werden (Abb.18 B). Beide *Pitx2* Isoformen induzierten ebenfalls die Transkription von *Pitx1* (Abb.18 B), was in Übereinstimmung mit der prominenten Expression von *Pitx1* in der Klebdrüse war. (Abb.13, 14). Ob die *Pitx1* Induktion durch *Pitx2* Isoformen ein direkter transkriptioneller oder ein indirekter, durch die Differenzierung zu Klebdrüsengewebe hervorgerufener Effekt war, liess sich anhand dieses Experiments nicht feststellen.



**Abb.18 Induktion von Klebdrüse im animalen Polkappentest durch *Pitx2* Isoformen in Abwesenheit von *otx2*.**

- (A) Schematische Darstellung des Experimentes. Froschembryonen (4-8 Zell Stadium) wurden mit synthetischer *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* mRNA in den animalen Pol injiziert (150 pg). Die animalen Polkappen wurden im Stadium 8 (Blastula) aus dem Embryo ausgeschnitten und bis zum Stadium 20 (frühe Kaulquappe) kultiviert. Eine phänotypische Differenzierung zu Klebdrüsengewebe konnte anhand der starken Klebrigkeit der Polkappen erkannt werden. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.
- (B) Durch semiquantitative RT-PCR wurden die Expression von *Xag-2*, *Pitx1*, *EF1-α*, *Xbra* und *otx2* analysiert. Stadium 13 (frühe Neurula) cDNA diente als Positiv-, nicht injizierte Polkappen und Wasser als Negativkontrolle. *Pitx2A* und *Pitx2B* mRNA Injektionen führte zur Induktion der Expression von *Pitx1* und des Klebdrüsenmarker *Xag-2*. Transkription des Homeoboxgens *otx2*, ein Kontrollgen der Kopf- und Klebdrüsenentwicklung, war nicht zu beobachten. Das Fehlen des panmesodermalen Markers *Xbra* zeigte, dass es keine mesodermale Differenzierung gab.

In der Literatur wurde das Homeoboxgen *otx2* als ein frühes Kontrollgen der Kopf- und Klebdrüsenentwicklung beschrieben. *otx2* Überexpression im animalen Polkappentest und im Embryo führt zu einer Induktion von Klebdrüsen (Blitz und Cho, 1995; Pannese et al., 1995; Sive und Bradley, 1996; Gammill und Sive, 1997). Die Klebdrüseninduktion durch *otx2* im animalen Polkappentest war dabei stets mit Induktion von Mesoderm verbunden (Blitz und Cho, 1995; Pannese et al., 1995).

Interessanterweise war die Klebdrüseninduktion durch die *Pitx2* Isoformen unabhängig von der *otx2* Expression (Abb.18 B). Desweiteren zeigte das Fehlen von *Xbra* mRNA, eines panmesodermalen Markergens, dass die Klebdrüseninduktion durch die *Pitx2* Isoformen unabhängig von Mesoderm

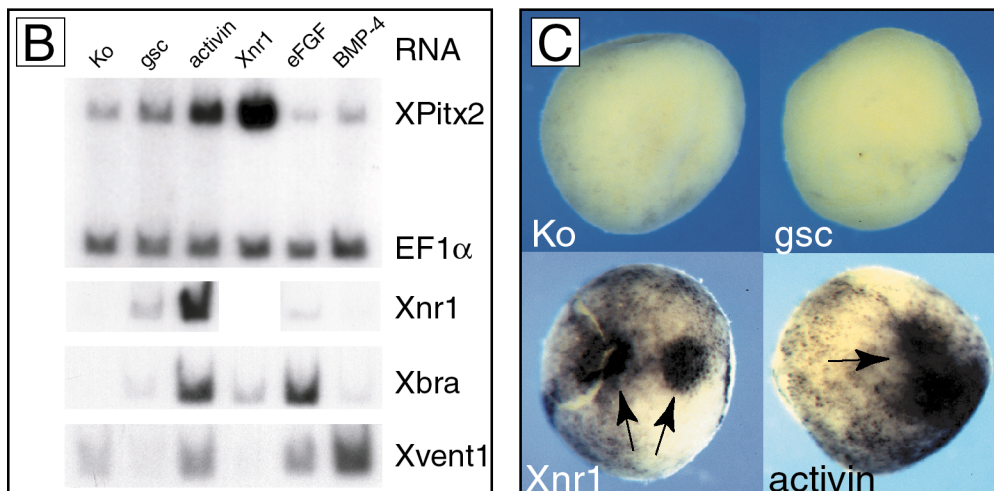
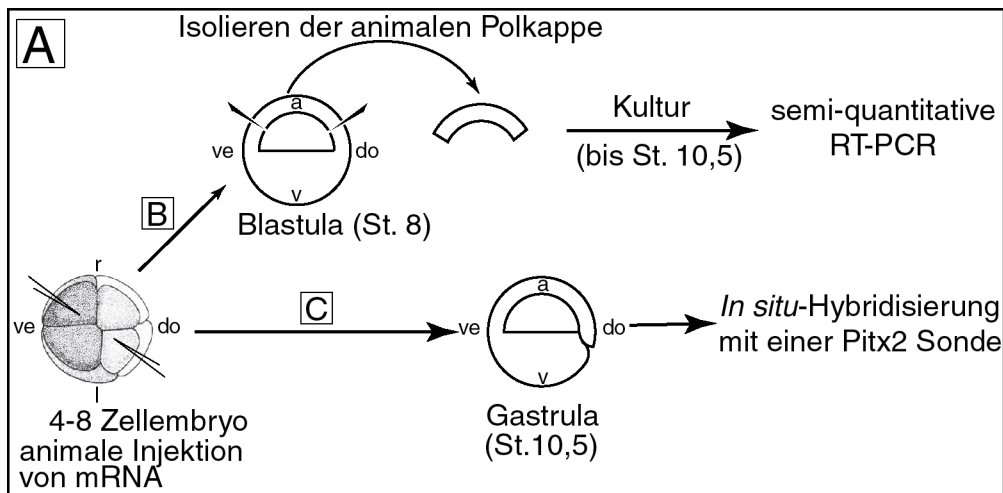
erfolgte (Abb.18 B). *Pitx2A* könnte somit, auf Grund der molekularen Unterschiede im Induktionsexperiment und der Koexpression mit *otx2* in der Klebdrüse, stromabwärts von *otx2* in der Klebdrüsenentwicklung stehen. In diesem Experiment fanden sich keine funktionellen Unterschiede zwischen *Pitx2A* und *Pitx2B*.

### **2.3.2 Die Rolle der *Pitx2* Isoformen bei der Entstehung der Links-Rechts Achse**

#### 2.3.2.1 *Pitx2* und die linke Signalkaskade

Der *TGF $\beta$*  Wachstumsfaktor *nodal* zeigt innerhalb der Vertebraten eine konservierte asymmetrische Expression im linken Seitenplattenmesoderm. In *Xenopus laevis* wurden vier Gene isoliert, die hohe Homologie zu Maus und Huhn *nodal* aufweisen (Jones et al. 1995; Smith et al., 1995; Joseph and Melton, 1997), und die alle mehr oder weniger überlappend während der Gastrulation exprimiert sind. Von diesen zeigte nur *Xnr1* (*Xenopus nodal related 1*) eine asymmetrische Expression im linken Seitenplattenmesoderm (Lowe et al., 1996; Lustig et al. 1996) und gilt daher als das *nodal* Homolog im Frosch.

Ein zeitlicher und räumlicher Vergleich von *Xnr1* und *Pitx2* Expression zeigte, dass *nodal* früher als *Pitx2* im linken SPM exprimiert wurde. Die Frage ob *nodal* in einer links bestimmenden Signalkaskade oberhalb von *Pitx2* einzuordnen ist, wurde einerseits qualitativ durch In situ Hybridisierung im Embryo untersucht und andererseits quantitativ mit RT-PCR im animalen Polkappentest (Abb.19 A). Der *TGF $\beta$*  Wachstumsfaktor *activin* spielt bei vielen Entwicklungsvorgängen eine Rolle (Feijen et al., 1994), auch während Lateralitätsentstehung. *activin  $\beta$ B* wird im Huhn während der Gastrulation auf der rechten Knotenseite exprimiert und bestimmt auch funktionell die rechte Körperachse (siehe Einleitung 1.6.2; Isaac et al.,1997; Boettger et al., 1999). Ohne dass eine asymmetrische *activin* Expression beobachtet wurde, wiesen jedoch Missexpressionsexperimente im Frosch *activin* eine linke Funktion zu (Lohr et al. 1998).



**Abb.19 Induktion von *Pitx2* durch *Activin* und *Xnr1* im animalen Polkappentest und im Embryo.**

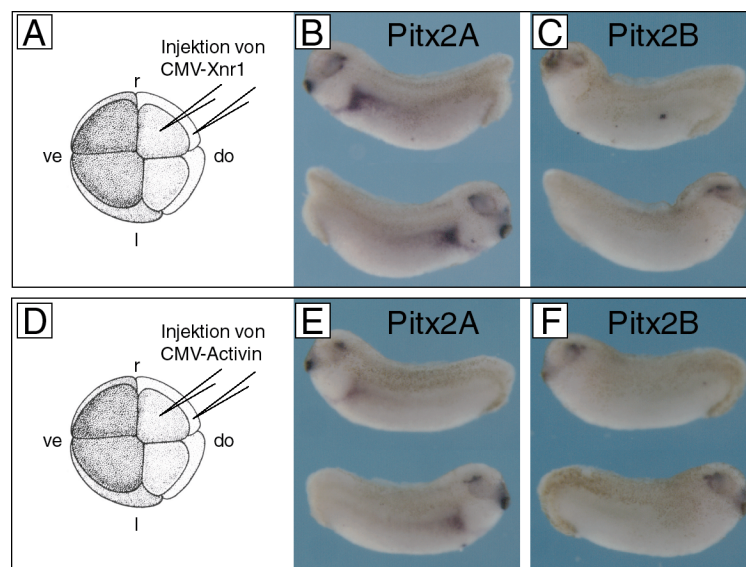
- (A) Schematische Darstellung des Experiments. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.
- (B) Synthetische *gsc* (250 pg), *Activin* (200 pg), *Xnr1* (100 pg), *eFGF* (20 pg) und *BMP-4* (200 pg) mRNA wurde in die animale Region eines 4-8 Zellembryos injiziert. Die animalen Polkappenregion wurden im Stadium 8 (Blastula) aus dem Embryo ausgeschnitten und bis zum Stadium 10,5 bis 11 (Gastrula) kultiviert. *Pitx2*, *EF1- $\alpha$* , *Xnr1*, *Xbra* und *Xvent1* Expression wurden durch semiquantitative RT-PCR analysiert. *Activin* und *Xnr1* induzierten die *Pitx2* Transkription, während *gsc*, *eFGF* und *BMP-4* im Vergleich zu den nichtinjizierten Kontrollkappen [Ko.] ohne Wirkung blieb. Die Wirksamkeit der Wachstumsfaktor Injektionen wurde durch Induktion von *Xnr1* (*activin*), *Xbra* (*activin* und *eFGF*) und *Xvent1* (*BMP-4*) überprüft. *EF1- $\alpha$*  Expression diente als Ladekontrolle.
- (C) Synthetische *gsc*, *Xnr1* und *Activin* mRNA wurde in die animale Region eines 4-8 Zellembryos injiziert. Zum Stadium 10,5 bis 11 (Gastrula) folgte die Analyse der *Pitx2* Expression durch In situ Hybridisierung. *Xnr1* bzw. *Activin* resultierten in Induktion der *Pitx2* Expression an den Orten der animalen Injektionen (Pfeile). Unbehandelte Kontroll- [Ko.] und *gsc* injizierte Embryonen zeigten keine *Pitx2* Transkription.

Die Injektion von synthetischer *Xnr1* und *activin* mRNA in die animale Hemisphäre von 4-8 Zellembryonen führte in beiden experimentellen Ansätzen zu einer starken Induktion der *Pitx2* Transkription, während die Injektion des Organisator-spezifischen Homeoboxgens *gsc* keinen Effekt hatte (Abb. 19 B, C). Die *Pitx2* Induktion durch *Xnr1* war deutlich ausgeprägter als mit *activin*. Dies lag möglicherweise an der parallele Aktivierung der *Xnr1* Expression durch *activin* und somit einer indirekten *activin* Wirkung via *Xnr1* zu (Abb.19 B).

Der Helix-Schleife-Helix Transkriptionsfaktor *eHand* zeigte eine innerhalb der Vertebraten konservierte, asymmetrische Expression im Herzen. Das *Xenopus* Homolog *XeHAND* konnte im animalen Polkappentest ebenfalls durch verschiedene *TGF $\beta$*  Wachstumsfaktoren (*BMP-2*, *BMP-4* und *activin*) induziert werden (Sparrow et al., 1998). Um festzustellen ob *TGF $\beta$*  Wachstumsfaktoren neben *Xnr1* und *activin* ebenfalls die *Pitx2* Transkription erhöhen, wurde *BMP-4* mRNA injiziert und auf *Pitx2* Induktion im Polkappenassay untersucht. Jedoch konnte keine Aktivierung der *Pitx2* Transkription durch *BMP-4* festgestellt werden, obwohl dessen Wirksamkeit durch die Induktion des Zielgens *Xvent1* nachgewiesen wurde (Abb. 19 B). Die mRNA Injektion des Wachstumsfaktors *eFGF* hatte ebenfalls keine *Pitx2* Induktion im Polkappenassay zur Folge (Abb. 19 B), wie es für *XeHAND* beschrieben wurde (Sparrow et al.,1998). *FGF* und *activin* sind potente Aktivatoren der Mesodermindifferenzierung. Diese Wirkung liess sich anhand der Induktion des panmesodermalen Markers *Xbra* im Polkappenassay ablesen (Abb. 19 B). Zusammen mit den zeitlichen und räumlichen Expressionsmustern von *Xnr1* und *Pitx2* unterstrichen diese Daten die Vermutung, dass *Xnr1* der endogene Aktivator der *Pitx2* Transkription im linken Seitenplattenmesoderm der Wirbeltiere ist.

### 2.3.2.2 Induktion von *Pitx2A*, aber nicht *Pitx2B* durch *nodal* und *activin*

Die Tatsache, dass nur *Pitx2A*, nicht aber *Pitx2B*, im linken Seitenplattenmesoderm exprimiert wurde (siehe Abb. 14 und 15) stellte die Frage nach der Isoformenspezifität des *nodal*- bzw. *activin*-Signaltransduktionsweges. Um dies im Kontext des Embryos zu untersuchen wurde *Xnr1* bzw. *activin* Überexpressionsvektoren in dorsal rechte Blastomeren von 4 bis 8 zelligen Embryonen injiziert (Abb. 20 A bzw. D). Ektopische rechtsseitige Induktion der *Pitx2* Isoformen wurden zum Stadium 29 durch die Verwendung spezifischer Sonden (siehe Material und Methoden 4.5.4) mit In situ Hybridisierung analysiert. Sowohl *Xnr1* als auch *activin* induzierten spezifisch *Pitx2A*, nicht aber *Pitx2B* im rechten Seitenplattenmesoderm (Abb. 20).



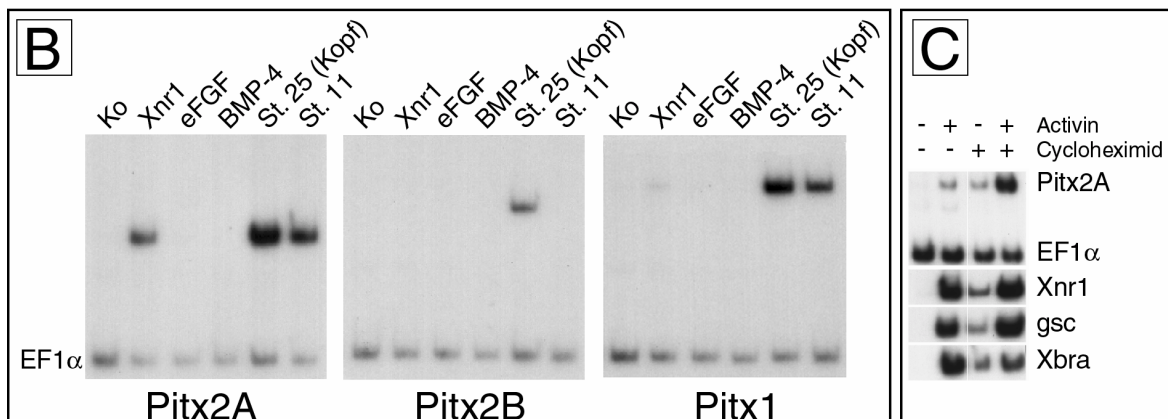
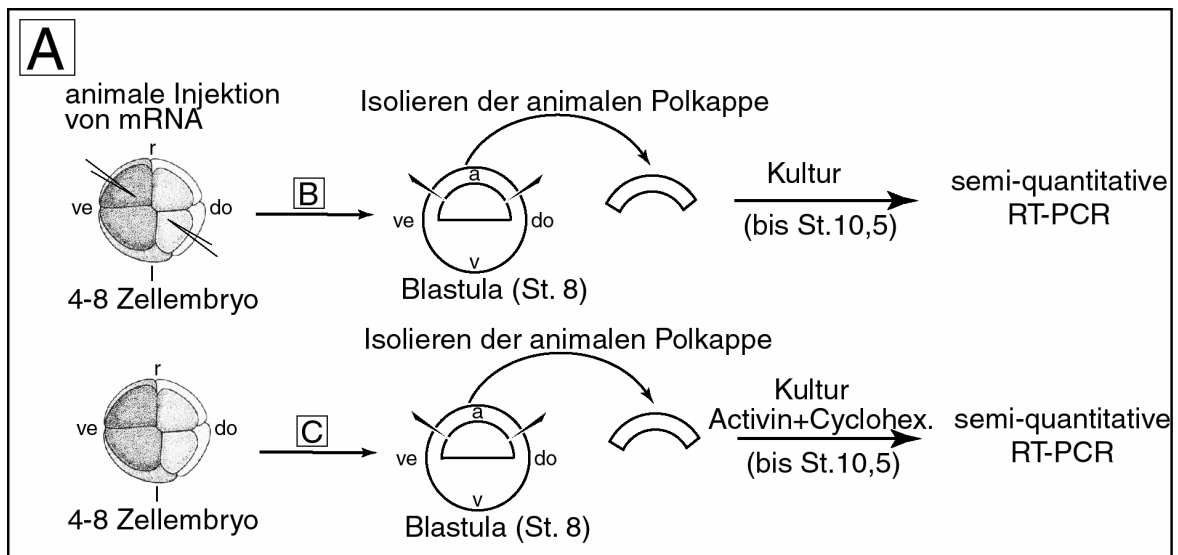
**Abb. 20 Spezifische Induktion von *Pitx2A* Isoform im rechten Seitenplattenmesoderm durch *Xnr1* und *Activin*.**

CMV- *Xnr1* and CMV- *Activin* DNA Expressionsvektoren wurden in dorsal-rechte Blastomeren von *Xenopus* Embryonen im 8 Zellstadium injiziert (A,D). Die spezifischen Transkripte der Isoformen *Pitx2A* (B, E) und *Pitx2B* (C, F) wurden im Stadium 29 durch In situ Hybridisierung analysiert.

(A - C) Nach rechtseitiger *Xnr1* Injektion wurde *Pitx2A* (B) aber nicht *Pitx2B* (C) im rechten Seitenplattenmesoderm detektiert.

(D - F) Induktion von *Pitx2A* (E) im rechten Seitenplattenmesoderm nach Injektion von *Activin*. Ektopische *Pitx2B* Expression (F) wurde nicht beobachtet.  
ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links.

Um eine semiquantitative Aussage über die Induktion der *Pitx2* Isoformen durch *Xnr1* und andere Wachstumsfaktoren (siehe oben) zu erlangen, wurde eine RT-PCR Analyse der *Pitx2A* und *Pitx2B* mRNA Transkription im animalen Polkappentest durchgeführt (Abb. 21). Während *Pitx2A* mRNA in Gastrulaembryonen (Stadium 11) und mRNA beider *Pitx2* Isoformen in der Kopfreion von Stadium 25 Kaulquappen detekiert wurde, zeigten isolierte, unbehandelte Polkappen keine *Pitx2* Transkription (Abb. 21 B). In Übereinstimmung mit dem im Embryo erhaltenen Ergebnis (Abb. 20), führte die Injektion von *Xnr1* zu einer Induktion der *Pitx2A* Expression und hatte keine aktivierende Wirkung auf die *Pitx2B* Transkription (Abb. 20 B). Weder die *Pitx2A* noch die *Pitx2B* Isoform konnten durch die Injektion der Wachstumsfaktoren *eFGF* bzw. *BMP-4* induziert werden, welches das in Abb.19 B beschriebene Experiment bestätigt.





**Abb. 21 Spezifische Induktion von *Pitx2A* mRNA Transkription durch *Xnr1* und *Activin* im animalen Polkappentest.**

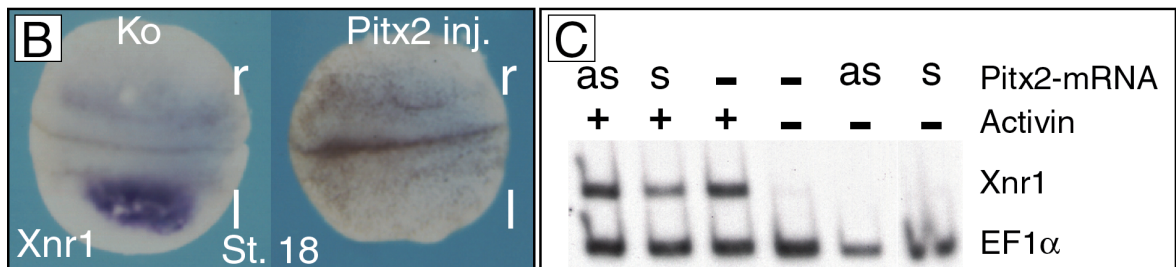
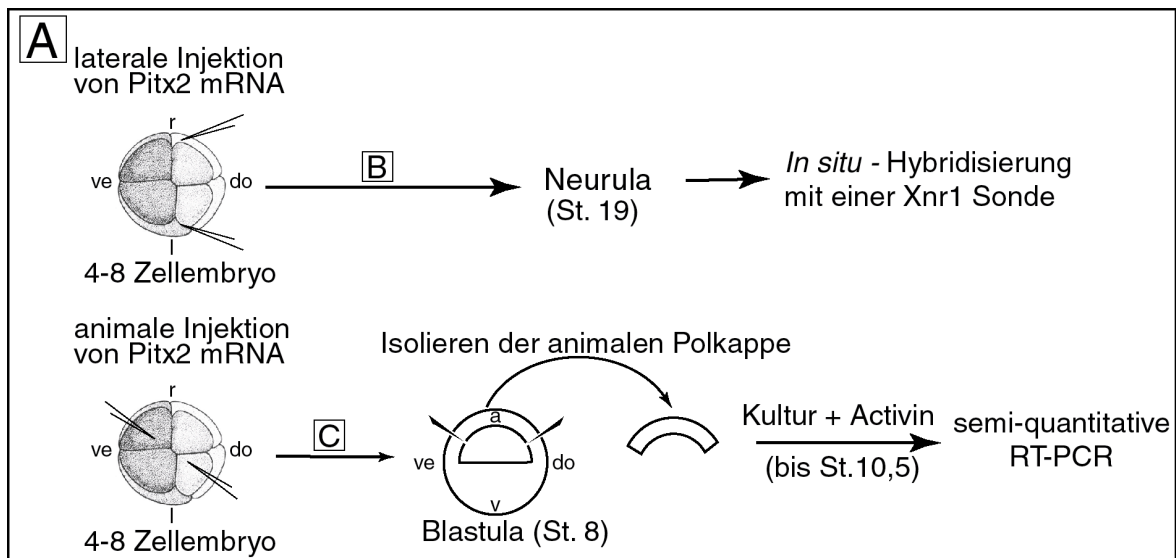
- (A) Schematische Darstellung der Experimente. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.
- (B) Synthetische *Xnr1* (100 pg), *eFGF* (20 pg) und *BMP-4* (200 pg) mRNA wurde in die animale Region von 4-8 Zellembryonen injiziert. Die animale Polkappenregion wurden im Stadium 8 (Blastula) aus dem Embryo ausgeschnitten und bis zum Stadium 10,5 bis 11 (Gastrula) kultiviert. *Pitx2A*, *Pitx2B*, *Pitx1* und *EF1- $\alpha$*  Expression wurden durch semiquantitative RT-PCR analysiert. *Xnr1* induzierte die *Pitx2A* Transkription, während keine *Pitx2A* bzw. *Pitx1* Expression detektiert werden konnte. Kontroll- [Ko], *eFGF* - und *BMP-4* injizierte Polkappen wiesen keine *Pitx2A*, *Pitx2B* oder *Pitx1* Induktion auf. Kopf-RNA (Stadium 25) und komplette Embryonen (Stadium 11) wurden als Kontrollen analysiert.
- (B) Animale Polkappenregionen wurden im Stadium 8 (Blastula) isoliert und bis zum Stadium 10,5 (Gastrula) mit [+] oder ohne [-] menschliches rekombinantes *Activin A* Protein und Cycloheximid bis zum Stadium 10,5 - 11 (Gastrula) kultiviert. *Pitx2A*, *EF1- $\alpha$* , *Xnr1*, *goosecoid* (*gsc*), and *Xbra* spezifische mRNAs wurden durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Die Induktion von *Pitx2A* durch *Activin* war, wie die der bekannten direkten Zielgene *goosecoid* and *Xbra*, unabhängig von Proteinsynthese und somit auch unabhängig von *Xnr1*. Ausserdem war *Xnr1* Transkription selber ein direktes Ziel der *Activin* Signalkaskade war. *EF1- $\alpha$*  diente als Ladekontrolle.

Um die *Activin* Wirkung auf die *Pitx2* Isoformen detaillierter zu untersuchen, wurden animale Polkappen isoliert und mit oder ohne rekombinantes menschliches *ActivinA* Protein kultiviert. Der Zusatz von Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, in das Kulturmedium sollte klären, ob die beobachtete *Pitx2* Induktion durch *activin* (Abb.19 B, C) ein direkter Effekt war oder indirekt möglicherweise über die Synthese von *Xnr1* Protein ablief. Die direkten Zielgene der *activin* Signaltransduktionskette *goosecoid* (Cho et al., 1991) und *Xbra* (Smith et al., 1991) dienten in diesem Experiment als Positivkontrolle, und wurden ebenfalls durch RT-PCR analysiert.

In der Kokultur der animalen Polkappen mit *ActivinA* Protein und Cycloheximid wurde eine starke, von Proteinsynthese und somit von *Xnr1* unabhängige, Induktion der *Pitx2A* Transkription beobachtet (Abb. 21 C). Eine Behandlung der Polkappen nur mit Cycloheximid resultierte ebenfalls in *Pitx2A* Induktion, die jedoch weit geringer als in der Kokultur mit *ActivinA* ausfiel (Abb. 21 C). Eine durch die *ActivinA*-Behandlung hervorgerufene *Pitx2B* Expression konnte nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Interessanterweise konnte *Xnr1* auch in Gegenwart von Cycloheximid durch *ActivinA* induziert werden (Abb. 21 C). *Xnr1* stellte somit ein direktes Zielgen der *Activin* Signaltransduktionskette dar. Diese Experimente zeigten, dass das *nodal* Homolog *Xnr1* und *ActivinA* im Embryo und im Polkappentest spezifisch nur die *Pitx2A* Isoform induzierten. Zusammen mit den Expressionsanalysen (Abb.13, 14) legen diese Daten nahe, dass die *Pitx2B* Isoform während der Entstehung der Links-Rechts Achse keine Rolle spielt.

#### 2.3.2.3 Repression von *Xnr1* durch *Pitx2* im linken Seitenplattenmesoderm und im Polkappentest

Ein Vergleich der asymmetrischen Expressionsmuster von *Xnr1* mit *Pitx2* zeigte, dass *Xnr1* nur transient im linken Seitenplattenmesoderm zu finden war (bis Stadium 30, Lustig et al. 1995), während *Pitx2* bis in die Organogenese weiterhin exprimiert wurde (Campioni et al., 1999; und Abb. 15 M, O, P). Diese Beobachtung eröffnete die Möglichkeit, dass *Pitx2* an der Reprimierung von *Xnr1* im linken Seitenplattenmesoderm beteiligt ist. Um einen möglichen Einfluss von *Pitx2* auf *Xnr1* Transkription zu untersuchen wurde *Pitx2B* mRNA lateral beidseitig in 4 bis 8 Zellembryonen injiziert, und *Xnr1* Transkription zum Stadium 18 durch In situ Hybridisierung analysiert (Abb. 22 A). Während die linke Injektion von *Pitx2B* mRNA zu Verlust der *Xnr1* Expression in 50% der Embryonen führte, hatte die rechtsseitige *Pitx2B* Behandlung keinen Effekt auf *Xnr1* (Abb. 22 B). Das Fehlen von *Xnr1* Transkription in 50% der Fälle lässt auf einen Repressionsmechanismus schließen.



**Abb. 22 *Pitx2* vermittelte Repression von *Xnr1* Transkription im Embryo und im animalen Polkappen Test.**

- (A) Schematische Darstellung der Experimente. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.
- (B) Froschembryonen im 4-8 Zellstadium wurden mit synthetischer *Pitx2* mRNA (200 pg pro Embryo) bilateral injiziert und zum Stadium 18 auf *Xnr1* Expression untersucht. Kontrollembryonen [Ko] zeigten *Xnr1* Transkription im linken Seitenplattenmesoderm, während 50% der *Pitx2* injizierten Embryonen keine *Xnr1* Expression aufwiesen. Das Experiment wurde von Pd Dr. H. Steinbeisser (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt, der die Veröffentlichung im Rahmen dieser Doktorarbeit erlaubt.
- (C) Froschembryonen im 4-8 Zellstadium wurden mit synthetisch *Pitx2* mRNA [s] in den animalen Pol injiziert (200 pg / Embryo). Als Negativkontrolle diente eine *Pitx2* Anti-Sinn mRNA [as] die ebenfalls animal injiziert wurde. Die animalen Kappen wurden im Stadium 8 (Blastula) isoliert und mit [+] oder ohne [-] menschliches rekombinantes *Activin A* Protein bis zum Stadium 10,5 - 11 (Gastrula) kultiviert. *Xnr1* und *EF1-α* mRNAs wurden durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Die durch *Activin* induzierte *Xnr1* Expression wurde durch *Pitx2* mRNA [s] um etwa 50% reduziert. Die Injektion von *Pitx2* Anti-Sinn-mRNA [as] hatte keinen Einfluss auf die *Xnr1* Transkription. Unbehandeltes oder nur mit *Pitx2* Sinn bzw. Antisinn mRNA injiziertes Polkappengewebe zeigten keine *Xnr1* Expression. Die Elongationsfaktor1- $\alpha$  [*EF1-α*] Boten-RNA diente als Ladekontrolle.

Zur Quantifizierung dieses Effekts wurde ein Polkappenexperiment durchgeführt. Isolierte, mit *Pitx2B* mRNA injizierte Polkappen wurden mit rekombinantem *ActivinA* Protein kultiviert, wodurch die *Xnr1* Transkription induziert wurde (Abb. 19 B). Im Falle eines spezifischen Repressionsmechanismus sollte durch die Überexpression von *Pitx2* die *Xnr1* mRNA Menge

reduziert werden, welches durch semiquantitativer RT-PCR analysiert wurde (Abb. 22 A). Trotz der direkten Induktion von *Xnr1* durch den *activin* Signaltransduktionsweg (Abb. 21 C) konnte durch die *Pitx2* Überexpression eine, im Verhältnis zu den Kontrollen, eine um ca. 50% reduzierte *Xnr1* mRNA Menge nachgewiesen werden (Abb. 22 C). Diese Experimente (Abb. 22) stärkten die Vermutung, dass die Expression von *Xnr1* über einen negativen Rückkopplungsmechanismus räumlich und zeitlich limitiert wird. Zum Zeitpunkt dieser Experimente stand ein *Pitx2A* Vektor nicht zur Verfügung, weshalb die Isoformen-Spezifität dieser Repression nicht untersucht wurde.

#### 2.3.2.4 Induktion von *Pitx2A* spezifischer Transkription nach ektoischer Expression von *Pitx2B* im Embryo und im animalen Polkappentest

Missexpressionsexperimente in Huhn und Frosch zeigten, dass beide *Pitx2* Isoformen, nach ektoischer Expression auf der rechten Körperseite, den Organsitus invertierten konnten. Logan et al.,(1998) benutzten *Pitx2B $\Delta$*  und Ryan et al.,(1998) nahmen *Pitx2A*, um in experimentellen Huhnembryonen die Lage von Herz und Darm umzukehren. Für die experimentelle Situsinversion in *Xenopus laevis* wurde von Ryan et al.,(1998) die *Pitx2A* Isoform und von Campione et al.,(1999, und nicht publizierte Daten) beide Isoformen, verwendet. Desweiteren induzierten sowohl *Pitx2A* als auch *Pitx2B* mRNA ektoische Klebdrüsen nach ventraler Injektion (Abb. 18).

Da beide Isoformen weitgehend identische Aminosäuresequenzen aufweisen (Abb. 11), könnten sie ebenfalls redundante Funktionen besitzen. Die *Pitx2* Genstruktur (Schweickert et al., 1999) sowie exklusive Expression und Induktion wiesen jedoch auf eine funktionelle Rolle von *Pitx2A* in der Lateralitätsentwicklung hin. Daher stellte sich die Frage, ob in den oben beschriebenen Missexpressionsexperimenten *Pitx2B* die Transkription von *Pitx2A* induzieren würde, welche dann die tatsächlich aktive Komponente der Organinversion darstellen könnte.

Um diese Hypothese zu testen wurde zunächst überprüft, ob *Pitx2B* die Expression von *Pitx2A* beeinflussen kann. *Pitx2B* mRNA wurde in die animale Region von 4-8 Zellembryonen injiziert. Die Polkappen wurden im Blastulastadium isoliert und bis Stadium 20 der Kontrollembryonen kultiviert. Die Analyse der Polkappen RNA auf *Pitx2A* Induktion erfolgte durch RT-PCR (Abb. 23 A). *Pitx2B* mRNA Injektion resultierte in einer Induktion der *Pitx2A* Transkription, während in den unbehandelten Polkappen keine *Pitx2A* mRNA nachweisbar war (Abb. 23 B). RNA aus Stadium 20 Kaulquappen diente als Positivkontrolle (Abb. 23 B).

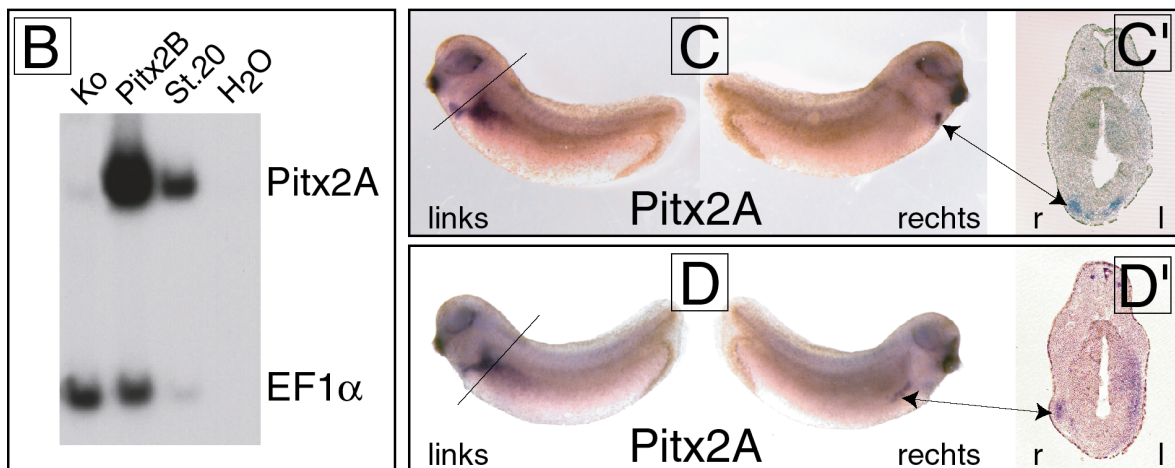
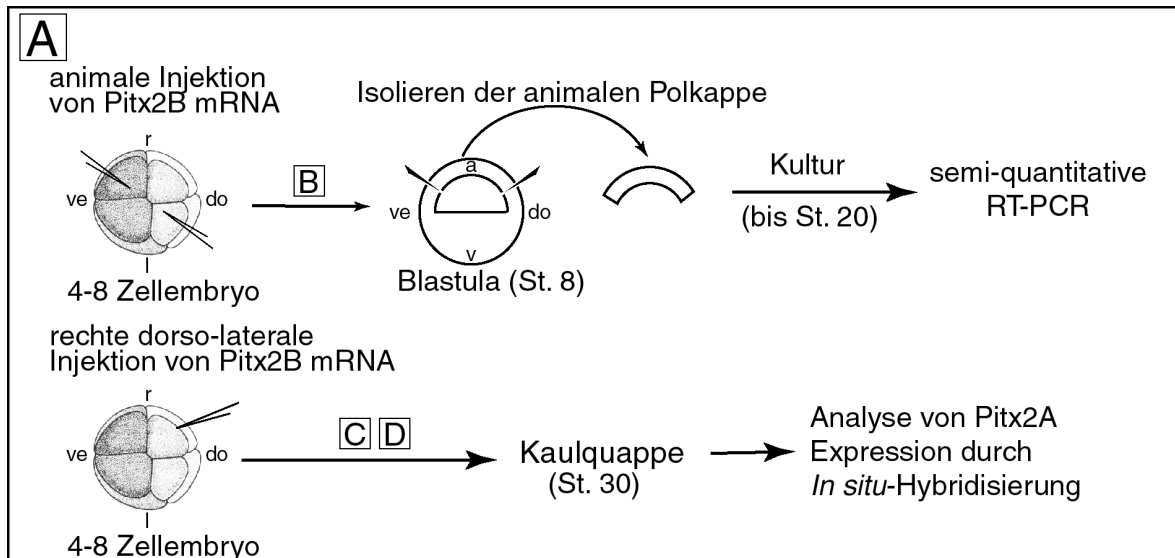
	ektopisch rechte <i>Pitx2A</i> Expression	Herz (rechtes Myocardium)	nicht identifizierte Regionen (rechts)	rechtes SPM
Experiment I (n = 31)	25 ( 80%) <sup>a</sup>	16 ( 52%) <sup>b</sup>	7 ( 22%) <sup>b</sup>	2 ( 6%) <sup>b</sup>
Experiment II (n = 30)	22 ( 73%) <sup>a</sup>	13 ( 43%) <sup>b</sup>	7 ( 23%) <sup>b</sup>	2 ( 7%) <sup>b</sup>

**Tabelle 1 Induktion von ektoptischer rechtsseitiger *Pitx2A* Expression durch Misexpression von *Pitx2B*** (Abb. 20).

<sup>a</sup> Prozent aller experimenteller Embryos.

<sup>b</sup> Prozent der Embryonen mit ektoptischer rechtsseitiger *Pitx2A* Expression.

Um die Relevanz dieser Beobachtung im Kontext des Embryos nachzuweisen wurde ein *Pitx2B* Expressionsvektor in dorsal-rechte Blastomere von Embryonen im 8 Zellstadium injiziert, die nach Studien von Cleaver et al., (1996) massgeblich zur Entwicklung des Herzens beitragen. Tatsächlich wurde in diesem Experiment ektoptische *Pitx2A* Transkripte zum Stadium 30 mit der In situ Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 23). Das Ergebniss von zwei Experimenten wurde in Tabelle 1 zusammengefasst und zwei typische Beispiele sind in Abb. 23 C und D gezeigt.



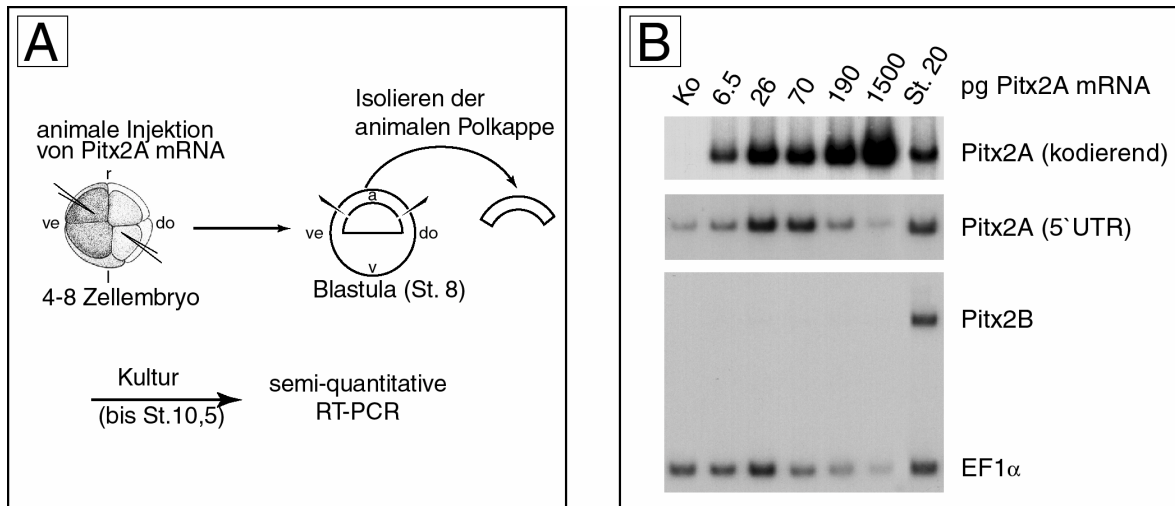
**Abb. 23 Misexpression von *Pitx2B* induziert *Pitx2A* im animalen Polkappen Test und im Embryo.**

- (A) Schematische Darstellung der Experimente. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.
- (B) Froschembryonen im 4-8 Zellstadium wurden mit synthetischer *Pitx2B* mRNA in den animalen Pol injiziert (200 pg). Die animalen Polkappen wurden im Stadium 8 (Blastula) isoliert und bis zum Stadium 20 (frühe Kaulquappe) kultiviert. *Pitx2A* und *EF1- $\alpha$*  Expression wurden durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Die Injektion von *Pitx2B* führte zu einer massiven Induktion der *Pitx2A* mRNA Transkription. Stadium 20 cDNA diente als Positiv-, nicht injizierte Polkappen und Wasser als Negativkontrolle. *EF1- $\alpha$*  fungierte als Ladekontrolle.
- (C, C', D, D') Ein *CMV-Pitx2B* DNA Expressionsvektor wurde in dorsal-rechte Blastomere von *Xenopus* Embryonen im 8 Zellstadium injiziert. Die *Pitx2A* spezifischen Transkripte wurden durch *In situ* Hybridisierung im Stadium 30 analysiert. Linien in C und D deuten die ungefähre Lage der in C' und D' gezeigten transversalen Schnitte an
- (C, C') Beispiel für ektopische *Pitx2A* Transkription in der rechten [r] Herzregion (Doppelpfeil).
- (D, D') Beispiel für ektopische *Pitx2A* Transkription im rechten Seitenplattenmesoderm (Doppelpfeil).

Von insgesamt 61 experimentellen Embryonen zeigten 47 (77%) eine ektopische rechtsseitige Expression von *Pitx2A*. Am häufigsten (29/47; 61 %) fand sich wie erwartet ektopische *Pitx2A* mRNA in der rechten Herzregion (Abb.23 C). Transversale Schnitte belegten die induzierte *Pitx2A* Transkription im rechten Herzmyocard (Abb. 23 C'). In 14 von den 47 Fällen (30%) waren kleinere rechtsseitige Bereiche *Pitx2A* mRNA positiv (nicht gezeigt), deren Natur durch histologische Schnitte nicht identifizierbar war. In 4 Embryonen (8%) konnte ektopische *Pitx2A* Expression im rechten Seitenplattenmesoderm nachgewiesen werden (Abb. 23 D, D'). Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass das Potential von *Pitx2B* den Situs zu ändern zumindest teilweise durch die Induktion der *Pitx2A* Transkription erreicht wurde.

#### 2.3.2.5 Autoinduktion von *Pitx2A*

Die Proteine der *Pitx2* Isoformen sind ca. zu 80% identisch. Die identischen Homeodomänen lassen auf gleiche DNA Bindenspezifitäten schließen. Eine *Pitx2A* Induktion, wie durch *Pitx2B* beobachtet, müsste demnach auch durch *Pitx2A* selbst erreichbar sein. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, in der, nach Wegfall der *Xnr1* Transkription in dem linken Seitenplattenmesoderm (Lustig et al., 1996; Lohr et al., 1997), die *Pitx2A* Expression im Embryo durch Autoinduktion gewährleistet bliebe. Um dies zu überprüfen wurde synthetisch hergestellte *Pitx2A* mRNA in die animale Hemisphäre von 4 bis 8 zelligen Embryonen injiziert. Da Konzentrationen über 1 ng / Embryo injizierter *Pitx2A* mRNA sich toxisch auf die Polkappen auswirkten (nicht gezeigt), wurden verschiedene Konzentrationen (6,5 bis 1500pg pro Embryo) verwendet. Die animalen Polkappenregionen wurden im Stadium 8 (Blastula) isoliert und bis zum Stadium 10.5-11 (Gastrula) kultiviert (Abb. 24 A). Anhand der 5'UTR Region konnte induzierte von injizierter *Pitx2A* mRNA unterschieden werden. Die induzierte *Pitx2A* mRNA wurde mit 5'UTR Oligos durch RT-PCR nachgewiesen, während Oligos, die kodierende Abschnitte amplifizierten, zusätzlich die injizierte *Pitx2A* mRNA detektierten.



**Abb. 24 Positive Autoregulation von *Pitx2A*.**

(A) Schematische Darstellung der Experimente. ve, ventral; do, dorsal; r, rechts; l, links; a, animal; v, vegetativ.

(B) Froschembryonen im 4-8 Zellstadium wurden mit synthetischer *Pitx2A* mRNA in den animalen Pol injiziert. Die animalen Kappen wurden im Stadium 8 (Blastula) isoliert und bis zum Stadium 10,5 - 11 (Gastrula) kultiviert. Durch semiquantitative RT-PCR wurde die injizierte RNA (kodierende Region) bzw. induzierte *Pitx2A* Transkription (5' UTR) und die *Pitx2B* und *EF1- $\alpha$*  Expression analysiert. Es wurden 5 verschiedene *Pitx2A* mRNA Konzentrationen injiziert: 6,5 pg, 26pg, 70 pg, 190 pg und 1,5 ng (Spalten 2 bis 6). Nicht injizierte animale Polkappen bzw. RNA von Stadium 20 Embryonen diente als Negativ- bzw. Positivkontrolle. *EF1- $\alpha$*  Expression diente als Ladekontrolle für die verwendeten cDNAs. *Pitx2A* Auto-Induktion wurde über einen breiten Konzentrationsbereich festgestellt, während *Pitx2B* nicht induziert wurde.

Die Injektion von *Pitx2A* mRNA führte zu einer Autoinduktion, während eine *Pitx2B* Expression nicht zu beobachten war (Abb. 24 B). Die deutlichste Autoinduktion konnte mit 26 pg bzw. 70 pg mRNA / pro Embryo erzielt werden, während niedrigere (6.5 pg / Embryo) und höhere (190 pg bzw. 1.5 ng / Embryo) Konzentrationen nur moderate Wirkung zeigten. Die Autoinduktion von *Pitx2A* lässt vermuten, dass *Pitx2A* in einer positiven Rückkopplungsschleife agiert, um seine eigene Expression zu erhalten, nachdem es möglicherweise selbst, ab Stadium 30, die Transkription des frühen Induktors *Xnr1* beendete (Abb. 22).



### 3. Diskussion

#### 3.1 Das zweite gooseoid Gen (*gsc2*) der Maus

Obwohl *gsc* in allen Wirbeltierspezies das Organisator-Gewebe markiert, und Fehlexpression im Frosch zu partieller Achsenduplikation führt, zeigte die *gsc* Knockout-Maus keinen Achsenphänotyp (Yamada et al., 1995; Rivera-Perez et al., 1995). Eine kompensierende Genaktivität sollte zwei Bedingungen erfüllen. Zum einen sollte es sich um einen Transkriptionsfaktor handeln, der die *gsc* Zielgene korrekt erkennen und regulieren kann, ausserdem sollte das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des gesuchten Gens während der Gastrulation mit *gsc* überlappen. Ein solcher Kompensationsmechanismus wurde beispielsweise für die zwei *engrailed* Homeoboxgene (*en-1*, *en-2*) der Maus nachgewiesen (Joyner et al., 1991; Wurst et al., 1994; Hanks et al., 1995).

Das in dieser Arbeit klonierte *gsc2* Gen erfüllt die erste Bedingung. Die für die DNA-Bindesepezifität wichtigen Aminosäuren in der Homeodomäne, insbesondere ein Lysin in Position 50, sind zwischen *gsc* und *gsc2* konserviert (Abb. 7). *gsc2* sollte daher ähnliche DNA-Bindesequenzen in der regulatorischen Region von Zielgenen erkennen können. Expression in der Mausgastrula konnte jedoch weder durch radioaktive In situ Hybridisierung von histologischen Schnitten noch durch die sensitivere RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 9 und nicht gezeigt).

Der direkte Nachweis, dass *gsc2* nicht den kompensierenden Faktor in der *gsc* Nullmutante darstellt, konnten andere Labors anhand der gezielten Inaktivierung des *gsc2* Gens in der Maus erbringen. Die *gsc2* Inaktivierung führte zu keinerlei phänotypischen Defekten, weder während der Gastrulation noch in der späteren Embryogenese. Die *gsc2* Nullmutanten lebten, waren fruchtbar und zeigten soweit untersucht auch keine Verhaltensdefizite (Saint-Jore et al. 1998; Wakamiya et al., 1998). Ausserdem waren Mäuse, in denen sowohl das *gsc* als auch das *gsc2* Gen inaktiviert wurde, phänotypisch nicht von der *gsc* Nullmutante unterscheidbar (Wakamiya et al., 1998). *gsc2* kommt daher als kompensierender Faktor nicht in Frage.

Wie gross ist die gooseoid Genfamilie? Ein weiteres gooseoid Gen (*cgsx*) wurde im Huhn kloniert, das eine hohe Homologie zu *gsc* innerhalb der Homeodomäne (Abb. 7) aufwies (Lemaire et al., 1997). Anhand von Sequenz- und Expressionsanalyse ist klar, dass es sich bei *gsc*, *gsc2* und *cgsx* um drei Mitglieder einer *gsc* Genfamilie handelt. *cgsx* und *gsc* wurden während der frühen Gastrulation im Huhn überlappend exprimiert (Abb. 5, Lemaire et al., 1997; Lemaire und Kessel, 1997). Darüberhinaus wiesen Missexpressionsexperimente die organisator- und somit die gastrulation-induzierende Potenz von *cgsx* nach (Lemaire et al., 1997). Diese Daten machen das *cgsx* Gen zu einem guten Kandidaten, der gesuchte kompensierende Faktor in der *gsc* Nullmutante zu sein. Eigene Kloniersversuche und Bemühungen anderer Labors führten allerdings bisher nicht zum Erfolg (Michael Kessel, MPI Göttingen, Jaime Rivera-Perez, Houston; persönliche Mitteilungen).

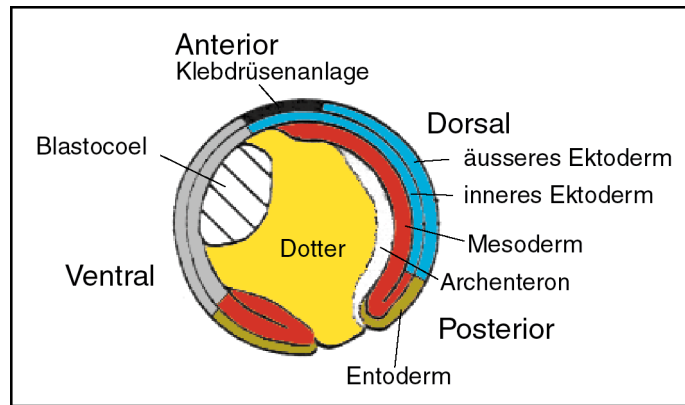
Ein Vergleich von *gsc* und *cgsx* im Huhn zeigte jedoch auch, dass die *cgsx* Expression in späteren Phasen der Gastrulation nicht mit der von *gsc* überlappte. So fand sich keine *cgsx* Transkription in der Prächordalplatte, welche eine konservierte und prominente Expressionsdomäne von *gsc* darstellt. Die Prächordalplatte stellt ein Signalzentrum für die Differenzierung des Vorderhirns dar. Die experimentelle Entfernung dieses Gewebes führt in *Xenopus laevis* und Huhn dazu, dass sich die Augenanlage nicht teilt und cyclopische Tiere entstehen (Li et al., 1997; Pera und Kessel, 1997). Die gezielte Inaktivierung von *sonic hedgehog* (*shh*), einem Gen das wie *gsc* in der Prächordalplatte exprimiert wird, resultierte in der Maus ebenfalls in einem cyclopischen Phänotyp (Chiang et al., 1996). Da in der *gsc* Nullmutante kein Phänotyp zu beobachten war, erscheint es möglich, dass auch im Fall der Prächordalplatte ein Kompensationmechanismus aktiv ist. Die *gsc* Genfamilie könnte daher aus vier (*gsc*, *gsc2*, *gsx* und *gsc4*) Mitgliedern bestehen in Übereinstimmung mit den zwei Genomduplikationen, die sich während der Evolution von Invertebraten zu Vertebraten ereignet haben (Kirschner und Gerhart, 1997). Eine abschliessende Aussage über die Zahl von *gooseoid* verwandten Genen wird vermutlich erst durch eine Identifizierung im Rahmen der Genom Projekte möglich sein.

## **3.2 *Pitx2* in *Xenopus laevis*: Expression und Funktion der verschiedenen Isoformen**

### **3.2.1 Die *Pitx* Genfamilie und Entwicklung der Klebdrüsen**

Die vorliegende Untersuchung der *Pitx* Genfamilie hat gezeigt, dass diese Gene eine wichtige Rolle für die Entwicklung anteriorer Kopfstrukturen wie Klebdrüse und Stomodeum-Hypophysenanlage spielen. Um diese Ergebnisse angemessen diskutieren zu können, werden hier zunächst die molekularen Grundlagen der Klebdrüsenentwicklung dargestellt.

Bei den meisten Froscharten besitzen die Kaulquappen ein klebriges Kopfanhangsorgan, die Klebdrüse. Sie bildet sich ventral von der zukünftigen Mundöffnung, einer Position die etwa dem Kinn der Säugetiere entspricht. Die Klebdrüse produziert ein klebriges Sekret, welches es dem Embryo erlaubt, sich an Bodensubstrat anzuheften. Die Klebdrüse ist aus mehreren Gründen ein entwicklungsbiologisch interessantes Organ. Zum einen stellt die Klebdrüse die anteriorste Struktur des Embryos dar, an das posterior das Neuroektoderm des Vorderhirns angrenzt (Abb. 25). Damit ist die Klebdrüse ein deutlich sichtbarer Marker für anteriore Kopfentwicklung. Zum anderen wird die Klebdrüse wie das Neuroektoderm durch zum Teil dieselben Organisatorsignale induziert, welches eine Frage nach der Spezifizierung der beiden Gewebetypen nach sich zieht. Damit stellt die Klebdrüse auch dorsales Gewebe dar, das unmittelbar an die ventrale Körperseite angrenzt (Abb. 25). Diese zweifache Grenzlage zur ventralen Körperseite und zum Neuroektoderm lässt auf eine komplexe Regulation der Klebdrüsenentwicklung schließen.



**Abb. 25 Zur mittleren Gastrula (Stadium12) ist die Klebrüse im dorso-anterioren Ektoderm determiniert.**

Die Klebrüsenanlage (schwarz) grenzt an das ventrale Ektoderm (grau) und das anteriore Neuroektoderm (blau). Nur die äussere ektodermale Zellschicht nimmt an der Klebrüsenentwicklung teil. (nach Sive and Bradley, 1996)

Die Lage der Klebrüse wird durch eine Kombination von hemmenden und induzierenden Signalen während der Gastrulation festgelegt. So hemmt der „ventrale“ Wachstumsfaktor *BMP-4* wie auch Retinsäure oder der Wachstumsfaktor *eFGF*, letztere beide Determinanten einer posterioren Neuralentwicklung, die Klebrüsenbildung (Sive und Bradley, 1996; Sasai und De Robertis, 1997). Die vom Organisator sekretierten Proteine *noggin*, *chordin* und *folliculin* induzierten bei Fehlexpression im Polkappentest und im Embryo neben neuralem- auch Klebrüsen-Gewebe (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Smith und Harland, 1992; Lamb et al., 1993; Sasai et al., 1994; Sasai et al., 1995). Das in räumlicher Nähe zur Klebrüsenanlage gelegene anteriore Mesoderm (Prächordalplatte) exprimiert diese Faktoren ebenfalls (Abb. 25), und stellt somit eine Quelle von klebrüseninduzierenden Molekülen dar (Sive und Bradley, 1996). Als eine weitere Quelle von klebrüseninduzierenden Signalen konnte das anteriore Neuroektoderm identifiziert werden (Sive und Bradley, 1996). Möglicherweise spielt auch hier der Wachstumsfaktor *noggin* eine Rolle, der zumindest während der frühen Neurulation in der anterioren Neuralleiste exprimiert wird (Knecht und Harland, 1997).

Der Wirkmechanismus der organisatorspezifischen Wachstumsfaktoren *noggin*, *chordin* und *folliculin* während der dorso-ventralen Achsenentwicklung und der neuralen Induktion ist es, die Signaltransduktion von *BMP* Wachstumsfaktoren zu unterbinden. Denkbar ist, dass durch die Diffusion der

*BMP* Antagonisten ein *BMP* Signalgradient entsteht, der zum Beispiel die dorso-ventrale Determinierung des Mesoderms bestimmt. Solch ein Mechanismus kommt vermutlich auch während der Lagefestlegung der Klebdrüse zum Tragen (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Smith und Harland, 1992; Sasai et al., 1994; Sasai et al., 1995; Sive und Bradley, 1996). Weitere Signalmoleküle, die einen positiven Einfluss auf die Klebdrüsenentstehung haben, sind *cephalic hedgehog* (*chh*) und *Xag-2* (Ekker et al., 1995; Aberger et al., 1998).

Schliesslich und endlich müssen die Signalmoleküle regulatorische Gene in der Klebdrüsenanlage aktivieren, die die weitere Differenzierung kontrollieren. Ein Kandidat hierfür ist das Homeoboxgen *otx2*. *otx2* gehört wie *gsc* und *Pitx2* zur *bicoid* Klasse der Homeoboxgene, und stellt ein zentrales Kontrollgen der Kopfentwicklung dar. Zu Beginn der Gastrulation wird *otx2* im Spemann-Organisator, in der späten *Xenopus* Gastrula jedoch in einer breiten anterio-dorsalen Domäne exprimiert. Diese Domäne beinhaltet und definiert das zukünftige Vorderhirn und die Klebdrüsenanlage. *otx2* Missexpression in *Xenopus*-Embryonen führte neben Achsenduplikationen zu ektopischen Klebdrüsen (Blitz und Cho; 1995; Pannese et al., 1995).

Im animalen Polkappentest induziert *otx2* allerdings neben Klebdrüsen- und neuronalem Gewebe auch noch Mesoderm, was auf die Organisatorfunktion hinweist (Blitz und Cho; 1995; Pannese et al., 1995; Gammill und Sive, 1997). Die durch *otx2* induzierte Klebdrüsendifferenzierung im animalen Polkappentest stellt eine direkte *otx2* Wirkung dar, da *otx2* ohne Proteinsynthese die Transkription von Klebdrüsenmarkergenen induzieren konnte (Gammill und Sive, 1997). Darüberhinaus führte Überexpression von klebdrüseninduzierenden Wachstumsfaktoren (*noggin*, *chordin*, *folliculin*, *chh* und *Xag-2*) im animalen Polkappentest zu einer parallelen Induktion des Homeoboxgens *otx2* (Sive und Bradley, 1996; Aberger et al., 1998). Zusammenfassend ist *otx2* ein wichtiges und potentes Kontrollgen der Klebdrüsenentwicklung. Da *otx2* aber im gesamten Kopfektoderm exprimiert ist und zusätzliche Gewebetypen induziert, stellt sich die Frage nach dem Abgrenzungsmechanismus von Klebdrüse zu Neuroektoderm.

### 3.2.1.1 Klebdrüseninduktion durch *Pitx2* Missexpression.

Die Expressionsanalyse der *Pitx2* Isoformen und *Pitx1* in *Xenopus* Embryonen ergab, dass nur die *Pitx2A* Isoform mit *Pitx1* überlappend in der Klebdrüsenanlage exprimiert war (Abb. 13). Eine in der Klebdrüsenanlage lokalisierte *Pitx2A* bzw. *Pitx1* Transkription konnte zum erstenmal in späten Gastrulastadien (Stadium 12) nachgewiesen werden (nicht gezeigt), welches mit dem Zeitpunkt der Determination des Klebdrüsenektoderms übereinstimmt (Sive und Bradley, 1996). Eine prominente *Pitx2A* und *Pitx1* Expression konnte während der weiteren Differenzierung und in der aktiven Klebdrüse nachgewiesen werden (Abb. 13, 14, 15).

Die ventrale Missexpression von *Pitx2A*-, *Pitx2B*- und *Pitx1* mRNA in *Xenopus*-Embryonen führte wie *otx2* zur Ausbildung ektopischer Klebdrüsen auf der Bauchseite (Abb. 17 und nicht gezeigt; Blitz und Cho, 1995; Pannese et al., 1995; Gammill und Sive, 1997). Da *Pitx2B* nicht in der Klebdrüse exprimiert, und die Klebdrüseninduktion durch *Pitx2B* einen unphysiologischen Charakter hat, legte dies auf den ersten Blick eine redundante Funktion der *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* Proteine nahe (siehe 3.2.4.3). Im Unterschied zu ventraler Missexpression von *otx2* wurden keine Achsenduplikationen in den experimentellen Embryonen beobachtet. Dieses Experiment wies auf eine instruktive Wirkung von *Pitx2A* und *Pitx1* während der Klebdrüsenentwicklung hin.

Im animalen Polkappentest konnte ebenfalls durch Überexpression der *Pitx2* Isoformen eine Klebdrüseninduktion beobachtet werden (Abb. 18). Bereits die phänotypische Betrachtung der injizierten animalen Polkappen (Pigmentierung und Klebrigkeit) als auch die durch RT-PCR nachgewiesene Induktion des Klebdrüsenmarkers *Xag-2* (Aberger et al., 1998) belegten dies. Überraschenderweise konnte in den zu Klebdrüsengewebe differenzierten Polkappen keine *otx2* Transkription nachgewiesen werden (Abb. 17). Dies traf auch im Kontext des Embryos zu. In durch ventrale *Pitx2A* oder *Pitx2B* mRNA Injektion induzierten ektopischen Klebdrüsen von experimentellen Embryonen wurde ebenfalls keine *otx2* Transkription festgestellt (H. Steinbeisser, MPI Tübingen persönliche Mitteilung).

Es sind zwei Interpretationen dieses Resultats möglich. Da nur *Pitx2A* in der Klebdrüse exprimiert ist (Abb. 13, 14, 15), stellt sie dort die in vivo aktive Isoform dar. In der Klebdrüsenentwicklung könnte *Pitx2A* einerseits als ein paralleler, von *otx2* unabhängiger, Signalweg wirken, oder alternativ dazu stromabwärts von *otx2* die Klebdrüsendifferenzierung steuern. Im Moment gibt es keine experimentellen Daten, die eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten zulassen. Das Vorhandensein von DNA Bindemotiven im *Pitx2A* Promotor, die von *otx2* erkannt werden können (siehe unten, Schweickert et al., 1999), und die generelle Bedeutung von *otx2* für die Kopfentwicklung lässt eher auf *Pitx2A* als Zielgen von *otx2* schließen. Die Ergebnisse deuten jedoch stark darauf hin, dass *Pitx2A*, möglicherweise in Wechselwirkung mit *Pitx1*, die Klebdrüsenanlage vom benachbarten Neuroektoderm abgrenzt (*otx2* Expressionsdomäne).

Die dorsale Überexpression von *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* mRNA in der Organisatorregion führte meistens zu schweren Gastrulationsdefekten (Abb. 16 und nicht gezeigt). Bei wenigen experimentellen Embryonen allerdings schien speziell die Kopfregion des Embryos betroffen zu sein, die als solches nicht mehr erkennbar war (z.B. Abb.17 F). Diese Art von Phänotyp wurde ebenfalls im Maussystem bei der *otx2* Nullmutante beobachtet, wo die gezielte Inaktivierung des *otx2* Gens in einem weitgehenden Verlust von Kopf-, speziell, Gehirnstrukturen resultierte (Acampora et al., 1995; Ang et al., 1995). Die im Frosch durch dorsale *Pitx2A* und *Pitx2B* Missexpression hervorgerufenen Phänotypen könnten demnach die Folge einer Repression der *otx2* Funktion während der Kopfentwicklung sein.

Vorläufige Ergebnisse unterstützen diese Hypothese. 4-8 Zellembryonen wurden dorsal mit *Pitx2A* bzw. *Pitx2B* mRNA injiziert und im Gastrulastadium (Stadium 10,5 - 11) auf *otx2* Expression durch In situ Hybridisierung analysiert. Tatsächlich konnte eine Abnahme der *otx2* Transkription in der Organisatorregion beobachtet werden (H. Steinbeisser, MPI Tübingen persönliche Mitteilung). Gegen eine direkte transkriptionelle Repression in der Klebdrüse spricht das Vorhandensein von *otx2* Expression während der gesamten Klebdrüsen-Entwicklung (Kablar et al., 1996). Eine mögliche

Alternativhypothese zur aktiven transkriptionellen Repression, basiert auf dem hohen Grad an Ähnlichkeit von *otx2* und *Pitx2* bzw. *Pitx1* innerhalb der Homeodomäne (62%, Semina et al., 1996). Alle drei Gene gehören zur *bicoid* Klasse von Homeodomänen-Proteinen, die charakteristische gleichgeartete DNA-Bindemotive erkennen (Wilson et al., 1993). Die Tatsache, dass Homeodomänen-Proteine der *bicoid* Klasse ihre Funktion als Transkriptionsfaktor in Form von Homo- oder Heterodimeren ausüben, erhöht die Komplexität der Zielgenerkennung (Wilson et al., 1993). Möglicherweise können die *otx2* und *Pitx2* bzw. *Pitx1* Proteine um gleiche DNA-Bindemotive in den jeweiligen Zielgenen konkurrieren, und entweder die Funktion des anderen unterbinden, oder wie im Fall der Klebdrüsendifferenzierung auch übernehmen.

Die beobachtete Abnahme der *otx2* Transkription in der Organisatorregion nach dorsaler *Pitx2* mRNA Injektion könnte in diesem Sinne interpretiert werden. *otx2* induziert in einer direkten autoregulatorischen Rückkopplungs-Schleife seine eigene Transkription (Gammill und Sive, 1997). Die Überexpression von *Pitx2* Isoformen könnte diesen Mechanismus ausser Kraft setzen und somit die *otx2* Transkription hemmen.

#### 3.2.1.2 *Pitx1* und Klebdrüse

Die Expression von *Pitx1* überlappte mit *Pitx2A* während der Klebdrüsenentwicklung, und erste Experimente zeigten, dass *Pitx1* wie *Pitx2* eine ektopische Klebdrüseninduktion verursachen kann (nicht gezeigt). Trotz der grossen Homologie zwischen beiden Genen (Abb. 11) ist dieses Ergebnis signifikant. Zum einen kann *otx1*, ein zu *otx2* nah verwandtes Gen, in Überexpressionsexperimenten kein Klebdrüsengewebe induzieren (Andreazzoli et al., 1997). Ein Experiment im Huhn weist darauf hin, dass *Pitx1* und *Pitx2* nicht-redundante Funktionen in der Entwicklung der Gliedmassen wahrnehmen. Während *Pitx1* die Vorderextremität partiell in eine Hinterextremität transformieren kann, ist *Pitx2* dazu nicht in der Lage (Logan und Tabin, 1999). Im animalen Polkappentest erfolgte nach Überexpression von *Pitx2* Isoformen eine Induktion von *Pitx1* (Abb. 18). Ob diese *Pitx1* Induktion ein direkter transkriptioneller Effekt war oder indirekt durch die Klebdrüsendifferenzierung



hervorgerufen wurde, muss im Zusammenhang der *otx2*, *Pitx2A* und *Pitx1* Wechselwirkungen in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

### 3.2.1.3 Was lässt sich daraus für die Klebdrüsenentwicklung ableiten?

Der frühe Organisator legt in einer ersten Phase durch die Sekretion von *BMP* Antagonisten den Kopfbereich grob fest, was anhand der breiten Expression von *otx2* im Kopfbereich manifestiert wird. In einer zweiten Phase bewirkt *otx2* im Konzert von reprimierenden und induzierenden Signalen die antero-posteriore Untergliederung des Kopfektoderms in Klebdrüse, Stomodeum-Hypophysen Anlage und Neuroektoderm. Dies geht einher mit spezifischer Induktion von *Pitx2A* und *Pitx1* Transkription in der Klebdrüsenanlage, und damit der Determinierung und Abgrenzung der Klebdrüse vom Neuroektoderm. Da *otx2* ein sehr potentes Protein darstellt, welches an einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen beteiligt ist, könnte es notwendig sein, die *otx2* Aktivität in der determinierten Klebdrüse zu reprimieren. Die letztendliche Differenzierung der Klebdrüse unterläge dann der *Pitx2A* und *Pitx1* Wirkung.

### 3.2.2 Stomodeum-Hypophysen-Anlage

Die Entwicklung der Stomodeum-Hypophysen-Anlage im Ektoderm zwischen Klebdrüsenanlage und Neuroektoderm unterliegt vermutlich einem ähnlichen molekularen Mechanismus wie die Induktion der Klebdrüse. Dazu gehören vermutlich *otx2* in Kombination mit hemmenden und induzierenden Wachstumsfaktoren (siehe oben). In der Stomodeum-Hypophysen-Anlage wurde eine überlappende *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* Expression bereits zum Zeitpunkt der frühen *Xenopus*-Neurula (Stadium 13) detektiert (Abb. 13). Damit stellen *Pitx2A*, *Pitx2B* und *Pitx1* die frühesten bekannten Marker der Stomodeum-Hypophysenentwicklung in *Xenopus laevis* dar, was bereits für die Maus beschrieben wurde (Lanctot et al., 1997; Tremblay et al., 1998; Drouin et al., 1998). Für die innerere Ektodermschicht der Stomodeum-Hypophysen-Anlage in späten Neurula-Embryonen konnte gezeigt werden, dass ausschliesslich diese Region der Ursprung der Adenohypophyse darstellt (Kawamura und

Kikuyama, 1998). Die spezifische *Pitx2B* Expression in der inneren Ektodemschicht der Stomodeum-Hypophysen-Anlage könnte bedeuten, dass schon in der frühen Neurula (Stadium 13) die Hypophysenanlage determiniert ist. Gezielte isoformspezifische Inaktivierung des *Pitx2* Gens könnte Aufschluss geben über die jeweilige Rolle der *Pitx2* Isoformen während der Hypophysenentwicklung.

### **3.2.3 Pitx1**

Der Vergleich mit veröffentlichten *Pitx1* Expressionsmustern ergab konservierte und neue Transkriptionsdomänen während der Embryonalentwicklung von *Xenopus*. In der Maus wurde u.a. *Pitx1* Expression in der Hypophyse (siehe oben), im posterioren Seitenplattenmesoderm sowie spezifisch in den Hinterbeinanlagen beschrieben (Szeto et al., 1996; Lanctot et al., 1997). Diese *Pitx1* Expressionsdomänen wurden ebenfalls in *Xenopus* beobachtet (Abb. 13, 14, 15 und nicht gezeigt). Für *Pitx1* konnte eine determinierende Rolle in der Hinterbeinentwicklung nachgewiesen werden. So führte der Verlust von *Pitx1* Expression in der *Pitx1* Nullmutante zu Hinterbeinen, die einige Charakteristika von Vorderextremitäten aufwiesen (Szeto et al., 1999; Lanctot et al., 1999; Logan und Tabin, 1999). Ebenso ergab das reziproke Experiment der Missexpression von *Pitx1* in der Vorderbeinanlage des Huhns zumindest andeutungsweise eine Hinterbeindifferenzierung (Szeto et al., 1999; Logan und Tabin, 1999).

Die in *Xenopus* beobachtete *Pitx1* Expressionen in Gehirn und Augenlinse (Abb. 14, 15) sind in der Maus nicht beschrieben, und stimmen dort eher mit der Expressionsdomäne von *Pitx3*, dem dritten Gen der *Pitx* Familie überein (Smidt et al., 1997; Semina et al., 1998). Ob diese Unterschiede evolutionären Ursprungs sind, so dass in der Maus zwei *Pitx* Gene die Funktion von *Pitx1* im Frosch ausüben, sollte die Klonierung des *Pitx3* Gens in *Xenopus laevis* erweisen.

### 3.2.4 Das Homeoboxgen *Pitx2* und die Entstehung der Links-Rechts Asymmetrie

Die asymmetrische *Pitx2* Expression im linken Seitenplattenmesoderm ist bei allen untersuchten Wirbeltierspezies wie Huhn, Maus, Frosch und Zebrafisch (Abb. 18) konserviert. Dennoch zeigen sich auch Speziesunterschiede. Während eine asymmetrische Herzexpression von *Pitx2* in Maus, Huhn und Frosch (Abb. 14, 15 und Campione et al. 1999) beschrieben wurde, konnte eine solche im Zebrafischherz nicht nachgewiesen werden (Frauke van Bebber, MPI Tübingen, persönliche Mitteilung). Es bleibt aber abzuwarten, ob im Zebrafisch eine zweite Variante des *Pitx2* Gens existiert, da im Zebrafisch häufig Duplikate von Genen auftreten, die in anderen Spezies nur singulär vorhanden sind.

#### 3.2.4.1. *Pitx2* Isoformen und die Links-Rechts Kaskade

In allen bis heute analysierten Wirbeltierspezies dient das Homeoboxgen *Pitx2* als ein Mediator zwischen dem linken asymmetrischen *nodal* Signal und der asymmetrischen Organmorphogenese. Missexpressionsexperimente in Huhn- und *Xenopus*-Embryonen, sowie animale Polkappentests im Frosch konnten nachweisen, dass *nodal* der endogene Aktivator der *Pitx2* Transkription im linken Seitenplattenmesoderm darstellen könnte (Abb. 19; Logan et al., 1998; Meno et al., 1998; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999).

Während der *Xenopus*-Embryonalentwicklung werden jedoch zwei Isoformen, *Pitx2A* und *Pitx2B*, transkribiert. Die Expressionsanalyse in *Xenopus* zeigte, dass nur die *Pitx2A* und nicht die *Pitx2B* Isoform an der Lateralitätsentstehung beteiligt ist (Abb. 14, 15). *Pitx2A* Expression fand sich im linken Seitenplattenmesoderm, im linken Herz und während der asymmetrischen Organmorphogenese des Magen-Darmtraktes auf der linken Seite des Magens (Abb. 14, 15). Im linken Seitenplattenmesoderm induziert das linke Lateralitätssignal *nodal* (*Xnr1*) spezifisch die *Pitx2A* Isoform. Dies wurde durch *Xnr1* Überexpression im animalen Polkappentest und durch rechtsseitige *Xnr1*

Fehlexpression im Kontext des Embryos gezeigt (Abb. 20, 21). Die *Pitx2B* Transkription wurde in diesen Experimenten in keinem Fall aktiviert. Der *Pitx2A* Promotor sollte somit ein für die *nodal* Signaltransduktionkette spezifisches DNA Element aufweisen.

Die Expressionsanalyse der *Pitx2* Isoformen in der Maus ergab ebenfalls, dass nur die *Pitx2A* Isoform im linken Seitenplattenmesoderm und während der asymmetrischen Schleifenbildung von Herz und Darm transkribiert wurde (Schweickert et al., 1999), während die *Pitx2B* Isoform an keinem Ort der Links-Rechts Entwicklung exprimiert wurde. Die konservierte Expression und die spezifische Regulation weisen die *Pitx2A* Isoform als den Mediator zwischen dem asymmetrischen *nodal*-Signal im linken Seitenplattenmesoderm und der asymmetrischen Organmorphogenese aus.

#### 3.2.4.2 *Activin* und die Links-Rechts Kaskade

Im Huhnembryonen wirkt der *TGF $\beta$*  ähnliche Wachstumsfaktor *Activin $\beta$ B* als Bestandteil der rechten Lateralitätskaskade im Hensen'schen Knoten (Levin et al., 1995; Boettger et al.). Im Gegensatz dazu führt in *Xenopus* die Fehlexpression von *activin* im animalen Polkappentest und im Embryo zu einer Transkription des „linken“ *Pitx2* Gen (Abb. 19). Diese Induktion war wie im Fall von *Xnr1* isoformenspezifisch. Abb. 20 zeigt, dass rechte Missexpression von *activin* im *Xenopus*-Embryo ausschließlich in einer *Pitx2A* Induktion in der rechten Seitenplatte führt. Darüber hinaus war die *activin*-Wirkung auf die *Pitx2A* Transkription ein direkter Effekt der *activin* Signalkaskade, da *Pitx2A* ohne Proteinbiosynthese im animalen Polkappentest induziert wurde (Abb. 21 C).

Interessanterweise konnte hierbei eine synergistische Wirkung von *Activin* und einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese auf die *Pitx2A* Transkription beobachtet werden (Abb. 21 C). Die synergistische Wirkung war *Pitx2A* - spezifisch, da die direkten Zielgene der *activin* Signaltransduktionskette *gsc* und *Xbra* nicht betroffen waren (Abb. 21). Dies deutet auf einen raschen Umsatz der *Pitx2A* mRNA hin. Dieser Prozess des beschleunigten Abbaus der *Pitx2A* mRNA war von einer de novo Proteinbiosynthese abhängig, so dass deren Hemmung zu einer Akkumulation der *Pitx2A* mRNA führte. Dies Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Zelllinien in Bezug auf die Hypophysenfunktion von *Pitx2*, in deren Rahmen eine posttranskriptionelle Regulation diskutiert wurde (Tremblay et al., 1997; Drouin et al., 1998).

Der Sequenzvergleich der nicht translatierten cDNA Regionen (UTR) der *Pitx2* Isoformen von Maus und Frosch ergab, dass im 3`UTR ein 169 bp grosser Homologiebereich existierte (Abb. 12 D). Möglicherweise handelt es sich bei dieser konservierten Sequenz um das Ziel eines posttranskriptionellen Regulationsmechanismus. Eine Regulation auf Ebene der mRNA ist in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* ein häufig benutzter Mechanismus. So werden die mRNAs der maternalen Effektorgene *bicoid* und *nanos* durch spezifische 3`UTR Sequenzen an den anterioren bzw. posterioren Pol des Eies lokalisiert (Ferrandon et al. 1994; Smibert et al., 1996). Konzentrationsabhängige *Pitx2A* Autoinduktion (Abb. 25) und die wahrscheinliche *Pitx2* Haplo-Insuffizienz des menschlichen Rieger-Syndroms deuten stark auf Dosiseffekte der *Pitx2* Proteine hin. Eine posttranskriptionelle Kontrolle der *Pitx2* mRNA könnte einen Mechanismus darstellen, die aktive Proteinkonzentration zu regulieren.

Auf Grund der Beobachtung, dass Missexpression von *activin* auf der rechten Körperseite von *Xenopus* zu Situsinversionen führt (Hyatt und Yost, 1998) wurde spekuliert, dass ein *activin* ähnliches Molekül die *Xnr1* Transkription in der linken Seitenplatte induziert (Lohr et al., 1998). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte rekombinantes *ActivinA* Protein die *Xnr1* Expression ohne Proteinbiosynthese im animalen Polkappentest induzieren (Abb. 21 C). *Pitx2A* war aber ebenfalls ein direktes Zielgen von

*activin* (Abb. 21 C), und *Pitx2A* Fehlexpression alleine ist ausreichend, um Situsinversionen in *Xenopus*-Embryonen hervorzurufen (Ryan et al., 1998; Campione et al., 1999). Daher scheint es sehr wahrscheinlich, dass *activin* im unphysiologischen Fall der rechtsseitigen Fehlexpression die *nodal*-Funktion übernimmt. Dafür sprechen auch die wachsende Anzahl von Evidenzen, dass *nodal* über *activin* Rezeptoren seine Funktion ausübt (Oh und Li, 1997; Whitman, 1998; Gritsman et al., 1999). Wenn dies zutrifft, lassen sich für *nodal*-Funktion im linken Seitenplattenmesoderm zwei Schlussfolgerungen ziehen. Erstens die Induktion der *Pitx2A* Transkription ist ein direkter Effekt. Zweitens *nodal* propagiert sein Signal direkt ohne Umweg in einer positiven autoregulatorischen Rückkopplungsschleife.

#### 3.2.4.3 *Pitx2A* / *Pitx2B* Protein-Funktionen

Basierend auf der spezifischen Expression und Induktion der *Pitx2A* Isoform kann auf eine besondere Funktion des *Pitx2A* Proteins während der Lateralitätsentstehung geschlossen werden, die in der Isoform *Pitx2B* nicht vorhanden ist. Die, durch *Pitx2B* verursachte, experimentelle Situsinversion im Huhn und Frosch, spricht nicht gegen funktionelle Unterschiede der *Pitx2A* und *Pitx2B* Proteine, da diese mit der Induktion der linken *Pitx2A* Isoform einherging (Abb. 23). Tatsächlich folgte jeder experimentellen Manipulation (*Xnr1*, *activin* und *Pitx2B*), die zu einem Wechsel der Links-Rechts Achse führt, eine Induktion der *Pitx2A* Transkription (Abb. 20, 23). Dies unterstreicht die Bedeutung der *Pitx2A* Isoform für die Lateralitätsentwicklung.

Die komplexe genomische Struktur des *Pitx2* Locus in Maus und Mensch (Abb. 12; Schweickert et al., 1999; Arakawa et al., 1998) mit isoformspezifischen Promotoren spricht dafür, dass die Separation der verschiedenen Isoformen während der Evolution, zumindest für die Links-Rechts-Entwicklung, notwendig war. Denn, wenn die *Pitx2* Proteine funktionell identisch wirken würden, hätte ein für die *nodal* Signaltransduktionkette spezifisches DNA Element im Promotor eines einzelnen Gens ausgereicht, um die Mediator-Eigenschaften während der Lateralitätsentwicklung zu erfüllen.

Die bis dato hypothetischen funktionellen Unterschiede sollten in den isoformspezifischen aminoterminalen Bereichen der *Pitx2* Proteine liegen. Ein Sequenzvergleich der *Pitx2A*-spezifischen Proteinabschnitte von Huhn, Maus, Mensch und *Xenopus* wies zwei Bereiche auf, die eine Konservierung zeigten. Die ersten 16 und die 18 letzten Aminosäuren von Exon 4 waren unter den verschiedenen Wirbeltierspezies konserviert, während die dazwischenliegende Region deutlich variierte (Abb. 12 C). Diese beiden Domänen könnten über Protein-Protein Interaktionen die *Pitx2A* spezifische Aktivität ausführen. Der Nachweis für funktionelle Unterschiede von *Pitx2A* und *Pitx2B* wird nur möglich sein, wenn N-terminal interagierende Partner und Zielgene identifiziert sind.

Neben der Lateralitäts- und Klebdrüsenentwicklung, in denen nur die *Pitx2A* Isoform eine Rolle spielt, zeigten die beiden *Pitx2* Isoformen beispielsweise in Hypophyse und Gehirn ein überlappendes Expressionsmuster (Abb. 13, 14, 15). Da in den Missexpressionsexperimenten die *Pitx2B* Isoform die *Pitx2A* Transkription induzierte, könnte in diesen Geweben ein solcher Mechanismus die Koexpression beider Isoformen bewirken.

Der zeitliche Vergleich von *nodal* und *Pitx2A* Expression im linken Seitenplattenmesoderm von Maus und Frosch zeigte, dass nach Ende der transienten *nodal* Expression weiterhin eine kontinuierliche *Pitx2A* Transkription stattfand. Daraus leiten sich zwei Fragen ab, zum einen, ob das Ende der *nodal* Transkription durch *Pitx2A* bewirkt wurde, und zweitens, wie ohne *nodal* Signal die Aufrechterhaltung der *Pitx2A* Expression im linken Seitenplattenmesoderm sichergestellt wird.

Es wurde gezeigt, dass Missexpression von *Pitx2B* im Froschembryo und animalen Polkappentest die *Xnr1* Transkription tatsächlich hemmen kann (Abb. 22). Damit eröffnet sich die Möglichkeit einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen *Xnr1* und *Pitx2A* im linken Seitenplattenmesoderm, in welcher *Pitx2A* zu einem bestimmten Zeitpunkt die Transkription des eigenen Induktionssignal *Xnr1* beendet. Die Verwendung der *Pitx2B* Isoform in diesen Experimenten stellt ein Problem dar, denn auf Grund der postulierten Funktionsunterschiede zu dem linksseitigen *Pitx2A* Protein kann dieses Experiment als unphysiologisch

betrachtet werden. Die Rolle der Isoformen war zum Zeitpunkt dieser Experimente noch nicht bekannt und ein *Pitx2A* Überexpressionsvektor noch nicht verfügbar.

Die Tatsache, dass *Pitx2B* Missexpression zur Induktion der *Pitx2A* Transkription führt (Abb. 23) könnte dennoch eine in vivo Relevanz vorliegen. Diese Experimente müssen mit der *Pitx2A* Isoform wiederholt und reproduziert werden. Ein anderer experimenteller Ansatz wäre in der Maus die Analyse der *Pitx2* Nullmutante. Falls ein Repressionsmechanismus existiert, müsste man in dieser Mutante eine zeitlich verlängerte *nodal* Expression im linken Seitenplattenmesoderm nachweisen können.

Eine Möglichkeit der Aufrechterhaltung der *Pitx2A* Transkription im linken Seitenplattenmesoderm ohne *Xnr1* wäre ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus. Im *Pitx2A* Promotor fanden sich mehrere DNA Bindestellen (Schweickert et al., 1999), die von Homeoboxgenen der *bicoid* Familie, also auch von *Pitx2A*, erkannt werden (Wilson et al., 1993). Tatsächlich konnte im animalen Polkappentest eine Autoinduktion durch *Pitx2A* beobachtet werden. Diese war *Pitx2A* spezifisch, da die *Pitx2B* Isoform davon nicht betroffen war (Abb. 24). Die durch *Pitx2B* Missexpression im rechten Seitenplattenmesoderm induzierte *Pitx2A* Transkription könnte in diesem Kontext eine ektopische Aktivierung des Rückkopplungsmechanismus im rechten Seitenplattenmesoderm darstellen. Eine Erklärung für die nachgewiesene asymmetrische Herzexpression von *Pitx2A* bietet dieser Mechanismus nicht, da das Herz zu keinem Zeitpunkt *nodal* exprimiert und somit der Induktor des Rückkopplungsmechanismus fehlt.



#### 3.2.4.4 *Pitx2* und Krankheit

Das menschliche *Pitx2* Gen ist in Patienten, die am Rieger-Syndrom leiden, mutiert (Semina et al., 1996). Diese autosomal dominante Erbkrankheit wird charakterisiert durch einen hervorstehenden Bauchnabel, Hypodontia und Augenkammer Defekten, die häufig zu Glaukom führen (Jorgensen et al., 1978). Die Mutationen im *Pitx2* Gen von Rieger-Patienten bestanden grösstenteils aus Punktmutationen in der Homeodomäne und in Spleißstellen von Intron 5, welches die Homeobox teilt (Semina et al., 1996). Mutationen im *Pitx2A* spezifischen Teil des Gens wurden nicht berichtet. Die Mutationen führen vermutlich zu einer Haplo-Insuffizienz des *Pitx2* Genproduktes, welches für die betroffenen Organe eine Dosisabhängigkeit nahelegt.

Die Rieger Patienten weisen einen normalen Situs solitus auf. Der hervorstehende Nabel deutet jedoch auf einen Lateralitätsdefekt während der asymmetrischen Darmmorphogenese hin. Während der Darmentwicklung der Wirbeltiere bildet sich, vermutlich aus Platzgründen, eine Mitteldarmschleife aus, die teilweise ausserhalb der Körperwand liegt. Dieser Vorgang wird als physiologischer Nabelbruch bezeichnet. Ausserhalb der Körperhöhle vollführt die Nabelschleife eine 90° Drehung, und die ebenfalls mit einer Rotation einhergehende Rückverlagerung der Darmschleife in die Körperhöhle beendet die ca. 270° Drehung des Darms (Larsen, 1997). Die Ursache der Rückverlagerung der Darmschlinge untersuchte Enbom (1938, 1939) histologisch in vier Spezies (Mensch, Opossum, Erdhörnchen, Flughund). Enbom bemerkte, dass die Mitteldarmarterie (Ateria mesenterica superior), die ebenfalls aus der Körperhöhle heraussragt, während dem physiologischen Nabelbruch eine starke Muskulatur aufwies. Diese Muskulatur war zu diesem Stadium sogar ausgeprägter als die der Aorta. Im Laufe der Rückverlagerung der Darmschlinge konnte Enbom eine Verkürzung der Mitteldarmarterie von über 50% feststellen. Daher schloss Enbom, dass diese Arterie als muskuläres Organ die Darmschleife aktiv in die Körperhöhle repositioniert.

Eine starke *Pitx2A* Expression wurde in der Mitteldarmarterie von Mausembryonen (E 13.5) nachgewiesen (Schweickert et al., 1999). Der hervorstehende Nabel bei Rieger Patienten könnte somit Ausdruck einer unterentwickelten Muskulatur der Mitteldarmarterie sein, die die Rückverlagerung beeinträchtigt. Dies legt eine *Pitx2A* Funktion im Rahmen der Muskelentwicklung nahe, welches sehr suggestiv ist, da beide Isoformen während der Somitogenese im Myotom exprimiert werden (Blum et al., 1999; Campione und Blum, unveröffentlicht). Beim Menschen sind Fehlrotationen der Darmschleife relativ häufige Krankheitsbilder, die vermutlich auch auf Fehlfunktionen der Mitteldarmarterie zurückzuführen sind. Es wird interessant sein festzustellen, ob in diesen Fällen *Pitx2A* mutiert ist.

Ob der Mechanismus der asymmetrische Organmorphogenese und somit die *Pitx2A* Funktion generell mit Muskelkontraktion erklärt werden kann bleibt zu klären. Alternativ dazu könnte eine regionalisiert verstärkte oder verminderte Proliferationsrate Organe asymmetrisch positionieren. Die Identifikation von *Pitx2A* Zielgenen und dessen isoformspezifische Inaktivierung in der Maus sollten Aufschluss über die genaue Funktion der links-spezifischen Isoform *Pitx2A* während der Lateralitätsentstehung geben.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Behandlung von Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Photometrische Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren

Zur genauen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wird die Extinktion (E) von UV-Strahlung der Wellenlängen 260 und 280 nm beim Durchtreten einer Nukleinsäurelösung, im Abgleich gegen das jeweilige Lösungsmittel, in einem Spektralphotometer gemessen. Eine  $E_{260}$ -Einheit entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml, einer RNA-Konzentration von 40 mg/ml und einer Einzelstrang-Oligonukleotid-Konzentration von 20 mg/ml. Das Verhältnis der Extinktion, bei 260 und 280 nm, zueinander ist ein Indikator für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Das Verhältnis  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  nimmt bei optimaler Reinheit von DNA den Wert 1,8 und von RNA den Wert 2,0 an.

#### 4.1.2 Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

In 70% Ethanol gelöste mRNA wurde mit 3 M Natriumacetat [mit DEPC- $H_2O$  angesetzt, um eine Verunreinigung mit RNasen zu vermeiden (pH 5,2)] auf eine Salzendkonzentration von 0,3 M eingestellt, gevortext, 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in DEPC- $H_2O$  aufgenommen.

#### 4.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 1% oder 1,5% Agarosegelen. Je nach Größe und Volumen der Gelkammern wurde die entsprechende Menge an Agarose in 60 oder 300 ml 1x TBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben, bevor es in die horizontale Gelkammer gegossen werden konnte. Nach dem Überschichten des Gels mit 1x TBE-Puffer wurden die, mit 10x DNA-Probenpuffer versehenen, Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte, je nach Gelkammergröße, bei 80 oder 120 V. Im Anschluß konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente, aufgrund des sich zwischen die DNA-Stränge gelagerten und fluoreszierenden Ethidiumbromids, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

## 4.2 Präparationen von DNA

### 4.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Bakterien wurden in 3,5 ml Nährmedium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt, kurz gevortext und in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt, um dann für 2 Minuten bei 13000 rpm herunterzentrifugiert zu werden. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte in 100 µl GTE (50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 7,8) durch Vortexen und eine anschließende Inkubation von 5 Minuten bei RT. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS Lösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) wurden die Proben durch dreimaliges Umdrehen durchmischt, bevor 150 µl 3 M NaAc zugegeben, die Proben erneut vorsichtig für maximal 10 Sekunden durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand kam in neue Eppendorfröhrchen und wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform [1:1 (v/v)] versetzt, kräftig gevortext und erneut für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Proteine werden bei diesem Vorgang in der Interphase gesammelt und Stoffe, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, gehen in die untere Phase. Die obere wäßrige Phase, die die DNA enthält, wurde abgenommen, mit 1 ml 100%igem Ethanol (-20°C) versetzt, kräftig gevortext und nach 2 Minuten Inkubationszeit (RT) erneut, wie oben, für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer, der mit RNase versetzt war, aufgenommen.

### 4.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

200 ml einer über Nacht bei 37°C in NB-Selektionsmedium (1% N-Broth, 0.5% Hefe-Extrakt, 100 µg/ml Ampicillin) geschüttelten *E.coli*-Suspensionskultur wurden in einen Bakterienbecher überführt und 20 Minuten bei 4°C im BECKMAN-Rotor "J2-21" mit 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet bei RT kurz trocken gelassen. Danach wurde es in 10 ml Suspensionspuffer "P1" (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg hitzebehandelte RNaseA/ml) gründlich resuspendiert, 5 Minuten bei RT stehen gelassen und mit 10 ml Lysepuffer "P2" (0,2 M NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken und einer Inkubation von 5 Minuten bei RT wurde mit 10 ml 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5 durch wiederum vorsichtiges Schwenken neutralisiert und die Lösung für 15 Minuten auf Eis gestellt. Die nachfolgende Zentrifugation, für eine halbe Stunde bei 9000 rpm und 4°C, trennte die Bakterienzelltrümmer von den frei schwimmenden Plasmiden. Das Auftragen des Überstandes auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) äquilibrierte "QIAGEN-pack 500"-Säule erfolgte über ein Mullnetz, um frei schwimmende Teile des Bakterienpellets zurückzuhalten. Nach Durchlaufen des Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer "QC" (1000 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) gewaschen und die Plasmide mit 15 ml Puffer "QF" (1500 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) eluiert und anschließend mit 11 ml Isopropanol bei RT präzipitiert. Nach einer Stunde wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30 min, 10000 rpm, 4°C, HERMLE SwingOut-Rotor "AS 4.13"), mit 5 ml 80% Ethanol gewaschen, nochmals für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend bei RT getrocknet und je nach Pelletgröße in 300 bis 500 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst.

#### 4.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem DNA Purifikation Kit Easy Pure (Biozym)

Unter dem UV-Licht wurde die DNA-Bande knapp aus dem TBE-Gel ausgeschnitten und ihr Volumen bestimmt (100mg = 100 µl). Anschließend wurde das 1/2 Volumen „MELT“-Lösung und 4,5 x das Ausgangsvolumen an „SALT“-Lösung zugegeben und für mindestens 5 Minuten bei 55°C unter Schütteln inkubiert, bis sich das Gelstück aufgelöst hatte. 5 µl + 1µl/µg der erwarteten DNA-Ausbeute mußte an „BIND“-Lösung zugesetzt und danach für 5 Minuten unter häufigem Mischen inkubiert werden. Die DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, in 1 ml Waschlösung vollständig resuspendiert, nochmals durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und vollständig trocken gelassen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10-20 µl deionisiertem H<sub>2</sub>O. Diese Lösung wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand als gereinigte Probe in ein neues Gefäß überführt.

### **4.3 Präparation von RNA**

#### 4.3.1 Extraktion von RNA aus Froschembryonen und animalen Kappen mit dem PeqGOLD TriPure Kit (Peglab)

Die Extraktionsmethode basiert auf einer Einzelschritt-Flüssigphasen-Separation. PeqGOLD Tripure enthält Phenol und Guanidinthiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf, wobei die wäßrige Phase die RNA, die Interphase die DNA und die organische Phase die Proteine enthält. Die 30 in PBS bei -80°C tiefgefrorenen Embryos des Stadiums 9 wurden in 10 ml PeqGOLD TriPure (1 ml PeqGOLD TriPure pro 5 - 10 x 10<sup>6</sup> Zellen) mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Chloroform zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt, 10 Minuten bei RT inkubiert und 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere farblose wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 10 ml Isopropanol 15 Minuten bei RT gefällt und danach für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in 75%igen Ethanol zweimal resuspendiert und zentrifugiert ( 10 min, 12000 rpm, 4°C ). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in DEPC-Wasser aufgenommen und zum Lösen des Pellets 10 Minuten auf 55°C erwärmt, bevor die RNA bei -80°C zur Aufbewahrung tiefgefroren wurde.

## 4.4 Klonierungstechniken

### 4.4.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Pro µg zu verdauender DNA wurden 2 - 4 Einheiten Enzym in 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Salzkonzentrationen wurden nach den Herstellerangaben mit den entsprechenden Restriktionsenzym-puffern des gleichen Herstellers eingestellt. Die Inkubation erfolgte für zumindest zwei Stunden, bei einer Linearisierung auch über Nacht, bei 37°C. Im Anschluß konnte die Vollständigkeit des Verdaus auf einem Agarosegel gegen das ungeschnittene Plasmid geprüft werden.

### 4.4.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

500 ng Plasmid-DNA bzw. 10 - 15 µl des Ligationsansatzes wurden zu 100 µl, auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für exakt 90 Sekunden auf 42°C erwärmt und direkt wieder für 2 Minuten auf Eis plaziert, bevor nach Zugabe von 1 ml LB-Medium die Inkubation der Bakteriensuspension für 1 - 1,5 Stunden bei 37°C erfolgte. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) sedimentiert, 800 µl des Überstandes verworfen, das Bakterienpellet in den verbleibenden 100 µl Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen. Man läßt die Bakteriensuspension auf den Platten eintrocknen, bevor man diese 12 - 16 h bei 37°C inkubiert. Alternativ konnte zur Zeitersparnis die gesamte Bakteriensuspension nach 1 - 1,5 Stunden bei 37°C direkt zu 200 ml LB-Amp-Medium gegeben werden und diese als Übernachtskultur bei 37°C inkubiert werden, um im Anschluß eine Maxipräparation durchzuführen.

### 4.4.3 Subklonierung von PCR Produkten mit dem TOPO Cloning Kit (Invitrogen)

Das TOPO-Klonierungssystem bewirkt aufgrund einer schnellen, einstufigen Klonierungsstrategie die Möglichkeit der direkten Insertion von *Taq* Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Es beruht auf einer Template unabhängigen Aktivität der thermostabilen *Taq* Polymerase während PCR Reaktionen. Diese heftet an alle 3' Enden von doppelsträngiger DNA ein zusätzliches Desoxyadenosin (A). Diese A-Überhänge werden benutzt um PCR Produkte in einen speziell konstruierten pCR™II TOPO Vektor, mit einzelnen 3' Desoxythymidin (T) Überhängen, zu ligieren. In dem TOPO Cloning Kit waren zusätzlich kompetente Bakterien (TOP10F' One Shot Cells), SOC-Medium und β-Mercaptoethanol für die Transformation enthalten.

Diese Subklonierungsmethode wurde für das *gsc2* PCR fragment, *gsc2* codierende Region, *gsc2* 3' untranslatierte Region, *Pitx2* PCR-Fragmente von Huhn und Zebrafisch, *Pitx2A* und *Pitx2B* spezifische Regionen verwendet. 0,5 - 2 µl (10 ng/µl) PCR-Produkt mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 400 - ca. 2000 bp wurden für die Ligation eingesetzt.

Die Konzentration an PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese, durch Abschätzung und Vergleich mit Markern definierter Menge, ermittelt. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

frisches PCR-Produkt      0,5 - 2 µl  
mit sterilem Wasserauffüllen bis zu 4 µl  
pCR TOPO Vektor          1 µl

Nach gründlichem, vorsichtigen Hoch- und Runterpipettieren, erfolgte die Ligation innerhalb von 5 Minuten bei RT, so daß im Anschluß direkt mit der Transformation nach Vorschrift des TOPO Klonierungssystems begonnen werden konnte.

## 4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 4.5.1 Standart PCR-Protokoll

Zur Amplifikation wurden mit 2,5 µl 2 mM NTP's 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,2 µl thermostabiler DNA-Polymerase (*Taq*) und jeweils 10 pmol Primern in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt und in einen Thermocycler eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen der Zyklen richtete sich jeweils nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments sowie der Schmelztemperatur ( $T_m$  für „melting temperature“) der Amplifikationsprimer und waren empirisch ermittelt.

Normalerweise wurde zuerst 1 Minute bei 95°C denaturiert und anschließend mit der in der Regel 36maligen Wiederholung der folgenden Zyklen begonnen: zuerst wurde 30 Sekunden bei 95 °C denaturiert, 1 Minute bei einer bestimmten Temperatur hybridisiert, die 3 - 5 °C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Amplifikationsprimer (siehe unten) lag und schließlich bei 72°C Minute synthetisiert. Als Anhaltspunkt zur Berechnung der Schmelztemperatur von Amplifikationsprimern gilt folgende Gleichung:

$$T_m = 20 \cdot (4 \cdot G/C + 2 \cdot A/T) \cdot n^{-1}$$

wobei:      G/C = Anzahl der hybridisierenden G/C-Basenpaare  
              A/T = Anzahl der hybridisierenden A/T-Basenpaare  
              n = Gesamtzahl der hybridisierenden Basenpaare

### 4.5.2 Modifiziertes PCR-Protokoll

Zur Klonierung des genomischen *gsc2* Fragments mit je 100pmol der degenerierten PCR-Oligos 1 und 2, wurde die Stringenz der Hybridisierungstemperatur während der ersten 5 Zyklen variiert. Die Temperatur wurde von anfänglich 60°C mit einer Geschwindigkeit von 0,2°C pro Minute auf 37°C gesenkt. Dies ermöglichte eine erleichterte Hybridisierung der Oligos und die Amplifikation des Zielgens. Um die, unter diesen unspezifischen Bedingungen wahrscheinliche, Artefaktamplifikation zu minimieren, wurde die PCR mit weiteren 35 Zyklen bei konstanten 55°C zu Ende geführt. Die übrigen Parameter entsprachen dem Standartprotokoll.

### 4.5.3 Semiquantitative RT-PCR

Um PCR Produktmengen von verschiedenen RT Reaktionen vergleichen zu können, mussten 2 Faktoren gewährleistet werden. 1. Die eingesetzten RT Reaktionen beinhalteten vergleichbare Mengen an cDNA. Der Nachweis dafür erfolgte mit der Amplifikation des Elongationsfaktor  $1-\alpha$  [*EF1- $\alpha$* ] der in embryonalem, sich schnell vermehrenden Zellen in konstant hohen mRNA Mengen vorkommt (Ding et al.,1997). Um technische Unzulänglichkeiten, wie etwa Pipettiermengen auszugleichen, wurden für die experimentelle Fragestellung wichtige Detektionen bei gleichzeitiger *EF1- $\alpha$*  Amplifikation durchgeführt. 2. Die PCR Reaktion musste im linearen Bereich der Produktamplifikation beendet werden. Um dies sicherzustellen wurde der PCR Reaktion 0,2  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) zugegeben, welches eine sensitive Detektion des PCR-Produkts durch Radiographie und somit eine Reduktion der Zyklenzahlen ermöglichte. Der effektivste und lineare Bereich der PCR wurde empirisch ermittelt und lag für *EF1- $\alpha$*  bei etwa 21, sonst zwischen 23 und 27 Zyklen.

### 4.5.4 PCR-Oligos: DNA-Sequenz, Produktlänge und Hybridisierungsbedingungen

Die Sequenzen der Oligos sind folgend immer in 5`-3` Orientierung angegeben.

<i>gsc2</i> kodierend	forward	ATGGCGACTGCAGGCAGCGCGGCCAGCCGC
	reverse	TCAACAACCTCTCCTTGGGAG
		1600 bp, genomisch, 55°C
<i>gsc2</i> Probe	forward	CTTGCGGCTGGCGTGGCCGC
	reverse	CTCAAGGCTGAGGTGAAGGAGCAGATG
		580 bp, 60°C
Frosch:		
<i>Xag-2</i>	forward	TTTGCATGCCCTGGAACACTCTT
	reverse	AGCGCTTGTGCCACCTTGAAACTC
		243 bp, 55°C
<i>otx2</i>	forward	GGATGGATTTGTTACATCCGTC
	reverse	CACTCTCCGAGCTCACTTCCC
		315 bp, 55°C
<i>Xbra</i>	forward	CACAGTTCATAGCAGTGACCG
	reverse	TTCTGTGAGTGTACGGACTGG
		323 bp, 57°C
<i>Xvent1</i>	forward	ATCTGACTCTTCAGTTTCATCCGTC
	reverse	CCAGCGCCGGCTGAGAACGGCATTCC
		180 bp, 55°C
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	forward	CAGATTGGTGCTGGATATGC
	reverse	ACTGCCTTGATGACTCCTAG
		268 bp, 57°C
<i>goosecoid</i>	forward	CTCCCTTACATGAACGTTGGC
	reverse	TCTGAGATGAACTCTCCTTGC.
		194 bp, 55°C
<i>Xnr1</i>	1.)	Xnr1A 5` AGTCAAGTCCTCTGCCAA
		Xnr1A 3` TCAAACAACCTCATCTCCC



		452 bp, 54°C
2.)	Xnr1B 5`	CCCAACAATACAATCCTCATC
	Xnr1B 3`	ATCCAATGTCCTCAAAGT
		312 bp, 54°C
<i>Pitx2A</i> kodierend	forward	GCTCTGGGGAGTGTAAGTCAAG
	reverse	TTGTTGTACGAGTAACTGGGGTAC,
		482 bp, 57°C
<i>Pitx2A</i> 5' UTR	forward	GGGTCTCCATGCCTGTTGGTAG
	reverse	GTGTCTGGGCTGGAGGTG
		400 bp, 55°C
<i>Pitx2B</i>	forward	TTGTTTCCCTTTGCCTTG
	reverse	CATGTCGGGGTAACGATTTTC
		503 bp, 55°C
Fisch;Huhn <i>Pitx2</i> :	forward	GAKGAYCCSTCYAAGAAGAAG
	reverse	TGCTTKGCTTTSAGTCTCAGG
		641 bp, 60°C
<i>Pitx1</i>	forward	TGTGGAACAGGCGTTTCTT
	reverse	ACATCTCGTCGTACGGCTGCATG
		527 bp, 55°C

## 4.6 Markierung von DNA mit Radionukleotiden

### 4.6.1 „random priming“ von doppelsträngiger DNA

DNA-Fragmente wurden nach der Random-Primer-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Hierbei hybridisieren die durch Erhitzen entstandenen Einzelstränge mit kurzen DNA-Stücken zufälliger Sequenz, welche dann als Primer für die nachfolgende Polymerisation, durch Exonuklease-freie Klenow-Polymerase, dienen. Durch Zugabe radioaktiv markierter Nukleosid-Triphosphate wird, bei deren Einbau, der entstehende Doppelstrang radioaktiv markiert. Verwendet wurde das "rediprime DNA labelling system" der Firma Amersham. 25 ng DNA wurden in 45 µl TE aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert, danach sofort auf Eis gesetzt und kurz herunterzentrifugiert. Diese 45 µl wurden in ein „redi-prime“-Eppendorfgefäß gegeben, das die für die Reaktion notwendigen Nukleotide, die Polymerase, Primer und Puffer in lyophylierter Form enthält und zusätzlich wurden 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) zugegeben. Das Mischen des Reaktionsansatzes erfolgte durch Hoch- und Runterpipettieren und die darauffolgende Inkubation für 45 Minuten bei 37°C, bis diese durch Zugabe von 5 µl EDTA (0,2 M) gestoppt wurde.

Der Ansatz wurde zum Entfernen der nicht inkorporierten Nukleotide über eine Sephadex-G50-Säule laufen gelassen. Die Tropfsäule wurde zuerst mit 3 ml TE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) äquilibriert, die radioaktive Probe auf das Säulenbett aufgetragen, mit 400 µl TE in die Säule einlaufen gelassen und mit wiederum 400 µl eluiert. Mit einem Aliquot von 2 ml konnte die Aktivität (Cerenkov Counts) der Sonde in einem Scintillations Counter überprüft werden. Die sich im Eluat befindende markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis heruntergekühlt und stabilisiert und konnte dann zur Hybridisierung von Replikafiltern eingesetzt werden.

## 4.7 Durchsuchung einer Phagen cDNA Bibliothek

### 4.7.1 Vorbereitung der Wirtsbakterien

Der bei -80°C gelagerte Bakterienglycerinvorrat wurden auf den Bakterienbedürfnissen entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die verwendeten *E. coli*-Wirtsbakterien waren: XL1 Blue, die auf Tetracyclin-Agarplatten und SOLR, die auf Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen wurden. Am nächsten Morgen konnten einzelne Bakterienklone gepickt und in LB-Medium mit einem Zusatz von 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Maltose bei 37°C unter ständigem Schütteln, inkubiert werden. Lambda-Phagen adsorbieren an Rezeptoren der äußeren Membran von *E. coli*, die durch das bakterielle lamB Gen kodiert und normalerweise für den Transport von Maltose in die Bakterienzelle genutzt werden. Da die Synthese dieser Rezeptoren durch Maltose induziert und durch Glukose unterdrückt wird, gibt man dem Medium Maltose zu. Die Magnesiumionen erleichtern die Adsorption der Bakteriophagen an die Rezeptoren. Sobald die Bakteriendichte eine optische Dichte (600 nm) zwischen 0,5 und 1,0 erreicht hatte, wurden die Zellen bei 3500 rpm für 10 Minuten herunterzentrifugiert, in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und auf eine optische Dichte (600 nm) von 0,5 eingestellt.

### 4.7.2 Ausplattieren und Titerbestimmung

Vor dem Ausplattieren wurde ein 10<sup>-2</sup> Verdünnung der Bank hergestellt, zweimal je 1 µl (= 10<sup>-5</sup>) und zweimal je 10 µl (= 10<sup>-4</sup>) davon mit je 100 µl Wirtsbakterien vermischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, damit eine Adhesion der Phagen an die Bakterienoberfläche stattfinden kann. Die Bakterien und Phagen wurden dann zu 3 ml NZY Top Agar ( geschmolzen und auf 48°C erwärmt), dem 15 µl 0,5 M IPTG (in H<sub>2</sub>O) und 50 µl X-gal [250 mg/ml (in DMF)] zugesetzt waren, gegeben, kurz gevortext und auf vorgewärmte, leicht angetrocknete, 9cm NZY-AgarPlatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur Bestimmung des Titers (Plaque forming units pro Milliliter = pfu/ml) wurden die Plaques gezählt und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 \mu\text{l/ml} = \text{pfu/ml.}$$

### 4.7.3 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Die Hybridisierungstemperaturen müssen der angewendeten Stringenz und der verwendeten Hybridisierungslösung angepaßt werden, wobei die maximale Hybridisierungstemperatur einer 100% homologen Sonde bei 65°C liegt. Die verwendete Hybridisierungslösung beinhaltete 1 M NaCl, 1% SDS, 1 mg/ml Hefe-RNA und 10% Dextransulfat. Aufgrund des Screenens einer *Xenopus*-cDNA-Bibliothek mit einer Maus *Pitx2* cDNA-Sonden wurde die Hybridisierungstemperatur auf 50°C festgelegt. Nicht spezifisch gebundene Sonden wurden durch 4 Waschschrte (2 mal 30 Minuten 2x SSC, 30 Minuten 1x SSC/1% SDS und ein zusätzliches Spülen mit 1x SSC) entfernt. Die Stringenzkriterien sind ebenfalls Temperatur und die Salzkonzentration, so daß die ersten drei Waschschrte bei 50°C und der Spülschritt bei RT durchgeführt wurde.

#### 4.7.4 Plattieren der cDNA-Bibliothek

Von der Frosch-Neurula-cDNA-Bibliothek wurde ein Aliquot entnommen, das  $10^6$  Phagen enthielt und dieses auf 20 150 mm große und bei 37°C vorgetrocknete NZY-Agar-Platten ausplattiert, so daß jede Platte ca. 50000 Phagen enthielt. Dazu wurden die Phagen und die entsprechenden Wirtsbakterien zunächst für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in 15 ml erwärmte NZY-Topagarose (48°C) überführt, schwach gevortext, ohne Luftblasen zu erzeugen und auf die Platte aufgebracht. Nach 6 - 8 Stunden im 37°C-Raum waren die Plaques ausreichend gewachsen und die Platten wurden auf 4°C heruntergekühlt (s.u.).

#### 4.7.5 Filterabzüge: Transfer von Phagen auf Nylon-Filter (Hybond+, Amersham)

Nachdem durch ausreichend langes (mindestens zwei Stunden) Kühlen der Platten bei 4°C die Verfestigung der Top-Agarose gewährleistet war, wurden die Platten durchnummeriert und von jeder zwei Replikafilter hergestellt. Die ebenfalls durchnummerierten 137 mm Filter wurden von der Mitte her langsam auf die Platten gelegt, der erste Filter für 2, der zweite für 5 Minuten. Während des Aufliegens der Filter werden diese zwecks Orientierung markiert, indem mehrmals, asymmetrisch mit einer Kanüle durch Filter und Agar durchgestochen wurde. Die Einstichlöcher wurden mit einem Filzstift auf dem Boden der Platten markiert, so daß der zweite Filter mit identischen Markierungen versehen werden konnte.

#### 4.7.6 Denaturierung und Fixierung der Phagen-DNA auf Nylonfilter

Mit Hilfe einer stumpfen Pinzette wurden die Filter vorsichtig von den Platten abgezogen und mit der DNA-behafteten Seite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) getränktes Whatman 3MM Papier gelegt. Nach 2 Minuten wurden sie, in der gleichen Orientierung für 5 Minuten, auf ein weiteres, mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8.0) benetztes Whatman 3MM-Papier überführt. Die Filter wurden daraufhin für maximal 30 Sekunden in Waschlösung (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 2x SSC) geschwenkt, bevor die Lufttrocknung der Filter erfolgte. Zur Fixierung der Phagen-DNA wurde ein Stratagene UV Crosslinkgerät verwendet.

#### 4.7.7 Hybridisierung und Identifikation von positiven Klonen

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurden die Filter nochmals in deionisiertem Wasser von Salzen freigewaschen, die sonst zu unspezifischen Signalen führen könnten, bevor ca. 10 150mm-Filter in eine Folie eingeschweißt wurden. Nach der Zugabe von 30 ml Hybridisierungslösung (3ml/Filter) wurde für mindestens 2 Stunden vorhybridisiert und anschließend, mit der bei 95 °C denaturierten und mit Eis gekühlten radioaktiven Probe, über Nacht hybridisiert. Nach einer Exposition der Filter auf Röntgenfilm über Nacht bei -80°C, und die Entwicklung der exponierten Filme, folgte die Auswertung. Wurden auf beiden, von einer Platte abstammenden, Filtern positive Signale an ein und derselben Stelle entdeckt, wurde die entsprechende Stelle auf der Agarplatte markiert und mit Hilfe einer umgedrehten sterilen Pipettenspitze eine Fläche von ca. 0,5 cm Durchmesser

aus dem Agar ausgestanzt. Dieser mit Phagen behaftete Agar wurde in 500 µl SM-Puffer überführt, dem zur Abtötung der mitausgestochenen Bakterien 20µl Chloroform zugeführt wurden. Nach kurzem Vortexen konnten die Phagen bei 4°C über Nacht in den SM-Puffer diffundieren.

#### 4.7.8 Rescreening

Um die beim ersten Screen erhaltenen Signale zu überprüfen und letztendlich einzelne Phagenklone zu erhalten, wurden die im ersten Hybridisierungsschritt isolierten Phagen 2 weiteren Hybridisierungen unterworfen. Dazu wurden  $10^{-2}$  Verdünnungen der, aufgrund der Phagendiffusion aus dem Agar entstandenen, Phagensuspensionen hergestellt, davon je 1, 5 und 25 µl zu 200 µl Wirtsbakterien gegeben und diese für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde dann mit 4 ml vorgewärmten LB-Topagar (48°C) auf 9 cm LB-Agarplatten plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Platten mit ca. 500 Plaques wurden für die Hybridisierung ausgewählt und bei 4°C gekühlt. Diese erfolgte wie oben beschrieben mit Doppelfilterabzügen, Denaturierung und Fixierung und mit der anschließenden Hybridisierung der jeweiligen Proben. Die doppeltpositiven Bereiche wurden wiederum ausgestanzt, in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform überführt und dem zweiten Rescreen unterzogen. Dazu wurde das oben beschriebene Protokoll verwendet, die Phagenkonzentration allerdings so verringert, daß je 2, 10 und 50 µl einer  $10^{-4}$ -Verdünnung der positiven Plaques aus dem ersten Rescreen ausplattiert wurden. Plaques, die sich nach der Hybridisierung als positiv herausstellten, waren jetzt so weit vereinzelt, daß sie nur einen Klon repräsentieren konnten. Diese Plaques wurden wieder ausgestanzt und in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform überführt. Aliquots davon wurden, nach Zugabe von DMSO, in einer 7% DMSO-Lösung bei -80°C eingefroren.

#### 4.7.9 Subklonierung mit dem *Lambda Zap II* Phagen System

Die Subklonierung der positiven Phagenklone erfolgte *in vivo* über die Freisetzung des pBluescript Phagmids aus dem Phagengenom. Zur Überführung der Pitx2 positiven rekombinanten Uni-Zap Klone in ein pBluescript Phagmid muß eine Coinfektion mit dem filamentösen Helferphagen ExAssist (Stratagene) stattfinden. Dazu wurden 200µl XL1 Blue MRF<sup>+</sup> Bakterien mit einer optischen Dichte (600nm) von 1, mit 250µl der Phagenbibliothek (mindestens  $10^5$  Phagen) und 1µl ExAssist Helferphage ( $> 10^6$  pfu/µl) in einem 15 ml Polypropylen Röhrchen (Falcon 2059) vermischt und für ca. 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit der Zugabe von 3ml LB-Medium erfolgte eine 2,5 - 3 stündige Inkubation bei 37°C, während der die *in vivo* Ausschneidung des pBluescript Phagmids aus dem XL1-Blue Genom stattfindet.

Die *in vivo* Ausschneidung hängt von DNA-Sequenzen ab, die in das Lambda Phagengenom integriert wurden, sowie von der Anwesenheit einer Vielzahl an Proteinen, Bakteriophage f1-abstammende Proteine eingeschlossen. In *E.coli*-Bakterien eingeführt, erkennen diese f1-Proteine eine DNA-Region innerhalb des Lambda Vektors, die normalerweise im f1 Bakteriophagen als Ausgangspunkt der +Strang Replikation (ori, origin of replication) dient und

öffnen einen der beiden DNA- Stränge. An der Öffnungsstelle findet DNA Synthese statt, die alles was stromabwärts (3') liegt, wie die klonierte cDNA und die pBluescript DNA Sequenzen, dupliziert und bei einem 3' vom ori liegenden Terminationssignal innerhalb des *Lambda* Vektors stoppt. Die einzelsträngige DNA wird durch ein Helferphagen Protein (Gen II Produkt von f1 Phagen) zirkularisiert, wobei das pBluescript Phagemid entstehen, welches als filamentöses Phagenpartikel verpackt wird.

Im Anschluß an die Freisetzung des pBluescript Phagemids wurde das Reaktionsgemisch 20 Minuten lang auf 70°C erhitzt und die Bakterientrümmen durch Zentrifugation (15 min, 3500 rpm) entfernt. Der Überstand, der das, als filamentöses Phagenpartikel verpackte, rekombinante pBluescript Phagemid enthielt, wurde in ein steriles 15 ml Polypropylenröhrchen überführt. Zur Ausplattierung des Phagemids wurden 200 µl frisch gewachsener SOLR-Bakterien (siehe 3.7.8) mit einer optischen Dichte (600 nm) von 1 mit 10 bzw. 100 µl Phagemid-Suspension angeimpft und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Ausplattieren wurden je 200 µl dieser Zellmischung auf LB-Ampicillin-Agarplatten (50 µg/ml) aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der ExAssist Helferphage besitzt eine amber Mutation, welche eine Replikation des Phagengenoms in SOLR Bakterien verhindert. Zusätzlich sind diese Bakterien *Lambda* Phagen resistent, so daß nur jene SOLR unter Selektionsbedingungen wachsen können, die das zirkuläre Bluescript Phagemid haben. Die am nächsten Tag gewonnenen Einzelkolonien wurden zur Bestimmung der Insertgröße einer DNA-Präparation und einer anschließenden gelelektrophoretischen Analyse unterzogen.

#### **4.8 Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Didesoxymethode**

Die zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA (pCR II-TOPO-Vektor) wurde nach der Isolierung mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifikation System von Promega in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen und deren Konzentration mittels Spektroskopie bestimmt. Für jeden zu sequenzierenden Klon wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, um die Sequenz von beiden Seiten mit den, für den TOPO-Vektor passenden, Primern M13 forward und M13 reverse lesen zu können. Für jede dieser beiden Reaktionen wurden wiederum vier PCR-Reaktionen angesetzt, von denen jede 2,5 µl Terminationsmix, der aus 2 µl dGTP Nukleotid Mastermix (7,5µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 µl des entsprechenden [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddNTP ( [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ddATP, -ddGTP, -ddTTP, -ddCTP) besteht, enthielt. Jede dieser PCR-Reaktionsansätze enthielt somit 0,25 µl des entsprechenden Primers (2 pmol), 0,5 µl 10 x Reaktionspuffer, 3,75 µl DNA (= 1 - 3 µg), 0,5 µl *Taq* Polymerase (4U/µl) und 2,5 µl Terminationsmix. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler nach dem folgenden Programm:  
30 sek      95°C; 30 sek 55°C; 1 min      72°C für 50 Zyklen.  
Anschließend wurde die Reaktion mit je 4 µl Stop-Lösung ("SSB") abgestoppt und für 20 Minuten auf 80°C erhitzt, bevor sie auf ein denaturierendes 6%-iges Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenziergel aufgetragen werden konnte. Der Gellauf erfolgte bei 1500 V und 120 mA in 1 x TBE-Puffer bis die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreicht hatte. Nach Abkühlen und Trocknen des Gels erfolgte die Exponierung auf AMERSHAM-Hyperfilm-MP (24 - 48 h).

Stop Lösung: 95% Formamid, 20mM EDTA, 0,05% Bromphenol Blau, 0,05% Xylen Cyanol FF  
6% Polyacrylamidgel:

Zur Auftrennung von, im Verlauf von Sequenzierreaktionen entstandenen, DNA-Fragmentgemischen wurden denaturierende 6% Polyacrylamidgele verwendet. Um die DNA-Fragmente in denaturiertem Zustand zu halten, wurden Sequenzgele normalerweise mit einer hohen Harnstoffkonzentration (8 M) hergestellt. Unter Verwendung einer Sequenzierapparatur der Firma Biorad wurde die Elektrophorese bei einer hohen Leistung (100 W) durchgeführt, um die erforderliche Temperatur von 45 - 50 °C aufrechtzuerhalten. Die Elektrophorese-dauer richtete sich nach dem Ausmaß der gewünschten Sequenzinformation und betrug daher zwischen 1,5 und 4,5 Stunden. 150 ml einer Gellösung [6% (w/v) Acrylamid; 0,16% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 8 M Harnstoff in TBE pH 8,3] wurden mit 900 µl 10% (w/v) APS und 90 µl TEMED versetzt und nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch zwei konisch zulaufende 0,2 bis 0,4 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen eines Taschenformers (Haifischkamm) erfolgte die Polymerisation des Gel in horizontaler Lage über Nacht. Am nächsten Morgen wurde das auspolymerisierte Gel in eine Vertikalgelapparatur eingespannt, oberes und unteres Pufferreservoir mit TBE gefüllt und der Taschenformer umgedreht. Nach einem 0,5 stündigen Vorlauf des Gels bei einer Leistung von 100 W konnten die Proben in die Taschen überführt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten, nach Abkühlen des Gels auf RT, voneinander getrennt, das Gel auf 3MM Papier aufgezogen und für zwei Stunden bei 80°C im Wasserstrahlvakuum getrocknet, bevor das Gel auf einem AMERSHAM-Hyperfilm-MP bei RT über Nacht exponiert wurde.

## 4.9 Transkription von Nukleotidsequenzen

### 4.9.1 Erst-Strang-Synthese mit der SUPERSCRIPT II Rnase H<sup>-</sup> Reversen Transkriptase (GIBCO)

Diese RT ermöglicht die Synthese von Erst-Strang-DNA, die im Anschluß mittels der PCR-Reaktion amplifiziert wird, aus RNA.

Dazu wurden 11 µl RNA (ca. 1,7 µg) mit 1 µl (50ng) random Primer gemischt, für 12 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gesetzt. Nach der Zugabe der folgenden Komponenten: 4 µl 5x Erst-Strang-Puffer; 2 µl 0,1 M DTT; 1 µl 10 mM dNTP Mix; (10 nM je dATP, dGTP, dTTP und dCTP)

wurde die Reaktion für 10 Minuten bei RT stehen gelassen und anschließend für 2 Minuten auf 42°C erhitzt, bevor 1 µl (200 E) an SUPERSCRIPT II-RT durch vorsichtiges Hoch- und Herunterpipettieren zugegeben werden konnte.

Anschließend wurde die Reaktion für 1 Stunde bei 42°C inkubiert, bevor die Reverse Transkriptase durch einen 15 minütigen 70°C-Schritt inaktiviert und damit die Reaktion gestoppt wurde.

#### 4.9.2 Transkription von Plasmid-DNA zur Herstellung Digoxigenin markierter RNA

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von *antisense* und *sense* RNA-Sequenzen von einem TA bzw TOPO PCR Klonierungs-Vektor (Stratagene) durchgeführt.

Die Transkription wurde wie folgt angesetzt:

Template (cDNA-Matrize)	X $\mu$ l = 1 $\mu$ g
DEPC-H <sub>2</sub> O	bis 10 $\mu$ l
RNase-Inhibitor	1 $\mu$ l
DIG-NTP	2 $\mu$ l
5x Puffer	4 $\mu$ l
RNA-Polymerase	2 $\mu$ l
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde gevortext, kurz abzentrifugiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die darauffolgende Fällung erfolgte durch die Zugabe von 3,75  $\mu$ l 4M LiCl und 100  $\mu$ l 100% EtOH für 10 Minuten auf -20 °C. Anschließend wurde die RNA abzentrifugiert (20 min, 13000 rpm, 4 °C), in 100  $\mu$ l 80% EtOH gewaschen und in 60  $\mu$ l Formamid/DEPC-H<sub>2</sub>O (1/1) gelöst. Die RNA, deren Qualität und Menge, wurde gelelektrophoretisch analysiert.

#### 4.9.3 Radioaktive Markierung von *gsc2* und *gsc* RNA durch *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von *antisense* und *sense* RNA-Sequenzen von einem TA bzw TOPO PCR Klonierungs-Vektor (Stratagene) durchgeführt. Ein 3'UTR Fragment von *gsc2* (580 bp) und *gsc* (643 bp) wurde zwischen die im Transkriptionsvektor enthaltenen Promotorsequenzen für zwei Phagen-RNA-Polymerasen (Sp6 und T7) kloniert. Durch Linearisierung der Transkriptionsplasmide wurde der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der DNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch konnten durch zwei Linearisierungsansätze von einem Transkriptionsvektor zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die *sense* oder *antisense* Transkription benutzt wurden.

Zur radioaktiven Markierung des Transkriptes wurde  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP als Nukleotid verwendet. In einem 20  $\mu$ l Transkriptionsansatz wurden 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l der entsprechenden DNA-Matrize in 1 x TSC-Puffer (40 mM Tris pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50  $\mu$ g/ml BSA) mit 20 mM DTT, 2 U RNAsin, 625  $\mu$ M rNTPs (ohne UTP), 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP und 30 U Phagenpolymerase (T7 bzw. Sp6) für 75 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 7,5  $\mu$ g tRNA und 3 U RNA-freier DNase-I wurde die Plasmid DNA für 15 min bei 37 °C unter verdaut. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, um die Proteine zu extrahieren. Das RNA-Transkript wurde zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide zweimal mit 2 M NH<sub>4</sub>Ac und 2,5 Volumina Ethanol gefällt. Nach der letzten Zentrifugation (10 min bei 10000 g) wurde das Pellet getrocknet und in 50  $\mu$ l 100 mM DTT aufgenommen. Davon wurde 1  $\mu$ l in 3 ml Szintillationslösung gemessen, 2  $\mu$ l wurden auf einem denaturierenden

Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die restliche Probe wurde in 2 M NH<sub>4</sub>Ac und 2,5 Volumina Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.9.4 *Pitx2A* und *Pitx2B* mRNA Synthese für *Xenopus* Injektionen

Die kodierenden Regionen von *Pitx2A* und *Pitx2B* wurden durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor CS2+ kloniert (Rupp et al., 1994). Die synthetische mit einer 7-Methyl-guanosinium-Kappe versehene mRNA wurde mit dem nach Angaben des Herstellers Ambion, von „mRNA message Kit“ hergestellt.

### **4.10 In situ Hybridisierung**

#### 4.10.1 In situ Hybridisierung im Ganzpräparat

In 100% Methanol aufbewahrte Embryonen wurden durch eine Methanol-PBT-(PBS+Tween)-Reihe ( je 5 min 75%, 50%, 25% MeOH/PBT und 2x je 5 min PBT) auf Eis rehydriert, mit Proteinase K (10 µg/µl PBT) für 10 Minuten angedaut, um die Intensität der Färbung zu erhöhen und wieder 2x je 5 Minuten in PBT aufbewahrt, um die Proteinase K abzuspülen. Anschließend wurden die Embryonen 4% Paraformaldehyd/PBT für 20 Minuten fixiert, wieder 2x je 5 Minuten in PBT gespült und dann je 5 Minuten in PBT/Hybridisierungsmix (1:1) und reinem Hybridisierungsmix bei RT aufbewahrt.

Der Hybridisierungsmix (50 ml) besteht aus folgenden Komponenten:

25 ml Formamide

7,5 ml NaCl-DEPC 5M

6,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

5 ml PE-DEPC 10x

0,5 ml BSA/DEPC 10%

5 ml SDS/DEPC 10%

50 µl Tween 20

0,5ml Hefe-RNA

PE (10x): 1,501 g PIPES (100mM), 0,186 g EDTA (10mM), 50 ml H<sub>2</sub>O, (pH=5)

Die anschließende Prähybridisierung erfolgte für eine Stunde bei 70°C in 900 µl Hybridisierungsmix. Nach ca. 2 Stunden wurde ca. 200 ng Sonde (markierte RNA) in 100 µl Hybridisierungsmix für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und diese 100 µl, inklusive der Sonde, zu den restlichen 900 µl, in denen über Nacht die Hybridisierung ablief, gegeben. Um die freie RNA herauszuwaschen, wurden die Embryonen je zweimal für 30 Minuten in 70°C heißem Hybridisierungsmix gewaschen und danach bei RT in TBST (TBE + 0,1% Tween) überführt ( 10 min Hybridisierungsmix/TBST (1:1), 2x 10 sek TBST, 15 min TBST). Zur darauffolgenden Blockier- und Antikörper-Reaktion wurden die Embryonen zuerst für 60 Minuten in TBST, das 2% Boehringer Blocking Reagenz enthielt, dann für 60 Minuten in TBST, das 2% Boehringer Blocking Reagenz und 20% Ziegenserum enthielt. Die Embryonen wurden bei 4°C, in TBST, das 2% Boehringer Blocking Reagenz, 20% Ziegenserum und AP-DIG-Antikörper (1:2000) enthielt, über Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden die freien Antikörper mit TBST herausgewaschen (10 sek TBST, 3x 60 min TBST)



und die Embryonen in BM-Purple überführt, wo die Farbreaktion im Dunkeln bis zum Eintritt einer zufriedenstellenden Färbung erfolgte, bis sie durch die Überführung der Embryonen in PBS gestoppt wurde. Die Embryonen wurden anschließend in Glyzerin bei 4°C oder in Methanol bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.10.2 Radioaktive In situ Hybridisierung an Gewebeschnitten

##### 4.10.2.1 Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Glasfärbegestellen

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10 % HCl / 70 % Ethanol, Wasser und 96% Ethanol gereinigt und 10 min bei 150°C getrocknet. Die Beschichtung erfolgte durch Eintauchen (10 sek) der Objektträger in eine 2 % TESP/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100 % Aceton und einmal Waschen in Wasser wurden die Objektträger über Nacht bei 42°C im Ofen getrocknet. Die Deckgläschen wurden in eine Silikon-Lösung getaucht und bei RT getrocknet. Dann wurden sie in 100 % Ethanol durch kurzes Eintauchen gewaschen und ebenfalls bei RT trocken gelassen. Die Deckgläschen wurden in einem Becherglas gesammelt und im Ofen bei 160 °C gebacken. Zur Beseitigung von Spuren von RNase wurden die Glaskästen und Glasfärbegestelle im Ofen bei 250 °C für vier Stunden gebacken.

##### 4.10.2.2 Isolierung und Fixieren von Embryos

Schwangere Mäuse wurden zur Isolation der Embryonen durch cervikale Dislokation getötet und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus mit den Implantationen wurde entnommen und in PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular. Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Implantationen durchtrennt. Mit zwei #3 Uhrmacherpinzetten wurde das Uterusgewebe vorsichtig entfernt. Die Föten wurden von sämtlichen embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) befreit, sowie die Plazenten an der Nabelschnur entfernt. Die Embryos wurden 2 mal in PBS 5 min gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd / 1 x PBS\* (PBS\* = PBS, Ca- und Mg-frei) fixiert. Anschließend wurden die Embryos drei mal 5 min in PBS\* gewaschen und schrittweise (25, 50, 75, 100, 100 % Methanol in PBS\*) in Methanol überführt. Die fixierten, dehydrierten Embryos wurden bis zur Einbettung bei -20 °C aufbewahrt.

##### 4.10.2.3 . Einbetten von Embryos und Anfertigen von histologischen Schnitten

Die fixierten Maus-Embryonen wurden mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) in folgenden Schritten mit Gewebewachs perfundiert:

Ethanol	4 x 1 h
Aceton	2 x 1 h
Xylol	1 x 2 h
Xylol / Histowax (1:1) bei 59 °C	1 x 3 h
Histowax bei 59 °C	1 x 3 h

Nach Ablauf dieser Prozedur wurden die Embryos aus den Kassetten herausgenommen und in auf 59 °C vorgewärmte Einbettformen gelegt. Die Einbettformen wurden mit flüssigem Wachs aufgefüllt und eine Haltekassette aufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsblöcke aus den Einbettformen genommen. Das Loslösen des Wachsblockes aus der Einbettform wurde, nachdem das Wachs auf Raumtemperatur abgekühlt war, durch Abschrecken auf Eis unterstützt. Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Reichert und Jung, Nußloch) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden Schnitte von 7 µm angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42 °C gespreitet und auf die beschichteten Objektträger transferiert.

#### 4.10.2.4 . Vorbehandlung der Gewebeschnitte (Prähybridisierung)

Bei dieser Behandlung wurden die Schnitte für die Hybridisierung mit der RNA-Probe vorbereitet, so daß die aufgetragene Probe in das Gewebe eindringen kann, unspezifische Bindungen vermieden werden und das RNA:RNA-Hybrid nicht aus dem Gewebe diffundieren kann. Die Objektträger mit Gewebeschnitten, die zur Hybridisierung vorgesehen waren, wurden in ein Glasfärbegestell transferiert. Die Prähybridisierung der Schnitte erfolgte durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen. Um die Schnitte zu entwachsen wurden die Färbegestelle je 2x 10 min in Xylol inkubiert. Durch die folgende absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert (100 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol, je 2 min). Nach zwei Waschstufen in 1 x PBS und 0.83 % NaCl (je 5 min) wurden die Schnitte 20 min in 4 %-igem Paraformaldehyd / 1x PBS fixiert. Nach zweimal Waschen in 1x PBS (je 5 min) erfolgte ein partieller Verdau der Gewebe mit Proteinase K (10 mg / ml, Endkonzentration: 500 µl / 250 ml) in 20 mM Tris pH 4,7, 1 mM EDTA für 10 min. Nach nochmaligem Waschen für 5 min in 1x PBS erfolgte eine weitere Fixierung in 4 % Paraformaldehyd / 1 x PBS für 5 min und nochmaliges Waschen in 1 x PBS (5 min). Die darauffolgende 10 minütige Inkubation in einer Triethanolamin/Essigsäureanhydridlösung (3,125 ml: 0,625 ml / 250 ml Wasser) diente zur Neutralisierung positiver Ladungen und damit zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Nach jeweils 5 min Waschen in 1x PBS und 0,83 % NaCl wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und danach bei RT getrocknet.

#### 4.10.2.5 Hybridisierungsreaktion

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktiv markierte RNA Probe (siehe Methoden 3.6.4.) wurde 10 min bei 10000 g abzentrifugiert und einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Dabei wurde die spezifische Aktivität der RNA-DTT-Lösung auf  $1,5 \times 10^6$  cpm/µl eingestellt. Nach Zugabe von 9/10 Volumina Hybridisierungspuffer betrug die Aktivität  $1,5 \times 10^5$  cpm/µl. Um die Probe vollständig zu denaturieren, wurde die Hybridisierungslösung vor dem Auftragen auf die Gewebeschnitte 3 min bei 90 °C inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Vierzig µl Hybridisierungslösung wurden auf einen vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig verteilt und mit einem silikonisierten Deckgläschen abgedeckt. Zur Inkubation der Objektträger wurde eine

Styrolwanne mit Benchcoat und drei Lagen 3MM Whatman-Filterpapier ausgelegt. Das Filterpapier wurde mit 2 x SSC, 50 % Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in diese Hybridisierungswanne gelegt, diese mit einem Deckel abgedichtet und über Nacht bei 58 °C im Wasserbad inkubiert.

#### 4.10.2.6 Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus der feuchten Kammer genommen und wieder in Glasfärbegestelle gestellt. Das Waschen der Schnitte erfolgt unter stringenten und <sup>35</sup>S-stabilisierenden Bedingungen. Dieses wird erreicht durch die hohe Formamidkonzentration (50 %), die den Schmelzpunkt der RNA:RNA-Duplexe herabsetzt, durch die relativ hohe Temperatur von 65 °C und durch die Anwesenheit von β-Mercaptoethanol, welches vor Oxidation des Schwefels schützt.

Die Färbegestelle mit den Objektträgern wurden in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen eingetaucht:

- 2 x SSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C      15 min
- 2 x SSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 65°C      30 min
- 2 x SSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C      2,5 h
- NTE (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA) bei 37°C      15 min
- NTE mit RNase A (Endkonzentration: 20 µg/ml) bei 37°C      15 min
- NTE bei 37°C      15 min
- 2 x SSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 65°C      30 min
- 2 x SSC bei RT      15 min
- 0.1 x SSC bei RT      15 min

Eine Entwässerung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

- 30 % Ethanol, 0.25 M NH<sub>4</sub>OAc      2 min
- 50 % Ethanol, 0.25 M NH<sub>4</sub>OAc      2 min
- 70 % Ethanol, 0.25 M NH<sub>4</sub>OAc      2 min
- 80 % Ethanol      2 min
- 90 % Ethanol      2 min
- 95 % Ethanol      2 min
- 100 % Ethanol      2 min

Anschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet, mit einem Klebeband in einer Expositionskassette befestigt, und über Nacht ein Röntgenfilm (Hyper<sup>TM</sup>-MP) aufgelegt.

#### 4.10.2.7 Beschichten der Objektträger mit einer Photoemulsion

Die LM-1 Photoemulsion wurde in der Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 43 °C geschmolzen und mit Wasser 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde dann luftblasenfrei in ein Gefäß gefüllt, das speziell zur Beschichtung der Objektträger angefertigt wurde. Diese Vorrichtung wurde in das Wasserbad (43°C) gestellt, um die Photoemulsion flüssig zu halten. Die Objektträger wurden nacheinander durch Eintauchen in die Photoemulsion beschichtet. Nach der zweimaligen Beschichtung sollte die Photoemulsion so gleichmäßig wie möglich

auf den Objektträgern verteilt sein. Die beschichteten Objektträger wurden im Dunkeln 2 h getrocknet. Danach wurden sie in Polyoxymethylen Färbegestelle gestellt, in die entsprechenden Färbetröge eingepackt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger wurden mehrere Tage (meist 13) bei 4 °C exponiert.

#### 4.10.2.8. Entwickeln, Färben und Auswerten der Schnitte

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Objektträger in folgenden Lösungen entwickelt:

- |                              |            |
|------------------------------|------------|
| • 16 % Kodak D-19 Entwickler | 3 min      |
| • 1 % Eisessig               | 1 min      |
| • 30 % Natriumthiosulfat     | 5 min      |
| • Wasser                     | 2 x 10 min |
| • Wasser                     | 1 x 30 min |

Die Schnitte wurden getrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt (Mayer's Hämatoxylin 4 min, bewegtes Leitungswasser 15 min, ddH<sub>2</sub>O 2 min, Eosin in 1 % Essigsäure 1 min, 70 % Ethanol 15 sek, 100 % Ethanol 15 sek). Die über Nacht getrockneten Objektträger wurden mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt. Die Präparate wurden anschließend im Zeiss Axioskop-Mikroskop im Hell- und Dunkelfeld analysiert und photographiert. Für die Analyse von kleinen Vergrößerungen wurde das Binokular Wild M 10 (Leica) verwendet. Zur Photographie wurden Farbfilm für Kunstlicht (Kodak Extrachrome 160 oder 320T und Fuji 64T oder 160T).

### **4.11 *Xenopus laevis*; Embryologische Methoden**

#### 4.11.1 *In vitro* Fertilisation und Embryo Kultivierung

Die hormonelle Stimulation *Xenopus* Weibchen zur Eiablage erfolgte durch die Injektion von 400 units menschlichen Gonadotropins (Serva) in den dorsalen Lymphsack. Etwa 15 h nach der Injektion erfolgte die Eiablage. Die Eier wurden für die *in vitro* Befruchtung sofort mit 0,5 ml zerkleinertem Testis in 1 x MBS-H Puffer vermischt. Die Spermien sind unter diesen Hochsalz-Bedingungen immobil. Nach 5 Minuten wurde die Befruchtung in 1/10 MBS-H eingeleitet. Nach ca. 20 Minuten der Fertilisation wurde den Eiern die Gallerthülle mittels 7 minütiger Inkubation mit 2% Cystein, pH 8.0 entfernt. Das Cystein wurde durch mehrmaliges Waschen mit 1/10 MBS-H entfernt. Embryonen, die für die Injektion vorgesehen waren wurden in 1xMBS-H aufbewahrt.

#### 4.11.2 Explantation und Kultivierung animaler Kappen

Embryonen wurden zum Stadium 8 manuell von der Vitellinmembran befreit. Die Entfernung der animalen Kappenregion erfolgte in mit 1% Agar beschichtete Petrischalen in 1x MBS-H. Die Kappen wurden vorsichtig in frische Agar-beschichtete Petrischalen in 0,5x MBS-H transferiert. In diesen Puffer wurde bei einigen Experimenten menschliches rekombinantes *Aktivin A* (6-8

Units / ml) hinzugefügt. Die Cycloheximid Inkubation (10 µg / ml) erfolgte 1h vor der Activin Zugabe um jegliche Proteintranslation auszuschließen. Im Stadium 10.5 erfolgte entweder RNA Extraktion oder die Kappen wurden in 0.1x MBS-H überführt und bis zum Stadium kultiviert. Die Bestimmung der Entwicklungsstadien erfolgte anhand unbehandelter Kontrollembryonen.

#### 4.11.3 mRNA und DNA-Vektor Injektionen

Im 4-8 Zellstadium wurden Embryonen in Agar-beschichtete Petrischalen mit 1x MBS-H transferiert. Die synthetisch hergestellten mRNAs bzw Expressionsvektoren wurden in Gordons Puffer verdünnt und mit Glaskapillaren (5-10 µm Spitzendurchmesser) in die Embryonen injiziert. Die Eichung der Kapillaren erfolgte über die Bestimmung der Tropfengröße nach Injektionen in Fluorinert auf einer Mikrometerskala. Das Volumen der injizierten Tropfen betrug demnach ca. 5 nl. Die injizierten Embryonen wurden für 1-2 h 1x MBS-H kultiviert und dann in 1/10 MBS-H überführt.

#### 4.12 Material

β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, München
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Appligene, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio Rad, München
ATP	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienschalen (9 cm)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
DNase I (RNase frei)	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GbmH, Bensheim
Eosin B	Sigma, München
Entellan neu	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidumbromid	Sigma, München
Formamid	Sigma, München
Gene Screen Plus Nylon-Membranen	Du Pont, Boston
Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Glycerin	BRL, Inc., Neu-Isenburg
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München
Heringssperma-DNA Typ III	Sigma, München
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
LM-1 Emulsion für die Autoradiographie	Boehringer, Mannheim
Mayer's Hämatoxylin	Sigma, München

Lysozym	Boehringer, Mannheim
Natriumthiosulfat	Sigma, München
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Bio Rad, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
	Birsner und Grob, Dennylingen
	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sherwood, Athy
Paraplast Plus Histowax	Roth, Karlsruhe
Phenol	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbegestelle	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbetröge	Sigma, München
Proteinase K	Quiagen, Düsseldorf
Quiagen-tip-500-Säulen	Amersham, Braunschweig
RediPrime Random Primer Labelling	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Promega, Heidelberg
	USB, Cleveland
	Pharmacia, Freiburg
	Serva, Heidelberg
	Boehringer, Mannheim
	Promega, Heidelberg
	Amersham, Braunschweig
	Roth, Karlsruhe
	Pharmacia, Freiburg
	Serva, Heidelberg
	Sigma, München
	Costar, Bodenheim
	Promega, Heidelberg
	Boehringer, Mannheim
	Boehringer, Mannheim
	Amersham, Braunschweig
	Sigma, München
	Sigma, München
	AGS, Heidelberg
	Bio Rad, München
	Bender und Hobein, Karlsruhe
	Greiner, Nürtingen
	Amersham, Braunschweig
	Amersham, Braunschweig
Rinderserumalbumin (BSA)	
RNase A	
RNASin	
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Sephadex G 50	
Silikonlösung	
Spermidin	
Spin-X Röhrchen	
T <sub>4</sub> -Ligase	
T3-DNA-Polymerase	
T7-DNA-Polymerase	
Taq-Polymerase	
Triethanolamin	
Tris-HCl, Tris-Base	
Tristar	
Triton X-100	
Whatmann 3MM-Papier	
Zellkulturschalen	
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-UTP (370 MBq/ml)	
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP (740 MBq/ml)	

## 5. Literatur

- Acampora, Mazan, S. Lallemand, Y., Avantaggio, V., Maury M., Simone, M. und Brulet, A. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *otx2* <sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**, 3279-3290.
- Afzelius, B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976, **193**: 317-319.
- Amendt, B.A., Sutherland, L.B., Semina, E.V. and Russo, A.F. (1998) The molecular Basis of Rieger Syndrom. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20066-20072.
- Andeazzoli, M., Pannese, M. und Boncinelli, E. (1997). Activating and repressing signals in head development: the role of *Xotx1* and *Xotx2*. *Development* **124**, 1733-1743.
- Ang, S. L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L. und Rossant, J. (1995). A targeted mouse *otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**, 242-252.
- Arakawa, H., Nakamura, T., Zhadanov, A.B., Fidanza, V., Yano, T., Bullrich, F., Shimizu, M., Blechman, J., Mazo, A., Canaani, E. and Croce, C.M. (1998) Identification and characterisation of the Arp1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 4573-4578.
- Awgulewitsch, A., and Jacobs, D. (1992). Deformed autoregulatory element from Drosophila functions in a conserved manner in transgenic mice. *Nature* **358**, 341-4.
- Blitz, I.L. und Cho, K.W.Y., 1995. Anterior neuroectoderm is progressively induced during Gastrulation: The role of the *Xenopus* homeobox gene *orthodenticle*. *Development* **120**, 993-1004.
- Blum, M., De Robertis, E. M., Kojis, T., Heinzmann, C., Klisak, I., Geissert, D., and Sparkes, R. S. (1994). Molecular cloning of the human homeobox gene goosecoid (GSC) and mapping of the gene to human chromosome 14q32.1. *Genomics* **21**, 388-93.
- Blum, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D., and De Robertis, E. M. (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* **69**, 1097-1106.
- Blumberg, B., Wright, C. V., De Robertis, E. M., and Cho, K. W. (1991). Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science* **253**, 194-6.
- Boettger, T., Wittler, L. and Kessel, M. FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr. Biol.* 1976, **11**: 277-280.
- Boncinelli, E., Somma, R., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Faiella, A., and Simeone, A. (1988). Organization of human homeobox genes. *Hum Reprod* **3**, 880-6.
- Bowers, P.N., Bruckner, M. and Yost, H.J. Laterality disturbances. *Prog. Pediat. Cardiol.* 1996, **6**: 53-62.
- Brookes, M. and Zietman, A. (1998) *Clinical Embryology*. CRC Press, London, UK.
- Brown, N.A. and Wolpert, L. The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* 1990, **109**: 1-9.
- Burn, J. Disturbance of morphological laterality in humans. *CIBA Found. Symp.* 1991, **161**: 282-299.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, K.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R. and Blum, M. (1999) The homeobox gene *Pitx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*, **126**, 1125-1234.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. und Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic Hedgehog gene function. *Nature* **382**, 595-601.
- Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. (1991) Molecular Nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell*, **67**, 1111-1120.
- Cleaver, O.B., Patterson, K.D. and Krieg, P.A. (1996) Overexpression of the tinman-related genes *Xnrx2.5* and *Xnrx-2.3* in *Xenopus* embryos results in myocardial hyperplasia. *Development*, **122**, 3549-3556.
- Collignon, J., Varlet, I. and Robertson, E.J. (1996) Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature*, **381**, 155-158.

- Danilov, V., Blum, M., Schweickert, A., Campione, M., and Steinbeisser, H. (1998). Negative autoregulation of the organizer-specific homeobox gene goosecoid. *J Biol Chem* **273**, 627-35.
- Danos, M.C. and Yost, H.J. (1996) Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Biol.*, **177**, 96-103.
- Dareste, B. Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou essais de tératogénie expérimentale. 1877, Reinwald, Paris.
- De Robertis, E.M., Blum, M., Niehrs, C. and Steinbeisser, H. (1992) goosecoid and the Organizer. *Development* (Suppl.), 167-171.
- Ding, X., Hausen, P. and Steinbeisser, H. (1998) Pre-MBT patterning of early gene regulation in *Xenopus*: the role of the cortical rotation and mesoderm induction. *Mech. Dev.*, **70**, 15-24.
- Drouin, J., Lamolet, B., Lamonerie, T., Lanctot, C., Tremblay, J.J. (1998) The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol. Cell. Endocrin.*, **140**, 31-36.
- Enbom, G. (1938) Der Repositionsmechanismus des physiologischen Nabelbruchs bei Säugetieren und beim Menschen. *Morph. Jb.*, **82**, 271-292.
- Enbom, G. (1939) The early looping of the alimentary canal in the mammalian and human foetus and the mechanisms assumed to be active in this process. *Anat. Rec.*, **75**, 409-414.
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., and Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* **63**, 39-50.
- Feijen, A., Goumans, M. J. und van den Eijnden-vanRaaij, A. C. M. (1994). Expression of activin subunits, activin receptors und follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental function for different activins. *Development* **120**, 3621-3637.
- Feldman, B. Gates, M.A., Egan, E.S., Dougan, S.T., Rennebeck, G., Sirotkin, H.I., Schier, A.F. and Talbot, W.S. (1998) Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature*, **395**, 181-185.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Stufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221-32.
- Gage, P.J. and Camper, S.A. (1997) Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Gen.*, **6**, 457-464.
- Gammill, L. S. und Sive, H. (1997). Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during cement gland formation. *Development* **124**, 471-481.
- Gawantka, V., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene *Xvent-1*. *Embo J* **14**, 6268-79.
- Gehring, W. J, Affolter, M. und Bürglin, T. (1994) Homeodomain Proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 487-526.
- Gerhart, J. und Kirschner, M. (1997). Cells, Embryos And Evolution. *Blackwell Science Inc.*, 349-356.
- Gilbert, S. (1987). In friendly disagreement: Wilson, Morgan, and the embryological origins of the gene theory. *am. Zool.* **27**, 797-806.
- Gilbert, S. (1997). *Developmental Biology*. fifth edition, Chapter 14.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S. and Schier, A.F. (1999) The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell*, **97**, 121-132.
- Hamburger, V. The heritage of experimental embryology. Hans Spemann and the organizer. Oxford University Press, Oxford, U.K., 1988.
- Hanes, S. D. und Brent, R. (1991). a genetic model for interaction of the homeo domain recognition helix with DNA. *Science* **251**, 426-430.
- Hanes, S. D., and Brent, R. (1991). A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. *Science* **251**, 426-30.
- Harvey, R.P. (1998) Links in the left/right axial pathway. *Cell*, **94**, 273-276.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. und Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283-295.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., and Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283-95.



- Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R. und Lehrach, H. (1990). Cloning of the T Gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**: 617-622.
- Hummel, K.P. and Chapman, D.B. Visceral inversion and associated anomalies in the mouse. *J. Hered.* 1959, **50**: 9-13.
- Hyatt, B.A. and Yost, H.J. (1998) The left-right coordinator: the role of Vg1 in organizing left-right axis formation. *Cell*, **93**, 37-46.
- Itasaki, N., Nakamura, H. and Yasuda, M. Changes in the arrangement of actin bundles during heart looping in the chick embryo. *Anat. Embryol.* 1989, **180**: 413-420.
- Itasaki, N., Nakamura, H., Sumida, H. and Yasuda, M. Actin bundles on the right side in the caudal part of the heart tube play a role in dextro-looping in the embryonic chick heart. *Anat. Embryol.* 1991, **183**: 29-39.
- Izpisua-Belmonte, J. C., De Robertis, E. M., Storey, K. G., and Stern, C. D. (1993). The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell* **74**, 645-59.
- Izraeli, S., Lowe, L.A., Bertness, V.L., Good, D.J., Dorward, D.W., Kirsch, I.R. and Kuehn, M.R. The SIL gene is required for mouse embryonic axial development and left-right specification. *Nature* 1999, **399**: 691-694.
- Jones, C.M., Kuehn, M.R., Hogan, B.L.M., Smith, J.C. and Wright, C.V.E. (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development*, **121**, 3651-3662.
- Jorgenson, R.J., Levin, L.S., Cross, H.E., Yoder, F. and Kelly, T.E. (1978) The Rieger syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **2**, 307-318.
- Joseph, E. M. und Melton, D. A. (1997). Xnr4: A Xenopus nodal-related gene expressed in the Spemann organizer. *Dev. Biol.* **184**, 367-372.
- Kablar, B., Vignali, R., Menotti, L., Pannese, M., Andreazzoli, M., Polo, C., Giribaldi, M. G., Boncinelli, E. und Barsacchi, G. (1996). Xotx genes in the developing brain of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **55**, 145-158.
- Kaufman, M.H. The atlas of mouse development. Academic press, London, U.K., 1992.
- Kawamura, K. und Kikuyama, S. (1998). Morphogenesis of the hypothalamus and hypophysis: their association, dissociation and reassociation before and after „Rathke“. *Arch. Histol. Cytol.* **61**, 189-198.
- King, T., Beddington, R.S.P. and Brown, N.A. The role of the Brachyury gene in heart development and left-right specification in the mouse. *Mech. Dev.* 1998, **79**: 29-37.
- Kitamura, K., Miura, H., Yanazawa, M., Miyashita, T. and Kato, K. (1997) Expression pattern of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nk2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mech. Dev.*, **67**, 83-96.
- Klein, W.H. and Li, X. (1999) Function and Evolution of Otx Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 229-233.
- Knecht, A. K. und Harland, R. M. (1997). Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. *Development* **124**, 2477-2488.
- König, G. and Hausen, P. Planar polarity in the ciliated epidermis of *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 1993, **160**: 355-368.
- Kosaki, K. and Casey, B. Genetics of human left-right axis malformations. *Sem. Cell Dev. Biol.* 1998, **9**: 89-99.
- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. und Harland, R. M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-718.
- Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Trmblay, M. L. und Drouin, J. (1999). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* **126**, 1805-1810.
- Lanctot, C., Lamolet, B. and Drouin, J. (1997) The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development*, **124**, 2807-2817.
- Larsen, W.J. (1997) *Human Embryology*. Churchill Livingstone, New York, USA.
- Leana-Cox, J., Pangkanon, S., Eanet, K. R., Curtin, M. S. und Wulfsberg, E. A. (1996). Familial DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome with deletions of chromosome area 22q11.2: Report of five Families with a review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* **65**: 309-316.
- Lemaire, L. und Kessel, M. (1997). Gastrulation and homeobox genes in chick embryos. *Mech. Dev.* **67**, 3-16.

- Lemaire, L., Roeser, T., Izpisua-Belmonte, J. C., and Kessel, M. (1997). Segregating expression domains of two gooseoid genes during the transition from gastrulation to neurulation in chick embryos. *Development* **124**, 1443-52.
- Levin, M., and Mercola, M. (1998). Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry. *Dev Biol* **203**, 90-105.
- Levin, M., Johnson, R., Stern, C., Kuehn, M., and Tabin, C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 1995, **82**: 803-814.
- Levin, M., Roberts, D. J., Holmes, L. B. and Tabin, C. Laterality defects in conjoined twins. *Nature* 1996, **384**, 321.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. und Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* **124**, 603-615.
- Logan, M. und Tabin, C. J. (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-1739.
- Logan, M., Pagan-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L. and Tabin, C.J. (1998) The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell*, **94**, 307-317.
- Lohr, J.L., Danos, M.C., Groth, T.W., and Yost, H.J. (1998) Maintenance of asymmetric nodal expression in *Xenopus laevis*. *Dev. Genet.*, **23**, 194-202.
- Lohr, J.L., Danos, M.C. and Yost, H.J. (1997) Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development*, **124**, 1465-1472.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.W., Potter, S.S., Overbeek, P. and Kuehn, M.R. (1996) Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature*, **381**, 158-161.
- Lustig, K.D., Kroll, K., Sun, E., Ramos, R., Elmendorf, H. and Kirschner, M.W. (1996) A *Xenopus* nodal-related gene that acts in synergy with noggin to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development*, **122**, 3275-3282.
- Malicki, J., Cianetti, L. C., Peschle, C., and McGinnis, W. (1992). A human HOX4B regulatory element provides head-specific expression in *Drosophila* embryos. *Nature* **358**, 345-7.
- Mangold, O. (1933). Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. *Naturwissenschaften* **21**, 761-766.
- McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- Meno, C., Saijoh, Y., Fuji, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H. (1996) Left-right asymmetric expression of the TGF $\beta$ -family member lefty in mouse embryos. *Nature*, **381**, 151-155.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Oishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998) lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*, **94**, 287-297.
- Meyer, R. Die ursächlichen Beziehungen zwischen dem Situs viscerum und Situs cordis. *Arch. f. Entw.-Mech.* 1913, **37**: 85-107.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P.A., Hamada, H. and Yokoyama, T. Cloning of inv, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 1998, **395**: 177-181.
- Moore, K.L. and Persaud, T.V.N. (1993) *The developing human. Clinically oriented embryology*. W.B. Saunders editors, Philadelphia.
- Morgan, D., Turnpenny, L., Goodship, J., Dai, W., Majumder, K., Matthews, L., Gardner, A., Schuster, G., Vien, L., Harrison, W., Elder, F.F.B., Penman-Splitt, M., Overbeek, P. and Strachan, T. Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the inv mouse. *Nature Genet.* 1998, **20**: 149-156.
- Mucchielli, M-I., Martinez, S., Pattyn, A., Godiris, C. and Brunet, J-F. (1996) Otlx2, an otx-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol. Cell. Neurosc.*, **8**, 252-271.
- Nascone, N. and Mercola, M. The compulsion of chirality: towards an understanding of left-right asymmetry. *Genes Dev.* 1998, **12**: 763-769.
- Nascone, N. and Mercola, M. (1997) Organizer induction determines left-right asymmetry in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, **189**, 68-78.

- Niehrs, C., Keller, R., Cho, K. W., and De Robertis, E. M. (1993). The homeobox gene goosecoid controls cell migration in *Xenopus* embryos. *Cell* **72**, 491-503.
- Nieuwkoop, P. D. (1969). The formation of the mesoderm in urodele amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* **162**, 341-373.
- Nieuwkoop, P. D. (1973). The „organisation center“ of amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenic action. *Adv. Morphogen.* **10**, 1-39.
- Nieuwkoop, P. D. (1977). Origin and establishment of embryonic axes in amphibian development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **11**, 115-132.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland publishing company.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido and M., Hirokawa, N. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 1998, **95**: 829-837.
- Oh, S. P. and Li, E. (1997) The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev.*, **11**, 1812-1826.
- Onichtchouk, D., Glinka, A., and Niehrs, C. (1998). Requirement for Xvent-1 and Xvent-2 gene function in dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm. *Development* **125**, 1447-56.
- Pagan-Westphal, S. M. and Tabin, C. J. The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 1998, **93**: 25-35.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G. und Boncinelli, E. (1995). The *Xenopus* homolog of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* **121**, 707-720.
- Pera, E. M. und Kessel, M. (1997). Patterning of the chick forebrain by the prechordal plate. *Development* **124**, 4153-4162.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-98.
- Piedra, M. E., Icardo, J. M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J. C. and Ros, M. A. (1998) Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell*, **94**, 319-324.
- Pressler, K. Beobachtungen und Versuche über den normalen und inversen Situs viscerum und cordis bei Anurenlarven. *Arch. f. Entw.-Mech.* 1911, **32**.
- Price, R. L., Chintanowonges, C., Shiraishi, I., Borg, T. K. and Terracio, L. Local and regional variations in myofibrillar patterns in looping rat hearts. *Anat. Rec.* 1996, **245**: 83-93.
- Ramsdell, A. F. and Yost, H. J. (1998) Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet.*, **14**, 459-65.
- Rebagliati, M. R., Weeks, D. L., Harvey, R. P. and Melton, D. A. Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* 1985, **42**: 769-777.
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P. and Dawid, I. B. (1998) Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.*, **199**, 261-272.
- Rivera-Perez, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., and Behringer, R. R. (1995). Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* **121**, 3005-12.
- Rupp, R. A. W., Snider, L. and Weintraub, H. (1994) *Xenopus* embryos regulate the nuclear organization of XMyoD. *Genes Dev.*, **8**, 1311-1323.
- Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D. P., Robertson, E. J., Evans, R. M., Rosenfeld, M. R. and Izpisua-Belmonte, J. C. (1998) Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature*, **394**, 545-551.
- Sampath, K., Cheng, A. M. S., Frisch, A. and Wright, C. V. E. (1997) Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *Development*, **124**, 3293-3302.
- Sasai, Y. und De Robertis, E. M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* **182**, 5-20.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. und De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and BMP-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* **376**, 333-336.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geisler, H., Gont, L. K. und De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, **79**, 779-790.

- Schaart, G., Viebahn, C., Langmann, W. and Ramaekers, F.C.S. Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos. *Development* 1989, **107**: 585-596.
- Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K. W., De Robertis, E. M., and Nusslein-Volhard, C. (1994). Expression of zebrafish gooseoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development* **120**, 843-52.
- Semina, E. V., Ferrel, Minz-Hittner, H. A., Bitoun, P., Alward, W. L. M., Reiter, R. S., Funkhauser C., Daak-Hirsch, S. und Murray, J. C. (1998). A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat. Genet.* **19**, 167-170.
- Semina, E.V., Reiter, R., Leysens, N.J., Alward, W.L.M., Small, K.W., Datson, N.A, Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B.U., Carey, J.C. and Murray, J.C. (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* , **14**, 392-399.
- Semina, E.V., Reiter, R.S. and Murray, J.C. (1998) A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 415- 422.
- Sive, H. und Bradley, L. (1996). A sticky problem: The *Xenopus* cement gland as a paradigm for anterior-posterior patterning. *Dev. Dyn.* **205**, 265-280.
- Smibert, C. A., Wilson, J. E., Kerr, K., and Macdonald, P. M. (1996). smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10**, 2600-9.
- Smidt M., van Schaick H. S. A., Lanctot, C., Trembley J. J., Cox, J. J., van der Kleij, A. A. M., Wolterink, G., Drouin, J. und Burbach, P.H. (1997). a homeodomain gene PTX3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13305-13310.
- Smith, S. T. und Jaynes, J. B. (1996). A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, NK1-, NK2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* **122**, 3141-3150.
- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S. J., und Harland, R. M. (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the organiser in *Xenopus* embryos. *Cell* **82**, 37-46.
- Smith, W. und Harland, R. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-840.
- Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B.A., Weigel, D. and Herrmann, B.G. (1991) Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell*, **67**, 79-87.
- Spemann, H. Über eine neue Methode der embryonalen Transplantation. *Verh. d. D. zool. Ges.*, 1906a, 195-202.
- Spemann, H. Über experimentell erzeugte Doppelbildungen mit cyclopischem Defekt. *Zool. Jahrb.* 1904, **Suppl. VII**: 429-470.
- Spemann, H. and Falkenberg, H. Über asymmetrische Entwicklung und Situs inversus viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen. *Arch. f. Entw.-Mech.* 1919, **45**: 371-423.
- Spemann, H. und Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech.* **100**, 599-638.
- Spemann, H.. Über embryonale Transplantation. *Verh. d. Gesellsch. deutscher Naturforscher und Ärzte*, 1906b, 189-201.
- St. Amand, T.R., Ra, J., Zhang, Y., Hu, Y., Baber, S.I. and Qiu, M. Cloning and expression pattern of chicken Pitx2: a new component in the SHH signaling pathway controlling embryonic heart looping. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, **247**: 100-105.
- Stachel, S. E., Grunwald, D. J., and Myers, P. Z. (1993). Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* **117**, 1261-74.
- Steinbeisser, H., De Robertis, E. M., Ku, M., Kessler, D. S. und Melton, D. A. (1993). *Xenopus* axis formation: induction of gooseoid by injected Xwnt-8 and activin mRNA. *Development* **118**, 499-507.
- Steinbeisser, H., Fainsod, A., Niehrs, C., Sasai, Y. und De Robertis, E. M. (1995). The role of gsc and BMP-4 in dorsal-ventral patterning of the marginal zone in *Xenopus*: a loss-of-function study using antisense RNA. *EMBO J.* **14**, 5230-5243.
- Sulik, K., Dehart, D.B., Iangaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K. and Schoenwolf, G.C. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dyn.* 1994, **201**: 260-278.

- Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S. and Brueckner, M. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* 1997, **389**: 963-966.
- Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleibermann, A. S., Izpisua-Belmonte, J. C. und Rosenfeld, M. G. (1999). Role of Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes & Dev.* **13**, 484-495.
- Szeto, D. P., Ryan, A.K., O'Connell, S. M. und Rosenfeld, M. G. (1996). P-OTX: a PIT-1 interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7706-7710.
- ten Berge, D., Brouwer, A., Bahi, S. E., Guenet, J-L., Robert, B. und Meijlink, F. (1998). Mouse *Alx3*: An *aristaless*-like homeobox gene expressed during embryogenesis in ectomesenchyme und lateral plate mesoderm. *Dev. Biol.* **199**, 11-25.
- Thomsen, G.H and Melton, D.A. Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in Xenopus. *Cell* 1993, **74**: 433-441.
- Tremblay, J.J, Lanctot, C. and Drouin, J. (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1) acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol. Endocrinol.* **12**, 428-441.
- Tsuda, T., Philp, N., Zile, J.K. and Linask, K.K. Left-right asymmetric location of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev. Biol.* 1996, **173**: 39-50.
- Vogan, K.J. and Tabin, C.J. A new spin on handed asymmetry. *Nature* 1998, **397**: 295-298.
- Vogt, W. (1929). Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Viralfärbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* **120**, 384-706.
- Vorbrüggen, G., Constien, R., Zilian, O., Wimmer, E.A., Dowe, G., Taubert, H., Noll, M. and Jäckle, H. (1997) Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in Drosophila. *Mech. Dev.*, **68**, 139-147.
- Warynski, S. and Fol, H. Recherches expérimentales sur la cause de quelques monstruosités simples et de divers processus embryogéniques. In Recueil Zoologique Suisse, H. Fol, ed. H. Georg, Genève-Bale, pp. 1-25, 1884.
- Whitman, M. (1998) Smads and early developmental signaling by the TGF- $\beta$  superfamily. *Genes. Dev.*, **12**, 2445-2462.
- Wilhelmi, H. Experimentelle Untersuchungen über Situs inversus viscerum. *Arch. f. Entw.-Mech.* 1921, **48**: 517-532.
- Williams, R. W. (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* **20**, 280-2.
- Wolberger, C., Vershon, A. K., Liu, B., Johnson, A. D., and Pabo, C. O. (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**, 517-28.
- Yamada, G., Mansouri, A., Torres, M., Stuart, E. T., Blum, M., Schultz, M., De Robertis, E. M., and Gruss, P. (1995). Targeted mutation of the murine goosecoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* **121**, 2917-22.
- Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F.B. and Overbeek, P.A. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* 1993, **260**: 679-682.
- Yoshioka, H., Meno, C., Koshida, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimura, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E., Murray, J.C., Hamada, H. and Noji, S. (1998) Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*, **94**, 299-305.
- Yost, H.J. Establishing cardiac left-right asymmetry. In: *Heart Development* (R.P. Harvey, N. Rosenthal, eds.), Academic Press, London, U.K., 1999, pp 373-389.
- Zhu, C. C., Yamada, G., Nakamura, S., Terashi, T., Schweickert, A., and Blum, M. (1998b). Malformation of trachea and pelvic region in goosecoid mutant mice. *Dev Dyn* **211**, 374-81.

## 6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNase	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GBq	Gigabequerel
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
°C	Grad Celsius
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffer saline
PBS*	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
p.c.	post coitum
PCR	Polymerasenkettenreaktion
pH	potentium hydrogenium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR

SDS  
sek  
Tab.  
TBE  
TE  
TEMED  
Tris  
u.  
U  
mg  
ml  
UTP  
V  
vgl.  
Vol.  
W  
z.T.

Natriumdodecylsulfat  
Sekunden  
Tabelle  
Tris-Borat-EDTA-Puffer  
Tris-Acetat-EDTA-Puffer  
Tetramethylethyldiamin  
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  
und  
Enzymeinheiten (Units)  
Mikrogramm  
Mikroliter  
Uridintriphosphat  
Volt  
vergleiche  
Volumen  
Watt  
zum Teil