

„Die funktionelle Analyse des T-box
Transkriptionsfaktors Tbx18
in der Somitogenese der Maus“

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl. Biol. Markus Bussen
geboren am 22.9.1974 in Emsdetten

2005

Referent: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kispert

Tag der Promotion: 8 Juni 2005

Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert für die engagierte Betreuung bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Frau Gerardy-Schahn möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung bedanken.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Marianne Petry für die vielseitige Unterstützung und den Mitgliedern des Kispert Labors für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke auch Frau Dr. Karin Schuster-Gossler für die Injektion von ES-Zellen und Transgenen.

Ich danke auch Herrn Prof. Achim Gößler für die Unterstützung und wissenschaftlichen Diskussionen.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Institutes für Molekularbiologie für das angenehme Arbeitsklima und gute Zusammenarbeit, ich möchte mich auch bei Natalia Schröder und Jörg Vervoorts bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Abstract

Tbx18 belongs to the family of T-box genes. T-box genes are conserved between hydra and humans and they have been shown to play important role in mesoderm formation, patterning and in organogenesis.

Tbx18 is a nuclear protein that recognizes a palindromic DNA-binding site, that shows an inverted orientation compared to the binding site of the T-protein. Both proteins can bind to the Tbx18-binding site.

A functional analysis of *Tbx18* could show, that *Tbx18* is necessary for the maintenance of the anterior-posterior somite compartment. *Tbx18* mutant embryos show at day 18,5dpc extensive expansions of the pedicle and the proximal ribs. The expansions of these skeletal elements can be traced back to an expansion of lateral sclerotome markers. *Uncx4.1* which is usually expressed in the epithelial somite in the posterior compartment, expands progressively in Tbx18 mutant embryos into the anterior compartment. The initial anterior-posterior polarity is established in Tbx18 mutants but it is not maintained.

This has also consequences for the peripheral nervous system. The spinal nerves do condensate incorrectly during the passage of the lateral Sklerotome. There is clear evidence that Tbx18 is necessary for maintaining the anterior-posterior compartments.

In a gain-of-function study in mice, the expression of *Tbx18* was driven in both somite compartments by the MSD-promoter. The skeletons of these mice show a reduction of the pedicels and proximal ribs. The molecular analysis showed that in somites, polarized expressed marker genes like *Uncx4.1* are reduced. As a consequence the skeletal elements derived from the posterior compartment are missing. Also, the spinal nerves are much less condensed in the lateral sclerotome.

These data suggest, that Tbx18 is not only necessary to maintain somite borders, it is also sufficient to act on this process.

Zusammenfassung

Tbx18 gehört zur Familie der T-box (Tbx) Gene. T-box Gene sind von Hydra bis hin zum Menschen konserviert und besitzen Funktionen in verschiedenen Entwicklungsprozessen des Mesoderms, u.a. bei der Mesodermbildung, der Musterung des Mesoderms und der Organogenese.

Tbx18 ist ein nukleäres Protein dessen DNA-Bindungsstelle eine palindromische Sequenz ausweist, die eine inverse Orientierung der Halbseiten, im Vergleich zur Bindungsstelle des T-Proteins, aufweist. An die für das Tbx18-Protein bestimmte DNA-Bindungsstelle bindet sowohl das Tbx18-Protein, als auch das T-Protein. Eine funktionelle Analyse in der Maus hat gezeigt, daß *Tbx18* notwendig für die Aufrechterhaltung der anterior-posterioren (AP) Polarität der Somiten ist. In 18,5dpc alten mutanten Embryonen sind die proximalen Rippen und die Pedikel expandiert. Die Expansion dieser Elemente konnte auf eine Expansion von Markergenen zurückgeführt werden, die sich in den Somiten in die anteriore Hälfte hin ausbreiten. Dabei sind besonders Markergene wie *Uncx4.1*, die im posterioren Kompartiment des lateralen Sklerotoms exprimiert werden betroffen. Die AP-Polarität wird in Tbx18^{-/-} Embryonen zwar angelegt, jedoch geht diese mit der fortschreitenden Differenzierung der Somiten verloren – die anteriore Somitenhälften gewinnen einen caudalen Charakter. Die Spinalnerven des peripheren Nervensystems zeigen entweder eine starke Bündelung bei der Projektion durch das Sklerotom von Tbx18^{-/-} Embryonen, oder können in einigen Fällen gar nicht durch das Sklerotom projizieren. Die Daten deuten darauf hin, daß Tbx18 notwendig für die Aufrechterhaltung der anterior-posterioren Polarität in den Somiten verantwortlich ist.

Um zu untersuchen, ob Tbx18 auch in der Lage ist diesen Prozeß zu kontrollieren wurden transgene Mäuse hergestellt, bei denen *Tbx18* unter der Kontrolle des MSD-Promoters in den gesamten Somiten ektopisch exprimiert wurde. Die Skelette dieser Mäuse wiesen Defekte sowohl in den proximalen Rippen, als auch in der Entwicklung der Pedikel auf. Eine molekulare Analyse hat gezeigt, daß die Expression von Markergenen des posterioren lateralen Sklerotoms in diesen Mäusen reduziert ist. Kohärent dazu ist die Beobachtung, daß die Spinalnerven bei ihrer Projektion durch das Sklerotom in diesen Mäusen sehr viel weniger stark gebündelt sind. Damit ist *Tbx18* für diesen Prozeß nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend. Damit ist in dieser Studie gezeigt worden, daß die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität der Somiten, notwendig für die Entwicklung der Wirbelsäule ist.

Key words: T-box, somitogenesis, AP-polarity

Schlagwörter: T-box, Somitogenese, AP-Polarität

Abkürzungen

%	Prozent		epitheliale-mesenchymale Transition
μ	mikro-	EMT	Transition
A	Ampere	ES	embryonale Stammzellen
AA	Acrylamid	et al.	und andere
Ac	Acetat	EtOH	Ethanol
Amp	Ampicillin	F	Farad
AP	anterior-posterior	FCS	fötales Kälberserum
APS	Ammoniumpersulfat	g	Gramm
AS	Aminosäuren	G418	Geniticin
ATP	Adenosintriphosphat	GFP	grün fluoreszierendes Protein
bHLH	basischer Helix-Loop-Helix	GSH	Glutation
bp	Basenpaar	GST	Glutathion-S-Transferase
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin	GTP	Guanosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin	H ₂ O	Wasser
bzw.	beziehungsweise	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
C	Grad Celsius	HCl	Salzsäure
c	centi-	HE	Hämatoxylin/Eosin
CaCl ₂	Calciumchlorid		4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA	HEPES	Leukemia Inhibitor factor (menschl.)
Ci	Curie	hLIF	Hypoxanthin Guanin
	"calf intestinal phosphatase"		Phosphoribosyl Transferase
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm	HPRT	Immunglobulin
CMV	Cytomegalovirus	Ig	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
CPM	Zerfälle pro Minute	IPTG	di-Kaliumhydrogenphosphat
CsCl	Cäsiumchlorid	K ₂ HPO ₄	Kaliumacetat
CTP	Cytidintriphosphat	KAc	Kanamycin
Da	Dalton	Kan	Kaliumchlorid
	3'3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid	KCl	Kilodalton
DAB		kDa	Kaliumdihydrogenphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	KH ₂ PO ₄	Liter
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	l	β-Galaktosidase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LacZ	Luria-Bertani-Medium
	"dorsal root ganglia" dorsale Wurzelganglien	LB	Lithiumchlorid
DGR		LiCl	Leukemia Inhibitor Faktor
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	LIF	Mol pro Liter
Dig	Digoxigenin	M	milli-
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	m	multiple cloning site
DMSO	Dimethylsulfoxid	MCS	murine embryonale Fibroblasten
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MEF	Methanol
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat	MeOH	mesenchymale-epitheliale Transition
ds	doppelsträngig		Magnesium
DTT	Dithiothreitol	MET	Magnesiumchlorid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	Mg	Magnesiumsulfat
DV	dorsoventral	MgCl ₂	Minuten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MgSO ₄	Boten-RNA
	"electrophoretic mobility shift assay" Gelretentionsanalyse	min	b-Mercaptoethanol
EMSA	epitheliale-mesenchymale Transition	mRNA	nanno-
EMT		MSH	
		n	

Na	Natrium
Na ₂ HPO ₂	si-Natriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
p	pico-
p.c.	<i>post coitum</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung "polymerase chain reaction"
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydroxii
Pi	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PNS	Peripheres Nervensystems
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRL	Retikulozyten-Lysat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Strep	Streptomycin
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNA	Transfer RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit
U	enzymatische Einheit
u.U.	unter Umständen
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
x	-fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG	4
1.1 SOMITOGENESE	4
1.2 DORSO-VENTRALE KOMPARTIMENTIERUNG DER SOMITEN – SKLEROTOMENTWICKLUNG	9
1.3 ETABLIERUNG DER ANTERIOREN-POSTERIOREN POLARITÄT VON SOMITEN	12
1.4 T-BOX GENE.....	18
1.5 ZIELSETZUNG	21
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 REAGENZIEN UND GERÄTE.....	21
2.2 OLIGONUKLEOTIDE	24
2.3 DNA-VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE	25
2.3.1 Klonierungsvektoren	25
2.3.1 Transkriptionsvektoren.....	26
2.3.2 Prokaryontische Expressionsvektoren	27
2.3.3 Eukaryontische Expressionsvektoren.....	28
2.3.4 Fluoreszenz-Expressionsvektoren:	29
2.4 BAKTERIENSTÄMME	30
2.5 ZELLELINIEN	30
2.6 VERSUCHSTIERE.....	31
2.7 DNA-METHODEN	31
2.7.1 Lösungen und Puffer	31
2.7.2 Medien und Agarplatten.....	32
2.7.3 DNA-Präparationen	33
2.7.4 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	35
2.7.5 DNA-Modifikationen und radioaktive Markierungen.....	37
2.7.6 Transfer von DNA auf Membranfilter (Southern Blot)	38
2.7.7 Filterhybridisierung	39
2.7.8 Klonierung von DNA-Fragmenten	40
2.7.9 Selektion positiver Klone.....	43
2.7.10 Glycerin-Dauerpräparationen von Bakterienstämmen	43
2.7.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	43
2.7.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
2.8 RNA-METHODEN.....	49
2.8.1 Lösungen und Puffer	49
2.8.2 <i>in vitro</i> Transkription	49
2.8.3 „Whole-mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung von Mausembryonen	50
2.8.3.2 Hybridisierung und histochemischer Nachweis	51
2.8.4 <i>in situ</i> Hybridisierung auf Schnitten.....	53
2.9 PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOCHEMISCHE METHODEN	54
2.9.1 Lösungen und Puffer	54
2.9.2 <i>in vitro</i> Translation.....	55
2.9.3 Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation	55
2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.9.5 Transfer von Proteinen auf Membranfilter (Western Blot).....	56
2.9.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranfiltern	57
2.9.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen in Embryonen	57
2.9.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Schnitten.....	59
2.9.9 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	59
2.9.10 Immunisierung von Kaninchen und Herstellung von Seren.....	60
2.9.11 Affinitätsreinigung eines Antiserums gegen das Tbx18-Protein der Maus.....	61

2.9.12 Immunpräzipitation (IP).....	61
2.10 METHODEN FÜR DNA UND PROTEIN INTERAKTIONEN.....	62
2.10.1 Lösungen und Puffer	62
2.10.2 Selektion von Bindungsstellen aus einem Gemisch von zufälligen Oligonukleotiden	62
2.10.3 Gelretentionsanalyse (EMSA)	64
2.11 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	64
2.11.1 Lösungen und Medien	64
2.11.2 Allgemeine Kulturbedingungen	65
2.11.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	65
2.11.4 Transfektion mit CaPO ₄ -Methode	66
2.11.5 Transfektion mit lipophilen Reagenzien	66
2.11.6 Gewinnung von Zellextrakten (Frakelton-Extrakte)	66
2.12 ARBEITEN MIT EMBRYONALEN STAMMZELLEN	67
2.12.1 Allgemeine Kulturbedingungen für ES-Zellen.....	67
2.12.2 Herstellung von humanen, rekombinanten Leukemia Inhibitor Faktor (LIF)	67
2.12.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	68
2.12.4 Elektroporation von ES-Zellen.....	68
2.12.5 Selektion von ES-Zellen.....	69
2.12.6 Extraktion von ES-Zell-DNA	69
2.13 TRANSGENE METHODEN	70
2.14 EMBRYOLOGISCHE METHODEN	70
2.14.1 Gewinnung von Embryonen	70
2.14.2 Fixierung und Lagerung von Embryonen	70
2.15 HISTOLOGISCHE METHODEN	71
2.15.1 Paraffinschnitte	71
2.15.2 Entwachsen von Paraffinschnitten.....	71
2.15.3 Hämatoxylin/Eosin-Dünnschnittschnitte	71
2.15.4 Apoptose-Assay mittels TUNEL-Methode.....	72
2.15.5 Proliferations-Assay von BrdU-markierten Embryonen.....	72
2.15.6 Skelettfärbungen.....	73
3. ERGEBNISSE	75
3.1 PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES TBX18 PROTEINS DER MAUS	75
3.1.1 Gewinnung eines Tbx18 Antiserums	75
3.1.2 Analyse der Spezifität des Tbx18-Antikörpers	75
3.1.3 Bestimmung der DNA-Bindungsspezifität des Tbx18-Proteins.....	80
3.1.4 Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften des Tbx18-Proteins	89
3.2 ANALYSE DER TBX18 EXPRESSION MITTELS REPORTERGENE.....	99
3.2.1 Gewinnung von Tbx18.LacZ und Tbx18.GFP Embryonen	99
3.2.2 Expressionsanalyse von Tbx18 mit einem LacZ Reporter	100
3.2.3 Expressionsanalyse von Tbx18 mit einem GFP Reporter	104
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM SOMITENPHÄNOTYP TBX18 MUTANTER MÄUSEN	106
3.3.1 Morphologische und histologische Analyse.....	106
3.3.2 Untersuchungen zum Skelett-Phänotyp.....	109
3.3.3 Histologische Beschreibung von 10,5dpc und 11,dpc Embryonen	113
3.3.4 Untersuchung der Anlage des peripheren Nervensystems	116
3.3.5 Molekulare Analyse des Somitenphänotyps	118
3.4 EKTOPISCHE EXPRESSION VON TBX18	132
3.4.1 Erzeugung einer transgenen Maus mit einer ektopischen Tbx18-Expression unter Kontrolle des MSD-Promoters.....	132

3.4.2 Skelettanalyse von transgenen Mäusen.....	134
3.4.2 Molekulare Untersuchung von transgenen Mäusen.....	136
3.4.3 Untersuchung des peripheren Nervensystems von transgenen Mäusen	140
4. DISKUSSION	142
4.1 TBX18 KODIERT FÜR EIN DNA-BINDENDEN PROTEIN MIT EINER SPEZIFISCHEN DNA-BINDESEQUENZ	142
4.2 DIE REGULATION VON TBX18 IN DER SOMITOGENESE	145
4.3 DIE FUNKTION VON TBX18 IN DER SOMITOGENESE	150
5. LITERATURVERZEICHNIS	154

1. Einleitung

Die segmentale Organisation der Wirbelsäule, Muskeln und des peripheren Nervensystems von Wirbeltieren ist eine Konsequenz aus der Segmentierung des paraxialen Mesoderms.

Das paraxiale Mesoderm wird während der Gastrulation gebildet. Bei diesem Prozeß wandern in einem frühen Mausembryo, Zellen durch Invagination ins Innere des zunächst diblastischen Keims und formen so einen dreikeimblättrigen Embryo. Die drei Keimblätter bestehen aus dem äußeren Ektoderm, dem Entoderm und dem dazwischenliegenden Mesoderm. Das Mesoderm gliedert sich in Chordamesoderm, paraxiales Mesoderm, intermediäres Mesoderm und Lateralplatten-Mesoderm. Das paraxiale Mesoderm wird zu beiden Seiten des Notochords abgelegt und zeigt eine deutlich sichtbare Segmentierung. Der Prozeß der Segmentierung des paraxialen Mesoderms wird als Somitogenese bezeichnet.

1.1 Somitogenese

Im Hühnchen wandern während der Gastrulation Zellen aus dem Epiblasten durch den Primitiv-Knoten in das Blastocoel. Der Primitiv-Knoten befindet sich an dem anterioren Ende des Primitiv-Streifens, der durch eine kontinuierliche Regression zum posterioren Ende des Embryos verlagert wird. Durch das Einwandern von Zellen bei dem gleichzeitigen Zurückziehen des Knoten wird, kontinuierlich Mesoderm am posterioren Ende des Embryos gebildet (Selleck et al. 1991; Psychoyos et al. 1996). Zu beiden Seiten des Notochords wird das paraxiale Mesoderm geformt, welches sich durch mesenchymale Zellen auszeichnet, die das unsegmentierte präsomitische Mesoderm (PSM) bilden (Hatada et al. 1994; Schoenwolf et al. 1992). Durch verschiedene Markierungsexperimente mit Vitalfarbstoffen (Selleck et al. 1991) konnte gezeigt werden, daß die mesenchymalen Zellen unmittelbar nach der Passage durch den Knoten stark vermischt werden können.

Mit der fortschreitenden Lokalisierung zum anterioren Ende des PSM werden diese Bewegungen stark eingeschränkt (Tam et al. 1986). Im anterioren Bereich des PSM beginnen die mesenchymalen Zellen schließlich zu kondensieren. Diese Kondensate weisen eine metamere Anordnung auf und werden als Somitomere bezeichnet (Meier 1979).

An der anterioren Grenze des PSM bilden sich dann, synchron zu beiden Seiten des Notochord, durch Abtrennung vom PSM, Blöcke von kondensierten Zellen - die Somiten. Gleichzeitig mit der Abtrennung vom PSM, vollziehen die mesenchymalen Zellen der Somiten einen mesenchymale-epitheliale Übergang (*mesenchymal-epithelial transition*: MET). Von diesem, als Epithelialisierung bezeichneten Prozeß, werden die Zellen im Inneren der Somiten ausgeschlossen und behalten so ihren mesenchymalen Charakter bei und bilden das Somitocoel (Gossler et al. 1998). Der unmittelbar neugebildete Somit wird nomenklatorisch als S1 Somit bezeichnet, der zuvor gebildete als S2, usw. (nach Pourquie et al. 2001). Die zwei erkennbaren Somitomere im PSM werden als S0 bzw. S-1 bezeichnet.

Wird durch Mikromanipulation das PSM isoliert, so behält dieses für einen gewissen Zeitraum die Fähigkeit, selbstständig neue Somiten zu produzieren (Packard et al. 1976; Chernoff et al. 1982; Christ et al. 1972). Diese Fähigkeit ist damit eine intrinsische Eigenschaft des PSM. Es wurden in den letzten Jahren verschiedene Modelle aufgestellt, um den periodischen Mechanismus der Somitenbildung zu erklären (Cooke et al. 1976; Flint et al. 1978; Meinhardt 1986; Keynes et al. 1988; Primm et al. 1989). Als Grundlage vieler Modelle wird ein molekularer Oszillator postuliert, der die Periodizität der Somitenbildung treibt.

Erste Hinweise zu dem Modell des molekularen Oszillators lieferte die Expressionsanalyse von *c-hairy1*. Palmeirim et al. (1997) konnten zeigen, daß die Expression im Hühnchen von *c-hairy1* im PSM einen periodischen Verlauf folgt. Die Expression breitet sich innerhalb von 90min. wellenförmig vom posterioren Ende zum anterioren Ende des PSM aus. Damit korreliert die periodische Expression von *c-hairy1* genau mit der Periodizität der Somitenbildung im Hühnchen. In den neugebildeten Somiten stabilisiert sich schließlich die *c-hairy1* Expression und ist auf die posteriore Somitenhälfte begrenzt. Diese periodische Expression von *c-hairy1* ist zellautonom und unabhängig von Zellbewegungen im PSM. Daß es sich bei *c-hairy1* nicht um den eigentlichen Oszillator handelt, konnte dadurch gezeigt werden, daß eine Inhibition der Proteinsynthese nicht zum Verlust der periodischen Expression führt (Palmeirim et al. 1997).

Im Laufe der letzten Jahre wurden eine Reihe von oszillierenden Genen in Hühnchen, Maus und Zebrafisch entdeckt, was auf eine evolutionäre Konservierung eines oszillierenden Systems hindeutet (Forsberg et al., 1998; McGrew et al. 1998; Holley, et al. 2000; Jiang, et al. 2000; Jouve et al. 2000; Leimeister, et al., 2000;

Sawada, et al., 2000; Bessho, et al., 2000). Die Identifizierung von *lunatic fringe* (*Lfng*), als ein weiteres oszillierendes Gen implizierte, daß der Notch/Delta-Signalweg eine wichtige Rolle in diesem oszillierenden System spielt (Forsberg et al. 1998). Lunatic Fringe ist eine Glykosyl-Transferase, die den Notch-Rezeptor posttranslational modifiziert (Aulehla et al. 1999) und seine Affinität zu dem Liganden Delta1 verändert (für ein Review s. Haines et al. 2003). Pourquie postulierte, daß periodische Somitenbildung von einem periodisch aktiviertem Notch/Delta-Signal abhängt und bezeichnete dieses System als Somiten-Uhr.

Verschiedene genetische Experimente in der Maus deuten auf einen von Pourquie beschriebenen Mechanismus hin. Die Analyse einer Maus-Mutante mit einem *Lfng* Null-Allel zeigt, daß die Somiten in *Lfng*^{-/-} Mäusen eine gestörte Somitenentwicklung aufwiesen (Zhang et al., 1998; Evrard et al. 1998). Die metamere Abfolge, die Größe und Form der Somiten ist in diesen Mäusen stark beeinträchtigt. Eine molekulare Analyse konnte Störung der anterioren-posterioren (AP) Polarität der Somiten nachweisen (die Bildung der AP-Polarität wird in einen eigenen Kapitel beschrieben). Durch die ektopische und kontinuierliche Expression von *lunatic fringe* durch den mesodermalen Enhancer/Promoter des *Dll1*-Gens (Beckers et al. 2000) im PSM und in neugebildeten Somiten konnte gezeigt werden, daß in der Tat die oszillierende Expression von *lunatic fringe* für eine korrekte Somitogenese notwendig ist (Serth et al. 2003). Der Phänotyp dieser transgenen Mäuse gleicht den der *Lfng*^{-/-} Mäuse, ein deutliches Indiz dafür, daß nicht das bloße Vorhandensein von *lunatic fringe* notwendig ist, sondern dessen oszillierende Expression. Auch *Hes7* konnte eine notwendige Funktion in der Somitogenese zugeordnet werden, indem die periodische Repression von *Hes7* für die zyklische Transkription von *lunatic fringe* verantwortlich ist (Bessho et al. 2001). Für *Hes1* und *Hey2* – zwei weitere, oszillierende Gene – konnte hingegen keine Funktion in der Somitogenese nachgewiesen werden (Ishibashi et al. 1995; Ohtsuka et al. 1999; Jouve et al. 2000; Bessho et al. 2001; Gessler et al. 2002).

Die an der hypothetische Somiten-Uhr beteiligten Faktoren sind allesamt Komponenten des Notch/Delta-Signalweges. Deshalb wird diesem Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Somiten-Uhr zugesprochen (Pourquie 1999). Notch ist ein Transmembran-Rezeptor, mit 36 EGF-ähnlichen Motiven (Rebay et al., 1991). Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors wird Liganden-abhängig, proteolytisch durch die γ -Sekretase Presenilin-1 abgeschnitten.

Daraufhin kann das intrazelluläre Fragment des Notch-Rezeptors, zusammen mit weiteren Kofaktoren (CBF1/Su(H)), in den Zellkern wandern und dort die Expression von Zielgenen beeinflussen (Kidd et al. 1998; Schroeter et al. 1998; Lecourtois et al. 1998). Die funktionelle Bedeutung der proteolytischen Wirkung von Presenilin-1 für den Notch-Rezeptor konnte auch im Mausmodell beschrieben werden. Mäuse mit einem proteolytisch-inaktivem Allel des Notch-Rezeptors zeigen einen vergleichbaren Phänotyp, wie der Notch-Knockout (Huppert et al. 2000).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen oszillierenden Genen, zeigen die Liganden für den Notch-Rezeptor, *delta like 1 (Dll1)* und *delta like 3 (Dll3)* in der Somitogenese ein statisches Expressionsmuster (Bettenhausen et al. 1995; Dunwoodie et al. 1997). *Notch1* selber zeigt ebenfalls eine statische Expression im PSM und wird stark im anterioren PSM mit einer Ausdehnung von rund einem Somiten (entspricht ungefähr Somitomere S0) exprimiert (Reaume et al., 1992). Funktionelle Analysen in der Maus haben gezeigt, daß *Notch1* bzw. die Liganden *Dll1* und *Dll3* notwendig für eine korrekte Somitogenese sind (Conlon et al. 1995; Hrabe de Angelis et al. 1997; Dunwoodie et al. 2002). Mausembryonen, homozygot defizient für *Notch1*, zeigen eine unkoordinierte und z.T. verzögerte Somiten-Bildung (Conlon et al. 1995). Auch *Dll1*^{-/-} Embryonen zeigen unregelmäßig geformte Somiten und Defekte in der Epithelialisierung der Somiten. Ferner weisen *Dll1*^{-/-} mutante Embryonen eine gestörte anteriore-posteriore Polarität auf (Hrabe de Angelis et al. 1997) (siehe auch weitere Kapitel!).

Kürzlich konnte auch *Axin2*, eine Komponente des Wnt-Signalweges als oszillierende Komponente identifiziert werden (Aulehla et al. 2003). Dadurch konnte die schon bekannte Funktion des Wnt-Signalweges in der Mesoderm-Entwicklung um den Aspekt der Somiten-Uhr erweitert werden. Die genaue molekulare Natur der Somiten-Uhr ist noch nicht ausreichend verstanden, jedoch scheint die Somiten-Uhr zu einer zyklischen Aktivierung des Notch/Delta-Signalweges zu führen (Pourquie 2003).

Aufgrund von Transplantationsexperimenten ist bekannt, daß das PSM in zwei funktionelle Bereiche gliedert werden kann. Zellen, die sich in den ersten Zweidrittel vom posterioren Ende des PSM befinden, sind noch nicht determiniert im Bezug auf ihre anteriore-posteriore Polarität (Tam et al. 1982). Zellen im anterioren Bereich hingegen werden diesbezüglich spezifiziert.

Die molekulare Ursache dafür ist ein Morphogengradient im PSM. Der Fibroblasten Wachstumsfaktor 8 (FGF8) wird im posterioren Ende des PSM exprimiert. Das sezernierte FGF8-Protein hingegen bildet einen Gradienten vom posterioren zum anterioren Ende des PSMs (Dubrulle et al. 2004). Bei einer Erhöhung der FGF8-Konzentration konnte gezeigt werden, daß sich der posteriore Charakter des PSM ausdehnt und die Somitenbildung beeinträchtigt wird (Dubrulle et al. 2001). Hohe FGF8-Konzentrationen verhindern die Differenzierung der mesenchymalen Zellen des PSM. Fällt die FGF8-Konzentration unter einen Schwellenwert, beginnt das Differenzierungsprogramm der Zellen, indem diese beginnen dann verschiedene Gene zu exprimieren wie z.B. die Komponenten des Notch/Delta-Signalweges. Wird ein kritischer Grenzwert der FGF8-Konzentration unterschritten, werden die Zellen im anterioren PSM kompetent auf die Somiten-Uhr zu reagieren. Nach einer speziesabhängigen Anzahl von Zyklen (wellenförmige Expression der zyklischen Gene), kommt es zur Bildung der Somiten am anterioren Ende des PSM. Dieses Modell wird auch als „clock – wavefront“ Modell bezeichnet. (Pourquie 2003). Die zyklische Natur dieser Somiten-Uhr ist unmittelbar notwendig zur periodischen Bildung von Epithelialen Somiten.

Die Formierung von epithelialen Somiten ist das Charakteristikum der Somitogenese und wird sowohl von Komponenten des Notch/Delta-Signalweges als auch durch *Paraxis* kontrolliert. *Paraxis* ist ein basischer Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor, der notwendig für die Epithelialisierung und Segmentierung der Somiten ist und im anterioren PSM und neugebildeten Somiten exprimiert wird (Burgess et al. 1996; Sosic et al. 1997). *Paraxis* hat ferner einen Einfluß auf die anteriore-posterior Spezifikation der Somiten (Burgess et al. 1996), die im Detail in Kapitel 1.3 beschrieben wird.

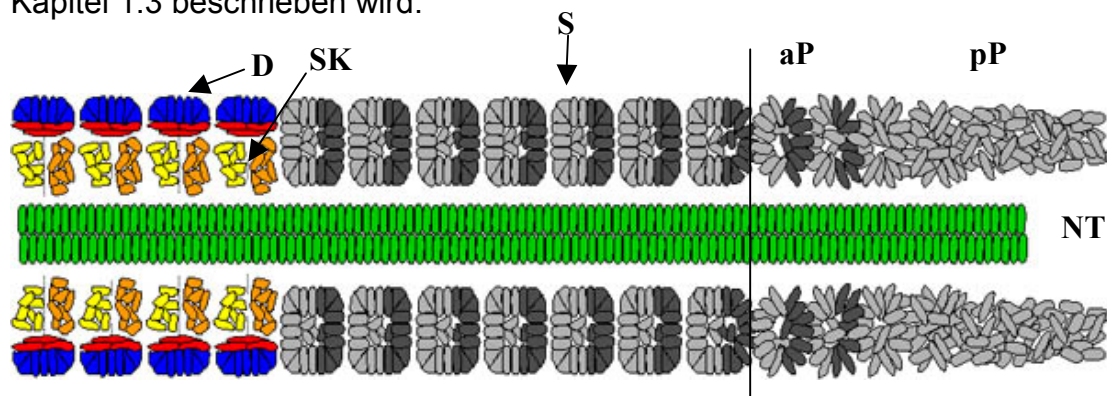
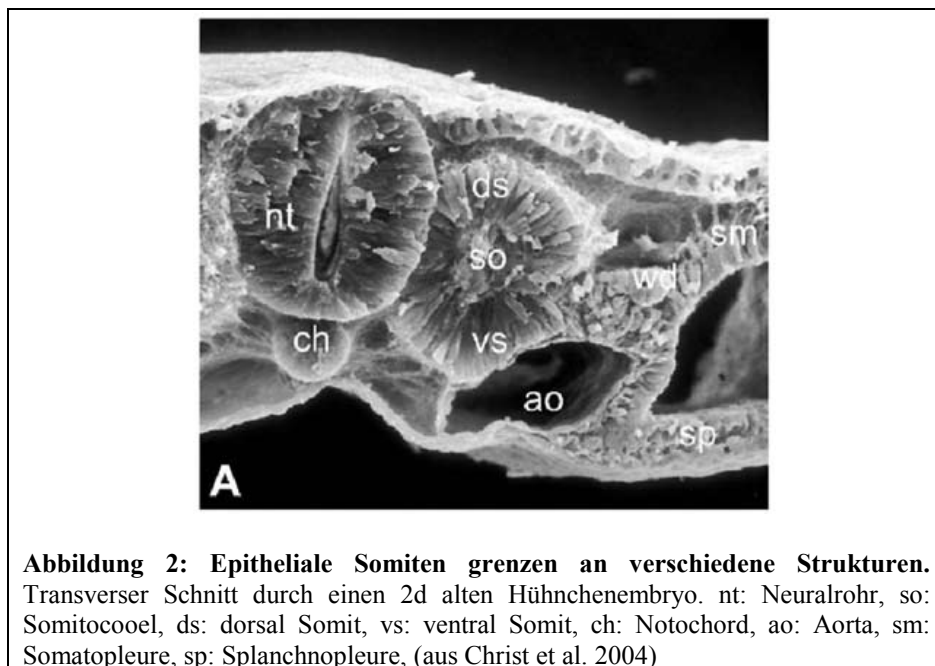


Abbildung 1: Schema der Somitogenese. aP: anteriores PSM; D: Dermomyotom NT: Notochord; pPSM posteriores PSM; S: Somiten; SK: Sklerotom

Epitheliale Somiten werden entlang ihrer anterior-posterior (AP) und dorso-ventralen (DV) Achse spezifiziert. Beide Prozesse unterliegen dabei sehr unterschiedlichen molekularen Mechanismen. Die Etablierung der DV-Achse ist unmittelbar notwendig für die Differenzierung der Somiten in Dermomyotom und Sklerotom.

1.2 Dorso-ventrale Kompartimentierung der Somiten – Sklerotomentwicklung

Neugebildete epitheliale Somiten grenzen an verschiedene Strukturen im Embryo, die einen wichtigen Einfluß auf die dorso-ventrale Kompartimentierung haben. Dorsal grenzen die Somiten an das Oberflächenektoderm, ventral befindet sich die Aorta und das Entoderm. An der lateralen Seite der epithelialen Somiten grenzen diese an das Intermediäre und Lateralplatten Mesoderm bzw. an das zentrale Notochord und Neuralrohr (Stockdale et al. 2000; Christ et al. 2004; s. a. Abbildung 2).

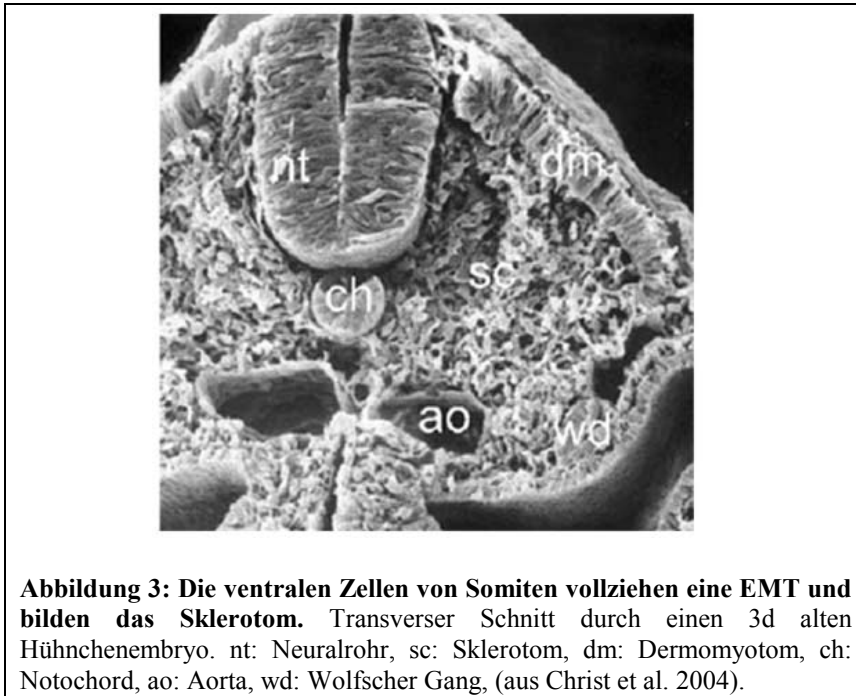


Die dorso-ventrale Kompartimentierung der epithelialen Somiten führt zu einer Spezifizierung der Zellen in Dermomyotom (dorsal) und Sklerotom (ventral). Aus dem Dermomyotom wird die Dermis der Haut und die Muskeln des axialen Skelettes bzw. der Gliedmaßen. Das axiale Skelett ist ein Derivat des Sklerotoms (Huang et al., 2000).

Anders als die intrinsische Fähigkeit zur Somitenbildung, ist die Differenzierung der Somiten entlang der dorso-ventralen (DV) Achse abhängig vom Mikromilieu der Somiten. Werden frühe, epitheliale Somiten manipulatorisch in ihrer dorso-ventralen Orientierung gedreht, entwickeln sich diese normal. Damit sind diese Zellen kompetent sich gemäß ihrer Umgebung zu verhalten (Aoyama et al. 1988; Christ et al. 1992; Dockter et al. 2000). Verschiedene Proteine der Wnt-Familie werden im dorsalen Neuralrohr und im Oberflächenektoderm exprimiert und sind notwendig für die Etablierung des Dermomyotoms in den epithelialen Somiten (Capdevila et al. 1998; Ikeya et al. 1998; Schubert et al. 2002). Werden Wnt-1, Wnt-3a bzw. Wnt-4 exprimierende Zellen in die Nachbarschaft von epithelialen Somiten transplantiert, dann breitet sich das Dermomyotom auf Kosten des Sklerotoms aus (Wagner et al. 2000). Die genaue Entwicklung des Dermomyotoms wird hier nicht weiter verfolgt. Eine ausführliche Übersicht zur Entwicklung des (Dermo-)Myotoms liefert Christ et al. (2004 b).

Die Bildung des Sklerotoms ist vom (ventralen) Neuralrohr und dem Notochord abhängig (Holtzer et al. 1953; Holtzer et al. 1970). Werden Neuralrohr und Notochord in einem Hühnchenembryo entfernt, bilden sich keine Wirbel und Rippen in den manipulierten Embryonen (Teillet et al. 1998). Daraus wurde geschlossen, daß ein induktiver Mechanismus für die Sklerotomentwicklung notwendig ist.

Das morphologisch auffälligste Anzeichen der Sklerotomentwicklung ist, daß die Zellen im ventralen Bereich der epithelialen Somiten eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) vollziehen. Die Zellen des dorsalen Dermomyotoms behalten jedoch ihren epithelialen Charakter bei (Abbildung 3). In Paraxis-/- Mäusen ist die Epithelialisierung der Somiten gestört, jedoch wird die Bildung des Sklerotoms induziert (Burgess et al. 1996). Damit sind beide Prozesse unabhängig voneinander, jedoch notwendig für die korrekte Entwicklung der Wirbelsäule.



Die mesenchymalen Zellen im ventro-medialen Bereich des Sklerotoms migrieren zum Notochord, kondensieren dort und bilden schließlich die Wirbelkörper und die Zwischenwirbelscheiben (Christ et al. 1992; Christ et al. 2000).

Für die molekulare Natur des Sklerotom-induzierenden Faktors konnte Sonic hedgehog (Shh) identifiziert werden. Shh wird vom Notochord und dem ventralen Anteil des Neuralrohrs sezerniert und ist notwendig für die Induktion und Aufrechterhaltung des Sklerotomkompartimentes (Koseki et al. 1993; Fan et al. 1994; Müller et al. 1996). Shh^{-/-} Mäuse zeigen keine Entwicklung der Wirbelsäule (Chiang et al. 1996) und weisen somit einen vergleichbaren Phänotyp auf, wie Hühnchenembryonen, bei denen Notochord und Neuralrohr entfernt wurden (s.o.).

Shh ist notwendig für die Aufrechterhaltung der *Pax1* Expression im ventro-medialen Sklerotom. *Pax1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der *Pairedhomöobox*-Familie und wird in epithelialen Somiten im ventro-medialen Bereich exprimiert und bleibt auch während der EMT exprimiert (Deutsch et al. 1988; Ebensperger et al. 1995). Die transkriptionelle Initiation erfolgt noch in Shh^{-/-} Mäusen, jedoch ist die Expression stark reduziert (Chiang et al. 1996). *Pax1* wird als Mediator des Shh-Signals interpretiert. Shh ist nicht nur notwendig für die (Aufrechterhaltung der) *Pax1* Expression (s.o.), sondern Shh ist auch in der Lage die Expressionsdomäne von *Pax1* auszubreiten, wenn dafür zusätzliches Notochordmaterial an epitheliale

Somiten¹ transplantiert wird (Brand-Saberi et al. 1993). *Pax1* wird auch als sklerotom-spezifischer Marker beschrieben (Christ et al. 2004) und ist zusammen mit dem Forkhead-Transkriptionsfaktor *Foxc1* (früher MFH-1) notwendig für die korrekte Entwicklung der Wirbel (Barnes et al. 1996; Winnier et al. 1997). Doppelhomozygote Mausembryonen für *Pax1* und *Foxc1* weisen eine signifikant reduzierte Proliferation im Sklerotom auf, was zum Verlust von Wirbelkörpern und Zwischenwirbelscheiben führt. *Pax9*, ebenfalls ein Mitglied der Pairedhomöobox-Familie, wird nach der EMT im ventralen Sklerotom exprimiert (Müller et al. 1996), jedoch führt der Funktionsverlust zu keinerlei Wirbeldefekt (Peters et al. 1999). Sowohl *Pax1*, als auch *Pax9* sind in einem synergistischen Mechanismus dafür notwendig die Chondrogenese des ventralen Sklerotoms, da beide Faktoren die Expression von *Bapx1* kontrollieren (Murtaugh et al. 1999; Monsoro-Burq et al. 2000).

Die Expression von *Pax1* und *Pax9* markieren das ventrale Sklerotom. Einige Zellen im dorsalen Anteil des Sklerotoms entgehen der Induktion von *Pax1* durch Shh und exprimieren *Msx1* und *Msx2*, die durch BMP-4 aus dem Oberflächenektoderm induziert werden. Diese *Msx*-positiven Zellen bilden schließlich Teile der Neuralbögen, die in *Pax1/Pax9* doppelhomozygoten Embryonen nicht betroffen sind (Monsoro-Burq et al. 2000). Nach der Spezifizierung des Sklerotoms unterteilt sich dieses also in ein Shh-abhängigen (ventro-medialen) und einen Shh-unabhängigen (dorsalen) Anteil.

Ebenso wie die Zellen des dorsalen Sklerotoms, zeichnen sich die Zellen des lateralen Sklerotoms durch ein fehlende Expression von *Pax1* aus (Ebensperger et al. 1995). Die molekularen Prozesse in diesem Subkompartiment des Sklerotoms sind vergleichsweise wenig gut untersucht, jedoch konnte Brent et al. (2003) zeigen, daß dieser Anteil des Sklerotoms, wichtig für die Sehnenentwicklung ist.

1.3 Etablierung der anterioren-posterioren Polarität von Somiten

Morphologisch ist eine anteriore-posteriore (AP) Polarität nur im Sklerotom differenzierter Somiten sichtbar. Es gibt weder morphologische noch molekulare Hinweise darauf, daß auch das Dermomyotom einer AP-Polarität unterliegt (Christ et al. 2004).

¹im Hühnchen

Experimente mit Hühnchen/Wachtel-Chimären haben gezeigt, daß eine Musterung entlang der anterior-posterioren Achse (AP-Achse) schon im anterioren Drittel des PSMs beginnt und damit noch vor der eigentlichen Somitenbildung.

Neugebildete, epitheliale Somiten zeigen eine symmetrische Zelldichte auf, wohingegen differenzierte Somiten deutliche Unterschiede im Bezug auf die Zelldicht zwischen zwei Somitenhälften zeigen. Die Zellen in der anterioren Hälfte weisen eine geringere Proliferationsrate auf als die Zellen in der posterioren Hälfte. Sichtbar wird eine metamere Abfolge von weniger-dichten (anterior) und stärker-dichten (posterioren) Kompartimenten. Schon Remak (1850) hat dieses Phänomen in Reptilienembryonen beschrieben. Die intrasomitische Grenze wird auch von Ebners Spalte genannt.

Die Etablierung der AP-Polarität hat auch eine unmittelbare Konsequenz auf die segmentale Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS). Die Neuralleistenzellen und die Axone der Motorneurone projizieren ausschließlich durch die weniger-stark kondensierte anteriore Somitenhälfte. Werden durch Mikromanipulation, multiple anteriore Somitenhälften im paraxialen Mesoderm aneinandergereiht, so führt dies zu einer Fusion der dorsalen Wurzelganglien und zu einer unvollständigen Kondensation der Motorneurone (Goldstein et al. 1990). Mit Hilfe dieser Transplantationen konnte auch gezeigt werden, daß von der anterioren Somitenhälfte Faktoren ausgehen, die sich positiv auf die Proliferation der Neurone im PNS auswirken (Goldstein et al. 1990). Werden die Neuralleistenzellen durch Barrieren daran gehindert, in die anteriore Somitenhälfte einzuwandern, führt dies zu einer erhöhten Apoptose in diesem Kompartiment – ein Zeichen dafür, daß wechselseitige Induktionsprozesse zwischen anteriorem Sklerotom und Neuralleistenzellen auftreten (Christ 1975). Die Zellen der posterioren Somitenhälfte üben eine repulsiven Wirkung auf das Auswachsen der Neuralleistenzellen aus. Da die anteriore Hälfte des Sklerotoms keinen chemoattraktiven Charakter aufweist, ist die Migration der Neuralleistenzellen durch die metamere Anordnung von permissiven (anterior) und repulsiven (posterior) Territorien determiniert (Christ et al. 2000).

Im Hühnchen werden die beiden *Ephrine B1* und *B4* in der posterioren Somitenhälfte exprimiert, in den Axonen der Motorneurone werden die kompetenten Ephrin-Rezeptoren *EphB2* und *EphB3* exprimiert. Der repulsive Charakter der posterioren Somitenhälfte beruht somit auf einem Zusammenspiel von Ephrinen und Ephrin-

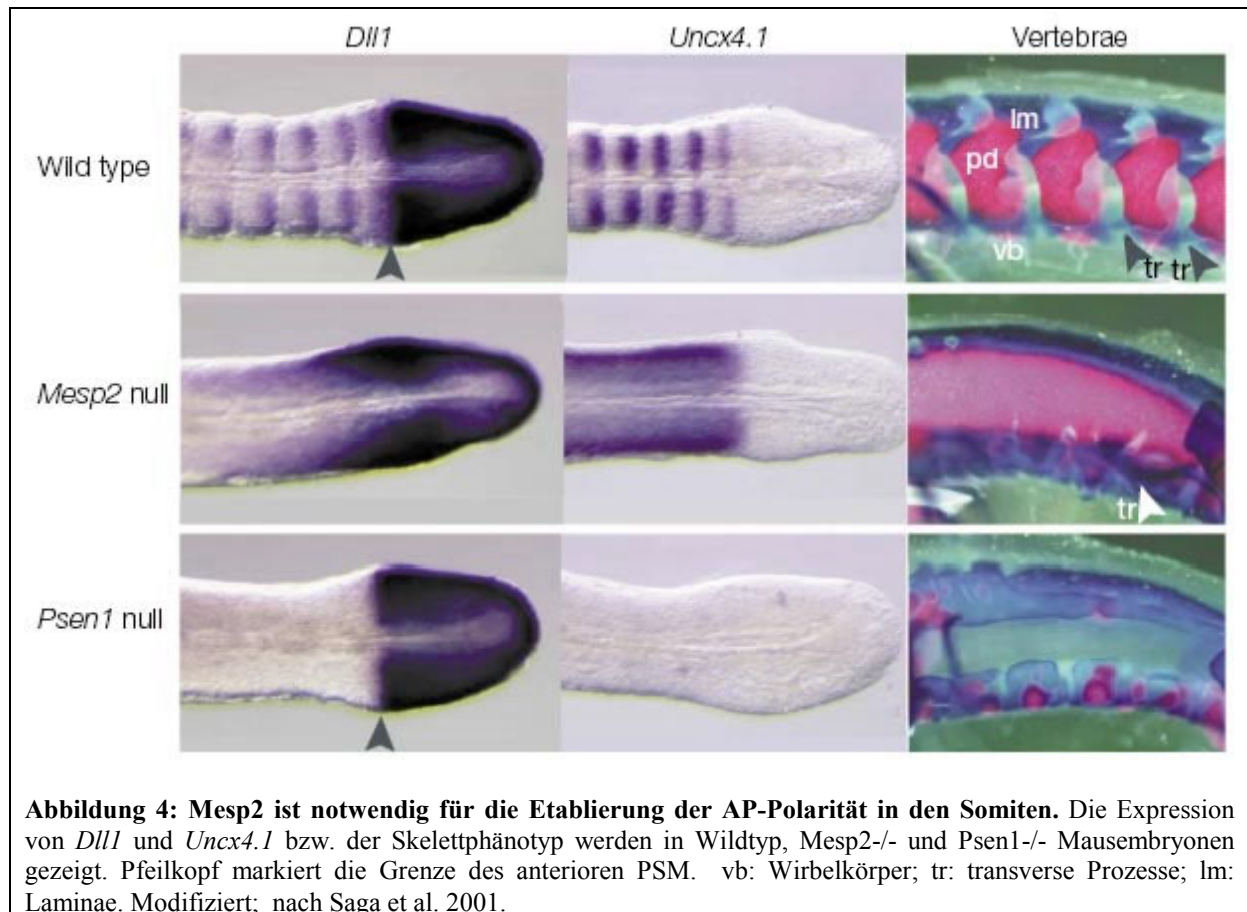
Rezeptoren (Wang et al. 1997; Henkemeyer et al. 1994; Ohta et al. 1996). Ephrine und die entsprechenden Rezeptoren sind nicht nur für die Segmentierung des PNS verantwortlich, sondern auch für die Segmentierung des paraxialen Mesoderms selber. Durbin et al. (1998; 2000) konnten im Zebrafisch zeigen, daß der Ephrin-Signalweg notwendig für die korrekte Somitenbildung notwendig ist. Der Ephrin-Rezeptor A4 wird schon im anterioren PSM schon in einem polarisierten Muster exprimiert (Bergemann et al. 1995). Dies deutet an, daß die anterior-posteriore Spezifizierung der Somiten schon im PSM stattfindet.

Anteriore und posteriore Somitenhälften besitzen, neben den unterschiedlichen Proliferationsraten auch unterschiedliche adhäsive Eigenschaften. Die EMT im Sklerotom wird dadurch ermöglicht, daß in diesem Kompartiment das Adhäsionsmolekül N-Cadherin herunterreguliert wird (Hatta et al. 1987; Takeichi 1988). Die sklerotomalen Zellen verlieren somit (einen Teil) ihrer adhäsiven Eigenschaften, in sind zur Migration befähigt. Die Bedeutung von N-Cadherin wurde durch Experimente sowohl mit einer N-Cadherin-Blockierung durch Antikörpern, als auch durch genetische Experiment gezeigt (Linask et al. 1998; Radice et al. 1997). N-Cadherin defiziente Mausembryonen zeigen verkleinerte, disorganisierte Somiten, deren epithelialer Charakter kaum beeinflusst war (Radice et al. 1997). Der Funktionsverlust von Cadherin-11 (*cad11*) in der Maus hingegen zeigte keinerlei Somitenphänotyp. Erst durch Mutation beider Gene in der Maus, treten deutliche Beeinträchtigungen in der Bildung der Somiten auf. *cad11*/N-Cadherin doppel-homozygote Embryonen zeigen verkleinerte, stark fragmentierte Somiten (Horikawa et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, daß beide Moleküle synergistisch zur Bildung von epithelialen Somiten beitragen. Diese stark fragmentierten Somiten zeigten jedoch eine Aufteilung in ein anteriores und posteriores Kompartiment. Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß die Zellen der beiden Somitenhälften unterschiedliche adhäsive Eigenschaften besitzen. Durch eine molekulare Untersuchung konnte ferner gezeigt werden, daß die anteriore-posteriore Polarität nicht beeinflusst war.

Über die Etablierung der AP-Polarität der Somiten ist im Laufe der letzten Jahre nicht zuletzt aufgrund zahlreicher genetischer Analysen ein differenziertes Bild entstanden. In dem Abschnitt 1.1 wurde bereits beschrieben, daß der Notch/Delta-Signalweg an der Somitenbildung beteiligt ist. Eine Schlüsselstellung in der AP-Polarisierung nimmt

Mesp2 im Zusammenspiel mit dem Notch/Delta-Signalweg ein. *Mesp2* kodiert für einen basischen Helix-Loop-Helix Faktor, der im anterioren PSM exprimiert wird (Saga et al. 1996; Saga et al. 1997). Zunächst wird *Mesp2* mit einer Ausbreitung von einem Somiten im PSM exprimiert, anschließend zieht sich die Expression auf die zukünftige anteriore Somitenhälfte zurück (Saga et al. 1997). Die Bedeutung von *Mesp2* für die Etablierung der AP-Polarität konnte anhand einer funktionellen Analyse in der Maus gezeigt werden. Die Skelette von homozygoten *Mesp2*-Mäusen zeigen starke Veränderungen im axialen Skelett. Besonders die Ossifikations-Zentren der Pedikel sind in diesen Mäusen fusioniert. Dies wird durch den Verlust des anterioren Charakters in den anterioren Somitenhälften dieser Mäuse interpretiert (Takahashi, et al. 2000). Normalerweise wird *Dll1* nur in den posterioren Somitenhälften epithelialer Somiten exprimiert, jedoch zeigt sich in *Mesp2*^{-/-}-Mausembryonen eine Ausbreitung von *Dll1* in die anteriore Somitenhälfte (Saga et al. 1997; Takahashi, et al. 2000). Mit Hilfe genetischer Experimente konnte auch gezeigt werden, daß *Mesp2* die Expression von *Dll1* durch ein Notch-Signal reguliert (s.a. Abbildung 4).

Dll1 zeigt eine starke Expression im posterioren PSM. Im anterioren Drittel des PSM hängt die *Dll1*-Expression sowohl von einem *Presenilin-1* (*Psen1*) abhängigen, als auch von einem *Presenilin-1* unabhängigen Notch-Signal ab. In der posterioren Somitenhälfte induziert ein Notch-Signal, *Presenilin-1* abhängig die Expression von *Dll1*. Hingegen blockiert *Mesp2*, welches auf die anteriore Somitenhälfte des zukünftigen Somiten begrenzt, ist diesen Signalweg und führt zu einer Repression der *Dll1*-Expression in dem anterioren Kompartiment (Saga et al. 2001; Koizumi et al. 2001) (s.a. Abbildung 4). Die Etablierung der AP-Polarität wird somit durch ein Zusammenspiel von *Mesp2* und dem Notch/Delta-Signalweg kontrolliert und wird somit sehr viel früher als die DV-Spezifizierung in den Somiten angelegt (s.o).



Neidhardt et al. (1997) haben die Expression des *Paired-related* Homöobox-Gens *Uncx4.1* beschrieben. Neben der Expression im Zentralnervensystem (ZNS) und weiteren Geweben, besitzt *Uncx4.1* eine Expression in neugebildeten Somiten in der posterioren Somitenhälfte. In differenzierenden Somiten ist die *Uncx4.1* Expression auf den posterioren Anteil der lateralen Sklerotoms reduziert, wobei der posterior-laterale Anteil eine deutlich stärkere Expression besitzt, als der posterior-mediale Anteil des Sklerotoms (Neidhardt et al. 1997). Die Funktionelle Analyse in der Maus hat gezeigt, daß *Uncx4.1* für die Entwicklung des axialen Skelettes notwendig ist. Die proximalen Rippen und die Pedikel der Wirbel sind stark reduziert in *Uncx4.1*^{-/-} Mäusen (Leitges et al. 2000; Mansouri et al 2000). Eine molekulare Analyse hat gezeigt, daß *Uncx4.1* für die Segmentierung des Mesoderms nicht notwendig ist, jedoch für die Entwicklung der lateralen Elemente der Wirbel und der proximalen Rippen. *Uncx4.1* reguliert in der posterioren Somitenhälfte die Expression von *Sox9*. Die durch *Sox9* vermittelte Kondensation unterbleibt in den posterioren Somitenhälften von *Uncx4.1*^{-/-} Mäusen (Mansouri et al 2000). Es hat sich ferner gezeigt, daß die Expression von oszillierenden Genen der Somiten-Uhr bzw. Komponenten des Notch/Delta-Signalweges in *Uncx4.1*^{-/-} Mäusen

nicht signifikant verändert ist (Kispert, pers. Kom). Das plaziert *Uncx4.1* in einer epistatischen Abhängigkeit unterhalb des Notch/Delta-Signalweges und schließt eine Funktion in der Etablierung der AP-Polarität so gut wie aus.

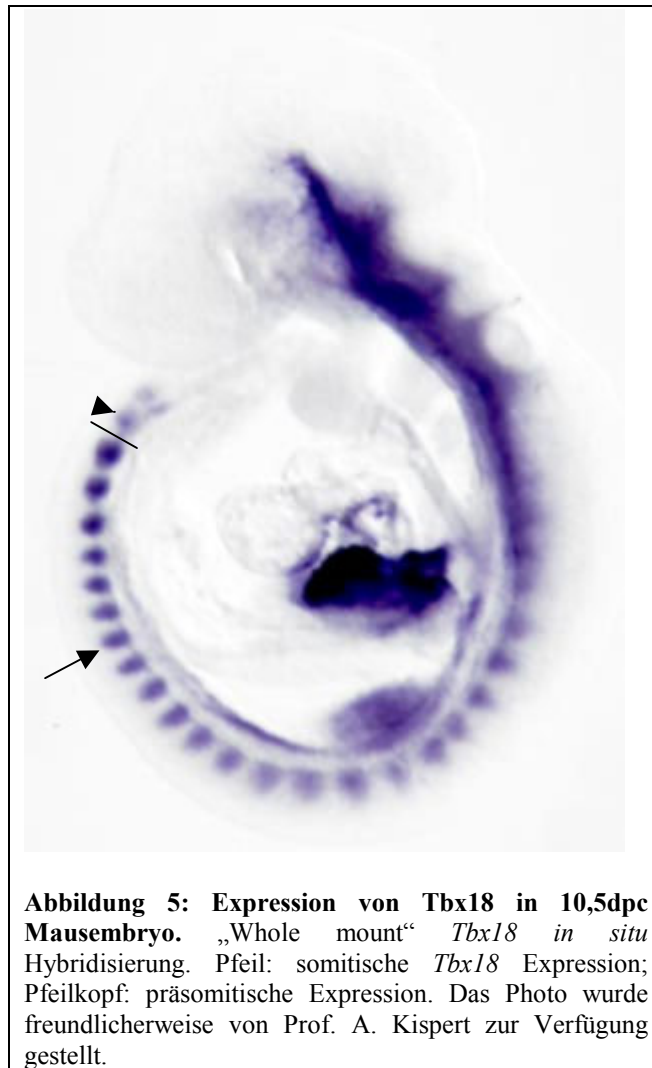
Die Etablierung der AP-Polarität hat unmittelbare Auswirkungen auf die Entwicklung des axialen Skelettes. Seit rund 150 Jahre wird über das Konzept der Neugliederung bzw. der Resegmentierung des Skelettes diskutiert (Remarck 1850; Ebner v. 1888; für eine Zusammenfassung s. Christ et al. 2000). Dieses Konzept beschreibt, daß sich ein Wirbel aus Zellen von zwei unterschiedlichen Somiten formt. Das Sklerotom aus einer anterioren Somitenhälfte fusioniert mit der posterioren Somitenhälfte eines anderen Somiten, um daraus einen kompletten Wirbel zu bilden. Durch diesen Prozeß, wird das Sklerotom und damit die daraus hervorgehenden Wirbel um eine halbe Somitenlänge, gegenüber dem Myotom und den sich daraus entwickelnden Muskeln, gegeneinander versetzt. Dies erlaubt, daß die Muskeln dann nicht an einem Wirbel ansetzen, sondern – verbunden durch Sehnen- zwei Wirbel miteinander verbinden. Diese Versetzung der Wirbel, relativ zu den Muskeln erlaubt die Flexibilität und Statur der Wirbelsäule.

Durch zahlreiche Zellschicksalexperimente konnte mittels unterschiedlicher Markierungstechniken gezeigt werden, daß Zellen aus unterschiedlichen Kompartimenten zu unterschiedlichen Knochenelementen beitragen (Bagnall et al. 1988; Huang et al. 1994; Huang et al. 1996; Ewan 1992; Evans 2003). Die Wirbelkörper werden aus den ventromedialen sklerotomalen Zellen beider Somitenhälften gebildet. Die Zwischenwirbelscheiben leiten sich aus den mesenchymalen Zellen des Somitocoels ab. Für die proximalen Rippen und für die lateralen Elemente der Wirbelsäule, die Pedikel konnte gezeigt werden, daß diese sich exklusiv aus Zellen der posterioren Somitenhälfte ableiten lassen.

Die oben beschriebenen Beobachtungen passen auch zu dem Befund, daß genau diese Elemente in der *Uncx4.1* Mutante fehlen (Mansouri et al 2000).

Eine fehlerhafte AP-Polarität hat somit unmittelbare Auswirkungen auf die Entwicklung der Wirbelsäule. Von Kraus et al. (2001) wurde die Expression des T-box Gens *Tbx18* in der Maus beschrieben. Neben weiteren Expressionsdomänen, besitzt *Tbx18* eine charakteristische Expression in der Somitogenese. Es wird in den anterioren Hälften, sowohl der beiden Somitomere S0 und S-1, als auch in den neugebildeten Somiten in der gesamten anterioren Somitenhälfte exprimiert. In

differenzierenden Somiten reduziert sich die Expression auf den anterioren Teil des lateralen Sklerotoms (s.a. Kraus et al. 2000).



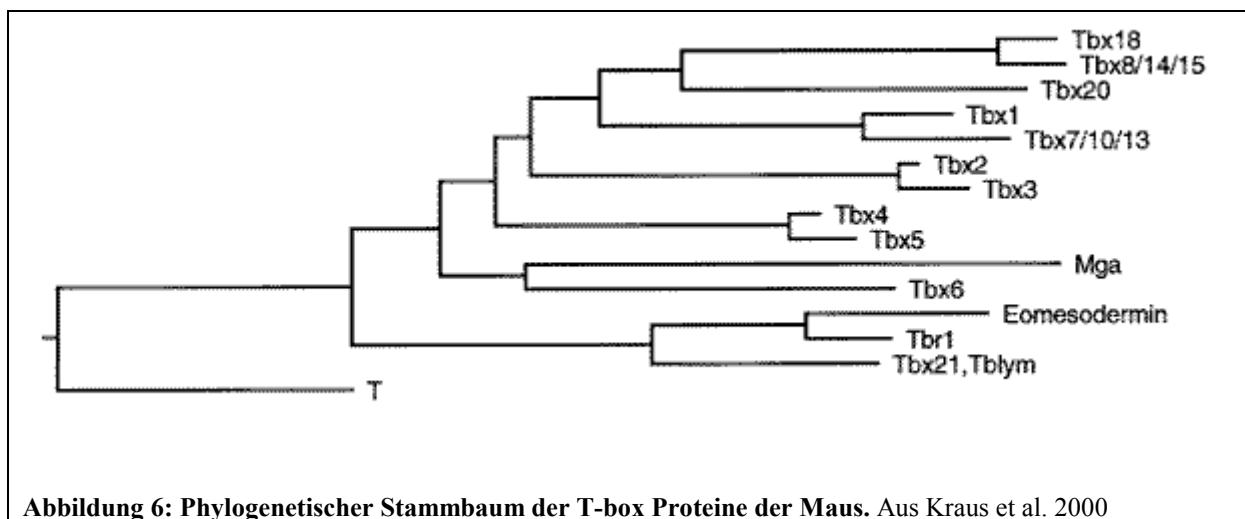
1.4 T-box Gene

Tbx18 gehört zur Familie der T-box (Tbx) Gene. Das erste beschriebene T-box Gen war Brachyury (T) und wurde 1990 von Hermann et al. identifiziert. Brachyury ist eine semidominante Mausmutante die sich dadurch auszeichnet, daß heterozygote Mäuse einen verkürzten Schwanz aufweisen (Dobrovolskia-Zavadskaja 1927). Homozygot ist die T-Mutation letal und die Embryonen zeigen Abnormalitäten in der Verlängerung der Körperachse. Während der Kopf normal angelegt wird, werden Rumpf und Schwanzbereich nicht weiter entwickelt (Chesley 1935).

T-box Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren die sich durch eine charakteristische DNA-Bindedomäne, der namensgebenden T-box auszeichnen (Kispert et al. 1993; Kispert et al. 1995).

Im Laufe der letzten Jahre konnten verschiedene weitere T-box Gene in der Maus, aber auch in anderen Spezies identifiziert werden (Pflugfelder et al. 1992; Bollag et al. 1994). T-box Gene sind von Hydra (*Hydra vulgaris*) bis hin zum Menschen konserviert (Technau et al. 1999; Yi et al. 1999; Papaioannou 2001).

Die phylogenetische Analyse hat gezeigt, daß T-box Gene im Laufe der Evolution aus einem „Vorläufer“-Gen durch Genduplikationen und Gentranslokationen entstanden sind (Agulink et al. 1996). Die Numerierung der T-box Gene korreliert (bis auf einige Ausnahmen) mit der zeitlichen Abfolge ihrer Entdeckung: Tbx1; Tbx2; usw. (Papaionnou et al. 1999). T-box Gene lassen sich aufgrund ihrer Verwandtschaft in einem phylogenetischen Stammbaum darstellen. Es lassen sich 5 verschiedene Subfamilien identifizieren: T-Subfamilie; Tbr1/Eomes-Subfamilie; Tbx6-Subfamilie; Tbx2-Subfamilie und die Tbx1-Subfamilie. Sowohl Tbx18 als auch Tbx15 (früher Tbx8) und Tbx22 bilden einen Unterarm der Tbx1-Subfamilie (s.a. Abbildung 6).



Mutationen in einigen T-box Gene sind mit menschlichen Krankheiten assoziiert. Deletionen von Tbx1 führen im Menschen zum DiGeorge-Syndrom; Patienten mit Mutationen in Tbx3 zeigen das Ulnar-Mammary-Syndrom, Mutationen von Tbx5 führen zum Krankheitsbild des Holt-Oram-Syndrom und Mutationen im Tbx22 Gen führen zur Bildung einer Gaumenspalte und zum Verwachsen der Zunge mit dem

Boden der Mundhöhle (Chieffo et al. 1997; Bamshad et al. 1997; Basson et al. 1997; Braybrook et al. 2001).

Mit Hilfe verschiedener Tiermodelle konnte die Funktion von verschiedenen T-box Genen gezeigt werden. Ihre wesentliche Funktionen ist die der Bildung, Musterung und Differenzierung des Mesoderms (Papaioannou 2001, Showell et al. 2004).

Kispert et al. (1993) konnte zeigen, daß das T-Protein an eine spezifische DNA-Sequenz bindet, die als T-Bindungsstelle bezeichnet wurde. Bei der T-Bindungsstelle handelt es sich um eine palindromische Sequenz aus zwei Halbseiten (TTTCACACCT). Für eine ganze Reihe von T-box Proteinen binden ebenfalls an diese Bindungsstelle bzw. Variationen binden können (Kispert et al. 1993; Ghosh et al. 2001; Sinha et al. 2000; Lingbeek et al. 2001). Aufgrund der Röntgenkristallstruktur von dem T-Protein und von Tbx3 ist bekannt, daß diese als Homodimere an die palindromische T-Bindungsstelle binden können (Müller et al. 1997; Coll et al. 2002). In Lösung liegt das T-Protein als Monomer vor und zeigt erst in der Gegenwart der T-Bindungsstelle eine Dimerisierung (Müller et al. 1997). Daß es sich dabei um einen kooperativen Mechanismus handelt, konnte sowohl mittels biochemischer Experimente als auch in vivo gezeigt werden (Sinha et al. 2000; Kusch et al. 2002). In *Drosophila* zeigt das Brachyury-Homolog *Brachyenteron* eine kooperative Aktivierung des direkten Zielgens *orthopedia*. In dem Promoter befinden sich mehrere unterschiedlich affine Bindungsstellen. Nach der Bindung von an die hochaffinen Bindungsstellen, werden die weniger affinen Bindungsstellen besetzt und somit die Transkription kooperativ aktiviert (Kusch et al. 2002). Dieser kooperative Mechanismus könnte eine Ursache für Haploinsuffizienz einiger T-box Faktoren sein.

Über die Kontrolle von Zielgenen durch T-Box Proteine ist für diese Transkriptionsfaktorfamilie ist wenig bekannt. Nachdem viele genetische Analysen die Bedeutung von T-box Faktoren nicht nur in der Embryonalentwicklung gezeigt haben, fokussieren molekulare Analysen die Aspekte der Regulation von T-box Genen und die Regulation von Zielgenen durch diese (Habets et al. 2002; Stennard et al. 2003; Christoffels et al. 2004).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. eine biochemische Analyse des Tbx18-Proteins durchgeführt werden. Dazu wurden Untersuchungen zur Kernlokalisation und zur DNA-Bindung des Tbx18-Proteins durchgeführt.

Durch homologe Rekombination in ES-Zellen wurde eine Mausmutante für Tbx18 generiert. Damit konnte eine funktionelle Analyse von Tbx18 in der Somitenentwicklung der Maus durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Geräte

Agarose: Invitrogen

Antibiotika: Ampicillin-NaSalz (Roth)

Autoradiographie: Kodak X-OMAT AR 5 Filme (43 x 35 cm und 23 x 18 cm), Kodak-Kassetten mit Verstärkerfolien (DuPont Cronex)

Computer: Apple Macintosh Imac

Software: Office:mac v.X. (Microsoft),
Filemaker pro 6.0 (Filemaker),

Mac Vector 7.2 (Accelrys),

Photoshop 7.0 (Adobe)

Enzyme, Biochemikalien, Kits für die Molekularbiologie:

5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (Roche), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente (Roche), Antigen unmasking solution (VectorLabs), Blocking Reagent (Roche), BM Purple AP Substrate (Roche), BSA (New England Biolabs), DIG-Labeling-NTP-Mix (Roche), DNase I (Roche), Klenow-Fragment (NEB), Lysozym, Proteinase K (Roche), Restriktionsendonukleasen (NEB, Fermentas), RNase A (Roth), Rnasin (Promega), SP6 RNA Polymerase (Roche), Pwo-Polymerase (PeqLab), Proteinmarker (Prestained P.. marker, NET), T3 RNA Polymerase (NEB), T4 DNA Ligase (Fermentas, Boehringer), T4 Polynukleotidkinase (Pharmacia), T7 RNA Polymerase (NEB), 1 kB Leiter (GibcoBRL), Taq DNA Polymerase (Sigma), Vectastain DAB

Substrate Kit für Peroxidasen (VectorLabs), Vectastain Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (PK4001, Vector), Vectastain Peroxidase-Mouse-on-Mouse-Kit (PK2200, Vector)

Feinchemikalien und gebrauchsfertige Lösungen:

10x Transkriptionspuffer (T7, T3, SP6), Agarose, Alzianblau 8GX, Bouins-Lösung, Bromphenolblau, Chloroform, DAPI, DEAE-Dextran, Diethylpyrocarbonat, DMSO, EGTA, Eosin Y-Lösung, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Ethanol, Ethidiumbromid, Formaldehyd, Formamid, Glukose, Glutaraldehyd, H₂O₂, Hämatoxylin-Lösung, Heparin, Hydrazin, IPTG, Isopropanol, Kalium-Ferricyanid, Kalium-Ferrocyanid, Lithiumchlorid, Methanol, MOPS, Mowiol, NP40 (Igepal), Nuclear Fast Red Lösung, Paraformaldehyd, Permout, Phenol, Rotihistol, Saccharose, SDS, Spermidin, TEMED, Triethanolamin, Triton X-100, Tween-20, X-Gal, Xylenorange, b-Mercaptoethanol, (Amersham, BioRad, Boehringer, Pharmacia, Fluka, Gibco, Roth, Sigma, GibcoBRL, Vector, Riedel-de-Häen, Fisher Chemicals, J.T.Baker)

Filterpapier: DEAE-Papier NA45, Faltenfilter (Schleicher&Schüll),
3 MM, Benchkote, DE-81 Filterpapier (Whatman),

Geldokumentationskammer: Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE

Gelelektrophoresezubehör: Eigenbau und BioRad
Transblot SD; BioRad

Glaswaren: Objektträger: Superfrost plus (Menzel),

Deckgläser: 24x60mm (Roth)

Grobchemikalien: p.A. Qualität (Fluka, Merck, Sigma, Roth, AppliChem, J.T.Baker)

Heizplatte: Schott

Hybridisierungsöfen: mit Kippschüttler (Amersham)
mit Drehschüttler (Biometra)

Inkubatoren: Wasserbäder (GfL)

Immunoreagenzien: G-anti-Maus,IgG;FITC Santa-Cruz
G-anti-Maus,IgG;HRP Santa-Cruz
G-anti-Kaninchen, IgG, FITC Santa-Cruz
G-anti-Kaninchen IgG; HRP Santa-Cruz
Maus-anti-c-myc (9E10) Roche
Kaninchen-anti-c-myc Bethyl Laboratories

Ratte-anti-N-CAM (H28-123-16) Roche
Maus-anti-P160 (H2H3) Dev. Studies
Mouse-anti-5-Bromo-2'-deoxy-Uridin IgG Roche
BrCH-Sepharose; Pharmacia
GSH, Pharmacia
GST-Sepharose, Pharmacia
Protein-A-Agarose, Roche

Trockeninkubatoren (Memmert)

Laborbedarf, allgemein: Multimed, KDL, Kimberly-Clark

Medien: Bactoagar, Hefeextrakt, (Gibco)

Trypticase Pepton (BBL)

Medien f. Zellkultur: GibcoBRL; Sigma

Membranfilter: Hybond-C; HybondN-Plus (Amersham)

Mikropipetten: 0,5-10 ml, 10-20 ml, 20-100 ml, 100-1000 µl (Eppendorf)

Mikroskope: Leica MZ75,
Leica M420 mit FUJI Digitalkamera HC3002,
Leica MZFLIII mit UV-Lampe ebq 100 (Leistungselektronik Jena GmbH)

Stereomikroskop Axioplan (Zeiss) mit Digitalkamera ProgRes C14 (Jenoptik) und UV-Lampe (Zeiss)

Mikrotom: Leica RM2155

Mikrowellenofen: LG

Netzteil: Biorad Powerpack 300

pH-Meter: WTW

Photometer: Eppendorf BioPhotometer

Plastikwaren: Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma

Präparierbestreck: Fine Science Tools

Radioaktivität: ^32P -ATP, ^32P -dCTP-3000 Ci/mmol (Hartmann Analytic),

Rundschüttler (Infors HT),

Röntgenfilmentwickler: Amersham pharmacia biotech, Hyper processor

Säulenmaterialien: Sephadex G50 (Pharmacia),

NucleoSpin-, NucleoBond-Säulen (Macherey&Nagel)

Schüttler und Rührer: Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL

Szintillationszähler: Gerät Beckmann LS 6000SE

Thermoblock: Eppendorf ThermoStat plus
 Thermocycler: Primus, Primus 96 plus (MWG-Biotech)
 Thermomixer: Eppendorf 5436, HLC
 Trockenplatte: Medax
 UV-Lampen: UV Stratalinker 2400 (Stratagene)
 Waagen: Kern
 Wasser: Leitungswasser doppelt deionisiert (Millipore Ionenaustauscher)
 Zentrifugationszubehör: 50 ml und 400 ml Becher (Beckman)
 Zentrifugen: Eppendorf Tischzentrifuge 5415D,
 Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20,
 Heraeus Biofuge13 und Biofuge15
 Zellkulturbedraht: Heraeus

2.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der MWG AG Biotech (Ebersberg) lyophilisiert bezogen, in Milli-Q H₂O gelöst und auf 100 pmol µl⁻¹ eingestellt.

Liste der verwendeten Oligonukleotide:

Oligoname	Oligosequenz
AKO0231	CCGGCTTTGGTGATGATC
AKO0364	GCTGCAGTTGCACTGAATTCGCCTC
AKO0365	CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCCG
AKO0366	CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTCCG(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT) (AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(A GCT)GAGGCGAATTCAGTGCAACTGCA
AKO0367	CAGCAGGACATATGGCGGAGAAGCGGAGG
AKO0368	CTTCATCAGACCATATGTGC
AKO0395	GAGGATCCTTTGAAGATATCCCTGGAA
AKO0396	GAGGATCCTACGTGAGTG TGAGCAG
AKO0397	GAGGATCCCACCAGAGTTCTTACAAC
AKO0398	GTGAATTCGCAGAGTTAACTTCCTAGGG
AKO0399	GTGAATTCCTTGGGAAGAAACAATTTTCTC
AKO0400	GTGAATTCTCCCATCAGTGCCGCCCATG
AKO0405	TACGGCCGAGTTCCTGCTTCCTCGGATCCC
AKO0406	GTGCGGCCGCATATCCATGGTCGCCTCCCCGAGCCCGCTC
AKO0457	ATGAATTCTGCAGCTCTCAGTCAAAGT
AKO0458	ATGAATTCCTGGCACATTTGAAATACAG
AKO0459	ATGAATTCTATTTATAAGCGAGTTATG
AKO0460	ATGAATTCGGGATCTTCTAGCACAGTTC

AKO0480	GGGAATTTACACCTAGGTGTGAAATTCCC
AKO0487	GCGCGGAAAAGGGCTCGG
AKO0488	GGATCATCTCAGGGCCAG
AKO0557	GGACAACAAGAGATACAGGTA
AKO0558	TCTGATAGGCAGTGACAGTTG
AKO0561	CACAGGACTAGAACACCT
AKO0562	GCTGGTGAAAAGGACCTC
AKO0580	GGGGATTGGTGGCGACG
AKO0581	CAGCCGCTACAGTCAACAG
AKO0586	TCACCCGTGCACCGCTGG
AKO0587	GCTCCAGGAGTCGTCGCC
AKO0654	GAAAACCTGGTGGCACAATTC
AKO0676	GATCCGGAGGTGTGAAATTTACACCTGGA
AKO0677	GATCTCCAGGTGTGAAATTTACACCTCCG
AKO0678	GATCCGGAGGTGTGAATTCACACCTGGA
AKO0679	GATCTCCAGGTGTGAATTCACACCTCCG
AKO0680	GATCCGGTGCAGTAGGTGTGAAATCGCACC TGGGGA
AKO0681	GATCTCCCAGGTGCGATTTACACCTACTGCACCG

2.3 DNA-Vektoren und rekombinante Plasmide

2.3.1 Klonierungsvektoren

Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurde der Vektor pBluescript KS II (pKS) der Firma Stratagene verwendet. Dieser Vektor besitzt einen Polylinker innerhalb der kodierenden Sequenz des α -Fragmentes der bakteriellen α -Galaktosidase (LacZ). Der Vektor erlaubt eine sogenannte Blau/Weiß-Selektion der Bakterienklone, wenn diese auf LB-Platten mit X-Gal und IPTG ausplattiert werden. Da der Polylinker durch die beiden Primer-Sequenzen T3 und T7 flankiert wird, eignet sich dieser Vektor auch zu Generierung von RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierung.

pKS.tbx18.cDNA(3.0):

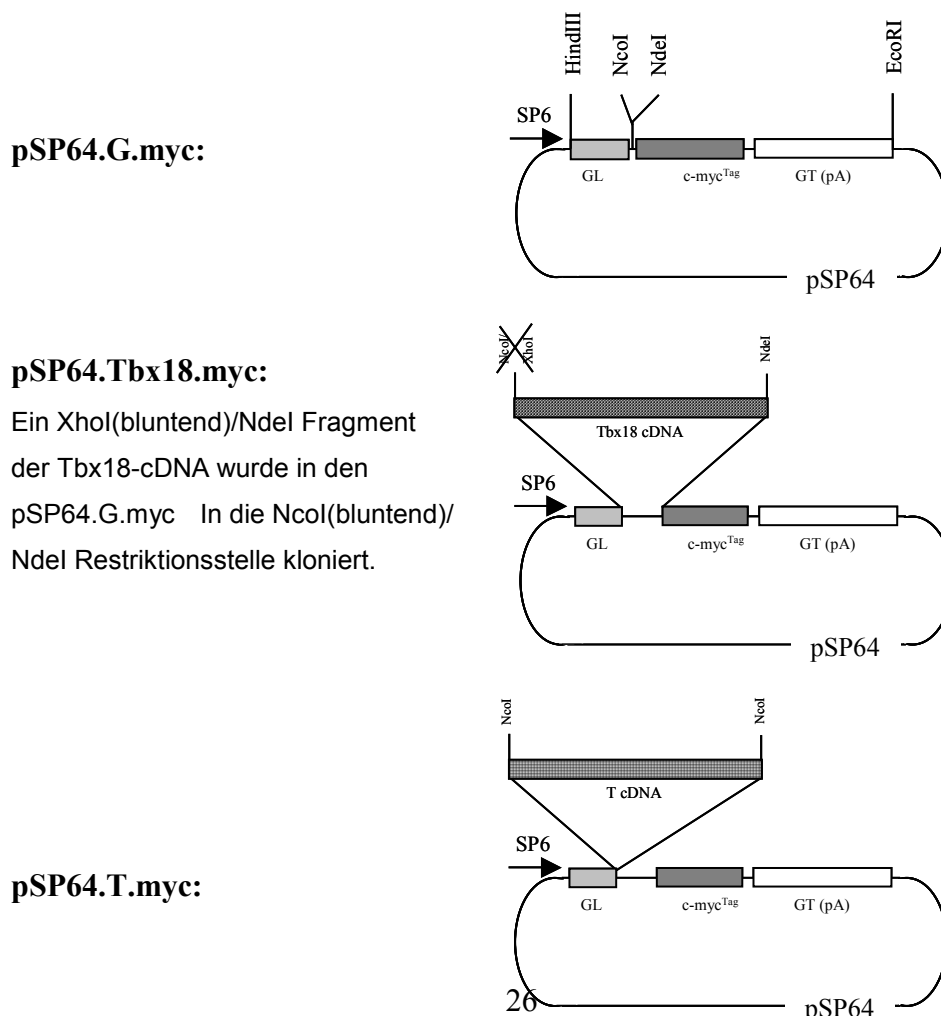
2764bp EcoRI cDNA-Fragment des murinen Tbx18-Gens aus einer 8,5d cDNA Bibliothek (Genebank accession number: AL035694; Kraus et al. 2001)

2.3.1 Transkriptionsvektoren

pSP64.G.myc-Familie:

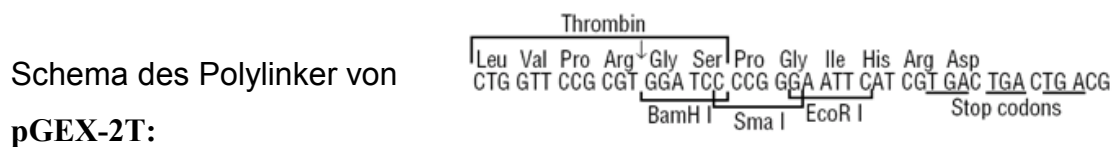
Bei dem pSP64.G.myc Vektor handelte es sich um einen modifizierten Expressionsvektor, der freundlicherweise von Prof. A. Kispert zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor kann dazu benutzt werden, um mit der SP6-Polymerase RNA einer entsprechenden cDNA zu synthetisieren. Dem Transkriptionsstart folgt ein 55bp großes Fragment des *Xenopus leavis* β -Globinleaders (HindIII/NcoI-Fragment), das eine hohe Translationseffizienz in einem Retikulozytenlysat erlaubt. Dem β -Globinleader folgt ein Fragment, das für das humane c-myc-Epitop codiert. Wird ein cDNA-Fragment in die NcoI- oder darauffolgende NdeI-Schnittstelle „in frame“ kloniert, erlaubt dieses Konstrukt die Expression eines Fusionsproteins mit einem c-myc-Epitop. Diesem folgt ein β -Globintrailer mit einem polyA-Signal zur Stabilisierung der generierten RNA.

Schema der verwendeten pSP64-Expressionsvektoren:



2.3.2 Prokaryontische Expressionsvektoren

Für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen, wurde der Vektor pGEX-2T der Firma Amersham verwendet. Dieser Vektor kodiert das Glutathion-S-Transferase (GST) Gen von *Schistosoma japonicum* gefolgt von einem Polylinker und drei STOP-Codons in verschiedenen Leserastern.



pGEX.Tbx18.GST1 :

Mit Hilfe der Primer AKO0395 (1457bp) und AKO0398 (2183bp) wurde ein DNA-Fragment von Tbx18 (pKS.Tbx18.3,0kb) amplifiziert. Dieses Fragment kodiert für den C-Terminus von Tbx18. Das Fragment wurde als BamHI/EcoRI-Fragment direktional in pGEX-2T kloniert.

pGEX.Tbx18.GST2:

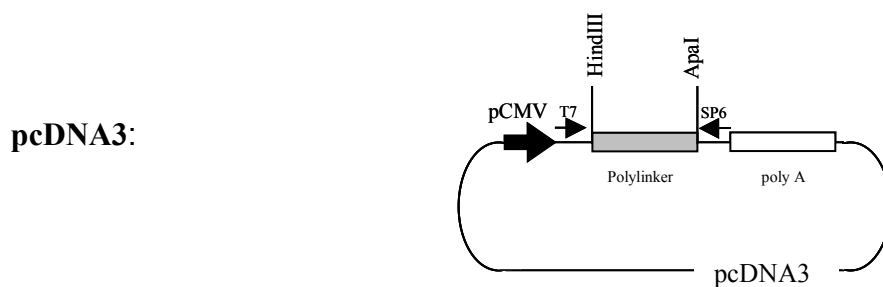
Mit Hilfe der Primer AKO0396 (1757bp) und AKO0398 (2183bp) wurde ein Fragment der Tbx18 cDNA aus dem Plasmid pKS.Tbx18.3,0kb amplifiziert. Dieses Fragment kodiert für den C-Terminus von Tbx18. Das Fragment wurde als BamHI/EcoRI-Fragment direktional in pGEX-2T kloniert.

pGEX.hLIF:

Das Plasmid pGEX.hLIF wurde freundlicherweise von Frau Schuster Gossler zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt wurde für die Expression des menschlichen Leukemia Inhibitor Faktor (hLIF) eingesetzt. Beim hLIF handelte es sich um ein 19,7kDa großes Protein, welches eine 78%ige Aminosäure Sequenzidentität mit dem murinen LIF aufweist. hLIF wurde zur Kultivierung von murinen Embryonalen Stammzellen dem Medium zugesetzt, um die spontane Differenzierung der ES-Zellen zu unterbinden (Carpenter et al,1999). Mittels Thrombin Protease, konnte das hLIF vom GST freigesetzt werden.

2.3.3 Eukaryontische Expressionsvektoren

Der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3 der Firma INVITROGEN diente als Ausgangsvektor für die in der Folge aufgelisteten Konstrukte. Dieser Vektor erlaubt die Expression einer cDNA unter dem starken Cytomegalovirus Promoter (CMV-Promoter). Dank eines T7 Promoters können auch *in vitro* Translationen durchgeführt werden.



pcDNA3.Tbx18

Ein XhoI/DraI-Fragment der *Tbx18* cDNA wurde in die XhoI bzw. die XbaI (bluntend) Schnittstelle des pcDNA3 Vektors einkloniert. Dieses Fragment kodiert für das komplette Offene Leseraster des *Tbx18*-Gens.

pcDNA3.Tbx18.myc

Ein HindIII/EcoRI-Fragment wurde aus dem Expressionsvektor pSP64.Tbx18.myc in den pcDNA3 Vektor direktional einkloniert. Dieser Vektor erlaubt die Expression von Tbx18 mit dem humanem c-myc Epitop.

pcDNA3.T.myc:

Ein HindIII/EcoRI-Fragment wurde aus dem Vektor pSP64.T.Myc in den pcDNA3-Vektor einkloniert.

2.3.4 Fluoreszenz-Expressionsvektoren:

Zur Transfektionskontrolle wurden verschiedene EGFP-Expressionskonstrukte eingesetzt. Dabei handelte es sich um Expressionsvektoren der Firma Clontech. Zum Einsatz kamen Vektoren mit dem EGFP beziehungsweise den destabilisierten Versionen pd1EGFP-N1 und pd2EGFP-N1. Bei EGFP handelt es sich um ein GFP mit zwei Aminosäuresubstitutionen (Phe-64 zu Leu; Ser-65 zu Thr). Daneben kam die rote Variante pDsRed-N1 (Clontech) bei Transfektionen zum Einsatz.

Zur Generierung eines Expressionskonstruktes, bei dem die cDNA von *Tbx18* unter der Kontrolle des MSD-Promoters stand, wurde eine modifizierte Version des pd1EGFP-N1 Vektors (Clontech) eingesetzt. Dazu wurde zuerst die AflII-Schnittstelle am 3'-Ende des PolyA-Signals durch Öffnen und anschließendes Auffüllen mit Klenowpolymerase zu einer PacI-Schnittstelle mutiert → pd1EGFP-PacI.

Das Mesoderm spezifische Element (MSD) mit dem Minimalpromoter des *Dll1*-Gens wurde mit der cDNA von *Tbx18* in den Polylinker des pd1EGFP-PacI Vektors (XhoI/SmaI-Schnittstellen) einkloniert. Dazu wurde ein 2,1kb großes Fragment der *Tbx18*-cDNA als XhoI/DraI Fragment in den Shuttlevektor pSackKiss kloniert und anschließend als HincII-Fragment wieder freigesetzt, um dieses Fragment in die SmaI-Seite des pd1EGFP-PacI Vektors zu klonieren. Bei der Transkription entsteht ein Fusionstranskript, mit dem kodierenden Bereich der *Tbx18*-cDNA und dem kodierenden Bereich der GFP-cDNA. Der MSD-Promoter wurde als Xho/KpnI-Fragment direktional in den pd1EGFP-PacI Vektor kloniert. Ein XhoI/PacI-Fragment wurde später für Pronukleus Injektionen zur Generierung eines MSD::*Tbx18* Transgens benutzt. Die Expression des Transgens konnte mit einer Sonde gegen das EGFP-Gen nachgewiesen werden.

2.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Transformationskompetenz	Genotyp
<i>E.coli</i> XL-1 blue (Stratagene)	elektrokompetent	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, LacI ^q ZΔM15, Tn10(tet ^r)];
<i>E.coli</i> XL-10 gold (Stratagene)	chemisch-kompetent	(mcrA)183 .(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].
DH5α (CLONTECH)	chemisch-kompetent	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rK-,mK+), recA1, relA1, supE44, thi-1, D(lacZYA-argFV169),
M15 [pREP4] (Qiagen)	chemisch-kompetent	nal ^S , str ^S , rif ^S , lac ⁻ , ara ⁻ , ga ⁻ , mtl ⁻ , F ⁻ , recA ⁺ , uvr ⁺ , [pREP4(kanamycinR)]

2.5 Zellelinien

Zelltyp:	Beschreibung:	Quelle:
HEK293T	Menschliche, embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch SV40 T Antigen ATCC: CRL-11268	A. Kispert
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i> Nierenzelllinie, transformiert durch SV40 T Antigen ATCC: CRL-1651	A. Kispert
NIH/3T3	Fibroblasten-Zelllinie, durch 3T3-Protokoll immortalisiert	A. Kispert
ES-Zellen	Maus embryonale Stammzellen Als Passage P13 erhalten.	K. Schuster-Gossler

2.6 Versuchstiere

Versuchstiere wurden unter photogenfreien Bedingungen im Tierhaus der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten.

Es wurden folgende Mausstämme benutzt: NMRI, Fvb, C57Bl6, Tbx18, Tbx18.LacZ, Tbx18.EGFP, Tbx18.EGFP Δ neo, Dll1 (Hrabé de Angelis M et al, 1997).

Für die Generierung von Embryonen mit verschiedenen Tbx18-Allelen wurden die Mäuse auf einem gemischten Hintergrund gehalten.

2.7 DNA-Methoden

2.7.1 Lösungen und Puffer

Auftragspuffer (DNA)	50mg/ml Orange blue, 30% Glycerol in 1x TAE
Church-Puffer	300mM NaPi pH 6,7, 7% SDS, 5mM EDTA
Denaturierungslösung	0.5M NaOH, 1.5M NaCl
HEX1	125mM MgCl ₂ , 250mM 2-Mercaptoethanol, je 0,5mM dATP dGTP und dTTP, 625mM TRIS-HCl pH 8,0
HEX2	600mM HEPES pH 6,6 mit NaOH
HEX3	900OD/ml Random Primer in TE
Hexamer-Markierungs-Puffer	Lösung aus HEX1:HEX2:HEX3 (2:5:3)
IPTG	2% in H ₂ O
KCM-Puffer (10x)	500mM KCl, 150mM CaCl ₂ , 250mM MgCl ₂
Lösung-I	50mM Glukose, 10mM EDTA, 25mM TRIS-HCl pH 8.0
Lösung-II	1% SDS, 0.2N NaOH
Lösung-III	5M KAc pH 6.0
Natriumacetat	3M in H ₂ O pH 5,5
Neutralisierungslösung	50 mM NaPi pH 6,7
PCR-Standard-Puffer	500mM KCl, 10-30mM MgCL ₂ , 100mM TRIS-

	HCl pH 8,5; alternativ mit 50% Glycerin oder DMSO bzw. 0,2% Tween-20
Phenol/Chloroform	1:1, TE-äquilibriert
S1-Puffer	10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, 50mM TRIS-HCl pH 8.0
S2-Puffer	1% SDS, 200mM NaOH
S3-Puffer	2.8M KAc pH 5.1
STET-Puffer	8% Sucrose, 0.5% Triton X-100, 50mM EDTA, 10mM TRIS-HCl pH 8.0
TAE (50X)	50mM EDTA, 2M TRIS-Acetat pH 8,0
TE Puffer	1mM EDTA, 10mM TRIS-HCl pH 8,0
TSB-Puffer	10% PEG(3500), 5% DMSO, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄
Wash II-Lösung	40mM NaPi pH 6,7, 1% SDS
X-Gal.	2% in Dimethylformamid

2.7.2 Medien und Agarplatten

LB	10g Bactotrypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl mit auf pH 7,2 einstellen, autoklaviert
LB/Amp.	LB mit 100µg/ml Ampicillin
LB/Kan.	LB mit 50µg/ml Kanamycin
LB-Agar	LB mit 1,5% Bactoagar, autoklaviert
2YT	15g Bactotrypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl auf pH 7,2 einstellen, autoklaviert
TB-A	12g Bactotrypton, 24g Hefeextrakt, 4ml/l Glycerin auf 900ml H ₂ O, autoklaviert
TB-B	0.17M KH ₂ PO ₄ , 0.72M K ₂ HPO ₄ ,
TB	TB-A:TB-B (9:1)
X-Gal-Agar	30µl X-Gal-Lösung und 30µl IPTG-Lösung auf LB/Amp.-Platten ausgestrichen

2.7.3 DNA-Präparationen

2.7.3.1 Alkalische Lyse-Methode

Diese DNA-Präparationsmethode wurde benutzt, um DNA im kleinen Maßstab aus einer großen Zahl transformierter Bakterien zu gewinnen. Das Protokoll basiert auf der Methode von Birnboim und Doly (1979), verwendet jedoch Lösungen, der Firma Machery & Nagel für die Präparation von Säulen-gereinigter DNA.

3ml LB- oder TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Zur Inkubation wurden Glasröhrchen benutzt, die mit 150U_{pm} bei 37°C üN auf einem Schüttler fixiert waren. 1,5ml üN Kultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30sec (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 100µl Puffer-S1 resuspendiert. Zur kompletten Lyse der Bakterien wurden 200µl Puffer-S2 zugegeben und das Eppendorf-Reaktionsgefäß zum Mischen mehrere Male über Kopf geschwenkt und 5min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung und der damit bedingten Präzipitation von SDS, genomischer DNA und Proteinen, wurden 200µl Puffer-S3 hinzugegeben und für 5min auf Eis gelagert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (13.000U_{pm}, RT) für 10min sedimentiert, der die Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

500µl Phenol/Chloroform (1:1) wurden zugesetzt und durch Vortexen gemischt, um noch rückständige Proteine zu denaturieren. Durch Zentrifugation (13.000U_{pm}, RT) für 5min wurden wässrige und organische Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde weiterbenutzt, um durch Zugabe von 500µl Isopropanol die Plasmid-DNA mittels Zentrifugation (13.000U_{pm}, 10min, RT) zu sedimentieren. Die so gewonnene DNA wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

Diese Methode wurde gegenüber der STET-Methode bevorzugt, wenn die DNA für anschließende Experimente (z.B. mit Niedrig-Salz-Restriktionsendonukleasen) besonders sauber sein sollte.

2.7.3.2 STET-Methode

Diese Präparationsmethode (Delsal G et al, 1988) wurde benutzt, um Plasmid-DNA aus einer Vielzahl transformierter Bakterien zu gewinnen. Mit dieser Methode kann

sehr schnell Plasmid-DNA extrahiert werden. Die DNA ist jedoch ist diese nur von mäßiger Reinheit und somit meist nur in Restriktionsverdau einsetzbar.

1,5ml einer üN Bakterienkultur wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30sec bei 13.000Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakteriensediment wurde im rückständigem Medium durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 300µl Lysozym-haltiger STET-Puffer zugegeben und für 5min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (13.000Upm, RT, 10min) entstand ein Präzipitat aus Proteinen und hochmolekularer, genomischer DNA, daß sich mittels eines Zahnstochers oder Pipettenspitze leicht aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß entfernen ließ. Es wurde dann das gleiche Volumen Isopropanol und 40µl 3M NaAc pH 7,0 zugegeben und nach dem Mischen wurde die Plasmid-DNA sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50µl TE-Puffer aufgenommen.

2.7.3.3 Cäsium-Chlorid Gradienten-Methode

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen darzustellen, wurde die CsCl-Gradienten-Methode angewendet. Mittels dieser Methode konnte DNA von höchster Reinheit gewonnen werden.

100ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie üN in Gegenwart von geeigneten Antibiotika inokuliert. Nach 24h wurden die Bakterien durch Zentrifugation (JA20, 4000Upm, 15min, 4°C) sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes, wurden die Bakterien zuerst im verbliebenden Rückfluß resuspendiert, anschließend wurden 5ml Lösung-I hinzugegeben. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe von 10ml Lösung-II gewährleistet. Dabei wurden die zur Zentrifugation benutzten Plastikgefäße mehrere Male, vorsichtig über Kopf geschüttelt, um ein Scheren der genomischen DNA zu vermeiden. Dieser Ansatz wurde für 10min bei RT inkubiert, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten. Proteine, SDS und genomische DNA wurden durch Zugabe der Lösung-III präzipitiert und durch Zentrifugation (JA20, 10.000Upm, 15min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde dann in ein 50ml Falcon Plastikgefäß überführt um mit 17ml Isopropanol versetzt. Durch eine weitere Zentrifugation (10.000Upm, 15min, 4°C) wurde die Plasmid-DNA sedimentiert. Das Sediment wurde dann in 4,5ml TE aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Zu diesem Röhrchen wurde

dann 4,6g CsCl und 200µl Ethidiumbromidlösung zugegeben. Nach dem Abzentrifugieren (10.000Rpm, 15min, 4°C) wurde der Überstand in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und üN mit 50.000Upm in einer Ultrazentrifuge (VTI65) zentrifugiert. Nach 24h wurde die Zentrifugation gestoppt und die DNA-Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Spritze, die knapp unterhalb der Bande in das Röhrchen gestochen wurde, abgesaugt. Das Ethidiumbromid wurde durch Ausschütteln (3x) mit Isoamylalkohol entfernt. Zum Schluß wurde die Plasmid-DNA nach Zugabe von 1x Volumen Isopropanol durch Zentrifugation (10.000Upm, 15min, 4°C) sedimentiert. Die DNA wurde dann in 200µl TE aufgenommen, die Konzentration und Reinheit wurden mittels Photometer bestimmt.

2.7.3.4 DNA-Präparation mit Säulen

Um DNA in größerem Maßstab und von hoher Reinheit zu gewinnen, wurden Säulen der Firma Machery & Nagel (NucleoBond® PC 100, #740573) eingesetzt. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellerprotokolls genau befolgt. Säulengereinigte DNA wurde u.a. für Transfektionen, *in vitro* Transkriptionen und Sequenzierungen eingesetzt.

2.7.4 Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

2.7.4.1 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Mittels Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch geschnitten werden. Es wurde prinzipiell zwischen analytischen und präparativen Restriktionsendonukleaseverdaus unterschieden. Um Plasmid-DNA analytisch zu verdauen wurden i.d.R. 0,5µg DNA in 20µl Gesamtvolumen mit 10U Enzym verdaut. Es wurden jeweils die von den Herstellern empfohlenen Puffer sowohl für Einzel- als auch für Doppel-Verdaus eingesetzt. Bei Inkompatibilität zweier Enzyme wurde die DNA nach dem ersten (Einzel-)Verdau Ethanol-präzipitiert und anschließend im geeigneten Puffer für das zweite Enzym aufgenommen.

Für präparative Verdaus wurden 5-10µg DNA in 50-100µl Gesamtvolumen mit 10-20U Enzym inkubiert.

Für die Genotypisierung mittels Southern-Blot wurden 20-30µl (abhängig von der DNA-Menge) Phenol/Chloroform-extrahierte DNA mit 25U Enzym in 50µl Gesamtvolumen \times N inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte morgens eine weitere Zugabe von 1µl Enzym, um einen vollständigen Verdau der genomischen DNA zu gewährleisten. Nach weiteren 6-8h Inkubation erfolgte die Beladung des Agarosegels.

2.7.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Sowohl zur Analyse als auch zur Aufreinigung wurden DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden Agarosegele von 0,8-4% eingesetzt, abhängig von den Größen der zu trennenden Fragmente. Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht und anschließend wurde Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 0,4µg/ml zur Visualisierung der DNA hinzugesetzt. Die DNA-Proben wurden zuvor mit entsprechender Menge an 6x Auftragspuffer versetzt. In einer entsprechenden Gelkammer mit 1x TAE wurde das Gel eingesetzt, die Auftrennung wurde durch eine konstante Spannung von 10-100 Volt gewährleistet. Für das Auftrennen von genomischer DNA für Southern-Blot wurden die Gele grundsätzlich bei 10-20 Volt \times N gefahren, um eine adäquate Auftrennung großer Fragmente zu ermöglichen.

2.7.4.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Säulen-System (QiaQuick) der Firma Qiagen. Die Durchführung folgte den Anweisungen des Herstellers. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit einem TRIS-Puffer. Für die Ligation von DNA-Fragmenten \geq 2 kb wurde die eluierte DNA Ethanol-präzipitiert und anschließend in MilliQ-H₂O aufgenommen.

2.7.5 DNA-Modifikationen und radioaktive Markierungen

2.7.5.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation von linearisierten DNA-Vektoren zu vermeiden, wurden die DNA-Vektoren mit Hilfe Alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase; CIP, Roche) dephosphoriliert. 10µg linearisierter Vektor wurden in entsprechendem CIP-Puffer aufgenommen und mit 3U CIP für 2h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Da die DNA anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt wurde, konnte auf eine Phenol/Chloroform-Extraktion verzichtet werden.

2.7.5.2 Phosphorylierungen von DNA-Fragmenten

Es wurden Phosphorylierungen sowohl zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, als auch Phosphorylierungen von Oligonukleotiden zum Einsatz bei Ligationen durchgeführt.

Um Oligonukleotide in Vektoren zu klonieren, wurden jeweils 10pmol der einzelsträngigen Primer in 100µl 1x Polynukleotidkinase-Puffer (NEB) aufgenommen. Die gelösten Oligonukleotide wurden mit 1mmol ATP und 10U Polynukleotidkinase (PNK, NEB) für 30min bei 37°C inkubiert. Zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide wurde der Ansatz in einem Glasgefäß für 5min aufgeköcht (dabei wurde die PNK inaktiviert). Nach dem Aufkochen wurde das Glasgefäß für min. 8h in einen Styropor-Container gestellt um ein langsames Abkühlen und somit die Hybridisierung der einzelsträngigen Oligos zu doppelsträngigen Oligos zu gewährleisten.

Um Oligonukleotide radioaktiv zu markieren, wurden 1pmol dsOligos mit 3µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 1µl PNK-Puffer und 10U PNK in 10µl Gesamtvolumen für 30min bei 37°C inkubiert. Es wurden anschließend 90µl TE-Puffer zugegeben und durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 2000Upm, 5min, RT) des Ansatzes durch eine Sephadex G-50 Säule wurden die freien Nukleotide von den Oligos getrennt. Zur Verwendung der markierten Oligos für Gelretentionsexperimente wurde die Aktivität der Oligos auf 10.000CPM eingestellt. Mit ^{32}P -markierte Oligos wurden bei -20°C gelagert und bis zu einer Woche für Experimente eingesetzt.

2.7.5.3 Auffüllen rezessiver Enden mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment wird durch partiellen, proteolytischen Verdau der *E.coli* Polymerase gewonnen und erlaubt das Auffüllen von DNA-Fragmenten mit rezessiven Enden.

0,5µg DNA-Fragmente wurden mit 2µl Klenow-Polymerase.-Puffer (NEB), 1µl (1mmol/µl) dNTPs und 1µl Klenow-Polymerase (NEB) für 30min bei RT in 20µl Gesamtvolumen inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide und der Polymerase erfolgte durch Gelelektrophorese und anschließender Fragmentaufreinigung.

2.7.5.4 Markierung durch „Random Priming“

Um DNA-Fragmente für Southern Blots herzustellen wurde die sogenannte „Random Priming“ Methode eingesetzt. Nach dem Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA können kurze, „random“ Oligohexanukleotide binden. Die Klenow-Polymerase anschließend radioaktiv markierte Nukleotide einbauen.

Für die Markierung wurden 100ng DNA-Fragment in 33µl H₂O aufgenommen und für 5min aufgeköcht. Das Reaktionsgefäß wurde dann auf dicht gepacktes Eis für 5min überführt um ein schnelles Abkühlen der Reaktion und somit ein Hybridisieren der Hexamere zu gewährleisten. Kondensat wurde durch kurze Zentrifugation des Reaktionsgefäßes gesammelt. Dann wurden 10µl „Hexamer Markierungs“-Puffer, 1µl BSA (100x; 20 mg/ml) 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 µCi/µl) und 1µl Klenow-Polymerase (5U/ml) zugegeben und für min. 2h bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation des Ansatzes durch eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt. 1µl der eluierten Sonde wurde mittels Szintillations-Zähler gemessen; nach 5 minütigem Aufkochen der Sonde konnte diese direkt zum Hybridisierungspuffer gegeben werden.

2.7.6 Transfer von DNA auf Membranfilter (Southern Blot)

Zum Transfer von DNA auf Membranfilter wurde das Protokoll von Southern (1975) dahingehend modifiziert, daß auf den Neutralisierungsschritt nach alkalischen Denaturierung verzichtet wurde. Das vorliegende Protokoll setzt die Verwendung von Hybond-N⁺ Membranen der Firma Amersham voraus.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einer Geldokumentationsanlage (BioRad) dokumentiert. Damit insbesondere große DNA-Fragmente besser transferiert werden konnten, wurden die Gele für 15min in 0,2N HCl inkubiert. Nach vorsichtigem Abgießen und zweimaligen Waschen mit H₂O wurden die Gele zweimal für je 20min in Denaturierungslösung inkubiert. Zwei, in Denaturierungslösung getränkte Fließpapiere wurden auf eine Haushaltsfolie gelegt. Die Gele wurden dann kopfüber auf die Fließpapiere gelegt, die Haushaltsfolie wurde bis zum Rand der Gele eingeschlagen, sodass ein vollständiger Transfer über die gesamte Gelfläche gewährleistet war. Eine zuvor mit H₂O benetzte und anschließend in Denaturierungslösung befeuchtete Hybond-N⁺ Membran wurde über dem zu transferierenden Gel blasenfrei plaziert. Zwei weitere, ebenfalls in Denaturierungslösung getränkte Fließpapiere wurden über die Membran gelegt, gefolgt von einem ca. 10cm hohen Stapel aus Einmalpapiertüchern. Eine Glasplatte mit einem zusätzlichen Gewicht von ca. 200g diente zur Beschwerung der Apparatur. Der Transfer erfolgte für mehr als 12h. Mit einem Bleistift wurde nach der Beendigung des Transfers die Positionen der Geltaschen eingezeichnet. Im Anschluss wurden die Membranen in 0,5l Neutralisierungslösung für 5min inkubiert, um dann die DNA auf der Membran mittels UV-Lichts kovalent zu fixieren (Stratalinker, 2000J).

Die Membranen wurden entweder unmittelbar für die Hybridisierung weiterverwendet, oder zwischen zwei Fließpapieren trocken gelagert.

2.7.7 Filterhybridisierung

Die benutzten Lösungen WaschII und Church-Puffer wurden vor ihrer Verwendung auf 65°C vorgewärmt. Membranfilter, auf die DNA transferiert wurde, wurden kurz in Wasch II-Lösung angefeuchtet und in ein geeignetes Glasrohr überführt. Die Membranfilter wurden dann mit 20ml Church-Puffer für mindestens 2h bei 65°C unter ständigem Drehen vorinkubiert. Die benutzte DNA-Sonde (siehe Markierung mit „Random Priming“) wurde vor ihrer Verwendung für 5min bei 94°C denaturiert und direkt in 20ml vorgewärmten Church-Puffer gegeben. Der zur Vorhybridisierung benutzte Church-Puffer wurde abgegossen und durch den die Sonde-enthaltenen Church-Puffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Drehinkubator bei 65°C üN, mindestens jedoch für 12h.

Am folgenden Tag wurden die Membranfilter 3x für je 20min mit 20ml Wasch II-Lösung bei 65°C gewaschen. Schließlich wurden die Membranfilter zwischen zwei Haushaltsfolien auf einer stabilen Pappkarton angebracht und gegen einen Röntgenfilm bei -80°C exponiert. Abhängig von der Markierungsrate der verwendeten Sonde wurden die Filme für 1-7 Tage exponiert.

2.7.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgte im Wesentlichen den bei Maniatis (Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol I-III (Auch als "Maniatis" bezeichnet) bzw. den in den Current Protocols (Roger B et al, 2001) beschriebenen Protokollen. Einzelne Protokolle oder Methoden wurden modifiziert oder erweitert.

2.7.8.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte ausschließlich mit dephosphorylierten Vektoren. DNA-Fragmente mit rezessiven Enden lagen in einem Mol-Verhältnis von 3 Teilen DNA-Fragment auf 1 Teil Vektor vor. DNA-Fragmente mit nicht-rezessiven Enden lagen in einem fünffachen Überschuss im Vergleich zum Vektor vor, bei dieser Form der Ligation wurde dem Ansatz Polyethylenglykol hinzugegeben (Endkonzentration 5%) um die Ligationsrate zu erhöhen. Bei allen Ligationen wurde eine Gesamt-DNA Menge von 200ng nicht überschritten. Die Ligation kleiner Fragmente (<500bp) erfolgte bei RT für min. 2h, für größere Fragmente (>500bp) wurde der Ligationsansatz bei 14°C üN inkubiert.

Gereinigte DNA-Fragmente wurde üblicherweise in 20µl Gesamtvolumen mit 2µl Ligationspuffer und 1µl Ligase (PEG alternativ) inkubiert.

Für die Transformation in elektrokompetente Bakterien, wurde der Ligationsansatz nach der Inkubation Ethanol-präzipitiert und anschließend in 20µl Milli-Q H₂O aufgenommen.

Da *E.coli* DNA mit gebundenen Proteinen nur sehr ineffizient aufnehmen kann, wurden Ligationsansätze für chemisch-kompetente Bakterien (CaCl₂- und KCM-Methode) zuvor für 10min bei 65°C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren.

2.7.8.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2.7.8.2.1 Für CaCl₂-Methode

Eine einzelne Kolonie von einer neu ausgestrichenen Platte wurde benutzt um 5ml LB-Medium anzupflegen. Am nächsten Tag wurden 400ml LB-Medium (auf RT vorgewärmt) mit den 5ml üN-Kultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀=0,4, wurden die Bakterien für 15min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 15min bei 4°C in einem vorgekühlten Rotor (JA20, 4000U_{pm}) wurden die Bakterien sedimentiert. Dann wurde der Überstand verworfen, die Bakterien im Medium-Rückfluß resuspendiert. 200ml 0.1M CaCl₂-Lösung wurden hinzugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 20min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden ein weiteres Mal sedimentiert (s.o.) und anschließend in 4.4ml 0.1M CaCl₂, 10% Glycerin resuspendiert. Es wurden 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.7.8.2.2 Für KCM-Methode

Eine einzelne Kolonie einer neu ausgestrichenen Platte wurde benutzt um 5ml einer üN-Kultur anzupflegen. 4ml Kultur wurden benutzt, um 250ml LB-Medium anzupflegen. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0.9 bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C für 10min (Rotor JA20, 4000U_{pm}, vorgekühlt) wurden die Bakterien sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde dann in 25ml TSB-Puffer (eiskalt) resuspendiert und für weitere 10min auf Eis inkubiert. Aliquots von 0.2ml wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.7.8.2.3 Für Elektroporations-Methode

Eine einzelne Kolonie von einer neu ausgestrichenen Platte wurde benutzt um 5ml LB-Medium anzupflegen. Am nächsten Tag wurden 100ml LB-Medium (auf RT vorgewärmt) mit den 5ml üN-Kultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0,9 beendet. Die Bakterien auf je 4 große Zentrifugationsbehälter aufgeteilt und anschließend für 15min auf Eis inkubiert und schließlich durch Zentrifugation (JA20, 4000U_{pm}, 15min, 4°C) sedimentiert. Die Bakterien wurden dann in 4x250ml MilliQ-H₂O resuspendiert und durch

Zentrifugation (JA20, 4000Upm, 15min, 4°C) wieder sedimentiert. Die Resuspension erfolgte ein weiteres Mal mit 4x125ml MilliQ-H₂O und einmal mit 4x5ml 10% Glycerol, jeweils nach dem Sedimentieren durch Zentrifugation (Bed. s.o.). Der letzte Resuspensionsschritt erfolgte mit 4x0,5ml 10% Glycerol. Die Bakterien wurden in zu 50µl Aliquots mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.8.3 Transformation von Bakterien mit CaCl₂-Methode

Nach dem Auftauen auf Eis, wurden 10µl Ligationsansatz zu den 50µl kompetente Bakterien (DH5α) gegeben und weitere 20min auf Eis inkubiert. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit den Bakterien wurden dann in ein 42°C Wasserbad für exakt 90sec überführt. Der Hitzeschock wurde dann durch eine zweiminütige Inkubation auf Eis beendet. Damit die transformierten Bakterien die entsprechende Resistenz aufbauen konnten, wurden 200µl LB-Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Platten mit entsprechender Resistenz ausplattiert.

2.7.8.4 Transformation von Bakterien mit KCM-Methode

Bei dieser Transformationsmethode wurden XL-10 gold Bakterien verwendet. Diese Methode wurde für die Mehrzahl der Transformationen benutzt, da diese Bakterien mittels dieser Methode eine sehr hohe Transformationseffizienz aufwiesen.

10µl Ligationsansatz wurden mit 20µl 10x KCM-Puffer und 70µl MilliQ H₂O gemischt und auf Eis gelagert. Nachdem die kompetenten Bakterien (100µl Aliquots) auf Eis aufgetaut waren, wurde der in KCM-Puffer gelöste Ligationsansatz unter vorsichtigem Rühren zu den Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden 15min mit der DNA auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock von 90sec mit 42°C ausgesetzt. Nach dem Abkühlen für 2min auf Eis, wurden 1ml LB-Medium ohne Resistenz zugegeben und der Ansatz für 30min bei 37°C in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten mit entsprechender Resistenz ausplattiert.

2.7.8.5 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

DNA aus Ligationsansätzen wurde für Elektroporationen Ethanol-präzipitiert. 10µl eines Ligationsansatzes wurde nach der Präzipitation in MilliQ-H₂O aufgenommen

und zu 50µl elektrokompetenten Bakterien, die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben.

Dieser Ansatz wurde daraufhin in Elektroporationsküvetten, die ebenfalls auf Eis vorgekühlt wurden, überführt. Die Elektroporation wurde mit dem GenePulser der Firma BioRad durchgeführt und folgte den Gebrauchsanweisungen des Herstellers.

2.7.9 Selektion positiver Klone

Um Klone zu gewinnen, wurden die Ligationsansätze schließlich auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert. Es kamen sowohl Ampicillin-, als auch Kanamycin-Platten zum Einsatz. Bei Klonierungen mit dem pBluescript KS II-Vektor wurden Ampicillin-Platten verwendet, die zusätzlich noch X-Gal und IPTG enthielten.

2.7.10 Glycerin-Dauerpräparationen von Bakterienstämmen

Um Bakterienstämme dauerhaft zu lagern, wurden 700µl der entsprechenden Bakterienkultur mit 300µl Glycerin in einem 2ml Schraubgefäß gemischt und anschließend bei -80°C gelagert. Die so konservierten Bakterienstämme wurden benutzt, wenn eine neue DNA-Präparation eines Plasmids notwendig war.

2.7.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firmen MWG und AGOWA durchgeführt. DNA wurde entsprechend den Anforderungen durch Säulenpräparation aufgereinigt, um die notwendige Reinheit zu gewährleisten.

DNA-Sequenzanalyse wurden mit den Programmen MacVector (Version 7) und der Programm-Suite McMolly (Analyse) durchgeführt. Es kamen Computer der Firma Apple (G3 und G4) und den entsprechenden Betriebssystemen zum Einsatz.

2.7.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.7.12.1 PCR mit Taq-Polymerase

Bei PCR-Applikationen, die ohne hohe Lesergenauigkeit auskamen, wie z.B. Genotypisierungs-PCRs, wurde Taq-Polymerase verwendet. Generell wurden PCRs

in 50µl Gesamtvolumen angesetzt. Es wurde auf das Überschichten mit Mineralöl verzichtet, da die verwendeten PCR-Maschinen beheizte Deckel besaßen. Bei Amplifikationen von Plasmid-DNA wurde <5ng DN, bei Amplifikationen von genomischer DNA wurde 10-50ng DNA als Ausgangsmenge eingesetzt.

Zur Etablierung eines PCR-Protokolls, wurden meist mehrere PCR-Ansätze mit verschiedenen PCR-Puffern angesetzt. Dabei wurde einem Standard-Puffer (500mM KCl, 100mM TRIS-HCl und 10mM MgCl₂) in 10mM-Schritten MgCl₂ zugesetzt, um die optimale MgCl₂-Konzentration zu ermitteln. Ferner wurden verschiedene Zusätze, wie 50% DMSO, 10% Formamid, 10% Glycerol und 0,2% Tween-20 den Puffern zugesetzt.

Ein PCR-Ansatz wurde mit jeweils 1µl der entsprechenden Primern (10pmol/µl), 1µl Taq-Polymerase, 1µl dNTPs (10mmol) und 5µl PCR-Ruffer in 50µl Gesamtvolumen angesetzt.

Das PCR-Programm wurde den Bedingungen des zu amplifizierenden Produktes gewählt.

Ein PCR Programm bestand aus den folgenden Schritten:

94°C – 3min	

94°C – 30-45sec	
50-65°C – 30-60sec	20-35 Zyklen
72°C – 30sec-3min	

72°C – 10-15min	
8°C – Lagerung	

2.7.12.2 PCR mit Pwo-Polymerase

Um DNA-Fragmente für Expressionskonstrukte mittels PCR zu amplifizieren, wurde Pwo-Polymerase anstatt Taq-Polymerase verwendet. Dabei kam die Pwo-Polymerase von PeqLab mit den dazugehörigen Puffern zum Einsatz. Die PCR-Ansätze basierten auf dem PCR-Protokoll für die Taq-Polymerase, jedoch wurden der von der Firma empfohlene PCR-Puffer sowie die Pwo-Polymerase verwendet. Aufgrund der etwas geringeren Prozessivität der Pwo-Polymerase, wurde die Elongationsphase von 30sec pro 1000bp auf 1min pro 1000bp heraufgesetzt.

2.7.12.3 Spezielle Polymerase Kettenreaktionen für Genotypisierungen

2.7.12.3.1 PCR für Tbx18 Wildtyp und mutantes Allel

Dieses PCR-Protokoll wurde etabliert, um Tbx18-Knockout Mäuse zu genotypisieren, die ein LacZ-Allel mit einer Neomycin-Genkassette besaßen.

PCR-Ansatz:

1µl genomische DNA (1:10 in TE-Puffer verdünnt)
1µl Primer A (10pmol/µl)
1µl Primer B (10pmol/µl)
1µl dNTPs (10mmol)
0,5µl Taq-Polymerase
5µl 10x PCR-Puffer (Standard-Puffer plus: 20mmol MgCl₂,
50% DMSO)

50 µl Gesamtvolumen

Primer-Name:	Primer-Lokalisation:
AKO0231	Sense, bei Position 885bp in Tbx18 cDNA
AKO0487	Sense, in genomischer DNA, in Deletion
AKO0580	Sense, in LacZ-Kassette

Detektiertes Allel	Primer A	Primer B	Fragmentgröße
Wildtyp-Allel	AKO0487	AKO0231	700bp
Mutantes Allel	AKO0580	AKO0231	2,5kb

PCR-Programm:

94°C – 3min

94°C – 40sec

55°C – 40min

72°C – 2min 30sec

| 30 Zyklen

72°C – 10min

8°C – Lagerung

2.7.12.3.2 PCR für Tbx18-LacZ Wildtyp und mutantes Allel

Um Tbx18.LacZ-Mäuse bzw. Embryonen zu genotypisieren, konnte das gleiche Protokoll verwendet werden, welches bei der Genotypisierung von Tbx18-Mäusen (s.o.) zum Einsatz kam. Die Größe des mutanten Tbx18.LacZ-Allels betrug aufgrund der Deletion der Neomycin-Kassette nur noch 800bp, das Wildtypallel war 700bp groß.

2.7.12.3.3 PCR für Tbx18EGFP Wildtyp und mutantes Allel

Dieses PCR-Protokoll wurde etabliert, um Tbx18.EGFP-Mäuse zu genotypisieren, die ein EGFP-Allel besaßen.

PCR-Ansatz:

1µl genomische DNA (1:10 in TE-Puffer verdünnt)
1µl Primer A (10pmol/µl)
1µl Primer B (10pmol/µl)
1µl dNTPs (10mmol)
1µl Taq-Polymerase
5µl 10x PCR-Puffer (Standard-Puffer plus: 20mmol MgCl₂,
50% DMSO)

50 µl Gesamtvolumen

Primer-Name:	Primer-Lokalisation:
AKO0231	Sense, bei Position 885bp in Tbx18 cDNA
AKO0487	Sense, in genomischer DNA, in Deletion
AKO0630	Sense, in pd2EGFP-Kassette

Detektiertes Allel	Primer A	Primer B	Fragmentgröße
Wildtyp-Allel	AKO0487	AKO0231	700bp
Mutantes Allel	AKO0630	AKO0231	ca. 2kb

PCR-Programm:
 94°C – 3min

 94°C – 45sec |
 55°C – 45min |
 72°C – 2min 30sec | 30 cycles

 72°C – 10min
 8°C – Lagerung

2.7.12.3.4 PCR für MSD-Tbx18 transgene Mäuse

Mit diesem PCR-Protokoll wurden adulte Mäuse auf das Vorhandensein eines MSD::Tbx18-Transgen hin genotypisiert. Die PCR beruhte darauf, dass die verwendeten Primer ein Fragment aus der cDNA amplifizieren (500bp). Von genomischer DNA konnte kein Produkt amplifiziert werden, da die Primer auf zwei verschiedenen Exons hybridisierten.

1µl genomischer DNA (1:10 in TE verdünnt) wurde zusammen mit je 1µl der Primer AKO0557 und AKO0558, 1µl dNTPs (10mmol), 1µl Taq-Polymerase, 5µl 10x PCR-Puffer (Standard-Puffer mit 20mM MgCl₂ und 50% DMSO) in 50µl Gesamtvolumen gemischt. Es wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

3min - 94°C

 40sec - 94°C |
 40sec - 56°C |
 1min - 72°C | 30 Zyklen

 10min - 72°C
 Lagerung - 8°C

Anschließend wurden 25µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.7.12.3.5 PCR für Genotypisierungen von MSD-Tbx18 transgenen Embryonen

Mit Hilfe dieses Protokolls, konnten Homozygote von hemizygoten MSD::Tbx18-Embryonen unterschieden werden. Es wurde ein PCR-Protokoll etabliert, welches auf einer Quantifizierung eines endogenen genomischen Fragments und dem Transgen beruhte. Zur Quantifizierung der genomischen DNA, wurde eine PCR

gemacht, die ein Fragment aus dem Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase-Lokus (HPRT) amplifiziert. Ferner wurde im gleichen PCR-Ansatz ein transgen-spezifisches Fragment amplifiziert. Die Intensität, der beiden Fragmente wurde verglichen, um so die Kopienzahl (0, 1 oder 2 Kopien) des Transgens zu bestimmen. Die PCR wurde dreimal wiederholt um eine gesicherte Genotypisierung zu gewährleisten.

In einem PCR-Ansatz, wurden 1µl genomische DNA (unverdünnt) mit je 1µl der Primer AKO0561 (HPRT, sense), AKO0562 (HPRT, antisense), AKO0557 (Tbx18 cDNA, sense) und AKO0558 (Tbx18cDNA, antisense), 1µl dNTPs, 2µl Taq-Polymerase, 5µl PCR-Puffer (Standard-Puffer mit 20mM MgCl₂ und 50% DMSO), 5µl Q-Solution (Qiagen) in 50µl Gesamtvolumen gemischt.

PCR-Programm :

94°C – 4min

94°C – 30sec

56°C – 40 sec

72°C – 2min

| 30 Zyklen

72°C – 15min

8°C - Lagerung

Es wurden anschließend 25µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der erreichten Auftrennung der 1,1kb HPRT-Bande und der 500bp Tbx18(cDNA)-Bande, wurden das Gel mit einer elektronischen Geldokumentationsanlage (BioRad) dokumentiert. Mit einem Analyseprogramm (GelDoc) wurde die Intensität der Banden bestimmt und Werte in eine EXCEL-Tabelle (Microsoft) übertragen. Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm wurden die relativen Intensitäten von beiden Banden bestimmt. Aus diesen Werten wurden ein Diagramm erstellt, mit dem man ersehen konnte, welche Embryonen „Wildtyp“, hemizygot und homozygot waren.

2.8 RNA-Methoden

2.8.1 Lösungen und Puffer

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet

Antikörperlösung	0,4 µl Anti-Dig Alkaline phosphatase (1:5000) pro ml MAB/2% Blocking reagenz
Blocklösung	2% Boehringer Mannheim blocking reagent in MAB
Denhardt's (50x)	1% Ficoll, 1% BSA, 1% Polyvinylpyrrolidone, steril filtriert
DEPC-H ₂ O	1/100 Volumen 10% DEPC in MilliQ-H ₂ O, üN RT, dann autoklavieren
Hybridisierungspuffer (Schnitte)	50% Formamid, 5x SSC, 1x Denhardt`s, 0,1% Tween-20, 50ug/ml tRNA, 50ug/ml Heparin, pH 7,0
Hybridisierungspuffer (whole ,mount)	50% Formamid, 5x SSC, 1%SDS, 50ug/ml Hefe t-RNA, 50ug/ml Heparin, in DEPC-H ₂ O pH4,5
LösungI	50% Formamid, 5x SSC, pH 4.5, 1% SDS
LösungII	50% Formamid, 2x SSC pH 4.5, 0.2% SDS
MAB-Puffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
MEMFA-Puffer	100mM MOPS, 2 mM EGTA, 1mM MgSO ₄ , 1/10 Formaldehyd (3.7%)
NTMT-Puffer	100mM TRIS-HCl. , 50mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 9.5
PBS	10x PBS in DEPC-H ₂ O, PBS: 1.15g Na ₂ HPO ₄ , 8g NaCl, 0.2g KH ₂ PO ₄ , 0.2g KCl pro L, pH 7,3
PBST	10x PBS in DEPC-H ₂ O, 0,1% Tween-20
Proteinase K	10mg/ml in DEPC-H ₂ O
RIPA-Puffer	0,0005% SDS, 150mM NaCl, 0,01% NP-40, 0,005% Deoxycholat, 0,001 EDTA. 50mM TRIS-HCl, in DEPC-H ₂ O
RNAse A	50 mg/ml in H ₂ O
SSC (20x)	175g NaCl, 88,2g Na-Citrat pro L
TNT-Puffer	10 mM TRIS-HCl, 0.5 M NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 7,5

2.8.2 *in vitro* Transkription

Rekombinante Proteine wurden in Retikulozytenlysaten (Amersham) aus Kaninchen exprimiert. Dazu wurde zuvor RNA durch eine *in vitro* Transkription generiert. Plasmid-DNA wurde so durch einen Restriktionsverdau linearisiert, daß das Plasmid am 3'-Ende der entsprechenden cDNA geschnitten wurde. In einem *in vitro*

Transkriptionsansatz wurden 1-2µg Plasmid-DNA, 2µl 10x Transkriptionspuffer (Roche), 2µl NTPs (4mM), 2µl DTT (100mM), 1µl RNase-Inhibitor (RNasin, 40U, Promega) und 1µl RNA-Polymerase (20U/µl) in 20µl Gesamtvolumen für 2h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde durch Präzipitation in Gegenwart von LiCl und Ethanol aufgereinigt. Der Ansatz wurde mit DEPC-H₂O auf 100µl aufgefüllt und nach Zugabe von 10µl LiCl (4M) und 300µl abs. Ethanol für 30min bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Sedimentierung der RNA durch Zentrifugation bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei 13.000Upm für 15min. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Sediment mit 200µl 70%igen Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das RNA-Sediment getrocknet und in 20µl DEPC-H₂O aufgenommen. 2µl der gelösten RNA wurde auf einem Agarosegel aufgetragen, um die Menge zu bestimmen.

2.8.3 „Whole-mount“ *in situ* Hybridisierung von Mausembryonen

2.8.3.1 Erzeugung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Um RNA als Sonden für den *in situ* Nachweis von endogenen Transkripten zu nutzen, wurden sogenannte „Anti-sense“ Transkripte in der Gegenwart von Digoxigenin-markierten Nukleotiden (Roche) synthetisiert. 0,5µg linearisierte Plasmid-DNA wurden mit 1µl 10x Transkriptionspuffer (Roche), 1µl DIG-markierte Nukleotide (Roche), 0,5µl RNasin (40U, Promega) und 0,5µl RNA-Polymerase in 10µl Gesamtvolumen für 90min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1µl DNaseI (Roche) wurde anschließend die DNA-Matrize entfernt. Die RNA wurde dann, wie im *in vitro* Transkriptionsprotokoll beschrieben, durch Zentrifugation (13.000Upm, 10min, 4°C) in Gegenwart von LiCl und Ethanol sedimentiert. Das Sediment wurde mit 200µl 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend in 55µl DEPC-H₂O resuspendiert. 5µl wurde auf einem Agarosegel aufgetragen, um die Qualität und Menge der RNA abzuschätzen. Wurde die RNA-Sonde nicht unmittelbar weiterverwendet, wurde die Sonde bei -80°C gelagert.

2.8.3.2 Hybridisierung und histochemischer Nachweis

In Methanol gelagerte Embryonen wurden über eine absteigende Methanol/PBS-Reihe (75%, 50%, 25%, je 10min Inkubation auf Rollschüttler) in PBS überführt. Durch Einstiche mit Kanülen, wurden kleine Löcher in die Kopfreion gestochen, damit eine gute Diffusion der RNA-Sonde gewährleistet war. Nach einer zweimaligen Inkubation in PBST für je 10min, wurden die Embryonen in 6% H₂O₂ in PBST für eine Stunde bei RT gebleicht. Durch dreimaliges Waschen für je 10min mit PBST wurde das H₂O₂ aus den Embryonen wieder herausgewaschen um eine anschließende Behandlung mit Proteinase K durchzuführen. 9,5dpc alte Embryonen wurden nicht Proteinase K behandelt, 10,5dpc und 11,5dpc alte Embryonen wurden für 3min bei RT mit Proteinase K anverdaut, 12,5dpc alte wurden für 5min inkubiert. Der proteolytische Verdau wurden dadurch gestoppt, indem eine Produkthemmung der Proteinase K durch in PBST gelöstes Glycin (2mg/ml) erfolgte. Dieser Schritt wurde zweimal für je 5min durchgeführt, anschließend erfolgten zwei Waschschrirte, ebenfalls für je 5min in PBST. Zur besseren Penetration der RNA-Sonden, wurde die Embryonen dreimal für je 5min in RIPA-Puffer inkubiert. Der Sodiumdodecylsulfat (SDS) enthaltende RIPA-Puffer wurde durch 3 Waschschrirte (je 5min) mit PBST wieder ausgewaschen. Da die Embryonen durch Protease-Verdau und Detergenzen (SDS) sehr fragil wurden, wurden die Embryonen durch Behandlung mit 4%PFA/0.2% Glutaraldehyd in PBST nachfixiert (exakt 20min). Die Nachfixierung wurde durch dreimaliges Waschen in PBST (ja 5min) gestoppt.

Bis zu diesem Schritt wurden die Embryonen in Glasgefäßen inkubiert. Nach dem letzten PBST-Waschschrirte wurden die Embryonen auf Einsätze mit Netzen überführt, die die Inkubation in kleineren Volumina ermöglichten.

Die Embryonen wurden in einer Mischung aus Hybridisierungspuffer und PBST (1:1) für 10min bei RT inkubiert, bevor eine Inkubation in Hybridisierungspuffer (10min, RT) erfolgte. Der Hybridisierungspuffer wurde dann ausgetauscht und die Embryonen für weitere 1-3h bei 65°C inkubiert.

Es kamen ca. 0,25µg/ml RNA-Sonde pro Hybridisierung zum Einsatz. Die Menge wurde bei Sonden mit geringerer Größe (≤500bp) variiert. Zum Ende der Inkubationszeit wurden die RNA-Sonden in Hybridisierungspuffer für 3min bei 80°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen.

Die denaturierte RNA-Sonde wurde schließlich in frischem Hybridisierungspuffer (ca. 500µl) verdünnt. Die Embryonen wurden in dieser Hybridisierungslösung üN bei 65°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die RNA-Sonde durch Waschen für je 2x30min mit Hybridisierungspuffer (65°C) ohne Sonde ausgewaschen. Der Hybridisierungspuffer wurde dazu zuvor auf 65°C vorgewärmt. Nach den Waschschritten wurden die Embryonen auf Raumtemperatur abgekühlt und einmal in einer Lösung aus Hybridisierungs-Puffer und RNase-Puffer (1:1) für 5min bei RT inkubiert. Zur vollständigen Entfernung von ungebundener RNA-Sonde, wurden die Embryonen 2x für je 30min in RNase-Puffer mit 100 µg/ml RNaseA bei 37°C inkubiert. Die RNaseA verdaut vorzugsweise die nicht-gebundene, einzelsträngige RNA-Sonde und nicht die mit der endogenen RNA hybridisierte, doppelsträngige RNA-Sonde.

Nach der RNaseA-Inkubation wurden die Embryonen in einer Lösung von RNase-Puffer und SSC/FA/Tween-20 (1:1) auf 65°C aufgewärmt. Schließlich wurden die Embryonen in mehreren Schritten (2x 5min, 3x 10min, 1x 30min und 5x 1h) in SSC/FA/Tween-20 bei 65°C inkubiert.

Für die Inkubation mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper wurden die Embryonen nach dem letzten Inkubationsschritt in SSC/FA/Tween-20 in einer Lösung von SSC/FA/Tween-20 und PBST (1:1) bei RT vorinkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschschritte in 1x TBST für je 10min an, bevor die Embryonen dann 2x in MBAT für je 10min (RT) inkubiert wurden. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen des Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Boehringer), wurde das *in situ*-Block-Reagenz der Firma Boehringer als 10%iger Lösung in MBAT hergestellt und die Embryonen für 1h bei 4°C darin inkubiert. Gleichzeitig wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper als 1:5000 Verdünnung in 1% *in situ*-Block-Reagenz/MBAT bei 4°C für eine Stunde präabsorbiert. Bevor der präabsorbierte Antikörper zu den Embryonen gegeben wurden, wurden ungelöstes *in situ*-Block-Reagenz durch Zentrifugation (13.000Upm, 2min, RT) entfernt. Die Inkubation des Antikörpers mit den Embryonen erfolgte bei 4°C üN. Das Auswaschen von ungebundenen Antikörper erfolgte am folgenden Tag durch dreimaliges Waschen für je 5min in PBST (bei RT), gefolgt durch 8x 1h Waschschritte mit PBST (bei RT).

Zur Entwicklung der Färbereaktion durch die am Antikörper konjugierte Alkalische Phosphatase (AP), wurden die Embryonen 3x für je 20min in Phosphatase-Puffer vorinkubiert. Bei diesen Inkubationsschritten wurde der pH-Wert auf das Optimum

der AP gebracht. Die eigentliche Entwicklung erfolgte durch Zugabe des AP Substrates BM Purple der Firma Roche. Dabei handelte es sich um ein präzipitierendes Produkt mit blauer Farbe. Die Färbung wurde durch Inkubation der Embryonen in PBS (3x je 10min) gestoppt.

Zur dauerhaften Fixierung der gefärbten Embryonen wurden diese üN in 4% PFA fixiert und am folgenden Tag nach zweimaligen Waschen mit PBS, schrittweise in 50% Glycerol überführt. Die so fixierten und geklärten Embryonen wurden dokumentiert und bei 4°C gelagert.

2.8.4 *in situ* Hybridisierung auf Schnitten

Um RNA auf Dünnschnittschnitten nachzuweisen, wurden PFA fixierte Embryonen eingesetzt das 10µm Paraffinschnitte vorlagen. Nach dem Entwachsen der Schnitte, wurden die Objekte mit Proteinase K für 10min bei 37°C anverdaut. Gestoppt wurde die Reaktion durch 0,2% Glycinlösung und zweimaliges Waschen mit PBS. Es folgte eine Nachfixierung mit 4% PFA für 10min und ein anschließendes, zweimaliges Waschen mit PBS. Einer 15minütigen Inkubation mit 0,2N HCl folgten wiederum zwei Waschschrirte mit PBS. Die Objektträger wurden dann in einem großen Plastikgefäß transferiert in dem 600ml DEPC-H₂O vorgelegt waren. Unter ständigem Rühren wurden 9 Tropfen Triethanolamin zugeführt um eine 0,1M Lösung zu erhalten, schließlich wurde Acetanhydrid bis zu einer Endkonzentration von 0,25% zugegeben. Die Objektträger wurden in dieser Lösung für 10min bei RT inkubiert und dann je einmal mit PBS und DEPC-H₂O gewaschen. Die Hybridisierung erfolgte in einer Plastikkammer, deren Atmosphäre durch den Hybridisierungspuffer gesättigt war.

Nach der Zugabe von 200µl Hybridisierungspuffer, wurden die Objekte mit einer Plastikfolie überzogen und für 2h bei 67°C vorinkubiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer abgenommen und durch Hybridisierungspuffer mit RNA-Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 67°C.

Die Plastikfolie wurde von den Objektträgern entfernt und diese dann dreimal für je 30min in LösungI bei 67°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrirte mit TNT-Puffer für je 5min, um dann einen RNase Verdau (100µg/ml) in TNT-Puffer gelöst für 30min bei 37°C durchzuführen. Anschließend wurden die Objektträger in TNT-Puffer/LösungII (1:1) für 5 min und dann dreimal für 30min in LösungII inkubiert. Es folgten dann drei Inkubationsschrirte in MAB-Puffer und anschließend eine Inkubation für 2-3h in

Blocklösung. Die Objektträger wurden mit der Antikörperlösung üN bei 4°C in einer Plastikkammer mit gesättigter Atmosphäre inkubiert. Am folgenden Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in MAB-Puffer für je 10min entfernt, gefolgt von einem 3-4stündigem Waschen in MAB-Puffer bei dem stündlich der Puffer gewechselt wurde. Danach wurden die Objektträger dreimal für 5min in NTMT-Puffer inkubiert, um dem pH-Wert für die AP anzupassen. Zur Detektion des Antikörpers wurden rund 300µl BM Purple Substrat auf die Objekte gegeben. Die Dauer der Fabreaktion variierte von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen. Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden die Objektträger zweimal in PBS gewaschen und dann mit MEMFA-Puffer nachfixiert. Schließlich wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und dann mit MOWIOL eingebettet und dokumentiert.

2.9 Proteinchemische und immunochemische Methoden

2.9.1 Lösungen und Puffer

5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin-Lösung	10mg/ml BrdU in 0,9% NaCl, 0,007N NaOH
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
PBST	0,1% Tween-20 in PBS
Lysepuffer A	200mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM 2-Mercaptoethanol, 50mM TRIS-HCl pH 7,9, 1µM Pepstatin, 1µM Leupeptin, 0,2mg/ml Lysozym
Transferpuffer	39mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol, 48mM TRIS-HCl
Trenngel	0,1% SDS, 0,375M TRIS-HCl pH 8,0, 9-12% Acrylamid (37,5:1 Acryl-Bisacrylamid)
Sammelgel	0,1% SDS, 0,125M TRIS-HCl pH 6,8, 5% Acrylamid (37,5:1 Acryl-Bisacrylamid)
Coomassie-Lösung	50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie Blue G-250
Dialysepuffer-2	50mM TRIS-HCl, 0,5M NaCl, 10% Glycerin, pH 7,9, 1mM PMSF
GSH-Puffer	10mM Glutation (reduziert), 1mM DTT, 50mM TRIS-HCl pH 8,0
Kopplungspuffer	0,5M NaCl, 10% Glycerin, 50mM TRIS-HCl pH 7,9, 1mM PMSF
Saccharoselösung	40% Saccharose, 1mM EDTA, 200mM NaCl, 10mM TRIS-HCl pH 7,5
SDS-Probenpuffer (2x)	4% SDS, 0,02% 2-Meraptoethanol, 23% Glycerin, 0,125M TRIS-HCl pH 6,8, 100µg/ml Bromphenolblau

BBO-Puffer	75mM NaCl, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet P-40, 25mM HEPES pH 7,4, 10ug/ml BSA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1uM Leupeptin, 1uM Pepstatin oder alternativ (1x Complete [Roche])
------------	---

2.9.2 *in vitro* Translation

Rekombinante Proteine wurden in Retikulozyten-Lysate (RRL) aus Kaninchen exprimiert. Es wurde das Retikulozyten-Lysat System der Firma Promega eingesetzt. Dazu wurde zuvor *in vitro* transkribierte RNA zu den Lysaten, die mit den notwendigen Aminosäuren versetzt waren, gegeben. *In vitro* Translationen wurden benutzt um sicherzustellen, daß Expressionskonstrukte Proteine mit der entsprechenden molekularen Größe exprimierten und zur Darstellung von Proteinen im kleinen Maßstab.

Zur Darstellung geringer Proteinmengen wurde das von der Firma angegebene Protokoll auf 50% der eingesetzten Mengen halbiert, ansonsten wurde das Protokoll der Firma genau eingehalten.

Für einen *in vitro* Tanslationsansatz wurden 2 von 20µl einer *in vitro* Transkription eingesetzt und mit 36µl RRL, 1µl Aminosäuremix, 1µl RNAsin, 2µl ³⁵S-Methionin (optional) in einem Gesamtvolumen von 50µl for 90min bei 30°C inkubiert.

Wurde radioaktiv markiertes Methionin verwendet, wurde nach Abschluß der neunzigminütigen Inkubation 1µl RNaseA hinzugegeben, um die radioaktive Met-tRNA abzubauen. Dann wurden 2-5µl Lysat benutzt, um eine SDS-PAGE Gelelektrophorese durchzuführen. Nach dem Trocknen des Gels konnte das translatierte Protein durch anschließende Exposition gegen einen Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die Lysate wurden zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.9.3 Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation

Mit dem TNT-System der Firma Promega, konnte eine gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation durchgeführt werden. Der Vorteil dieses Systems gegenüber der herkömmlichen *in vitro* Translation ist zum einen der verringerte Zeitaufwand zum anderen höhere Expressionsraten. Mit dem TNT-System translatierte Proteine wurden insbesondere für Gelretentionsexperimente eingesetzt. Die Angaben des Herstellers wurden genau befolgt.

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der von Lämmli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurde mit dem Gelelektrophorese-System der Firma BioRad gegossen und hatten Ausmaße von 90x70x0,75mm bzw. 1mm. Dabei erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel, daß je nach Proteingröße 9-12%ig war. Proteinproben wurden in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach Zugabe von 1µl β-Mercaptoethanol für 5min in einem Wasserbad aufgekocht. Direkt nach dem Aufkochen, wurden die Proben in einer Tischzentrifuge für 3min bei 13.000Upm abzentrifugiert und dann direkt auf das Sammelgel (5%) geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Voltzahl; zuerst liefen die Proteinproben mit 60 Volt in das Sammelgel ein, dann wurde die Voltzahl auf 100-120V erhöht. Nach der Elektrophorese wurden die Gele sowohl für Coomassie-Färbungen, Western-Blots als auch für direkte Exposition gegen Filme eingesetzt.

Für Coomassie-Färbungen wurden die Gele direkt in die Färbelösung gelegt (5-30min) und anschließend in 20% MeOH bis zur gewünschten Intensität der Banden gewaschen.

Für Western-Blots wurden die Gele zur Äquilibration in Western-Blot Transfer-Puffer eingelegt (ca. 15min) und dann weiter verwendet.

Wurden radioaktiv markierte Proteine aus *in vitro* Translationen verwendet, wurden die Gele in einer Vakuum-Trockenanlage für 1h bei 80°C getrocknet, bevor sie gegen einen Röntgenfilm exponiert wurden.

2.9.5 Transfer von Proteinen auf Membranfilter (Western Blot)

Um Proteine aus Acrylamidgelen auf Membranfilter zu transferieren, wurde die Semi-dry Blot-Methode eingesetzt. In einer Semi-dry Blot-Apparatur wurden drei Lagen 3MM Filterpapier (zuvor in Transferpuffer getaucht) blasenfrei aufgelegt. Die Nitrocellulosemembran (Hybond-C+, Amersham) wurde zuerst in Milli-Q H₂O und dann für 5min in Transferpuffer eingelegt, bevor sie auf die Filterpapiere gelegt wurde. Die zuvor in Transferpuffer äquilibrierten Gele wurden dann auf die Membran überführt und wiederum mit 3 Lagen 3MM Filterpapier (zuvor in Transferpuffer getaucht) überschichtet. Anschließend wurde die Apparatur assembliert und die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (10-15V) für 30min durchgeführt.

Zum Auswaschen verbliebender SDS-Reste wurde die Membran nach der Elektrophorese für 10min in PBS inkubiert, bevor diese weiterverwendet wurde.

2.9.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranfiltern

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden Nitrocellulosemembranen für 1h in 5% Trockenmilch in PBS inkubiert. Der primäre Antikörper wurde ebenfalls in 5% Trockenmilch (in PBS) aufgenommen und mit der Membran bei 4°C üN inkubiert. Bei der Verwendung des 9E10-Antikörpers (Maus anti c-myc^{menschl}) wurde eine Konzentration von 1:1000 eingesetzt. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für je 10min in PBS inkubiert um ungebundenen Antikörper auszuwaschen. Anschließend wurde die Membran für 1-2h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Maus bzw, anti-Kaninchen; 1:1000) in 5% Trockenmilch (in PBS) inkubiert. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um Peroxidase gekoppelte Antikörper, deren enzymatische Aktivität durch Inkubation mit dem ECL-System (Amersham) sichtbar gemacht werden konnte. Dazu wurde die Membran nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper 3x für je 10min mit PBS gewaschen. Für die ECL-Lösung wurden jeweils gleiche Volumina der Lösungen A und B kurz vor der Entwicklung zusammengemischt und dann die Membran darin für 1min inkubiert. Durch Autoradiographie mit einem Röntgenfilm, wurden die Signale, die an die Antikörper gekoppelten Peroxidase sichtbar gemacht. Die Filme wurden je nach der Stärke des Signals für 15sec bis zu 15min exponiert.

2.9.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen in Embryonen

Mit dieser Methode wurde die Expression von Proteinen in ganzen Embryonen nachgewiesen. Dabei wurden PFA-fixierte und in Methanol gelagerte Embryonen verwendet. Es wurden Embryonen von 9,5dpc-11,5dpc eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei 4°C und in Glasröhrchen durchgeführt. Die Embryonen wurden sukzessive in PBS (75% MeOH/PBS; 50% MeOH/PBS; 25% MeOH/PBS) überführt. Jeder Schritt wurde für 15min auf einem rotierenden Rollschüttler (RT) durchgeführt. Nach zweimaligen Waschen in PBS wurden mit einer kleinen Kanüle, Löcher in den Kopf der Embryonen gestoßen, um eine bessere Penetration des Antikörpers zu ermöglichen. Endogene Peroxidasen wurden durch Inkubation der Embryonen in 4% H₂O₂ in PBS inaktiviert. Nach

zweimaligen Waschen für je 15min mit PBST, wurden die Embryonen zur besseren Penetration der Antikörper mit Proteinase K anverdaut. Proteinase K (10mg/ml) wurde als 1:1000 Verdünnung in PBST angesetzt und die Embryonen in dieser Lösung für 20min auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt diffundiert die Proteinase K in die Embryonen, ohne dabei signifikante Proteinase-Aktivität zu entfalten. Nach der 20 minütigen Inkubation, wurden die Glasröhrchen mit den Embryonen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Mit diesem Schritt konnte gewährleistet werden, daß die Aktivität der Proteinase K den ganzen Embryo gleichmäßig anverdaut, statt nur an der Oberfläche. Die Inkubation bei 37°C erfolgte für 5-10min, je nach der Größe der Embryonen. Die enzymatische Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit PBST beendet. Bei diesen Schritten, wurden die Glasröhrchen auf Eis gelagert und öfter geschwenkt. Die durch den Verdau, fragil gewordenen Embryonen, wurden für 30min mit 4% PFA postfixiert (RT). Nach dreimaligen Waschen mit PBST für je 10min wurden die Embryonen in Blocklösung (10% FCS; 1% Schafserum; PBST) überführt und für 1h bei 4°C inkubiert.

Wurden Maus-Hybridoma Überstände als Antikörperquelle verwendet, wurden diese als 1:10-1:20 Verdünnung in Blocklösung eingesetzt. Zur Reduzierung des benötigten Volumens, wurden die Embryonen in 1,5ml oder in 0,4ml Plastikgefäße überführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C üN auf einem Rollschüttler.

Am folgenden Tag wurden die Embryonen wieder in Glasröhrchen überführt und 4x für je 20min in PBST gewaschen. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers, wurden die Embryonen ein weiteres Mal für 1h in Blocklösung inkubiert. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (Ziege anti-Maus, Peroxidase gekoppelt) erfolgte als 1:500 Verdünnung in Blocklösung für 3-4h bei RT auf einem Rollschüttler. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörper, wurden die Embryonen 4x für je 20min in PBST gewaschen. Damit die DAB-abhängige Farbreaktion gleichmäßig erfolgen konnte, wurden die Embryonen anschließend in DAB-Lösung (Sigma) ohne H₂O₂ für 20min bei RT vorinkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde die DAB-Lösung durch H₂O₂-haltige DAB-Lösung ausgetauscht. Die Farbreaktion dauerte zwischen 2 und 15min und wurde beim Erreichen der gewünschten Intensität durch Waschen in PBS abgestoppt. Die Embryonen wurden zur Endfixierung üN mit 4% PFA (4°C) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Embryonen nach zweimaligen Waschen in PBS, entweder schrittweise in 80% Glycerin überführt, oder nach einer

schrittweisen Entwässerung durch eine Methanol-Reihe mit Benzylalkohol/Benzylbenzoat (2:1) geklärt. Nach der vollständigen Überführung in das entsprechende Klärungsmedium, wurden die Embryonen unter einem Stereomikroskop fotografiert und digital dokumentiert.

2.9.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Schnitten

Zuerst wurden die Paraffin-Schnitte durch Inkubation (2x) in Rotihistol (Roth) deparaffiniert und anschließend über eine absteigende Ethanolreihe in H₂O überführt. Um falsch gefaltete Epitope zu regenerieren, wurden die Schnitte anschließend in Antigen Unmasking Solution (VectaLabs) für 15min, in einem 50ml Plastikröhrchen aufgeköcht. Nach dem anschließenden Abkühlen wurden die Schnitte zuerst ein weiteres Mal in PBS gewaschen, bevor sie in 3% H₂O₂ für 10min inkubiert wurden, um endogene Peroxidasen zu blocken. Dann erfolgte das Auswaschen des H₂O₂ durch dreimaliges Waschen in PBS für je 5min. Abhängig vom primären Antikörper (Quelle aus Maus oder Kaninchen), wurde zum weiteren Einsatz das ABC-System der Firma VectaLabs eingesetzt. Das verwendete System beinhaltete neben dem jeweiligen Antikörper auch die entsprechende Blocklösung. Die nachfolgenden Schritte wurden exakt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Verwendung des Tbx18-Antikörpers, wurde eine 1:20 Verdünnung eingesetzt. Der Farbnachweis der Peroxidase wurde durch das DAB-System (ebenfalls VectaLabs) umgesetzt. Dazu wurden die Schnitte nach dem letzten Waschschrift mit der DAB/H₂O₂-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde unter einem Stereomikroskop verfolgt und durch Waschen in PBS abgestoppt. Zur Fixierung wurden die Schnitte in 4% PFA üN inkubiert und am folgenden Tag mit Mowiol eingebettet. Die Schnitte wurden dann mit einem Mikroskop und einer Digitalkamera dokumentiert.

2.9.9 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Um Antikörper gegen das murine Tbx18 zu gewinnen, wurde C-terminale Fragmente des Tbx18 Proteins als GST-Fusionsproteine dargestellt. Für die Klonierung in den prokariotischen Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham) wurden zwei Fragmente mit Pwo-Polymerase amplifiziert und dann direktional als BamHI/EcoRI-Fragmente inkloniert. Die beiden Expressionsplasmide pGEX.Tbx18.GST1 (bp1457-2183) und

pGEX.Tbx18.GST2 (1757-2183) wurden dann in den Bakterienstamm M15 (Qiagen) zur besseren Proteinexpression transformiert.

Für die Proteinexpression wurde zuerst eine üN Kultur in 3ml LB-Medium angesetzt. Am folgenden Tag wurden dann 200ml 2YT-Medium (plus Ampicillin) mit 1ml der üN-Kultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von $DO_{600}=0,8$ bei 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 1mM IPTG für 2h. Durch Zentrifugation (6000Upm, JA-20, 15min, 4°C) wurden die Bakterien sedimentiert. Durch Zugabe von 10ml Lysepuffer A wurde das Bakteriensediment resuspendiert und anschließend mit 3x5sec sonifiziert. Dann wurden die Lysate mit Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1% eingestellt und für 30min auf Eis inkubiert. Um unlösliches Protein und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Lysate auf eine Saccharoselösung aufpipettiert und dann abzentrifugiert (10.000Upm, JA-20, 30min, 4°C). Der Überstand wurde dann 250µl äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham) zugeführt und für 1,5h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde dann zweimal mit PBS und zweimal mit PBS + 0,1% Triton X-100 gewaschen, bevor dann die Fusionsproteine mit 250µl GSH-Puffer eluiert wurden. Mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese wurden die Eluate getestet.

2.9.10 Immunisierung von Kaninchen und Herstellung von Seren

Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte im Tierlabor des Max-Planck Institutes für Immunbiologie in Freiburg nach Standard-Methoden. Die Immunisierung erfolgte durch viermalige Injektion von je 50µg der Fusionsproteine pGEX.Tbx18.GST1 und pGEX.Tbx18.GST2, gefolgt durch zweimalige Injektionen von je 150µg durch Gelelektrophorese aufgereinigte Fusionsproteine. Nach drei Wochen wurde dann das Blut aus dem Kaninchen entnommen. Durch eine einstündige Inkubation bei RT gefolgt von einer mehrstündigen Inkubation auf Eis, wurde die Blutgerinnung eingeleitet und das Serum durch Zentrifugation gewonnen. Die Seren wurden bei -80°C gelagert.

2.9.11 Affinitätsreinigung eines Antiserums gegen das Tbx18-Protein der Maus

2.9.11.1 Herstellung von Affinitätssäulen für die Antikörperaufreinigung

Für die Herstellung von Affinitätssäulen wurde CnBr-aktivierte Sepharose verwendet. Zuerst wurden 2g CnBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) in 1mM HCl auf Eis gequollen. Dann wurde die Gelmatrix zweimal mit 45ml 1mM HCl gewaschen und schließlich mit Kopplungspuffer neutralisiert. Für die Ligandenkopplung wurden zuvor je 1mg der beiden Fusionsproteins pGEX.Tbx18.GST1 und pGEX.Tbx18.GST2 gegen 500ml Dialysepuffer-1 üN bei 4°C und dann zwei weitere Male für 6h gegen 500ml Dialysepuffer-2 dialysiert. Die Dialysate wurden in 15ml Kopplungspuffer aufgenommen und mit der Sepharose für 3h unter leichtem Schütteln inkubiert. Schließlich wurde die Matrix dreimal mit 50ml Kopplungspuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Zum Blocken von nicht abgesättigten Gruppen, wurde die Matrix zweimal mit 0,1M Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Die Matrix wurde dann dreimal abwechselnd mit Waschpuffer-1 und Waschpuffer-2 gewaschen und schließlich in PBS aufbewahrt. Es wurde ebenfalls eine Säule mit GST gemacht, um die bei der Immunisierung mit GST-Tbx18 Proteinen, entstehenden Antikörper zu subtrahieren.

2.9.11.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Alle Schritte für die Serumaufarbeitung erfolgten bei 4°C. Für die Affinitätsaufreinigung wurden 10ml Serum mit 30ml Kopplungspuffer versetzt und dann dreimal über die Säulenmatrix geschickt. Dann wurde die Säule mit 10mM NaHCO₃, 100mM NaCl, 10mM TRIS-HCl pH 7,9 gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 0,1M Glycin die als 0,9ml Fraktionen in 100µl TRIS-HCl pH 8,0 gesammelt wurden. Anschließend wurde ein Elutionsprofil durch photometrische Bestimmung bei OD₂₈₀ durchgeführt. Die Fraktionen mit den höchsten Werten wurden für weitere Experimente eingesetzt.

2.9.12 Immunpräzipitation (IP)

Als Proteinquelle für Immunpräzipitationen kamen sowohl *in vitro* translatierte Proteine, als auch Zellextrakte zum Einsatz. 5-20µl Lysat wurden in 50µl BBO mit 1-

5µl Antikörper (für 9E10: 1-3µl, für anti-Tbx18 bis 5µl) auf Eis für 30min inkubiert. Danach wurden 100µl BBO mit 5µl Protein A-Agarose (zuvor in BBO voräquiliert) hinzugegeben und auf einem Schüttler üN bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Agarose-Perlen dreimal mit 1ml BBO gewaschen und schließlich in 20µl SDS-Probenpuffer für 5min aufgekocht und dann auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

2.10 Methoden für DNA und Protein Interaktionen

2.10.1 Lösungen und Puffer

BBO-Puffer	75mM NaCl, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet P-40, 25mM HEPES pH 7,4, 10ug/ml BSA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1uM Leupeptin, 1uM Pepstatin oder alternativ (1x Complete [Roche])
SDS-Probenpuffer (2x)	4% SDS, 0,02% 2-Meraptoethanol, 23% Glycerin, 0,125M TRIS-HCl pH 6,8, 100µg/ml Bromphenolblau
Tris-Glycin-Puffer (10x)	100mM TRIS-HCl, 500 mM Glycin, pH 8,0

2.10.2 Selektion von Bindungsstellen aus einem Gemisch von zufälligen Oligonukleotiden

Um die DNA-Bindungsstelle des Tbx18 Proteins zu bestimmen, wurde das von Pollock und Treismann (1990) beschriebene Protokoll benutzt. Das Oligonukleotid AKO0366 (R76) wurde mit dem Oligonukleotid AKO0364 nach Aufkochen hybridisiert. Durch Zugabe von Klenow-Polymerase und Nukleotiden, wurde der Gegenstrang synthetisiert. Das doppelsträngige Reaktionsprodukt wurde über ein 3%iges Agarosegel aufgereinigt. Dieses DNA-Fragment weist, 26 vollständig denaturierte Basen auf, die von zwei konstanten Primer-Sequenzen (Primer F und R) flankiert sind.

Durch Koimmunpräzipitation wurden anschließend DNA/Protein-Komplexe mit dem Tbx18-Antikörper präzipitiert. Als Proteinquelle wurden Frakelton-Extrakte aus 293T-Zellen, die mit einem Tbx18-Expressionsvektor transfiziert worden waren, benutzt.

Dazu wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß 50µl BBO-Puffer, 5µl Frakelton-Extrakt mit 2µg doppelsträngigen (ds) poly-dIdC und 3µl des Antikörpers gemischt und für 15min auf Eis inkubiert. Dann wurden 1µg des ds Oligonukleotids R76 hinzugegeben und für 1h auf Eis inkubiert. Dann wurde das Volumen auf 200µl mit BBO-Puffer erhöht und 20µl Protein-A Agaroseperlen hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde üN bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Am folgenden Tag wurden nach vorsichtigem Abzentrifugieren die Agaroseperlen dreimal mit 1ml BBO-Puffer gewaschen. Gebundene DNA-Fragmente wurden durch zweimalige Inkubation der Agaroseperlen in Proteinase-K Puffer bei 37°C eluiert. Anschließend wurden die Eluate vereinigt und die DNA-Fragmente durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Die präzipitierten DNA-Fragmente wurden in 30µl TE aufgenommen und 1/3 wurde für eine PCR-Amplifikation eingesetzt.

Ansatz:

7µl DNA

1µl Primer F (AKO0364) 10pmol/µl

1µl Primer R (AKO0365) 10pmol/µl

1µl dNTPs 10mM

1µl Taq-Polymerase

5µl 10x Standard-PCR Puffer (20mM MgCl₂)

50µl t.v.

94°C – 3min

94°C – 1min

62°C – 1min

72°C – 1min

72°C – 10-15min

8°C – Lagerung

|
| es wurden 22, 25 und 28
| Programmzyklen eingesetzt

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA daraus extrahiert (QiaQuick, Qiagen). Die so gewonnenen DNA-Fragmente konnten für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt werden. Bei jeder weiteren Selektionsrunde wurde der unspezifische Kompetitor poly-dIdC um 0,5µg erhöht, um die Spezifität der Selektion zu erhöhen.

2.10.3 Gelretentionsanalyse (EMSA)

Mit der Gelretentionsanalyse (EMSA) wurden DNA/Protein-Interaktionen untersucht. Die Methode beruht darauf, daß DNA-Fragmente in einem native Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Zuvor wurden die DNA-Fragmente mit dem entsprechenden Protein inkubiert dabei führt die Bindung eines Proteins an das DNA-Fragment zu einem verzögerte Laufverhalten im Gel.

Als Proteinquelle wurden sowohl *in vitro* translatierte Proteine, als auch Zellextrakte (aus 293T Zellen) verwendet. Die eingesetzten DNA-Fragmente wurden entweder durch Phosphorylierung mit T4-Polynukleotidkinase oder durch eine Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase radioaktiv markiert. Nach der Aufreinigung der DNA-Fragmente mit einer Sephadex G-50 Säule, wurde die Aktivität auf 10.000cpm eingestellt und 20.000-30.000cpm pro Versuchsansatz verwendet.

In einem 1,5ml Plastikgefäß wurden 25µl BBO-Puffer mit 1µg ds poly-dIdC (Amersham) mit 3-6µl Proteinlysate für 10min bei RT inkubiert. Dann wurden 20.000-30.000cpm der markierten DNA-Fragmente hinzugegeben und weitere 15min bei RT inkubiert. Mit nicht-markierten DNA-Fragmenten wurde die Bindung kompetitiert indem ein tausendfacher Überschuß eingesetzt wurde. Für einen sogenannten „Supershift“ mit Antikörpern wurden 1µl des Maus Anti-c-myc (9E10) bzw. 3µl des Tbx18-Antikörpers eingesetzt. Für die Kompetetion bzw. den „Supershift“, wurden die Ansätze für weitere 10min bei RT inkubiert, bevor sie dann auf ein 5%iges Acrylamidgel aufgetragen wurden. Es wurden 1x Tris-Glycin-gepufferte Acrylamid Gele benutzt, die 30min bei 300V vorgelaufen waren. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 4°C und mit konstanter Spannung von 200V für 3-6h. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf ein Filterpapier übertragen und in einem Vakuumtrockner getrocknet, bevor es gegen einen Röntgenfilm exponiert wurde.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Lösungen und Medien

DMEM	Gibco BRL
Einfríermedium	5% DMSO in Zellkulturmedium
Frakelton-Puffer	10mM Tris, 30mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 50mM NaCl, 50mM NaF, 1mM DTT, 1%

	Triton X-100, pH 7,1 plus 1x Complete (Beorhringer)
HBS (10x)	80g NaCl, 3,7g KCl, 1,25g Na ₂ HPO ₄ , 10g Glukose, 50g HEPES pH 7,05
PBS	1.15g Na ₂ HPO ₄ , 8g NaCl, 0.2g KH ₂ PO ₄ , 0.2g KCl pro L, pH 7,3
PBST	PBS, 0,1% Tween-20
Trypsin/EDTA-Lösung	0,5% Trypsin, 0,05mM EDTA in PBS
Zellkulturmedium	10% FCS (Hitze-inaktiviert), 1x PenStrep, 1x Glutamin
Zellkulturmedium (ES)	15% FCS (Hitze-inaktiviert), 1x PenStrep, 1x Glutamin, 200µl hLIF 1xNEM

2.11.2 Allgemeine Kulturbedingungen

293T- und Cos-7-Zellen wurden für die Routinehaltung in 10cm Zellkulturschalen gehalten. Konfluente Zellen wurden 1:5 neu ausgesät. Dazu wurde das Medium mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 10ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 5ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und diese damit für 5min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren von der Platte gelöst und schließlich wieder auf neue Platten mit Zellkultur-Medium ausgesät. Für immunhistochemische und andere Experimente wurden die Zellen wahlweise auf 12er-Platten oder 6cm-Zellkulturschalen ausgesät.

2.11.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen, wurden zu 100% konfluente 10cm Zellkulturschalen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die tryptische Reaktion wurde nach Inkubation für 5min bei 37°C durch Zugabe des gleichen Volumens Zellkulturmediums gestoppt und die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren von den Schalen gelöst. Anschließend wurden die Zellen für 5min in einer Zellkulturzentrifuge für 5min mit 1.000Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde vorsichtig in 1ml Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 5% DMSO) aufgenommen und in 2ml Plastikröhrchen überführt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Zellen in einen Pappkarton, der mit Watte gefüttert war, bei -80°C für 24h gelagert. Am folgenden Tag wurden die Plastikröhrchen in eine -150°C Gefriertruhe zur Dauerlagerung überführt.

2.11.4 Transfektion mit CaPO₄-Methode

Mit dieser Methode wurden sowohl 293T, als auch Cos-7 Zellen transfiziert. Bei dieser Methode wurde die zu transfizierende DNA mit einer Lösung aus Calcium und Phosphat inkubiert. Dabei bildet sich ein Präzipitat, welches von den Zellen aufgenommen werden kann.

Für transiente Transfektionen wurden Zellen auf 6cm Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 50-70% für Transfektionen eingesetzt. Für die Herstellung von Zellextrakten wurden 10µg Plasmid-DNA verwendet, für andere Applikationen wurde die DNA-Menge entsprechend angepasst. Zum Einsatz kam sowohl säulengereinigte DNA, als auch CsCl-Gradienten-gereinigte DNA.

10µg DNA wurden mit 62µl 2M CaCl₂ in 500µl Gesamtvolumen durch Vortexen gelöst. In einem 15ml Plastikgefäß wurden 500µl HBS vorgelegt. Unter kontinuierlichem Schütteln des 15ml Gefäßes wurde die DNA/CaCl₂-Lösung tropfenweise zugegeben. Dann wurde die Lösung mindestens 10min aber nicht mehr als 30min Zeit bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium in den Zellkulturschalen gewechselt und die Lösung anschließend tropfenweise und gleichmäßig verteilt auf die Zellen gegeben. Routinemäßig wurden Kontrolltransfektionen mit einem GFP-Repoterkonstrukt durchgeführt, um eine gleichbleibende Transfektionseffizienz zu gewährleisten. Nach 24h Inkubation mit der DNA wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24h wurden die Zellen für die entsprechenden Experimente eingesetzt.

2.11.5 Transfektion mit lipophilen Reagenzien

Da sich NIH3T3 Fibroblasten nicht mit der CaPO₄-Methode transfizieren ließen, wurde eine kommerzielle Transfektionsmethode mit Perfectin (PeqLab) eingesetzt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers genau befolgt. Es wurden 2µg Plasmid-DNA pro 6cm Zellkulturschale transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde das Medium in den Schalen gewechselt und nach weiteren 24h konnten die Zellen für die entsprechenden Applikationen eingesetzt werden.

2.11.6 Gewinnung von Zellextrakten (Frakelton-Extrakte)

Um Proteine in nativer Form aus Zellen zu extrahieren, wurden diese mit Frakelton-Puffer aufgeschlossen. 48h nach der Transfektion wurden 10cm Zellkulturschalen mit 293T- oder Cos-7-Zellen zweimal mit 10ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen

des PBS die Zellen in 500µl eiskalten Frakelton-Puffer aufgenommen. Mit einem Gummischaber wurden die Zellen von der Platte gelöst und anschließend in ein 1,5ml Plastikgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation der gelösten Zellen auf Eis für 15min mit gelegentlichem Vortexen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13.000Rpm, 15min, 4°C) sedimentiert, um der Überstand schließlich in ein neues 1,5ml Plastikgefäß überführt.

Die so gewonnenen Frakelton-Extrakte wurden (wenn möglich) mittels Western Blot auf die Expression des gewünschten Proteins hin untersucht. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.12 Arbeiten mit embryonalen Stammzellen

2.12.1 Allgemeine Kulturbedingungen für ES-Zellen

ES-Zellen wurden von Frau Dr. Karin Schuster-Gossler zur Verfügung gestellt. Jedes Trypsinisieren und Neuaussähen wurde als eine Passagennummer gezählt. Von Frau Dr. Schuster-Gossler wurden ES-Zellen als Passage P13 zur Verfügung gestellt. Das Neuaussähen wurde wie bei anderen Zellen (s.o.) durchgeführt.

ES-Zellen wurden in einer 5%igen, mit H₂O-gesättigten Atmosphäre bei 37°C inkubiert. ES-Zell Medium bestand aus DMEM (GibcoBRL) mit 15% FCS, 1x Penicillin/Streptomycin, 1x L-Glutamin und β-Mercaptoethanol, ferner wurde das Medium mit 100µl rekombinanten hLif versetzt. ES-Zellen wurden durchgängig auf 10cm Zellkulturschalen kultiviert, die mit 100% konfluenten primären Fibroblasten (MEF) bedeckt waren. Fibroblasten wurden zuvor mit Mitomycin C behandelt. In der Regel wurden ES-Zellen in einem Verhältnis von 1:5 wieder ausgesät.

2.12.2 Herstellung von humanen, rekombinanten Leukemia Inhibitor Faktor (LIF)

Da ES-Zellen in Kultur spontan zur Differenzierung neigen, wurde rekombinante, menschlicher Leukemia Inhibitor Faktor (hLIF) dem ES-Zell Medium zugesetzt. (LIF, humanen Ursprungs, besitzt die gleiche Aktivität bei Maus ES-Zellen).

Das hLIF lag als GST-Fusionsprotein Expressionskonstrukt (pGEX-hLIF) vor. Die Expression und die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll für GST-Fusionsproteine. Es erfolgte allerdings keine Elution mit Glutathion, sondern das hLIF wurde durch Verdau mit der Protease Thrombin freigesetzt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers (Amersham) befolgt. Das so gewonnene hLIF wurde anschließend mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese analysiert und die Menge mit einem Eichstandard mit BSA abgeschätzt. Anschließend erfolgte eine Aktivitätsbestimmung des hLIF. Dazu wurden ES-Zellen auf zuvor mit Gelatine beschichtete 10cm Zellkulturschalen ausgesät und 10 Tage lang mit ES-Zell Medium inkubiert, welches unterschiedliche Konzentrationen an hLIF enthielt. Die hLIF-Menge, bei der nach 10 Tagen die ES-Zell Kolonien keine deutliche Differenzierung („ausfransen der Kolonieränder und bräunliche Farbe der Kolonien) zeigten, wurde in doppelter Konzentration für die Dauerkultur eingesetzt. Dazu wurden Aliquots des hLIF eingefroren, nachdem diese mit 1mg/ml BSA versetzt wurden und durch einen 0,2µm Filter steril filtriert wurden. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.12.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

ES-Zellen wurden in ES-Zell spezifischem Medium (10% FCS, 5% DMSO und 85% ES-Zell Medium) eingefroren. Das Auftauen erfolgte schnell in einem Wasserbad. Anschließend wurde das Einfrieremedium durch Zentrifugation in einer Zellkulturzentrifuge (1.000Rpm, 5min, RT) abgetrennt. Das ES-Zell-Sediment wurde vorsichtig in ES-Zell-Medium aufgenommen und dann wurden die Zellen auf vorbereitete Feeder-Zellkulturschalen (10cm) ausgesät.

2.12.4 Elektroporation von ES-Zellen

Für die Elektroporation von ES-Zellen wurden diese 24h zuvor 1:5 neu ausgesät, damit diese sich in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die ES-Zellen wurden durch Trypsinisierung von Feeder-Platten gewonnen, die anschließend wieder für 20min in den Inkubator gelagert wurden. Während dieser Inkubation setzten sich die Feederzellen ab und die ES-Zellen konnten vorsichtig abgenommen werden. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wurden 5×10^6 Zellen in 0,8ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden dann in eine 0,4cm Küvette (RioRad) mit 10µg des linearisierten Targeting-Konstrukts überführt

und für 10min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit 240V und 500µF. Die Zellen wurden nach dem Elektroschock in der Küvette sofort wieder für 3min auf Eis inkubiert und dann in 10ml vorgewärmten Medium resuspendiert. Anschließend wurden je 1ml der ES-Zellen auf 10x10cm Feeder-Platten ausplattiert. Nach 24h wurde das ES-Zell Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht.

2.12.5 Selektion von ES-Zellen

Die Selektion positiver, elektroportierter ES-Zell Klone wurde durch Zugabe von G418 (0,4mg/ml aktive Form) durchführt. Da die verwendeten primären Fibroblasten ebenfalls G418-resistent waren, mußte auf eine Kokultivierung mit Fibroblasten nicht verzichtet werden. 24h nach der Elektroporation der ES-Zellen wurde das Medium durch Selektionsmedium ersetzt. Nach 10 Tagen wurden die ersten ES-Zellklone mit einer Pipette aufgenommen und in 96er- Zellkulturplatten (mit MEF) überführt. ES-Zellklone wurde bis zum zwölften Tag gesammelt. Selektionierte ES-Zellen wurden kontinuierlich unter Selektionsmedium gehalten. Die Amplifikation der ES-Zellen erfolgte von 96er-Platten über 24er-Platten auf 6cm Platten (alle mit MEF). Von 24er-Platten wurden Duplikate angelegt, wovon eine zur weitem Kultivierung verwendet wurde und die zweite für die Genotypisierung der ES-Zellklone. Zum Schluß wurden je 5 Plastikröhrchen jedes ES-Zellklons bei -150°C eingefroren.

2.12.6 Extraktion von ES-Zell-DNA

Um ES-Zellklone mit homologer Rekombination des Tageting-Konstruktes zu identifizieren, wurden mit Southern Blot Methode genotypisiert.

ES-Zellklone wurden auf 24er-Zellkulturplatte nach dem Waschen mit PBS trypsinisiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C, wurde das gleiche Volumen ES-Zellmedium zum Abstoppen der Reaktion hinzugegeben. Die einzelnen Klone wurden dann durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Dabei wurden sowohl die MEFs, als auch die ES-Zellen resuspendiert. Anschließend wurde die 24er-Zellkulturplatte wieder für 20-30min bei 37°C in einem Inkubator transferiert, damit sich die MEFs absetzen konnten. Anschließend wurden die noch nicht adhärenen ES-Zellen vorsichtig abgenommen und auf eine neue 24er-Zellkulturplatte überführt. Nach ca. 4-5 Tagen waren die ES-Zellklone konfluent und wurden in 300µl Proteinase K Puffer

(0,2mg/ml Proteinase K) aufgenommen. Nach einer Inkubation üN bei 37°C wurden die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Das DNA-Sediment wurde nach der Zentrifugation (4.000Upm, 15min, RT) und dem Waschen mit 70%igen Ethanol in 100-200µl TE-Puffer aufgenommen. 20-30µl der gelösten DNA wurde anschließend für die Southern Blot Analyse eingesetzt.

Vor der Injektion der ES-Zellklone in Blastozysten, wurden die Klone durch eine weitere Southern Blot Analyse verifiziert, um Kontermainationen auszuschließen.

2.13 Transgene Methoden

Der DNA-Transfer in den Pronukleus und der anschließende Ovidukttransfer wurde freundlicherweise von Dr. Karin Schuster-Gossler durchgeführt.

2.14 Embryologische Methoden

2.14.1 Gewinnung von Embryonen

Zur Gewinnung von Embryonen wurden heterozygote Mäuse *inter se* verpaart. Morgens wurden die Weibchen auf das Vorhandensein eines Vaginalpropfs hin untersucht. Da Mäuse nachtaktiv sind, wurde das Alter der Embryonen als 0,5dpc definiert.

Nach der Tötung des Muttertieres wurde der Bauchraum geöffnet und der Uterus herauspräpariert. Nach der Befreiung aus dem Uterus wurden die Embryonen in PBS von ihren extraembryonalen Hüllen befreit. Mußten die Embryonen genotypisiert werden, wurde der Dottersack zur DNA-Extraktion aufgehoben.

2.14.2 Fixierung und Lagerung von Embryonen

Embryonen wurden nach dem Waschen mit PBS in 4% PFA üN die 4°C fixiert. Am folgenden Tag wurde nach dem Waschen mit PBS eine aufsteigende Methanolreihe durchgeführt, um die Embryonen in 100% Methanol bei -20°C zu lagert.

Die so gewonnenen Embryonen wurden für in situ Experimente, histologische und immunbiochemische Experimente verwendet.

18,5dpc alte Embryonen wurden in Bouins-Lösung fixiert. Zuerst wurden die Embryonen in Ethanol fixiert und entwässert und dann in der Fixierungslösung für 1-3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen über mehrere Tage mit 70% Ethanol gewaschen.

2.15 Histologische Methoden

2.15.1 Paraffinschnitte

Embryonen wurden entweder mit Methanol oder mit Ethanol entwässert und dann in 100% Isopropanol überführt. Danach wurde sukzessiv der Paraffinanteil erhöht bis dieser 100% erreicht hatte. Die Dauer der Inkubationsschritte reichte bei kleinen Embryonen (9,5-11,5dpc) Stunden, für ältere Embryonen wurde die einzelnen Inkubationsschritte auf 12-36h verlängert.

Die in Paraffin überführten Embryonen wurden gemäß der gewünschten Orientierung in Plastikgefäße eingebettet. Nach dem Erkalten wurden 5-10µm Schnitte mittels eines Mikrotoms angefertigt. Die Objekte wurden für 5-10min in ein Wasserbad (42°C) zum Strecken transferiert und von dort dann auf Objektträger (Superfrost) überführt.

2.15.2 Entwachsen von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden zuerst zweimal in Rotihistol (Roth) für je 10min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolreihe. Zweimal wurden die Schnitte mit 100%igem Ethanol für je 10min inkubiert, dann folgten Waschschrte mit 70%igem und 50%igem Ethanol. Zum Schluß wurden die Schnitte zwei weitere Male für je 10min in H₂O gewaschen. Ab diesem Schritt, konnten die Schnitte für *in situ* Experimente, HE-Färbungen und immunhistologische Experimente weiter verwendet werden.

2.15.3 Hämatoxylin/Eosin-Dünnschichtsnitte

Für die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, wurden 10µm Schnitte eingesetzt. Die Färbung erfolgte nach dem Entwachsen der Schnitte mittels Rotihistol (Roth) und anschließender Ethanolreihe. Die Färbung mit Hämatoxylin erfolgte für 45sec und die Färbung mit Eosin mit 60sec. Anschließend wurden die Schnitte in Ethanol und

schließlich in Rotihistol überführt. Aus dem Rotihistol wurden die Schnitte mit Permount eingedeckelt.

2.15.4 Apoptose-Assay mittels TUNEL-Methode

Apoptotische Zellen auf Paraffin-Schnitten wurden mit der sogenannten TUNEL-Methode nachgewiesen. Die Methode basiert darauf, dass die genomische DNA apoptotischer Zellen fragmentiert vorliegt. An die 3'-Termini der DNA kann die Terminale Nukleotid Transferase (TNT) markierte Nukleotide addieren. Diese markierten Nukleotide können durch einen fluoreszenz-markierten Antikörper nachgewiesen werden. Es wurde dafür das indirekte Apoptose-System der Firma ApoTech mit Fluorescein gekoppelten Antikörpern verwendet. Es wurden 5µm Paraffin-Schnitte von PFA-fixierten Embryonen verwendet. Die Anweisungen des Herstellers wurden genau befolgt, einschließlich der DAPI-Kernfärbung. Die Dokumentation der Schnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und einer Digitalkamera.

2.15.5 Proliferations-Assay von BrdU-markierten Embryonen

Proliferierende Zellen können während der DNA-Synthesephase das Nukleotidanalogs 5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin (BrdU) in die DNA einbauen. Das BrdU kann anschließend mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden. Danach kann ein Markierungsindex erstellt werden, der die Zahl der markierten Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl stellt. Unterschiedliche Markierungsindizes zwischen zwei Objekten (z.B. WT gegenüber mutanten Objekt), reflektierten die unterschiedlichen Proliferationsraten zwischen den untersuchten Geweben.

Schwangere Mäuse wurden gegen Mittag mit 0,1ml pro 10g Körpergewicht mit einer BrdU-Lösung (10mg/ml) injiziert. Nach einer Stunde wurden die Embryonen gesammelt und in 4% PFA fixiert. Für immunhistochemische Experimente wurden 5µm Schnitte angefertigt (siehe auch Gewinnung von Paraffinschnitten und Entwachsen von Paraffinschnitten).

Nach dem letzten Ethanol Schritt der Entwachsprozedur wurden die Schnitte zweimal für je 3-5min in MilliQ-H₂O inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Schnitte mit einer sogenannten Antigen-Unmasking Lösung (VectorLabs). Dazu wurden je zwei Schnitte, in ein 50ml Plastikgefäß, mit Antigen-Unmasking Lösung

überführt und dann für 15min in einem Wasserbad aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Objektträger wurden diese zuerst einmal mit MilliQ-H₂O gewaschen, bevor sie durch eine Inkubation in 3% H₂O₂ für 10min inkubiert wurden. Es folgten zwei Waschschrte in PBS, um dann die Objekte in Blocklösung (M.O.M-Kit, VectorLabs) für eine Stunde zu blocken. Durch zweimaliges Waschen mit PBS für je 5min, wurde die Blocklösung wieder entfernt, um dann die Objekte in „Diluent“-Lösung (M.O.M-Kit, VectorLabs) für mindestens 5min zu äquilibrieren. Der primäre anti-BrdU Antikörper (Roche) wurde in der „Diluent“-Lösung 1:200 verdünnt und die Objekte damit für 30min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS für je 5min und anschließend eine Inkubation mit dem Biotin-markierten sekundären Antikörper (Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent, VectorLabs). Bei dem Einsatz des sekundären Antikörper wurden die Angaben des Herstellers genau befolgt.

Der Inkubation des sekundären Antikörper folgten zwei Waschschrte mit PBS für je 5min. Daran schloß sich eine Inkubation für 15min mit der frisch angesetzten ABS-Lösung an, die wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5min beendet wurde. Schließlich wurde durch die Farbreaktion mit DAB und H₂O₂ (VectorLabs) die BrdU-markierten Zellen sichtbar gemacht. Nach zweimaligen Waschen mit H₂O und Gegenfärben mit DAPI, wurden die Objekte in MOWIOL eingebettet.

Es wurden alle Zellen, die DAB-positive Färbung aufwiesen, als „markiert“ und alle DAPI fluoreszierende Zellen als „nicht-markiert“ definiert. Die Tatsache, dass das DAB-Präzipitat die Fluoreszenz des DAPI unterdrückt erlaubt eine eindeutige Zuweisung.

Die Anzahl der „markierten“ Zellen wurden ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt, um den Markierungsindex zu bestimmen.

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm EXCEL (Microsoft) durchgeführt, es wurden ferner die Standardabweichung und die Signifikanz mittels Studentischem T-Test bestimmt.

2.15.6 Skelettfärbungen

13.5d alte Embryonen wurden direkt durch Inkubation in Ethanol entwässert, älteren Embryonen wurde zuerst die Haut (nach 5min Inkubation mit 70°C H₂O) und dann die inneren Organe entfernt. Zur Genotypisierung wurden Gewebereste der inneren

Organe eingesetzt. Die freipräparierten Embryonen wurden in Ethanol für mehrere Tage entwässert. Daran schloß sich eine Inkubation mit Knorpelfärbelösung (80% Ethanol, 20% Eisessig, 150 mg/l Alcian Blau) für 1-3 Tage an. Durch mehrmaliges Waschen mit Ethanol wurde die überschüssige Färbelösung wieder entfernt. Daraufhin wurden die Embryonen unter Sichtkontrolle in 0,5-2%ige KOH-Lösung für ca. 1-3h inkubiert. Es folgte eine mindestens fünfstündige Inkubation in Knochenfärbelösung (50mg/l Alizarin Rot in 0,5% KOH-Lösung). Durch mehrmaliges Waschen mit H₂O wurde dann überschüssige Färbelösung wieder entfernt. Um nach vorhandene Gewebeteile zu entfernen, wurden die Embryonen über einen Zeitraum von 1-2 Wochen in 0,05-0,5%iger KOH-Lösung inkubiert. Die so präparierten Skelette wurden in 30%iges Glycerin überführt und schließlich dokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1 Proteinbiochemische Untersuchungen des Tbx18 Proteins der Maus

3.1.1 Gewinnung eines Tbx18 Antiserums

Für verschiedene proteinbiochemische Experimente wurde ein Antiserum gegen das Tbx18-Protein der Maus hergestellt. Für die Immunisierung von Kaninchen wurden Tbx18/GST-Fusionsproteine eingesetzt. Es wurden zwei Fragmente der *Tbx18* cDNA (Genebank Accession#: AL035694) in den Vektor pGEX-2T kloniert, um so die zwei Expressionskonstrukte zu generieren (pGEX.Tbx18.GST1^(bp1457-2183) und pGEX.Tbx18.GST2^(bp1757-2183)). Die beiden Fragmente entsprechen dem C-terminalen Bereich des Tbx18-Proteins. Dieser Bereich des Tbx18-Proteins weist keinerlei signifikante Homologie zu anderen Proteinen auf. Kaninchen wurden mit beiden, zuvor aufgereinigten Proteinen, immunisiert.

Für die Aufreinigung des Tbx18-Antiserums wurde das Rohserum zuerst über eine GST-Affinitätssäule geschickt, um die Antikörper, die gegen die Glutathion-S-Transferase gerichtet waren, zu entfernen. Anschließend wurde das Serum über eine Tbx18-Affinitätssäule geschickt. Die Affinitätssäule wurde durch eine Bindung beider Fusionsproteine an eine BrCN-Säule hergestellt. Nach der Elution der Antikörper von der Säule wurden die verschiedenen Fraktionen photometrisch auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt und verwendet. Im Folgenden wird das Tbx18-Antiserum als Tbx18-Antikörper oder R- α -Tbx18 bezeichnet.

Für eine genaue Beschreibung siehe auch Material und Methoden (2.9.9-2.9.11).

3.1.2 Analyse der Spezifität des Tbx18-Antikörpers

3.1.2.1 Spezifität des Tbx18-Antikörpers in Western Blots

Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde untersucht, für welche Experimente der Antikörper geeignet ist.

Um zu untersuchen, ob der Tbx18-Antikörper für den Nachweis des Tbx18-Proteins auf Membranen geeignet ist, wurde ein Western Blot Experiment durchgeführt. Dazu

wurden 293T-Zellen mit einem Tbx18-Expressionskonstrukt (pcDNA3.Tbx18) transient transfiziert. Auf einem SDS-PAGE Gel wurden die Lysate von nicht- und Tbx18-transfizierten Zellen aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine und dem Transferieren auf eine Membran, wurde diese mit dem Tbx18-Antikörper inkubiert. Nach der darauffolgenden Inkubation mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers, wurde die Membran schließlich mit dem ECL-System (Amersham) entwickelt.

Die Abbildung 7 zeigt, daß der Antikörper eine relativ hohe Hintergrundaktivität besitzt. Es konnte jedoch eine spezifische Bande bei ca. 75kDa identifiziert werden. Diese Bande trat nur in den Lysaten der transfizierten Zellen auf und zeigt, daß der Antikörper das Tbx18-Protein detektieren kann.

Das Tbx18-Protein zeigte somit ein größeres Molekulargewicht (75kDa) als theoretisch berechnet (65,5kDa).

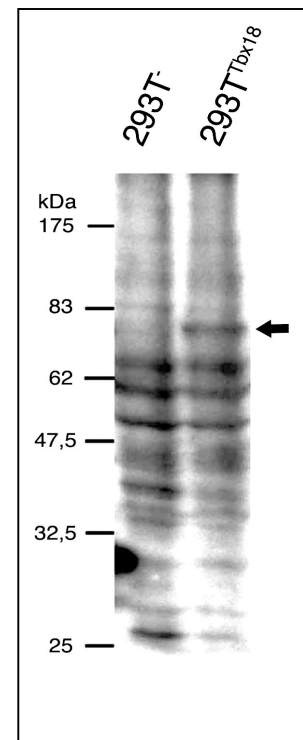


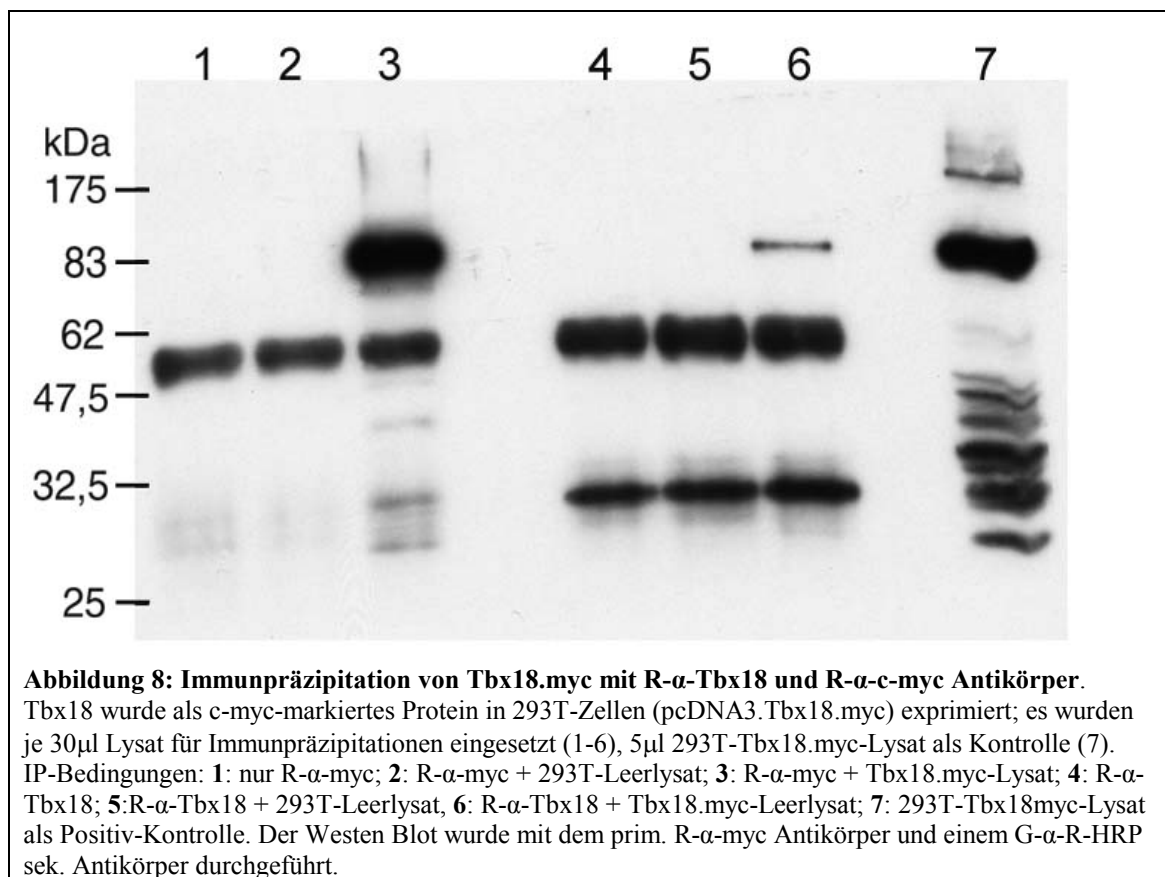
Abbildung 7: Tbx18-Western Blot. Links: 293T-Leerlysat, rechts 293T-Tbx18 Lysat. Der Tbx18-3' Antikörper zeigt eine Bande bei ca. 75kDa (s. Pfeil). kDa: Protein-Marker

3.1.2.2 Spezifität des Tbx18-Antikörpers in Immunpräzipitationen

In 293T-Zellen exprimiertes und mit einem c-myc-Epitop-markiertes Tbx18-Protein wurde mit dem Tbx18-Antikörper bzw. einem Anti-c-myc Antikörper immunpräzipitiert. Die gewonnenen Immunpräzipitate wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde eine Präzipitation mit einem Anti-c-myc Antikörper (R α -c-myc) in das Experiment integriert, um zusätzlich eine semiquantitative Aussage zur Effizienz des Tbx18-

Antikörpers, relativ zu dem Anti-c-myc Antikörper zu machen. Der verwendete Anti-c-myc Antikörper stammte aus Kaninchen und konnte, wie der Tbx18-Antikörper, detektiert werden. Anhand der Intensität der Banden, die durch die schwere Kette (ca. 50kDa) der Antikörper erzeugt wurden, konnte die Antikörperkonzentration, relativ zum Anti-c-myc Antikörper, abgeschätzt werden.

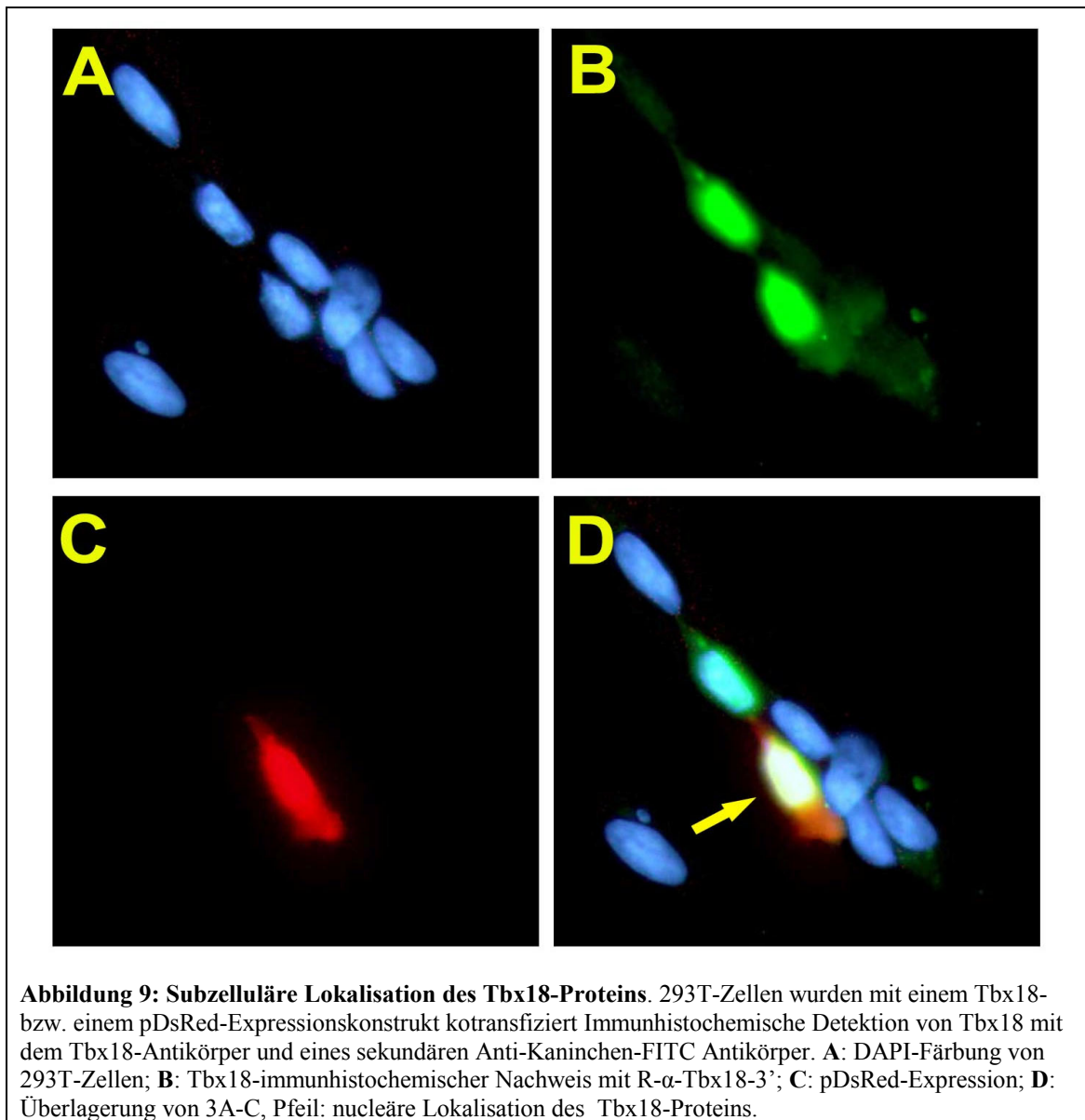
Die Abbildung 8 zeigt, daß der R- α -c-myc Antikörper spezifisch das Tbx18.myc-Protein aus 293T-Zellextrakten immunpräzipitieren kann (Abb.8 Spur 3). Mit dem Tbx18-Antikörper konnte ebenfalls das Tbx18.myc-Protein aus den Lysaten immunpräzipitiert werden (Abb.8 Spur 6), jedoch war die Menge im Vergleich zum R- α -c-myc Antikörper sehr viel geringer.



Die Banden, die von den schweren Ketten der Antikörper erzeugt wurden, wiesen eine annähernd gleiche Intensität im Western Blot auf. Daraus läßt sich folgern, daß gleiche Mengen an Antikörper für die Immunpräzipitationen verwendet wurden. Es muß angenommen werden, daß der Tbx18-Antikörper eine geringere Effizienz in Immunpräzipitationen besitzt als der Anti-c-myc Antikörper.

3.1.2.3 Einsatz des Tbx18-Antikörpers in immunhistochemischen Experimenten

Zur Untersuchung der Spezifität des Tbx18-Antikörpers in immunhistochemischen Experimenten wurden 293T-Zellen mit einem Tbx18-Expressionskonstrukt (pcDNA3.Tbx18) transfiziert. Anschließend wurde das exprimierte Protein mit dem Tbx18-Antikörper und einem FITC-markierten, sekundären Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen. Durch die gleichzeitige Transfektion mit dem pDsRed-Expressionskonstrukt und einer Kernfärbung mit dem DAPI-Farbstoff, konnte eine Aussage über die subzelluläre Lokalisation von Tbx18 gemacht werden, das rot-fluoreszierende DsRed eine zytoplasmatische Lokalisation besitzt und der DAPI-Farbstoff das Chromatin anfärbt.

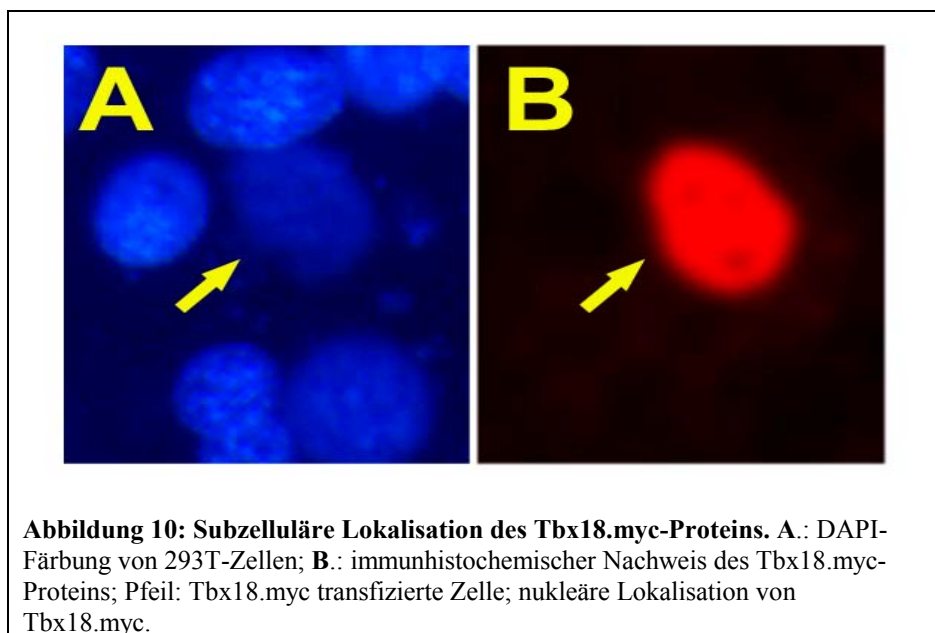


Die Abbildung 9 zeigt, daß mit dem Tbx18-Antikörper spezifisch das Tbx18-Protein in transfizierten Zellen nachgewiesen werden kann (Abb.9B). Eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigt, daß das Tbx18-Protein im Zellkern lokalisiert ist (Abb.9D, Pfeil).

Nicht-transfizierte 293T-Zellen zeigten eine kaum zu detektierende Fluoreszenz, was auf die Spezifität des Tbx18-Antikörpers hindeutet. Somit konnte nachgewiesen werden, daß der Tbx18-Antikörper für immunhistochemische Experimente - in denen Tbx18 überexprimiert wurde - einsetzbar ist.

Da für verschiedene proteinbiochemische Experimente c-myc-markiertes Tbx18-Protein verwendet wurde, ist auch für dieses Protein eine immunhistochemische Analyse durchgeführt worden, um die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen.

Dazu wurde das Tbx18.myc-Protein in transfizierten 293T-Zellen (pcDNA3.Tbx18.myc) mit einem Maus- α -c-myc Antikörper (9E10) immunhistochemisch nachgewiesen.



Die Abbildung 10 zeigt, daß das Tbx18.myc-Protein im Zellkern von 293T-Zellen nachgewiesen werden kann. Das c-myc-Epitop hat somit keinen Effekt auf die nukleäre Lokalisation des Proteins.

3.1.3 Bestimmung der DNA-Bindungsspezifität des Tbx18-Proteins

3.1.3.1 Isolierung von Tbx18 DNA-Bindungsstellen

Die T-box ist das Protein-Motiv, daß bei Proteinen der T-Box Familie die spezifische DNA-Bindung vermittelt. Für das Tbx18-Protein wurde eine Analyse der DNA-Bindungsspezifität durchgeführt. Es kam dabei eine Methode zum Einsatz, die von Pollock et al. (1990) beschrieben wurde und von Kispert et al. (1993) für die Bestimmung der DNA-Bindungsspezifität des T-Proteins eingesetzt wurde.

Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente von einer Länge von 76bp, deren innere 26 Basenpaare eine komplett degenerierte DNA-Sequenz aufweisen, eingesetzt. Die degenerierten 26bp werden durch konstante Primer-Sequenzen flankiert, die eine Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zulassen. Diese Fragmente werden mit einer Proteinquelle inkubiert, die den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor enthält. Anschließend werden durch eine Immunpräzipitation, Komplexe aus DNA und dem entsprechenden Transkriptionsfaktor isoliert.

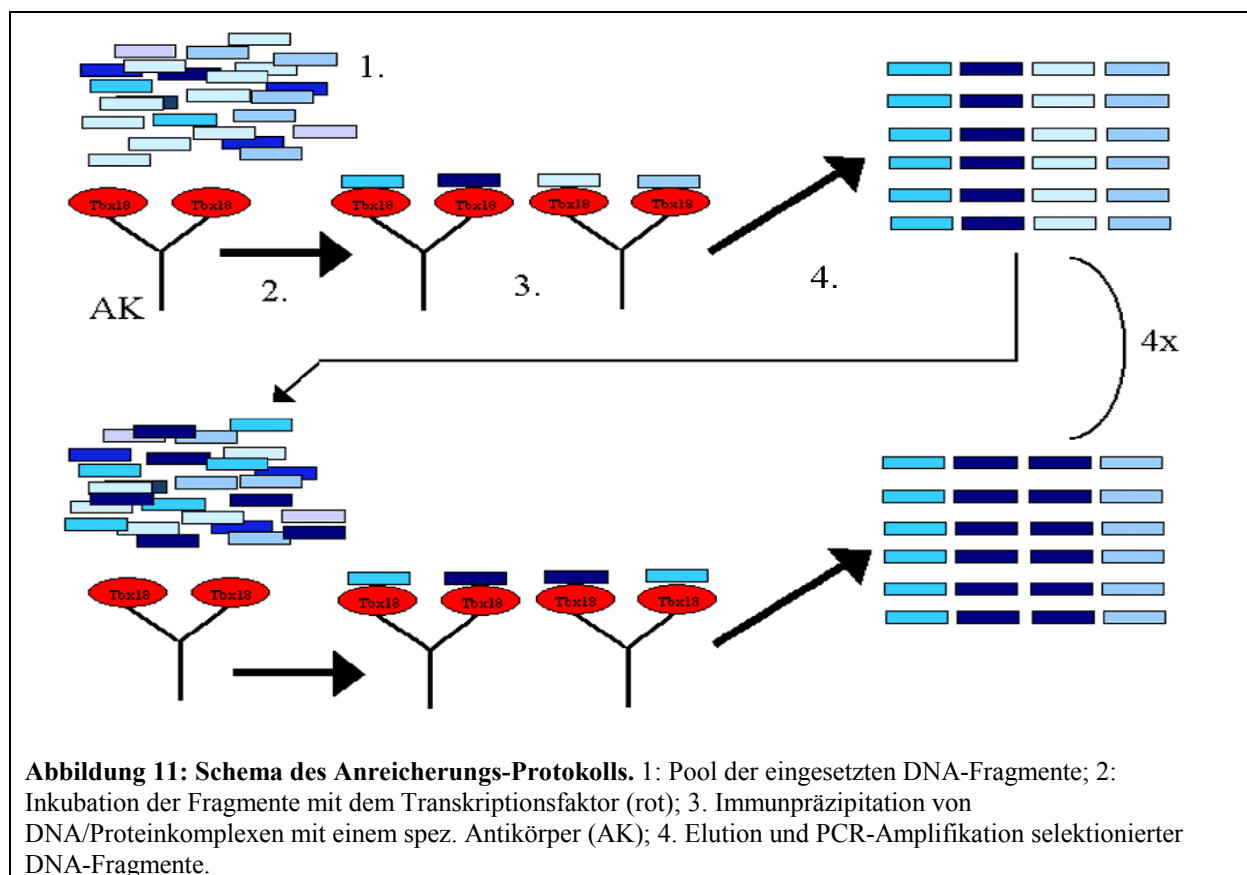


Abbildung 11: Schema des Anreicherungs-Protokolls. 1: Pool der eingesetzten DNA-Fragmente; 2: Inkubation der Fragmente mit dem Transkriptionsfaktor (rot); 3: Immunpräzipitation von DNA/Proteinkomplexen mit einem spez. Antikörper (AK); 4: Elution und PCR-Amplifikation selektierter DNA-Fragmente.

Nach der Freisetzung der DNA-Fragmente aus den DNA/Protein-Komplexen werden diese durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und dann einer neuen Selektionsrunde zugeführt. Es wurden für die PCR-Amplifikation der Fragmente mehrere Ansätze parallel durchgeführt, wobei die Anzahl der PCR-Zyklen variiert wurde. Es wurde versucht, die Zyklenzahl der PCR möglichst gering zu halten, um eine gleichförmige Amplifikation aller Fragmentspezies zu gewährleisten. Bei einer hohen Zyklenzahl besteht die Möglichkeit, daß einige Fragmente sich besser amplifizieren lassen und somit eine ungleichmäßige Anreicherung die Folge ist. Durch mehrmaliges Wiederholen von Immunpräzipitationen und PCR-Amplifikationen, können DNA-Fragmente angereichert werden, die der DNA-Bindungsstelle des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors entsprechen. Die Abbildung 11 zeigt ein Schema dieser Methode.

Für die Analyse der DNA-Bindungsspezifität des Tbx18-Proteins wurden Zellsate von 293T-Zellen, die mit einem Tbx18-Expressionskonstrukt (pcDNA3.Tbx18) transfiziert worden waren, eingesetzt. Die Immunpräzipitation der DNA/Protein-Komplexe erfolgte mit dem Tbx18-Antikörper. Es wurden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt, wobei aus jeder Selektionsrunde ein Teil der amplifizierten DNA-Fragmente für DNA-Bindungsstudien aufbewahrt wurde. Die selektionierten DNA-Fragmente wurden *in vitro* mittels Gelretentionsanalyse (EMSA) untersucht.

Die Fähigkeit eines Proteins an ein DNA-Fragment zu binden kann mittels Gelretentionsanalyse untersucht werden. Dazu inkubiert man, meist radioaktiv-markierte DNA-Fragmente, mit einer Proteinquelle des zu untersuchenden Proteins. Anschließend wird der Ansatz auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufzutrennt. Die DNA-Fragmente besitzen aufgrund ihrer molekularen Größe ein charakteristisches Migrationsverhalten. Durch die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment bildet sich ein DNA/Protein-Komplex mit einem höheren Molekulargewicht, als das eines ungebundenen DNA-Fragmentes. Als Folge zeigen diese DNA/Protein-Komplexe bei einer elektrophoretischen Auftrennung ein verzögertes Migrationsverhalten gegenüber den ungebundenen Fragmenten. Wird zu einem Ansatz aus DNA-Fragmenten und Protein noch ein spezifischer Antikörper, der gegen das Protein gerichtet ist, zugegeben, dann können sich noch

höhermolekulare Komplexe bilden, die zu einem noch geringeren Migrationsverhalten neigen. Diese hochmolekularen Komplexe werden oft auch als „Supershifts“ bezeichnet. Die Verwendung eines spezifischen Antikörpers erlaubt eine Aussage über die DNA-Bindungsfähigkeit eines Proteins, auch wenn eine komplexe Proteinquelle, wie z.B. Zellextrakte, zum Einsatz kommt. Nach der Exposition des Polyacrylamidgels gegen einen Röntgenfilm, kann das unterschiedliche Migrationsverhalten von DNA und DNA/Protein-Komplexen nachgewiesen werden.

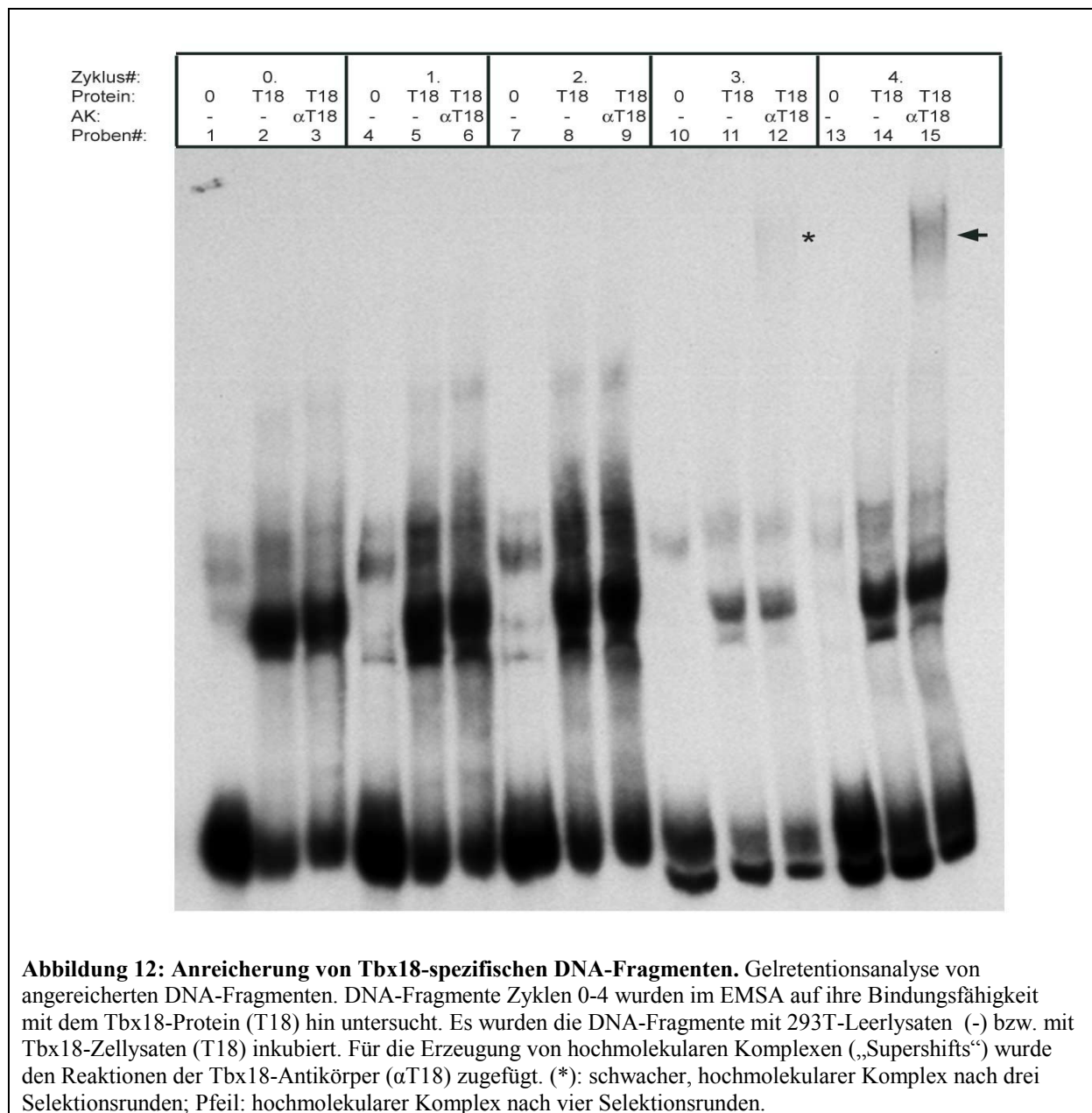


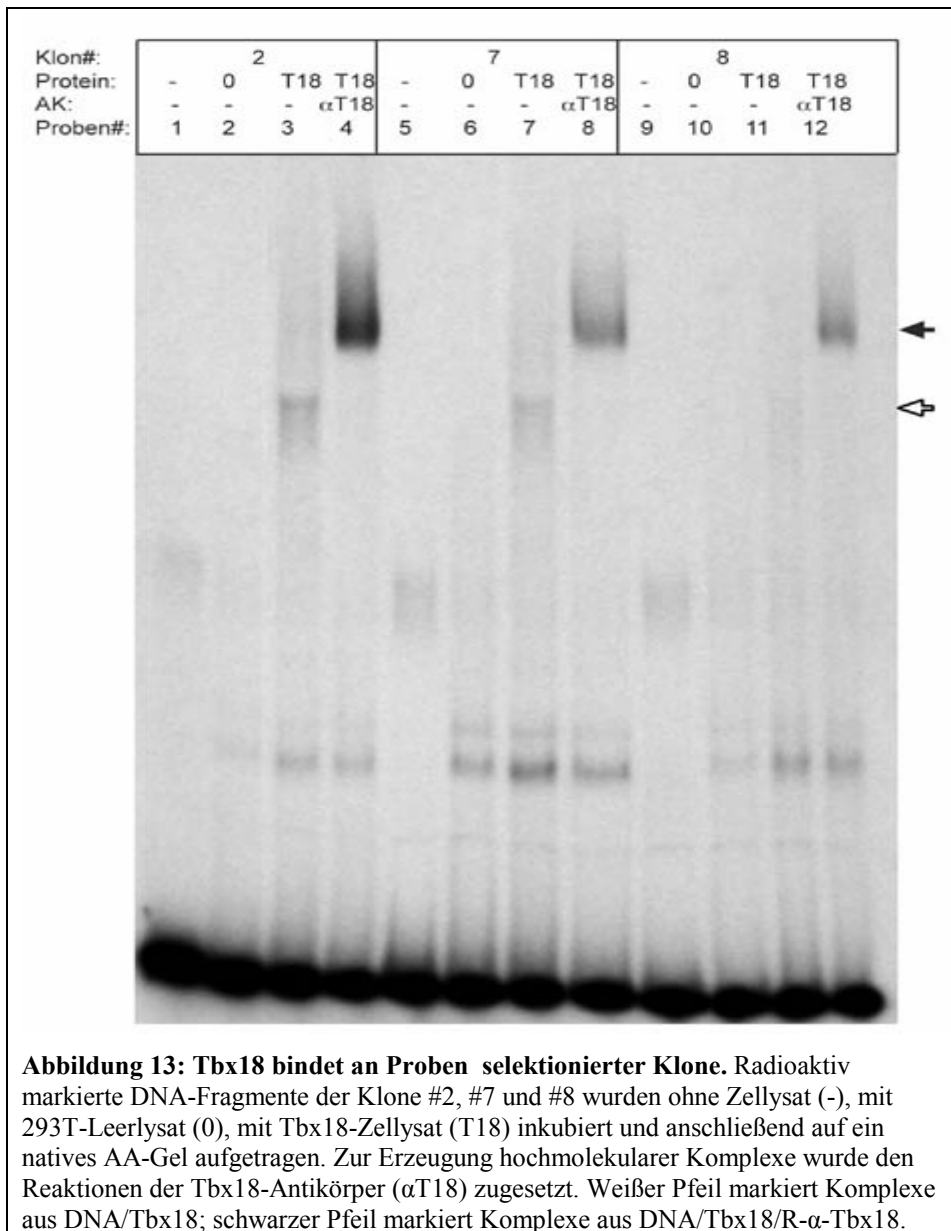
Abbildung 12: Anreicherung von Tbx18-spezifischen DNA-Fragmenten. Gelretentionsanalyse von angereicherten DNA-Fragmenten. DNA-Fragmente Zyklen 0-4 wurden im EMSA auf ihre Bindungsfähigkeit mit dem Tbx18-Protein (T18) hin untersucht. Es wurden die DNA-Fragmente mit 293T-Leerlysaten (-) bzw. mit Tbx18-Zellysaten (T18) inkubiert. Für die Erzeugung von hochmolekularen Komplexen („Supershifts“) wurde den Reaktionen der Tbx18-Antikörper (α T18) zugefügt. (*): schwacher, hochmolekularer Komplex nach drei Selektionsrunden; Pfeil: hochmolekularer Komplex nach vier Selektionsrunden.

Die Abbildung 12 zeigt, daß die eingesetzten DNA-Fragmente (0. Runde) keine sichtbaren, hochmolekularen DNA/Tbx18-Komplexe im EMSA bilden konnten da diese zu komplex waren. Erst nach drei Selektionsrunden war die Anreicherung an spezifischen DNA-Fragmenten ausreichend, um einen hochmolekularen Komplex mit dem Tbx18-Protein und dem Tbx18-Antikörper zu formen (Abb.12; Spur 12; Sternchen). Nach insgesamt vier Selektionsrunden wurden spezifische DNA-Fragmente selektioniert, die im EMSA einen robusten, hochmolekularen Komplex bilden konnte (Abb.12; Spur 15; Pfeil).

Für weitere DNA-Bindungsstudien wurden die amplifizierten DNA-Fragmente aus der vierten Selektionsrunde in den Klonierungsvektor pBluescript kloniert.

3.1.3.2 Untersuchung selektionierter DNA-Fragmente auf ihre Tbx18-Bindungsfähigkeit

Die DNA-Bindungseigenschaften einzelner Klone aus der vierten Selektionsrunde wurden mittels Gelretentionsanalyse charakterisiert. Diese Analyse wurde durchgeführt um zu bestimmen, ob DNA-Fragmente einzelner Klone eine Bindungsstelle für das Tbx18-Protein darstellten.

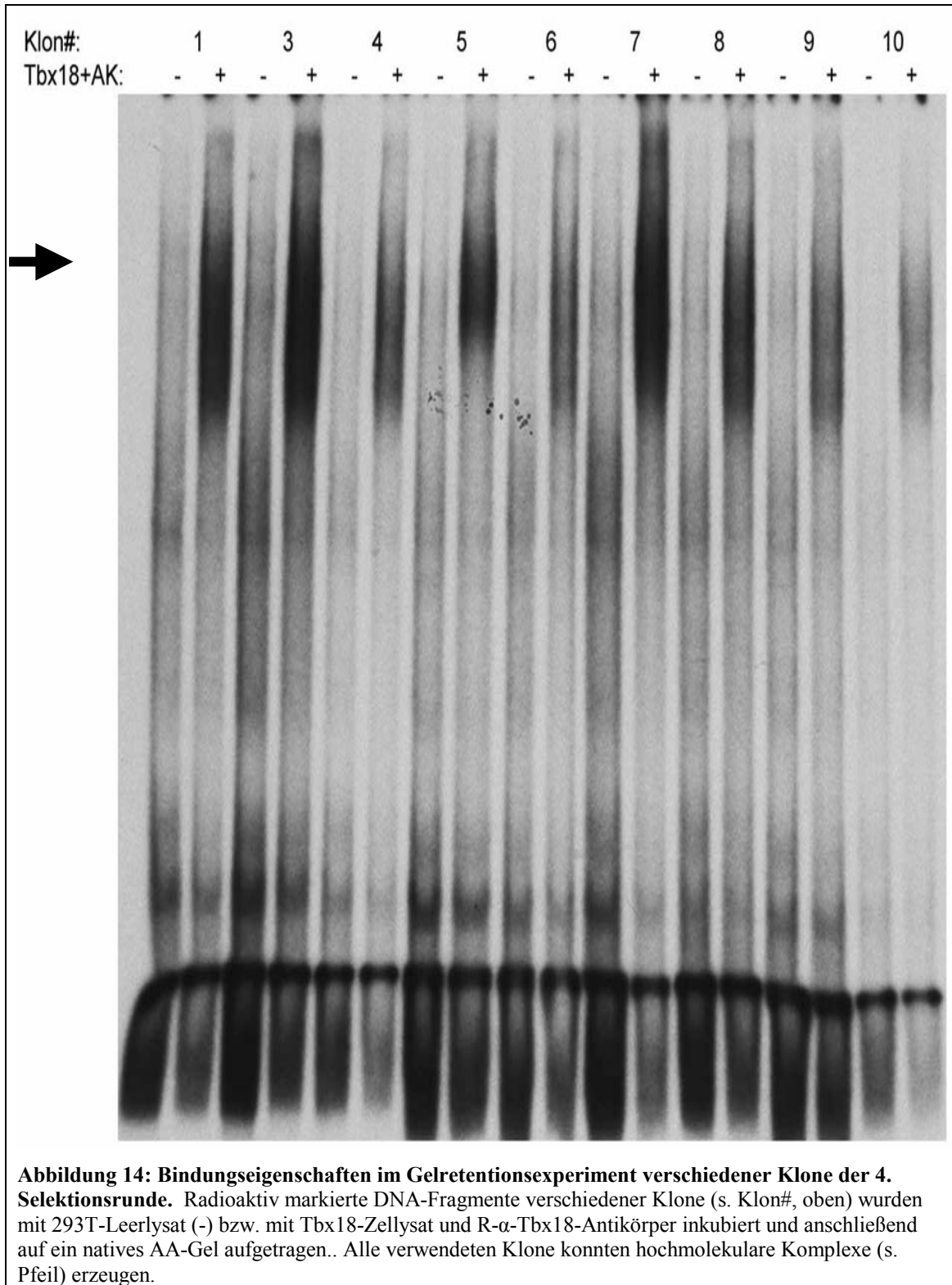


Die Abbildung 13 zeigt, daß Proben der Klone #2, #7 und #8 im Gelretentionsexperiment durch das Tbx18-Protein gebunden wurden (Abb.13; weißer Pfeil). Daß die Bindung der Fragmente durch das Tbx18-Protein vermittelt wurde, konnte dadurch gezeigt werden, daß mit Hilfe des Tbx18-Antikörpers spezifische, hochmolekulare Komplexe (Abb.13; schwarzer Pfeil) erzeugt werden konnten. Proben der beiden Klone #2 und #7 können mit dem Tbx18-Protein sowohl einem „Supershift“ als auch einen Komplex ohne Antikörper formen (Abb.13; weißer Pfeil). Im Gegensatz dazu, konnte mit der Probe des Klons #8 nur ein „Supershift“ erzeugt werden.

Da mit Hilfe des Tbx18-Antikörpers hochspezifische Komplexe erzeugt werden konnten wurden für die weitere Analyse die DNA-Fragmente nur unter diesen Bedingungen (Tbx18-Protein und Tbx18-Antikörper) untersucht. Da die Selektion der Bindungsstellen mit dem Tbx18-Protein in der Gegenwart eines Antikörpers (Immunpräzipitation) durchgeführt wurde, wurde die Eigenschaft der Proben mit dem Tbx18-Protein und Tbx18-Antikörper „Supershifts“ zu erzeugen als notwendiges Kriterium für eine weitere Untersuchung herangezogen. Dies wurde deshalb gemacht, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß der Antikörper Einfluß sowohl auf die Spezifität der DNA-Bindung, als auch die Kinetik ausübt.

Die Abbildung 14 zeigt, daß Proben aller untersuchten Klone in der Lage waren, an das Tbx18-Protein zu binden und mit dem Tbx18-Antikörper hochmolekulare Komplexe zu formen. Da die radioaktiv markierten Proben nicht explizit auf ihre Markierungseffizienz hin untersucht wurden, kann eine Affinität der Proben zum Tbx18-Protein nicht anhand der Intensität der „Supershifte“ bestimmt werden.

Alle untersuchten Klone konnten in Gelretentionsexperimenten (zumindest in der Gegenwart des Tbx18-Antikörpers) durch das Tbx18-Protein gebunden werden und wurden deshalb zur weiteren Analyse sequenziert.



3.1.3.3 Sequenzanalyse selektionierter DNA-Fragmente

Für die Bestimmung der Tbx18 DNA-Bindungssequenz wurden 21 selektionierte Klone sequenziert. 11 von 21 sequenzierten Klonen zeigten eine identische Sequenz (Tabelle 1; Sternchen). Dies deutet darauf hin, daß eine starke Bindungsstelle schon in einer frühen Selektionsrunde angereichert wurde.

Durch die Bestimmung der Häufigkeit einzelner Nukleotide in den Sequenzen von der untersuchten DNA-Fragmente konnte gezeigt werden, daß die Konsensussequenz das Motiv TTCACACCT der DNA-Bindungsstelle des T-Proteins enthielt (Tabelle 2; unterstrichene Sequenz).

Tabelle 1: Identifizierte Klone und Sequenzanalyse

1:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
2:	TAGGTGTTATTTTCACACCTTGCTGC	
3:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
4:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
5:	ACACTCTCCAGGCGTGAAAAGTGCTG	
6:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATG	
7:	TAGGTGTTATTTTCACACCTTGCTGC	
8:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
9:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC	
10:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
11:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
12:	GGAGTGAATTGTCACCTCTGACTATC	
13:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
14:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
15:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
16:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACCGCA	
17:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
18:	CCAGGTGCGATTTTCACACCTACTGCA	*
19:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC	
20:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC	
21:	AGAGGTGACAATTTCCACCTTCACTG	

Tabelle 2: Bestimmung der relativen Häufigkeit einzelner Nukleotide in den selektionierten Klonen

Ps.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
A:	2	2	15	0	0	0	5	6	2	14	1	0	0	5	14	0	16	1	1	1	17	0	1	5	0	12
T:	2	0	4	0	8	13	3	2	5	7	14	20	15	1	1	0	5	0	5	15	3	1	16	2	7	0
G:	5	6	2	20	13	7	13	0	12	0	6	1	0	1	0	1	0	0	0	5	0	2	1	12	2	3
C:	12	13	0	1	0	1	0	13	2	0	0	0	6	14	6	20	0	20	15	0	0	18	3	2	12	6

Position (Ps.) der Nukleotide im Selektionsoligo; relative Häufigkeit der 4 verschiedenen Nukleotide (A;T;G;C)

Konsensussequenz:

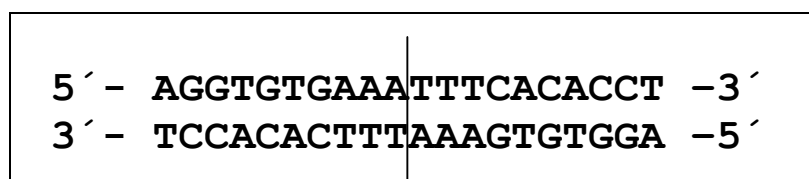
	C	C	A	G	G	T	G	C	G	A	T	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	G	C	A
%	57	62	71	95	62	62	62	62	57	67	67	95	71	67	67	95	76	95	71	71	81	86	76	57	57	57

Die so gewonnene Sequenz weist einen annähernd palindromischen Charakter auf. Die rechte Hälfte TTCACACCTAC der Sequenz ist dabei stärker konserviert, als die linke Hälfte AGGTGCGAT. Durch die Verwendung eines Sequenzanalyseprogramms (MacVector) konnte die Konsensussequenz noch weiter optimiert werden. Variationen treten insbesondere in der Symmetrieachse der palindromischen Sequenz auf. Die Tabelle 3 zeigt, ein „best fit alignment“ aller untersuchten Sequenzen. Berücksichtigt man die Variationen für die Generierung der Bindungsstelle aus dieser optimierten Konsensussequenz dann folgt daraus, daß die Tbx18 DNA-Bindungsstelle einer perfekten palindromischen Sequenz entspricht

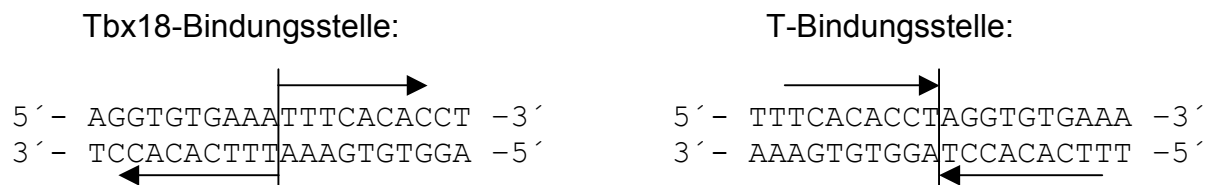
Tabelle 3: Sequenzanalyse

1:	CCAGGTGCGATTT--CACACCTACTGCA
2:	TAGGTGTTATTTT CACACCTTGCTGC
3:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
4:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
5:	CAGCACTTTTCACGCCTGGAGAGTGT
6:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATG
7:	TAGGTGTTATTTT-CACACCTTGCTGC
8:	CCAGGTGCGATTT--CACACCTACTGCA
9:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC
10:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
11:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
12:	GGAGTGAATTGTCACCTCTGACTATC
13:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
14:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
15:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
16:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACCGCA
17:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
18:	CCAGGTGCGATTT--CACACCT-ACTGCA
19:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC
20:	GGTGTGAATTGTCACCTCTGACTATC
21:	AGAGGTGACAATTTCCACCTTCACTG
Konsensus:	AGGTGTGAAATTTACACCT

Für die optimierte Tbx18 Bindungsstelle konnte folgende Sequenz identifiziert werden:



Die palindromische DNA-Bindungsstelle von Tbx18 zeigt eine inverse Orientierung zur DNA-Bindungsstelle des T-Proteins. Die Sequenz TTCACACCT wird (Kispert et al. 1993) als T/2-Bindungsstelle bezeichnet und stellt das gemeinsame Grundmotiv beider DNA-Bindungsstellen dar.



In weiteren DNA-Bindungsstudien wurde untersucht, ob und wie die Orientierung der T/2-Bindungsstellen, Einfluß auf die Bindungseigenschaften haben.

3.1.4 Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften des Tbx18-Proteins

Für die Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften des Tbx18-Proteins wurden verschiedene Bindungsstellen eingesetzt (Tabelle 4). Da die Tbx18 DNA-Bindungsstelle eine invertierte DNA-Bindungsstelle des T-Proteins darstellt, wurde eine DNA-Bindungsstudie mit verschiedenartigen Bindungsstellen durchgeführt, die unterschiedliche Orientierungen der T/2-Seiten aufwiesen. Da sich die DNA-Bindungsstellen des T- und des Tbx18-Proteins lediglich in der Orientierung der T/2-Seiten unterscheiden, wurde auch die Fähigkeit des T-Proteins untersucht, an die Tbx18-Bindungsstelle zu binden. Ziel der Analyse war es zu untersuchen, ob die Orientierung der T/2-Seiten die Spezifität festlegt, welches der beiden Proteine die entsprechende Bindungsstelle erkennen und binden kann.

Probenbezeichnung	Symbol	Sequenz (5'-3')
<i>T</i> – Bindungsstelle:	<i>P</i>	<u>GGGAATTCACACCTAGGTGTGAAATTCCC</u>
<i>T/2</i> – Bindungsstelle:	<i>P/2</i>	<u>GATCCGGTTTCACACCTGGA</u>
<i>Tbx18</i> – Bindungsstelle:	<i>P18</i>	<u>GATCCGGAGGTGTGAAATTCACACCTGGA</u>
<i>Tbx18-2</i> – Bindungsstelle:	<i>P18-2</i>	<u>GATCCGGAGGTGTGAATTCACACCTGGA</u>
Tbx18s – Bindungsstelle:	<i>P18s</i>	<u>GATCCGGTGCAGTAGGTGTGAAATCGCACCTGGGGA</u>

Tabelle 4: Auflistung der untersuchten Bindungsstellen; T/2-Seiten unterstrichen

Bei der Bindungsstelle P18-2 wurden zwei Nukleotide an der Symmetrieachse der Tbx18-Bindungsstelle entfernt. Diese Deletion verringert den Abstand der beiden T/2-Bindungsstellen. Die Bindungsstelle P18s repräsentiert die Bindungsstelle, die in mehr als 50% der Klone identifiziert wurde.

3.1.2.1 Untersuchungen zur Orientierung der palindromischen Anordnung der Bindungsstelle

Bei allen folgenden Gelretentionsanalysen wurden *in vitro* translatierte Proteine verwendet, um die Komplexität an DNA-bindenden Proteinen in den Reaktionen (im Vergl. zu Zellysaten) zu reduzieren. Die Proteine wurden als c-myc-markierte Proteine exprimiert, um durch den Einsatz eines Anti-c-myc Antikörpers (9E10), die Spezifität der Bindung nachzuweisen. In der Abbildung 15 ist zu erkennen, daß die Retikulozytenlysate alleine, zwei schwache, unspezifische Banden mit der P18-Bindungsstelle erzeugten.

Aus der Abbildung 15 wird ebenfalls deutlich, daß das Tbx18.myc-Protein die Bindungsstelle P18 *in vitro* binden kann. Die aus der Sequenzanalyse der selektionierten Fragmente abgeleitete DNA-Bindungsstelle P18 stellt somit eine echte DNA-Bindungsstelle für das Tbx18-Protein dar. Die Zugabe eines Anti-c-myc Antikörpers (9E10) führte zur Bildung eines noch größeren Komplexes und zu einer weiteren Verzögerung der Probe im Gel (Abb.15; Spur 4). Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Bindung der Probe P18 durch das Tbx18.myc-Protein erzeugt wurde. Daß die Retention des DNA/Protein-Komplexes durch den Anti-c-myc Antikörper gerichtet war, konnte dadurch gezeigt werden, daß bei der Verwendung eines Antikörpers gegen N-CAM keine Retention des Komplexes aus der P18-Probe mit dem Tbx18-Protein zur Folge hatte. Alle verwendeten Proben, die als (nicht-markierte) Kompetitor den Reaktionen im tausendfachen Überschuß zugegeben wurden, konnten um die Bindung mit der P(18)-Bindungsstelle kompetetieren (Abb. 15; Spur 6-9).

Auch das T.myc-Protein ist in der Lage an die Tbx18-Bindungsstelle P18 zu binden. Der Komplex, der von dem T.myc-Protein mit der P-18 Bindungsstelle generiert wurde zeigt, daß es sich dabei um eine starke Bindung handelt. Die Bindung des T.myc-Proteins wurde durch den Einsatz des Anti-c-myc (9E10) Antikörpers ebenfalls bestätigt. Das T-Protein kann somit an Bindungsstellen mit beiden Orientierungen

der T/2-Seiten binden. Der Einsatz eines spezifischen Antikörpers führte sowohl im Falle des Tbx18-Proteins, als auch im Falle des T-Proteins zu einer Verstärkung der DNA-Bindung beider Proteine. Die durch den Antikörper erzeugten Komplexe waren für beide Proteine deutlich stärker (sichtbar anhand der Intensität) als die Komplexe, die nur aus DNA-Probe und Protein erzeugt wurden. Für das T-Protein wurde dieser Effekt schon beschrieben (Kispert A; Doktorarbeit; 1993). Es liegen für das T-Protein Daten vor die zeigen, daß das T-Protein die T-Bindungsstelle als Homodimer binden kann (Müller et al. 1997).

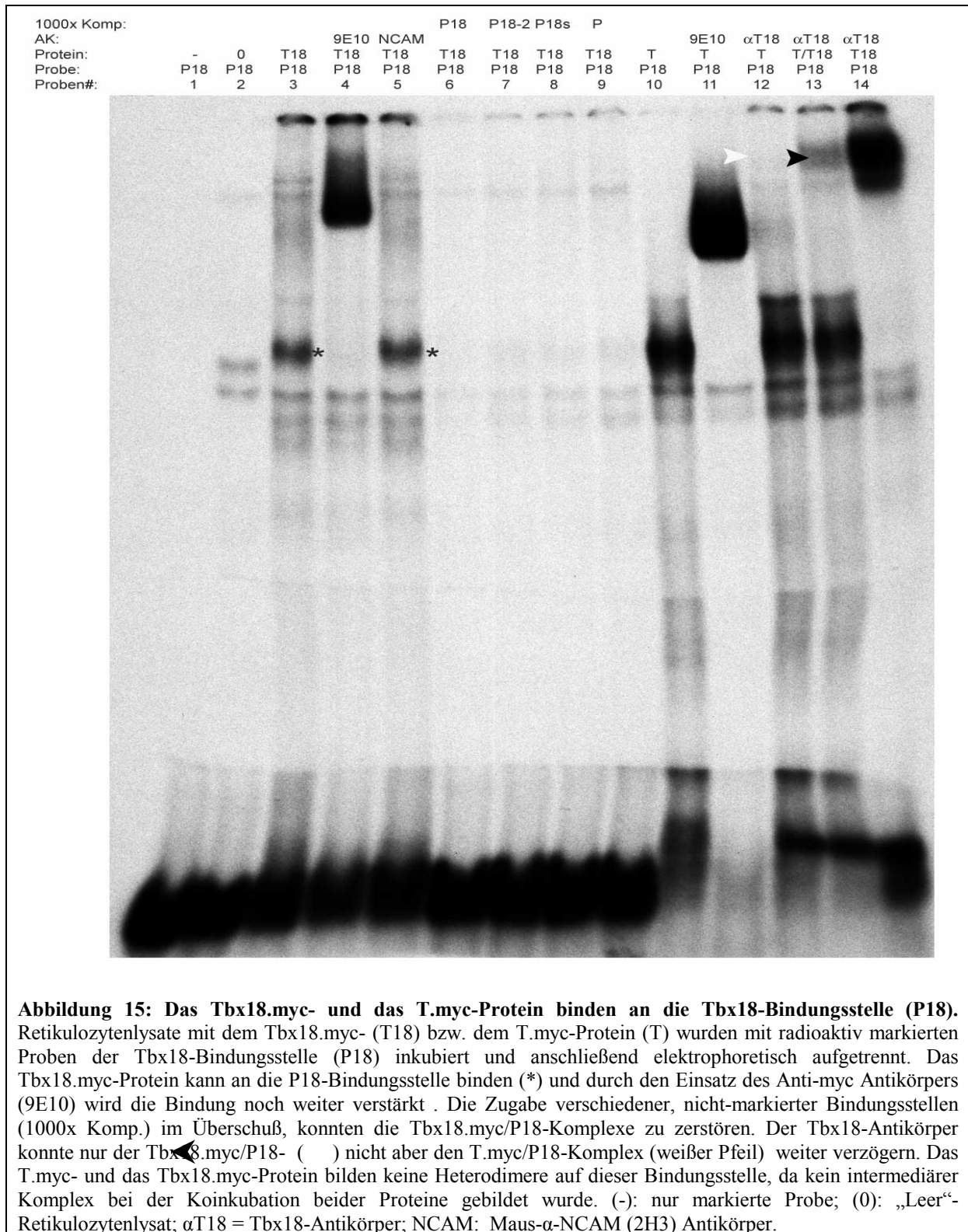
Es wurde im Rahmen der DNA-Bindungsstudien für das Tbx18-Protein auch untersucht, ob Tbx18 mit dem T-Protein Heterodimere auf den Bindungsstellen bilden kann.

Möglich wurde diese Untersuchung, da der Tbx18-Antikörper nur an das Tbx18-, nicht aber an das T-Protein binden kann (Abb15; Spur 12 u. 14). Damit könnten in einem Gel drei verschiedene Komplexspezies nachgewiesen werden. Homodimere Komplexe aus dem Tbx18-Protein mit der P18-Bindungsstelle würden durch den Tbx18-Antikörper am stärksten im Gel verzögert werden, da Antikörper an beide Proteine binden würden. Komplexe, in denen das T-Protein als Homodimer bindet, würden durch den Antikörper nicht im Gel verzögert werden. Heterodimere Komplexe aus dem Tbx18- und dem T-Protein würden einen intermediären Komplex erzeugen, da nur an das Tbx18-Protein die Antikörper binden können.

Mit Hilfe des Tbx18-Antikörpers, konnte nur der P18/Tbx18.myc-Komplex (Abb. 15 Spur 14) noch weiter im Gel verzögert werden, nicht jedoch der T.myc/P18-Komplex (Abb. 15 Spur 12). Bei der Koinkubation von Lysaten mit beiden Proteinen entstanden keine Heterodimere mit den P18-Bindungsstelle, die aufgrund ihrer molekularen Größe einen intermediären Komplex hätten formen müssen. Dadurch konnte gezeigt werden, daß das T.myc- und das Tbx18.myc-Protein keine Heterodimere mit der Tbx18-Bindungsstelle bilden unter diesen *in vitro* Bedingungen formen können.

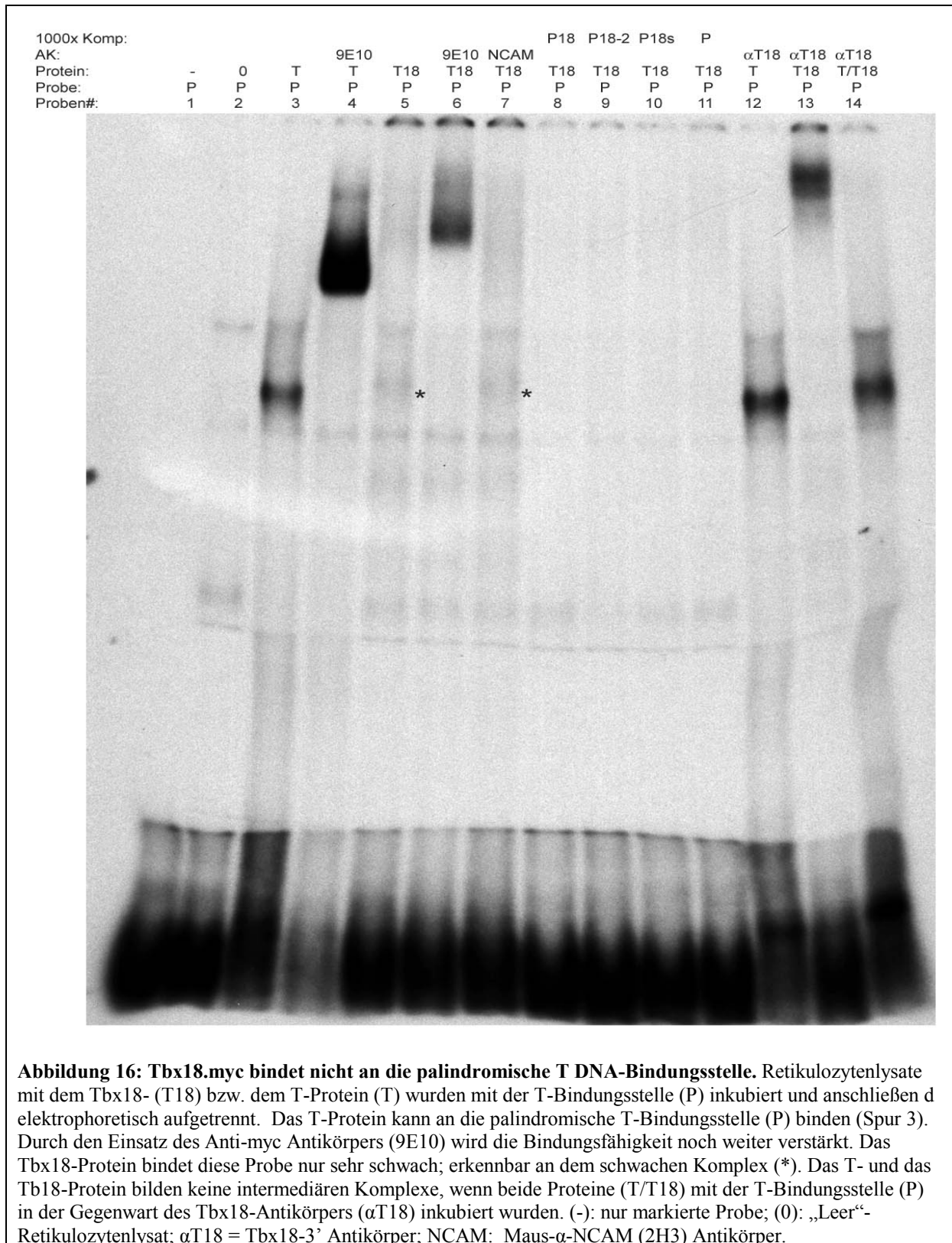
Das T-Protein besitzt eine starke Affinität zur Tbx18-Bindungsstelle. Bei der Koinkubation beider Proteine in Gegenwart des Tbx18-Antikörpers, konnte keine deutliche Verringerung an Komplexen aus dem T-Protein mit der P18-Bindungsstelle beobachtet werden (Abb.15; Spur 13; schwarzer Pfeil), obwohl der Tbx18-Antikörper eine verstärkende Wirkung auf die DNA-Bindung des Tbx18-Proteins besitzt. Damit

kann das Tbx18-Protein selbst in der Gegenwart eines Antikörpers nicht mit dem T-Protein um die P18-Bindungsstelle konkurrieren.



Da es sich bei der palindromischen Bindungsstelle (P) des T-Proteins um eine invertierte Tbx18-Bindungsstelle handelt, wurde auch mittels Gelretentionsanalyse

untersucht, ob bei dieser Orientierung der T/2-Seiten einen Einfluß auf die Bindung durch das Tbx18-Protein hat.



Wie schon von Kispert et al. (1993) beschrieben, bindet T.myc-Protein die palindromische T-Bindungsstelle (P) (Abb.16, Spur 3). Das Tbx18.myc-Protein bindet

im Vergleich zum T.myc-Protein nur sehr schwach an die T-Bindungsstelle (Abb10, *). Das Tbx18.myc-Protein war jedoch sowohl in der Gegenwart des Anti-myc (9E10) als auch des Tbx18-Antikörpers in der Lage, robuste Komplexe mit der T-Bindungsstelle zu formen. Der unspezifische Antikörper Anti-NCAM zeigte keinerlei Wirkung auf die DNA-bindenden Eigenschaften des Tbx18.myc-Proteins (Abb. 16, Spur 7).

Bei der Koinkubation beider Proteine - in der Gegenwart des Tbx18-Antikörpers - konnten keine intermediären Komplexe mit dieser Bindungsstelle beobachtet werden. Dies zeigt ebenfalls, daß beide Proteine keine Heterodimere unter diesen Umständen zusammen mit der T-Bindungsstelle formen können.

Die geringe Affinität des Tbx18.myc-Proteins zu dieser Bindungsstelle zeigt sich zum einen daran, daß die Komplexe nur äußerst schwach waren (Abb. 16, *) und zum anderen dadurch, daß bei der Koinkubation beider Proteine nur ein Komplex auf der Höhe des T.myc-Komplexes sichtbar war (Abb. 16, Spur 14). In der Gegenwart beider Proteine konkurriert das T.myc-Protein so stark um die Bindungsstellen, daß selbst in der Gegenwart des Tbx18-Antikörpers, sich keine Komplexe aus Tbx18.myc/T-Bindungsstelle/R- α -Tbx18 bilden.

Somit ist die Orientierung der Halbseiten der palindromischen DNA-Bindungsstellen des Tbx18-Protein wichtig für die DNA-Bindungseigenschaften ist. Das Tbx18-Protein bindet an die Tbx18-Bindungsstelle (P18) und nur äußerst schwach an die T-Bindungsstelle (P).

Dagegen ist das T-Protein in der Lage an Bindungsstellen mit beiden Orientierungen der T/2-Seiten zu binden.

3.1.2.2 Untersuchung von modifizierten Tbx18-Bindungsstellen

In weiteren DNA-Bindungsstudien wurde der Einfluß von Deletionen innerhalb der palindromischen Bindungsstelle analysiert. Durch die Deletion eines Adenosins und eines Thymidins an der Symmetrieachse der Tbx18-Bindungsstelle (P18) wurde die Bindungsstelle P18-2 generiert. Tbx18 kann trotz dieser Deletion an diese Bindungsstelle binden wie die Abbildung 17 zeigt.

Da die Kernsequenz TCACACCT nicht verändert ist, scheint die Bindung durch das Tbx18-Protein tolerant gegenüber Veränderungen außerhalb dieser Kernsequenz zu

sein. Eine weitere Untersuchung bezüglich des Abstandes der T/2-Seiten wurde an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

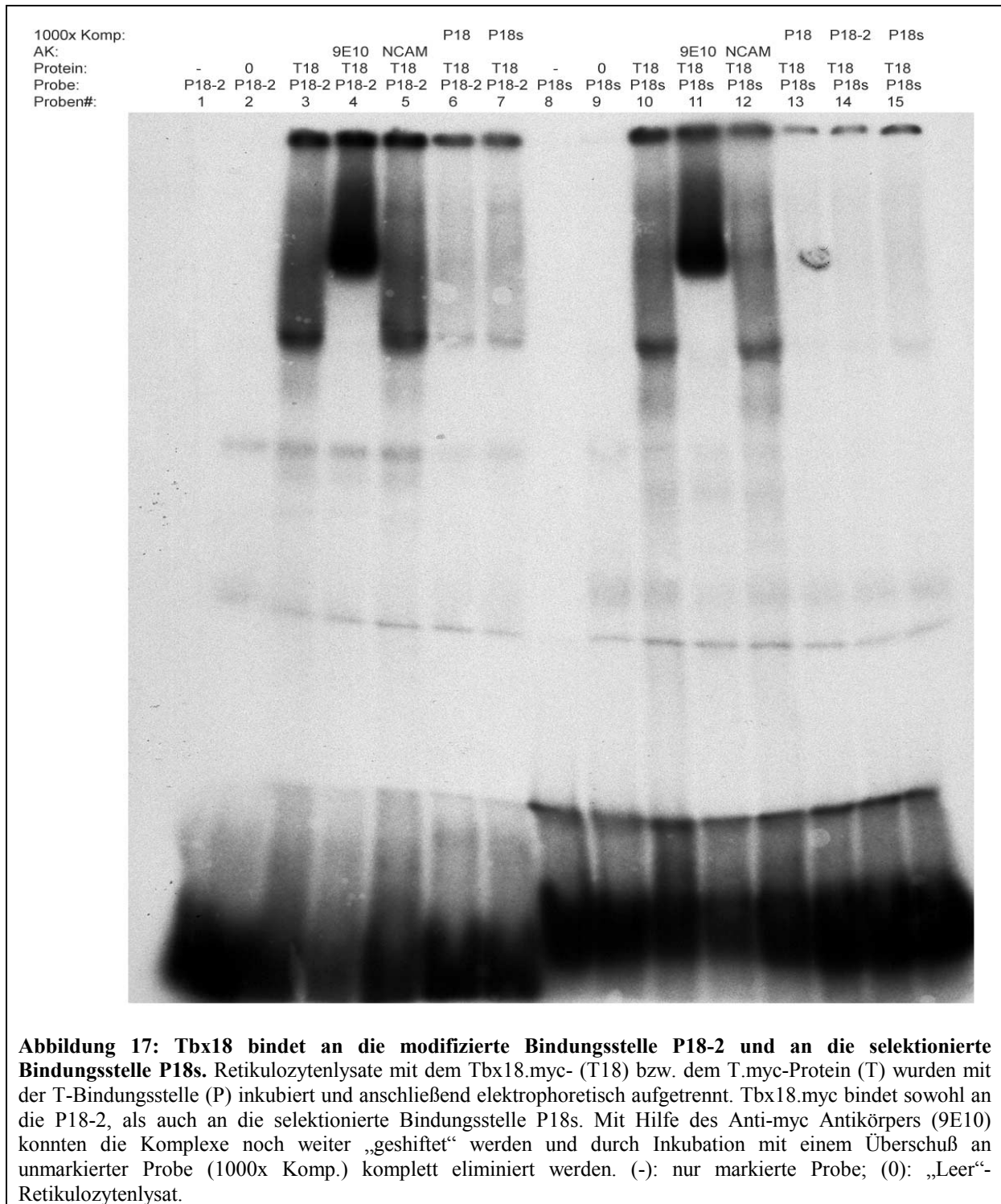


Abbildung 17: Tbx18 bindet an die modifizierte Bindungsstelle P18-2 und an die selektierte Bindungsstelle P18s. Retikulozytenlysate mit dem Tbx18.myc- (T18) bzw. dem T.myc-Protein (T) wurden mit der T-Bindungsstelle (P) inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Tbx18.myc bindet sowohl an die P18-2, als auch an die selektierte Bindungsstelle P18s. Mit Hilfe des Anti-myc Antikörpers (9E10) konnten die Komplexe noch weiter „geschiftet“ werden und durch Inkubation mit einem Überschuß an unmarkierter Probe (1000x Komp.) komplett eliminiert werden. (-): nur markierte Probe; (0): „Leer“-Retikulozytenlysat.

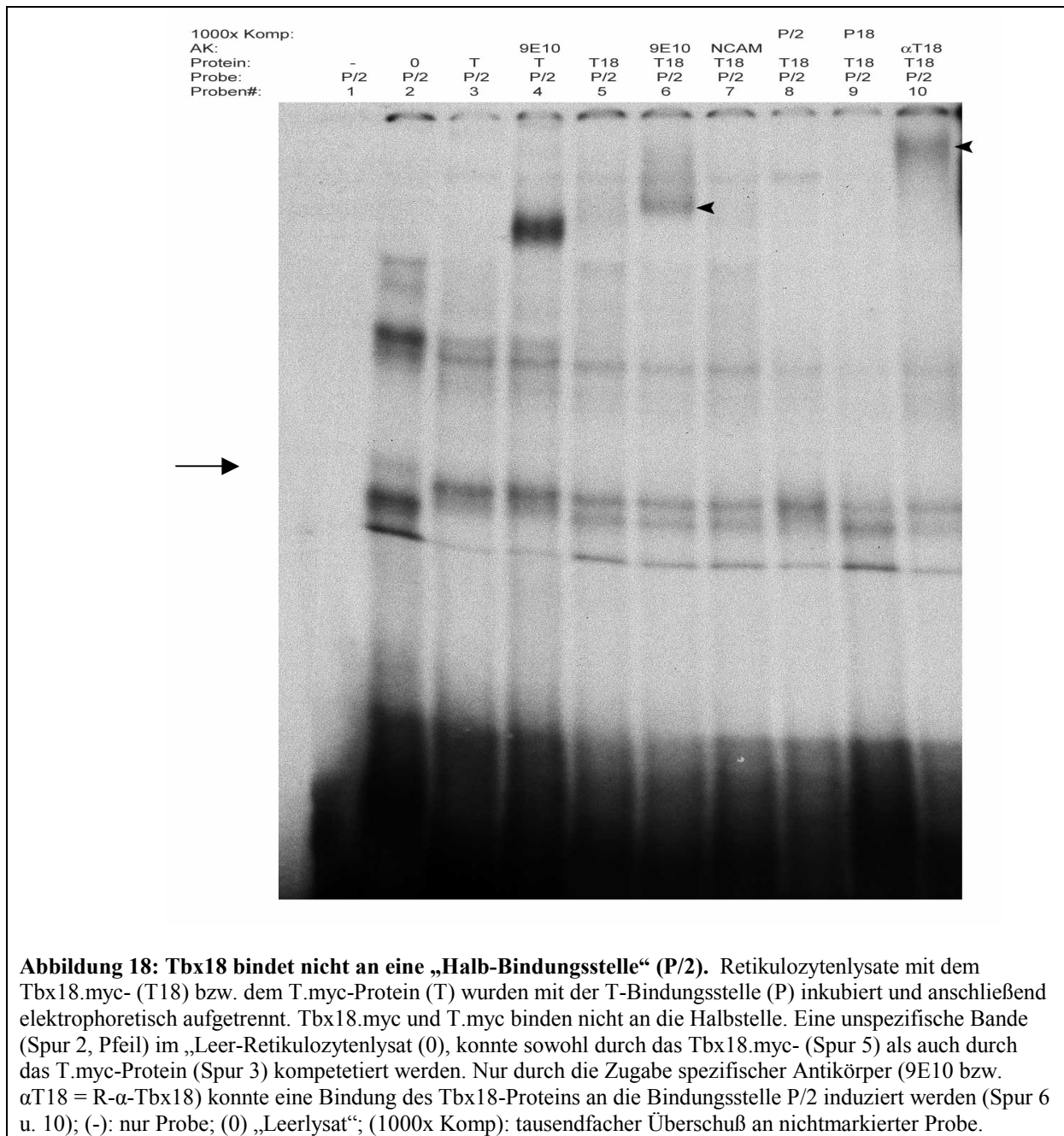
Auch die Bindungsstelle, die in der Selektion zu mehr als 50% isoliert wurde, wird von dem Tbx18.myc-Protein gebunden. Durch die Zugabe des Anti-c-myc Antikörpers (9E10) konnten die Komplexe mit beiden Bindungsstellen noch weiter verstärkt und im Gel verzögert werden. Die Verwendung von unmarkierten Proben im

großen Überschuß führte zu einer Eliminierung der DNA/Protein-Komplexe (Abb17; Spur 6,7 und 13-15).

Eine Bindung des Tbx18-Proteins an DNA scheint somit dann gewährleistet zu sein, solange zwei „Kern-Halbseiten“ TCACACCT in der Konfiguration der Tbx18-Bindungsstelle vorliegen.

Zur Untersuchung, ob eine Halbseite für die Bindung von Tbx18 ausreichend ist, wurden Gelretentionsexperimente mit einer T/2-Bindungsstelle (P/2) durchgeführt. Aus der Abbildung 18 ist zu erkennen, daß weder das Tbx18.myc- noch das T.myc-Protein in der Lage ist, an eine T/2-Bindungsstelle zu binden. Eine unspezifische Bande des Retikulozytenlysates (Abb. 18, Spur 2) konnte jedoch durch beide Proteine fast komplett eliminiert werden (Abb. 18, Pfeil). Dies deutet darauf hin, daß sowohl das Tbx18.myc- als auch das T.myc-Protein eine Affinität zu dieser Bindungsstelle besitzen und mit dem unspezifischen Protein um diese Bindungsstelle kompetetieren. Jedoch sind beide Proteine nicht in der Lage, stabile Komplexe mit dieser Bindungsstelle zu formen. Erst die Zugabe von spezifischen Antikörpern induziert bei beiden Proteinen eine Bindung an die T/2-Bindungsstelle (Abb.18 Pfeilkopf).

Aus den oben beschriebenen Bindungsstudien für das Tbx18-Protein - als auch für das T-Protein - ist zu erkennen, daß das DNA-Motiv TCACACCT ein notwendiges Motiv für die DNA-Bindung beider Proteine ist. Das T-Protein vermag an Kombinationen mit beiden Orientierungen zu binden, wohingegen das Tbx18-Protein nur eine Konfiguration binden kann: AGGTGTGAAATTTTCACACCT. Es ist aus den Experimenten ebenfalls abzuleiten, daß das Tbx18-Protein zwar eine Affinität zu der Halbseite besitzt, jedoch eine (Homo-) Dimerisierung zur DNA-Bindung notwendig erscheint.



3.1.2.3 Tbx18-Strukturvorhersage

Für das *Xenopus*-Homolog von Brachyury, Xbra und vom menschlichen Tbx3 wurden zusammen mit der palindromischen DNA-Bindungsstelle (P), die Kristallstrukturen beschrieben (Müller et al. 1997; Coll et al. 2002). Innerhalb der T-box weisen beide Proteine eine Aminosäureidentität von rund 50% auf (Coll et al. 2002). Strukturell zeigen beide Proteine ebenfalls eine hohe Homologie insbesondere in den Bereichen, in denen Aminosäuren den Kontakt mit der DNA aufnehmen.

Mit Hilfe des Programms SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>) wurde anhand der Tbx18 Primärsequenz eine Strukturvorhersage durchgeführt.

Nimmt man die 3D-Struktur der T-box von Xbra als Grundlage, so kann die Primärsequenz der T-box von Tbx18 mit hoher Ähnlichkeit gegen diese Struktur superpositioniert werden (Abbildung 19A und B). Die Abbildung 19C zeigt einen Sequenzvergleich der verschiedenen T-box Domänen von Xbra, Tbx18 und des menschlichen Tbx3. Das Tbx18-Protein der Maus besitzt nur 44% Aminosäureidentität bei einer Sequenzähnlichkeit von rund 66%, mit der T-box des Xbra-Proteins. Jedoch sind die Aminosäuren, die im Xbra-Protein den Kontakt mit der DNA vermitteln, im Tbx18-Protein bis auf drei Unterschiede konserviert. Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit, lässt sich auch die Sequenzspezifität des Tbx18-Proteins für die T/2-Seite erklären.

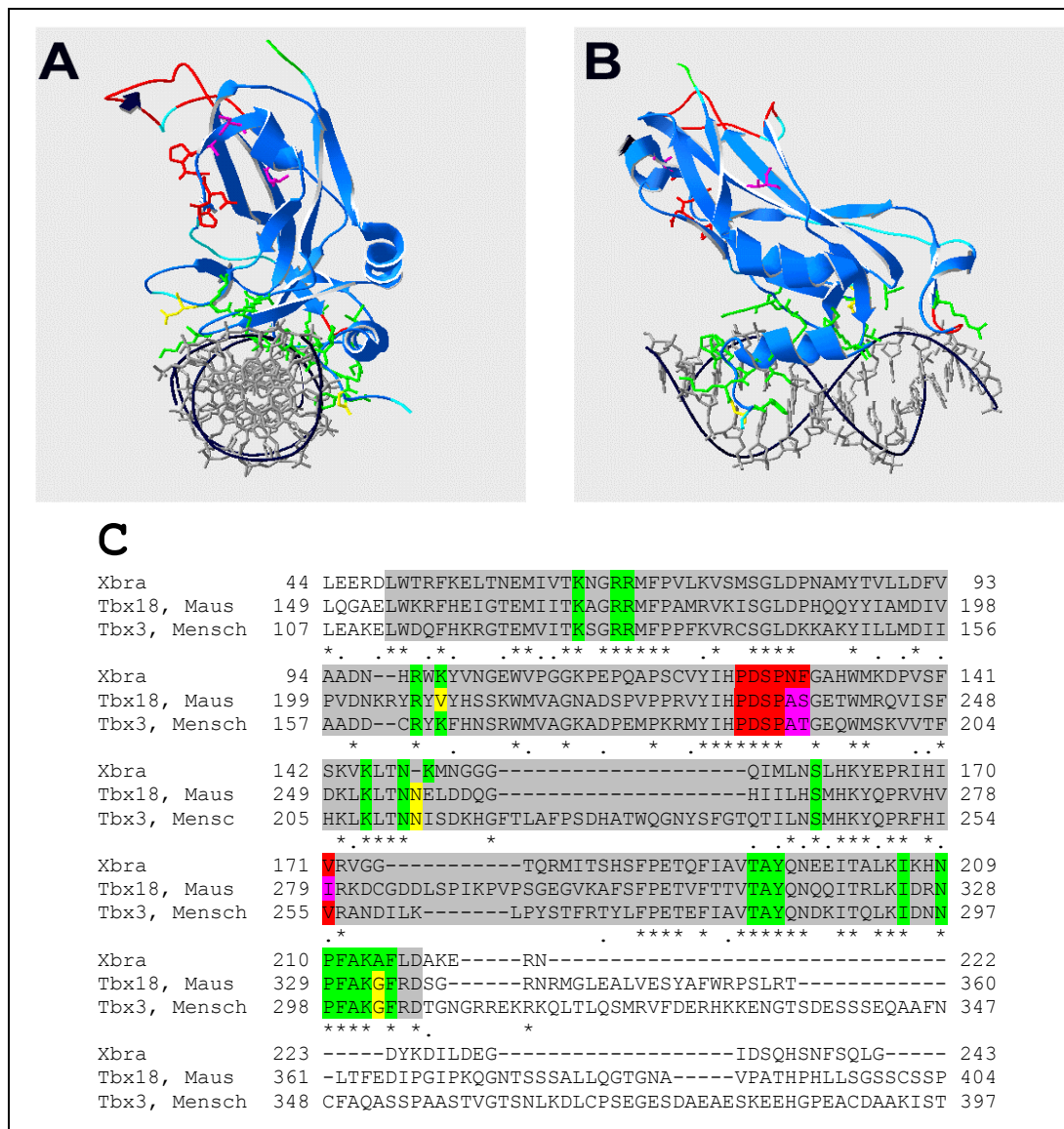


Abbildung 19: Aminosäuren, die Kontakt mit der DNA aufnehmen sind zwischen Tbx18 und Xbra konserviert. Superposition von Tbx18 gegen Xbra/T-Halbstelle; frontale Ansicht **A)** und Seitenansicht **B) C)** Sequenzvergleich von Xbra, Tbx18 und menschl. Tbx3; grau: T-box Sequenzhomologie; grün/gelb: konservierte AS, die im Xbra-Protein Kontakt mit der DNA haben/ bzw. Sequenzunterschiede; rot/pink: konservierte AS, die im Xbra-Protein eine Interaktionsdomäne bilden/ bzw. Sequenzunterschiede zu Tbx18

Ebenfalls sind zwischen dem Xbra- und dem Tbx18-Protein Aminosäuren konserviert, von denen im Xbra-Protein gezeigt wurde, daß diese eine Kontaktstelle zwischen zwei Xbra-Proteinen auf der palindromischen Bindungsstelle bilden. Diese Interaktionsflächen tragen zur Stabilität des dimeren Xbra-Protein/DNA-Komplexes bei (Müller et al. 1997) .

Die spiegelbildliche Orientierung beider Tbx18-Proteine unter der Voraussetzung, daß diese als Dimer binden, würde eine Interaktion dieser Domänen unwahrscheinlich machen. Betrachtet man nur die T-boxen von T und Tbx18, erscheint eine Heterodimerisierung prinzipiell aufgrund der hohen Sequenzhomologie der T-boxen beider Protein möglich. Da jedoch keine Heterodimere von T und Tbx18 in den DNA-Bindungsstudien nachgewiesen werden konnten, muß davon ausgegangen werden, daß Domänen außerhalb der T-box beider Proteine Einfluß auf die Bindung haben.

3.2 Analyse der Tbx18 Expression mittels Reportergene

3.2.1 Gewinnung von Tbx18.LacZ und Tbx18.GFP Embryonen

Die funktionelle Untersuchung von *Tbx18* in der Somitogenese und der Skelettentwicklung wurde anhand eines Maus-Modells („Knockout-Maus“) durchgeführt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit zwei Knockout-Mäusen gearbeitet. Durch die Insertion eines LacZ-Reportergens bzw. eines GFP-Reportergens in den *Tbx18*-Lokus, wurden zwei verschiedene Mauslinien generiert. Die Tbx18.LacZ-Mauslinie wurde vom Betreuer der Doktorarbeit zur Verfügung gestellt und ist bei Bussen et al. (2004) beschrieben. Die Tbx18.GFP-Mauslinie wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt (s.a. Material und Methoden).

Für die Gewinnung von homozygot mutanten Embryonen beider Linien wurden heterozygote Elterntiere verpaart und Embryonen der Stadien 9,5-18,5dpc gesammelt.

3.2.2 Expressionsanalyse von *Tbx18* mit einem LacZ Reporter

In heterozygote und homozygote Embryonen konnte erst nach der Entfernung (A. Kispert pers. Mitteilung) der geflochten Neomycin-Kassette eine β -Galaktosidase Aktivität in den Embryonen nachgewiesen werden. Die Reporter-Gen-Analyse wurde mit 10,5dpc und 11,5dpc alten Embryonen durchgeführt. Da es sich bei der β -Galaktosidase um ein Enzym mit einer langen Halbwertszeit handelt, reflektiert die Färbung durch X-Gal-Färbung nicht notwendigerweise die endogene Expression dieses Lokus.

In 10,5dpc alten, heterozygoten Embryonen konnte durch die X-Gal-Färbung eine LacZ-Aktivität im kranialen, paraxialen Mesoderm, im Proepikardialorgan, in den Genitaleisten und eine schwache Aktivität in den vorderen Gliedmaßen nachgewiesen werden (Abbildung 20A). In neugebildeten Somiten bzw. Somitomeren konnte keine Färbung beobachtet werden. Damit zeigte die LacZ-Aktivität in den heterozygoten Embryonen einen deutlichen Unterschied zu der von Kraus et al. (2001) beschriebenen *Tbx18*-Expression. In differenzierten Somiten hingegen zeigte sich eine LacZ-Expression im Sklerotom (Abbildung 20C, Pfeil). Die Expression beschränkte sich auf die anteriore Somitenhälfte des lateralen Sklerotoms (Abbildung 20E).

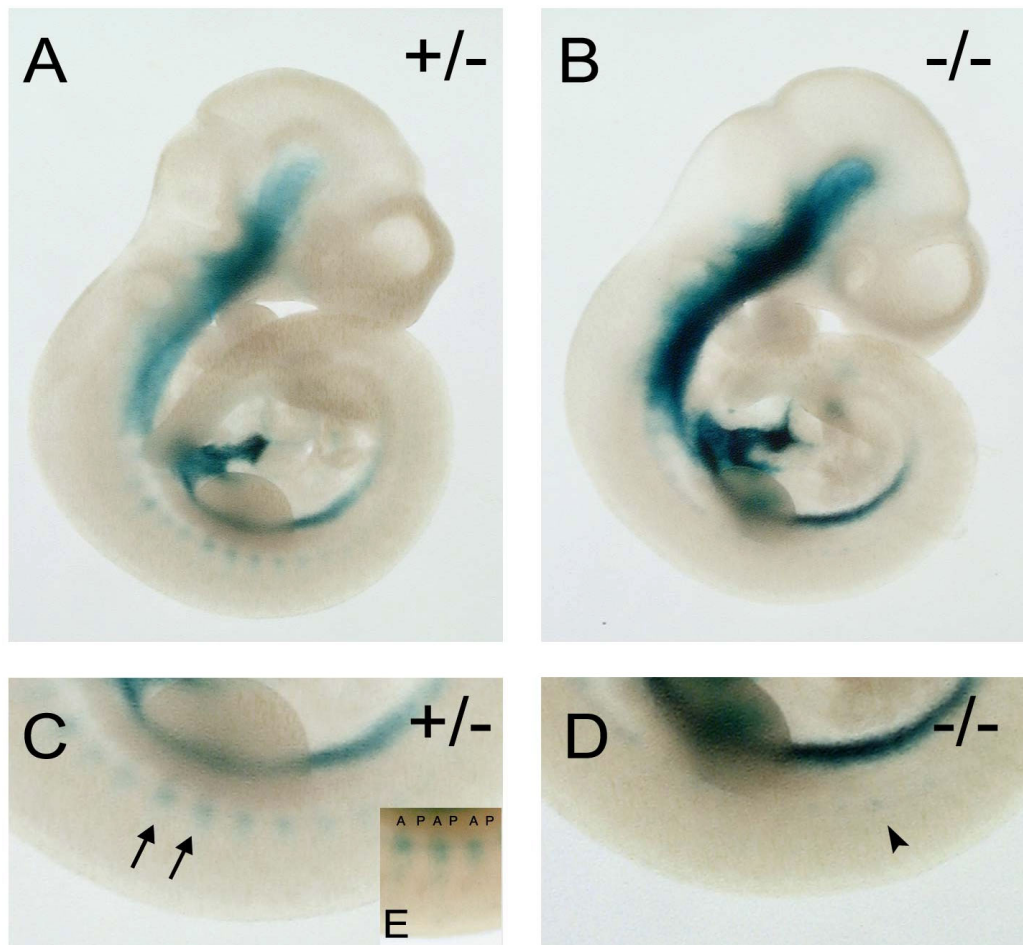
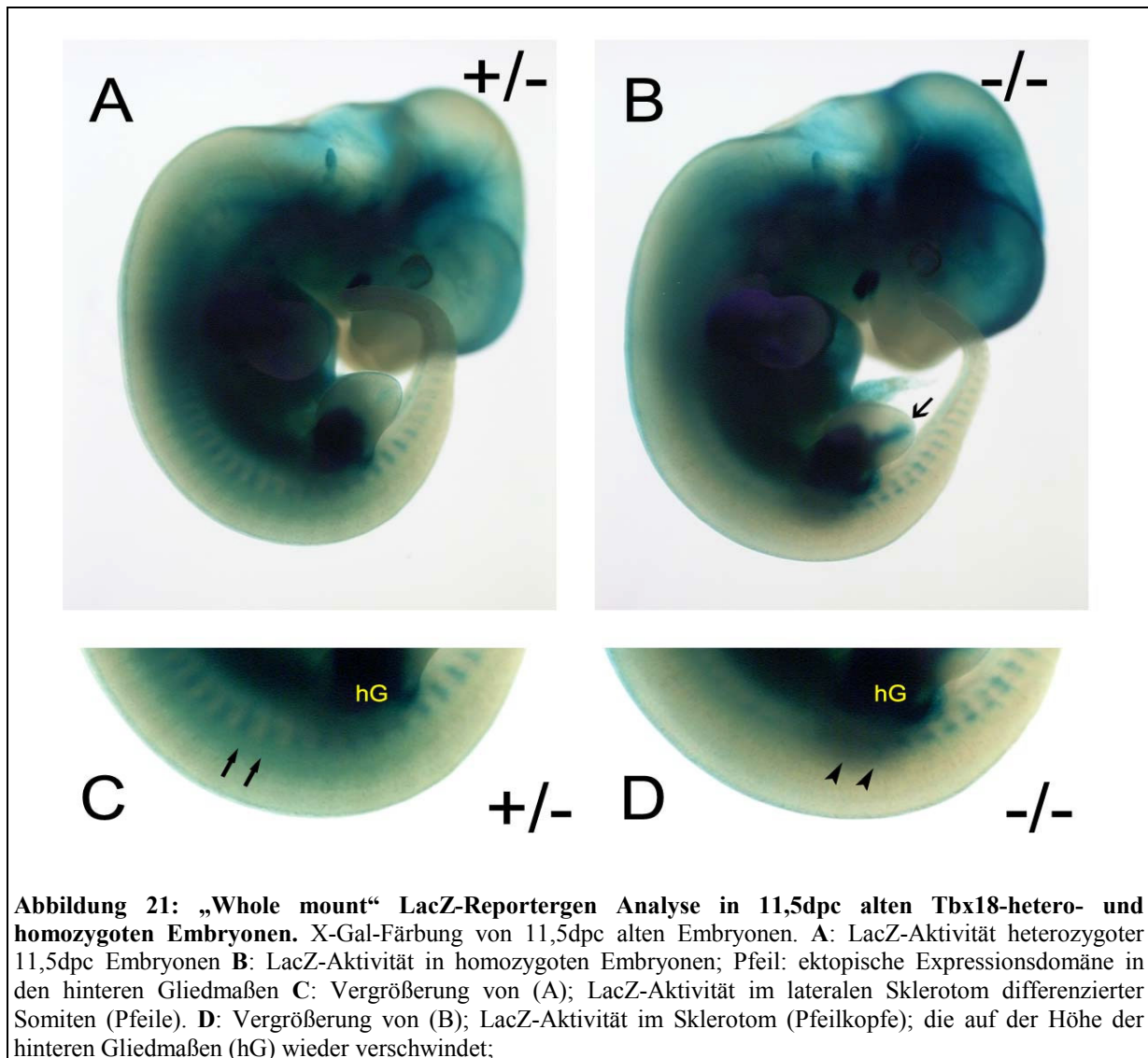


Abbildung 20: „Whole mount“ LacZ-Reporteranalyse in 10,5dpc alten Tbx18-hetero- und homozygoten Embryonen. X-Gal-Färbung von 10,5dpc alten Embryonen. **A:** LacZ-Aktivität heterozygoter 10,5dpc Embryonen im kranialen, paraxialen Mesoderm, in den Genitalleisten, im Proepikardialorgan und schwache Aktivität in den vorderen Gliedmaßen. In frühen Somiten ist keine LacZ-Aktivität nachweisbar, erst differenzierten Somiten zeigt sich eine LacZ-Aktivität. **B:** LacZ-Aktivität in homozygoten Embryonen im cranialen, paraxialen Mesoderm, in den Genitalleisten, im Proepikardialorgan, in Vor- und Hintergliedmaßen. Keine sichtbare LacZ-Aktivität in Somiten. **C:** Vergrößerung von (A); LacZ-Aktivität im Sklerotom differenzierter Somiten (Pfeile). **D:** Vergrößerung von (B); nur minimale LacZ-Aktivität im Sklerotom (Pfeilkopf) von homozygoten Embryonen. **E:** Ausschnitt aus (C); LacZ-Aktivität zeigt ein polarisiertes Muster. Die Aktivität ist auf Sklerotom der anterioren Somitenhälfte beschränkt.

In homozygoten Embryonen wurde eine stärkere Aktivität des exprimierten LacZ-Reportergens beobachtet. Die Ursache dafür, ist mit der doppelten Kopienzahl des LacZ-Allels zu erklären. Die Expressionsdomänen im kranialen, paraxialen Mesoderm, im Proepikardialorgan und in den Genitalleisten waren unverändert. Aufgrund der stärkeren Expression konnte neben der β -Galaktosidase Aktivität in den vorderen Gliedmaßen auch eine β -Galaktosidase Aktivität in den hinteren Gliedmaßen beobachtet werden (Abbildung 20B). In frühen Somiten konnte keinerlei Färbung in neugebildeten Somiten und im Sklerotom differenzierter Somiten, nur

sehr geringe Aktivität des LacZ-Reportergen nachgewiesen werden (Abbildung 20D, Pfeilkopf).

In 11,5dpc alten heterozygoten und homozygoten Tbx18.LacZ-Embryonen wird die β -Galaktosidase-Aktivität im kranialen, paraxialen Mesenchym und im Mesenchym um die mandibuläre-maxilläre Spalte aufrecht erhalten (Abbildung 21A u. B).



In den Gliedmaßenanlagen heterozygoter Embryonen konnte eine starke β -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 21A). Dabei deutet die β -Galaktosidase-Aktivität auf eine starke Expression im anterior-proximalen Mesenchym der Gliedmaßen. In den Vordergliedmaßen breitete sich eine schwache LacZ- Aktivität bis in den distalen Bereich der Handplatte aus. Wie in 10,5dpc alten

Embryonen, konnte auch in 11,5dpc alten Embryonen keine β -Galaktosidase-Aktivität in neugebildeten Somiten bzw. Somitomeren nachgewiesen werden. Erst im Sklerotom differenzierter Somiten zeigte sich eine β -Galaktosidase-Aktivität, die auf die anteriore Somitenhälfte beschränkt war (Abbildung 21C, Pfeile).

In 11,5dpc homozygoten *Tbx18.LacZ*-Embryonen konnte eine β -Galaktosidase-Aktivität im kranialen paraxialen Mesoderm, im Mesenchym der mandibuläre-maxilläre Spalte, und in dem anterior-proximalen Mesenchym der Gliedmaßen beobachtet werden (Abbildung 21B). In den hinteren Gliedmaßen homozygoter 11,5dpc alter Embryonen war jedoch im Gegensatz zu den heterozygoten Embryonen eine zusätzliche, ektopische Expressionsdomäne sichtbar, die sich als dünner Streifen im posterioren Mesenchym distal ausbreitete (Abbildung 21B, Pfeil).

In frühen Somiten homozygoter Embryonen zeigte sich keine β -Galaktosidase-Aktivität, jedoch konnte eine streifenförmige Domäne im Sklerotom differenzierter Somiten bis auf die Höhe der hinteren Gliedmaßen (Abbildung 21D, Pfeilköpfe) nachgewiesen werden. Während in heterozygoten Embryonen die streifenförmige Färbung im Sklerotom eine gleichförmige Intensität aufwies, zeigte sich in den homozygoten Embryonen eine ungleichförmig intensive Färbung im Sklerotom.

Die Expression des LacZ-Reportergens zeigt somit Unterschiede zu der von Kraus et al. (2001) beschriebenen *Tbx18*-Expression. Für *Tbx18* wurde neben den hier beschriebenen Expressionsdomänen, eine Expressionsdomäne in den beiden Somitomeren S0 und S-1 und in den neugebildeten Somiten beschrieben. Dort ist die Expression von *Tbx18* auf die anteriore Hälfte beschränkt. Mit der fortschreitenden Differenzierung der Somiten reduziert sich die Expression auf den anterioren Anteil des lateralen des Sklerotoms.

In heterozygoten Embryonen konnte die sklerotomale Expressionsdomäne mit dem LacZ-Reportergen nachgewiesen werden. In 10,5dpc homozygoten Embryonen ist die sklerotomale Expression bis auf rudimentäre Reste (Abbildung 20D, Pfeilkopf) nicht angelegt. In 11,5dpc alten Embryonen wird diese Domäne im Sklerotom angelegt, jedoch ab der Höhe der hinteren Gliedmaßen nicht mehr aufrechterhalten (Abbildung 21D, Pfeilkopf).

3.2.3 Expressionsanalyse von *Tbx18* mit einem GFP Reporter

Für die Generierung einer *Tbx18*.GFP-Mauslinie wurde ein destabilisiertes EGFP-Reportergen in das Startcodon von *Tbx18* durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingefügt. Die kurze Halbwertszeit von nur zwei Stunden (pd2EGFP) des Reportergens erlaubt einen besseren Rückschluß auf die zeitliche und räumliche Expression des Transgens.

Bei dieser Strategie im Gegensatz zu der *Tbx18*.LacZ-Strategie der 5'-untranslatierten Bereiches nicht deletiert.

In 10,5dpc alten heterozygoten Embryonen konnte eine Expression des Reportergens im kranialen, paraxialen Mesoderm, im Proepikardialorgan, in den Genitalleisten und den Gliedmaßen beobachtet werden (Abbildung 22A). Im Gegensatz zu *Tbx18*.LacZ Embryonen wurde eine GFP-Reportergen Expression in den neugebildeten Somiten nachgewiesen, die sich in differenzierten Somiten auf das Sklerotom beschränkte (Abbildung 22C). Entlang der gesamten Körperachse konnte eine segmentale Expression von GFP beobachtet werden, die jeweils auf das anteriore Kompartiment beschränkt war. Ob das GFP-Reportergen bereits in den beiden Somitomeren S0 und S-1 exprimiert war, ließ sich aufgrund der geringen Auflösung bei dieser Technik nicht eindeutig bestimmen. Die streifenförmige GFP-Expression zeigte schon in den neugebildeten Somiten eine gleichförmige Intensität und Ausdehnung (Abbildung 22E).

10,5dpc homozygote *Tbx18*.GFP-Embryonen sind die Expressionsdomänen im kranialen, paraxialen Mesoderm, in den Genitalleisten, im Proepicardialorgan und in den Gliedmaßen unverändert gegenüber heterozygoten Embryonen. Jedoch, aufgrund der doppelten Kopienzahl, weisen diese Domänen eine stärkere Intensität auf. In den frühen epithelialen Somiten homozygoter Embryonen konnte eine GFP-Expression beobachtet werden (Abbildung 22B und F), jedoch nicht im Sklerotom differenzierter Somiten (Abbildung 22D). Damit unterscheidet sich die Expression der Reporter gene der beiden Mauslinien in den epithelialen Somiten. Die Deletion von 150bp des 5'-untranslatierten Bereiches in der *Tbx18*.LacZ-Linie könnte ein Somiten-spezifisches Element enthalten, welches notwendig für die Etablierung der frühen, polarisierten Expression von *Tbx18* ist.

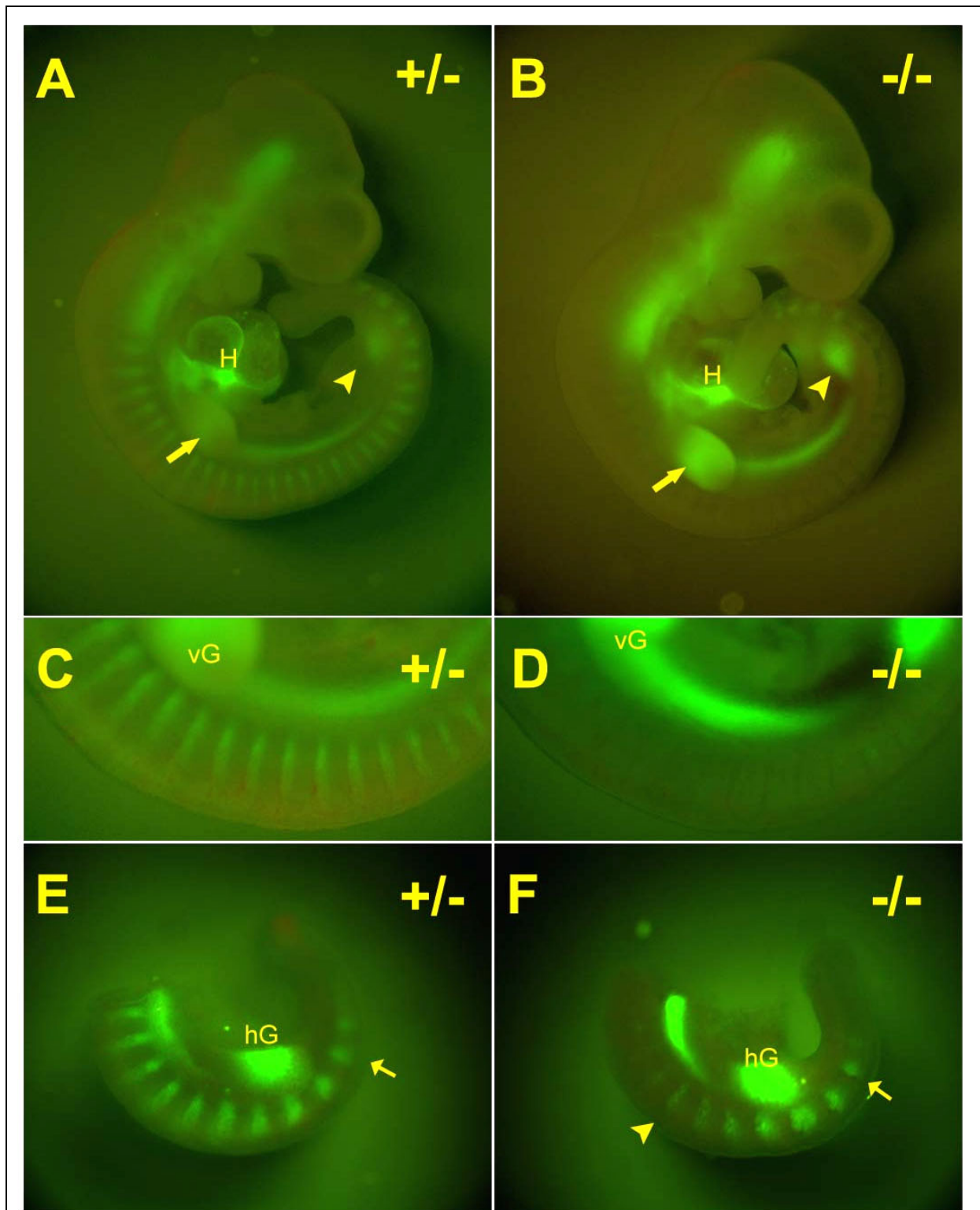


Abbildung 22: „Whole mount“ GFP-Reportergen Analyse in 10,5dpc alten Tbx18-hetero- und homozygoten Embryonen. GFP-Expressionsanalyse mittels Fluoreszenznachweis. **A:** GFP-Reportergen Expression im cranialen, paraxialen Mesoderm, im Proepikardialorgan, in den Genitalleisten und in den Gliedmaßen (Pfeil u. Pfeilkopf). GFP-Expression in frühen und späten Somiten. **B:** GFP-Reportergen Expression in homozygoten Embryonen im cranialen, paraxialen Mesoderm, im Proepikardialorgan, in den Genitalleisten und in den Gliedmaßen (Pfeil u. Pfeilkopf). GFP-Expression nur in frühen Somiten. **C:** GFP-Expression im anterioren Kompartiment des Sklerotoms. **D:** Keine GFP-Expression im Sklerotom homozygoter Embryonen. **E:** Initiation der GFP-Expression (Pfeil). **F:** Initiation der GFP-Expression in homozygoten Embryonen, Verlust der Reportergen Expression (Pfeilkopf) auf der Höhe der hinteren Gliedmaßen (hG) . H: Herz

Die GFP-Expression in den frühen Somiten wird bei hetero- und homozygoten Embryonen noch gleich angelegt (vergl. Abbildung 22E und F, Pfeile). In homozygoten Embryonen ist dieses streifenförmige Muster jedoch sehr viel ungleichmäßiger. Auf der Höhe der hinteren Gliedmaßen beginnen diese Expressionsstreifen zuerst kleiner zu werden und dann gänzlich zu verschwinden (Abbildung 22F, Pfeilkopf). Im lateralen Sklerotom mutanter Embryonen konnte keine GFP-Expression beobachtet werden (Abbildung 22D).

3.3 Untersuchungen zum Somitenphänotyp *Tbx18* mutanter Mäusen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Funktion von *Tbx18* in der Somitogenese und in der Wirbelsäulenentwicklung untersucht. Dazu wurden Embryonen der Embryonalstadien 9,5-18,5dpc gesammelt und analysiert. Da beide Mauslinien, *Tbx18.LacZ* und *Tbx18.GFP* phänotypisch identisch waren, wurden im Laufe der Untersuchung Embryonen beider Linien eingesetzt.

3.3.1 Morphologische und histologische Analyse

Bei der Genotypisierung von Embryonen zwischen 9,5dpc und 18,5dpc wurde ein Mendelsches Verteilungsverhältnis der Nachkommen beobachtet, wenn heterozygote Elterntiere verpaart wurden. Bei der Genotypisierung adulter Tiere wurden keine homozygot mutanten Tiere identifiziert. Diese Beobachtung deutete auf eine frühe postnatale Mortalität homozygoter Neugeborener hin. Aus diesem Grund wurden Neugeborene unmittelbar nach der Geburt gesammelt. Aus der Abbildung 23 wird deutlich, daß *Tbx18*^{-/-} Neugeborene eine auffällig verkürzte Körperachse aufweisen, während Gliedmaßen und Schädel normal entwickelt sind.

Alle untersuchten *Tbx18*^{-/-} Embryonen zeigten eine verkürzte Körperachse, was auf eine komplette Penetranz dieses Phänotyps bei einem gemischten genetischen Hintergrund hindeutet.

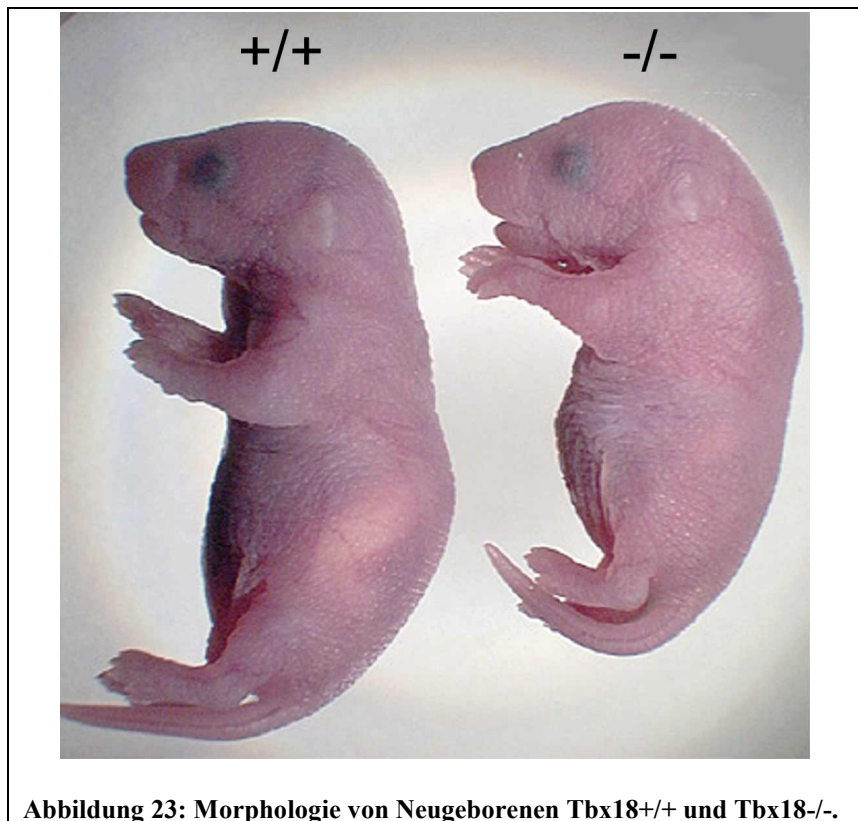


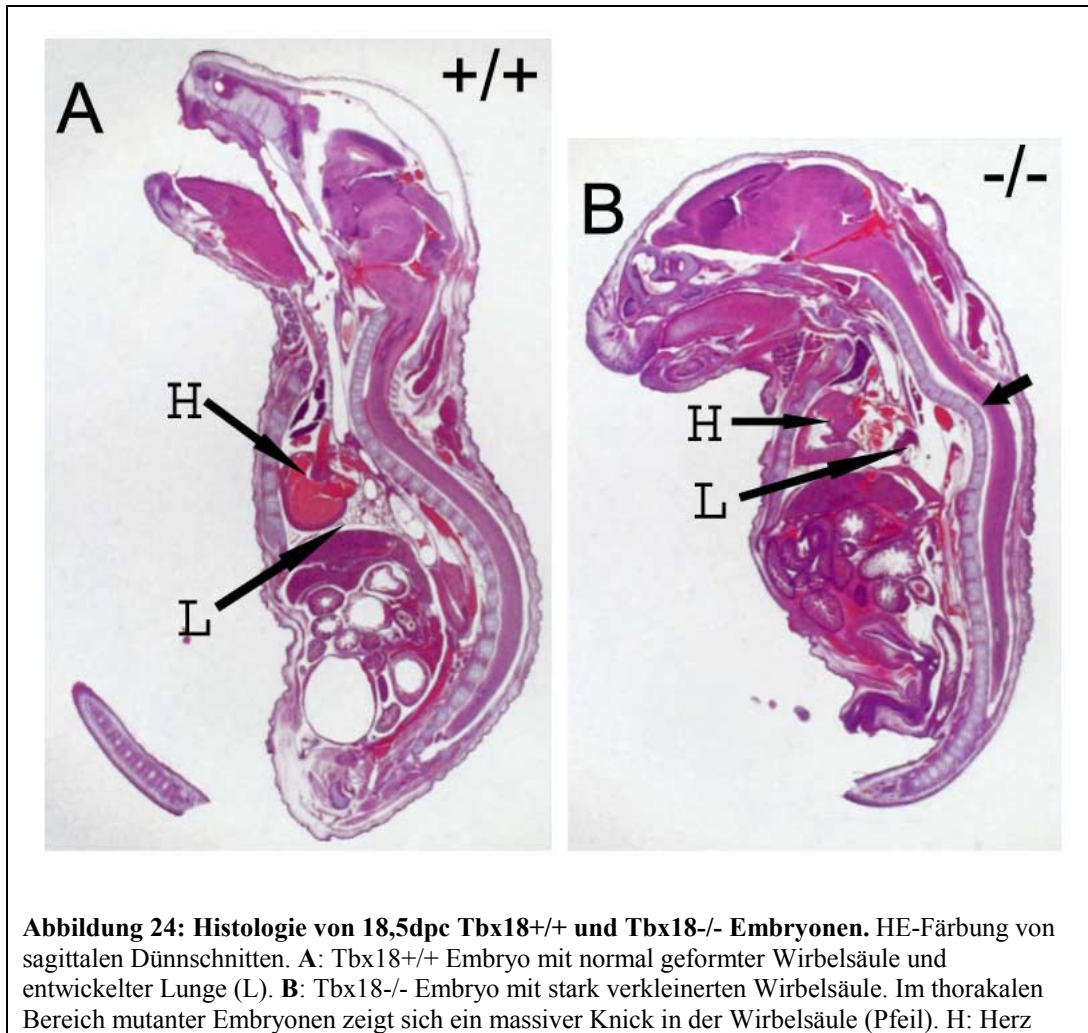
Abbildung 23: Morphologie von Neugeborenen Tbx18+/+ und Tbx18-/-.

Eine histologische Untersuchung von 18,5dpc alten Embryonen zeigte, daß Tbx18^{-/-} Embryonen Defekte in verschiedenen Organsystemen aufweisen. Die histologische Analyse 18,5dpc alter Embryonen bestätigt die Beobachtung, daß die Gliedmaßen keine sichtbare Veränderung in Tbx18^{-/-} Embryonen aufweisen. Auch das Herz von Tbx18^{-/-} Embryonen zeigt keinen erkennbaren morphologischen Unterschied im Vergleich zum WT. Damit zeigen diese Strukturen, obwohl Tbx18 in den Vorläuferstrukturen (Gliedmaßenanlage und Proepikardialorgan), keinen morphologisch sichtbaren Phänotyp.

Die Wirbelsäule mutanter Embryonen hingegen zeigt eine auffällige Veränderung im Vergleich zu WT Embryonen (Abbildung 24B; dicker Pfeil). Die im WT S-förmig Natur der Wirbelsäule ist in Tbx18^{-/-} Embryonen durch eine fast gradlinige Wirbelsäule ersetzt. Die bauchseitige Ausbuchtung der Wirbelsäule (Lordose) im zervikalen und oberen thorakalen Bereich von Tbx18^{+/+} Embryonen zeigt in Tbx18^{-/-} Embryonen eine Kyphose. Diese rückseitige Ausbuchtung ist im thorakalen Bereich mutanter Embryonen so stark, daß dies einem regelrecht Knick gleicht (Abbildung 24B; kleiner Pfeil). Auch der Rippenkasten mutanter Embryonen ist verkleinert und hat damit zur Folge, daß die Lunge von 18,5dpc alten mutanten Embryonen ist nur unzureichend entwickelt ist (Abbildung 24B) In Tbx18^{-/-} Neugeborenen werden die Lungen nur unzureichend mit Luft gefüllt. Da Tbx18^{-/-} Neugeborene nach der Geburt eine flache,

unregelmäßige Atmung zeigen, ist als Todesursache eine respiratorische Insuffizienz anzunehmen.

Andere Phänotypen, die bei 18,5dpc alten Embryonen auftreten, wurden innerhalb dieser Doktorarbeit nicht weiter beschrieben.



Da die morphologische und histologische Untersuchung gezeigt hat, daß das axiale Skelett von Tbx18^{-/-} Embryonen stark verändert ist, wurde zur genaueren Untersuchung dieses Phänotyps eine Skelettpräparation mit anschließender Knochen/Knorpel-Färbungen durchgeführt.

3.3.2 Untersuchungen zum Skelett-Phänotyp

3.3.2.1 Skelett-Analyse von 18,5dpc alten Embryonen

Eine Skelettanalyse mittels Knochen/Knorpel-Färbung von 18,5dpc alten Embryonen zeigte, daß das axiale Skelett in homozygot mutanten Embryonen stark beeinträchtigt ist (Abbildung 25). Die Wirbelsäule mutanter Embryonen ist im Vergleich zu WT Embryonen deutlich verkürzt und der Rippenkasten ist sichtbar verkleinert. Der Schädel und die Gliedmaßen mutanter Embryonen weisen keine Defekte auf. Damit ist der Skelettphänotyp auf das axiale Skelett beschränkt

In einigen mutanten Embryonen konnte beobachtet werden, daß das Hinterhauptsbein (Os occipitale) und der Atlas manchmal fusioniert waren. Anhand der Abbildungen 25 und Abbildung 26 (D u. H), kann man erkennen, daß die lateralen Elemente der Wirbel, die Pedikel und z.T. die Querfortsätze der Wirbel



Abbildung 25: Tbx18^{-/-} Embryonen zeigen eine verkürzte Wirbelsäule und einen deformierten Rippenkasten. Knochen/Knorpel-Färbung von 18,5dpc alten Embryonen. Links Tbx18^{+/+}, rechts Tbx18^{-/-}: Das Gliedmaßen-Skelett ist im Gegensatz zum axialen Skelett nicht deformiert.

(Processi transversi), expandiert sind und im zervikalen und thorakalen Bereich der Wirbelsäule ein kontinuierliches Band formen. Damit ist der, für die Flexibilität der Wirbelsäule, notwendige segmentale Charakter der Wirbelsäule in diesem Bereich der Wirbelsäule von Tbx18^{-/-} Embryonen nicht ausgebildet. Die segmentale Natur der lateralen Wirbelelemente ist in Tbx18^{-/-} Embryonen vom lumbalen bis in den sakralen Bereich jedoch erhalten. Im Lendenbereich zeigen die Pedikel mutanter Embryonen eine symmetrische Form auf und unterscheiden sich somit deutlich von der polarisierten Form der Pedikel von WT Embryonen (Abbildung 26; C; D; G u. H). Bei einer dorsalen Aufsicht auf die Skelette von Tbx18^{+/+} (Abbildung 26, A u. E) und Tbx18^{-/-} Embryonen (Abbildung 26, B u. F) läßt sich erkennen, daß die proximalen

Rippen mutanter Embryonen durch ein kontinuierliches Knochenband miteinander verbunden sind (Abbildung 26; B u. F; Pfeile). Die distalen Rippen mutanter Embryonen weisen vereinzelt Fusionen auf (Abbildung 26; F, Sternchen). Die Wirbelkörper sind im Gegensatz zu den lateralen Anteilen in den mutanten Embryonen nur mäßig betroffen. Die Zwischenwirbelscheiben als verbindende Elemente für die Wirbel, sind im thorakalen Bereich reduziert (Abbildung 26; I u. J). Der Skelettphänotyp zeigt somit einen deutlichen graduellen Charakter. Im anterioren Bereich sind die Expansions der lateralen Elemente der Wirbel (und der proximalen Rippen) so ausgeprägt, daß diese komplett miteinander verwachsen. Zum posterioren Ende werden diese Expansions jedoch immer geringer.

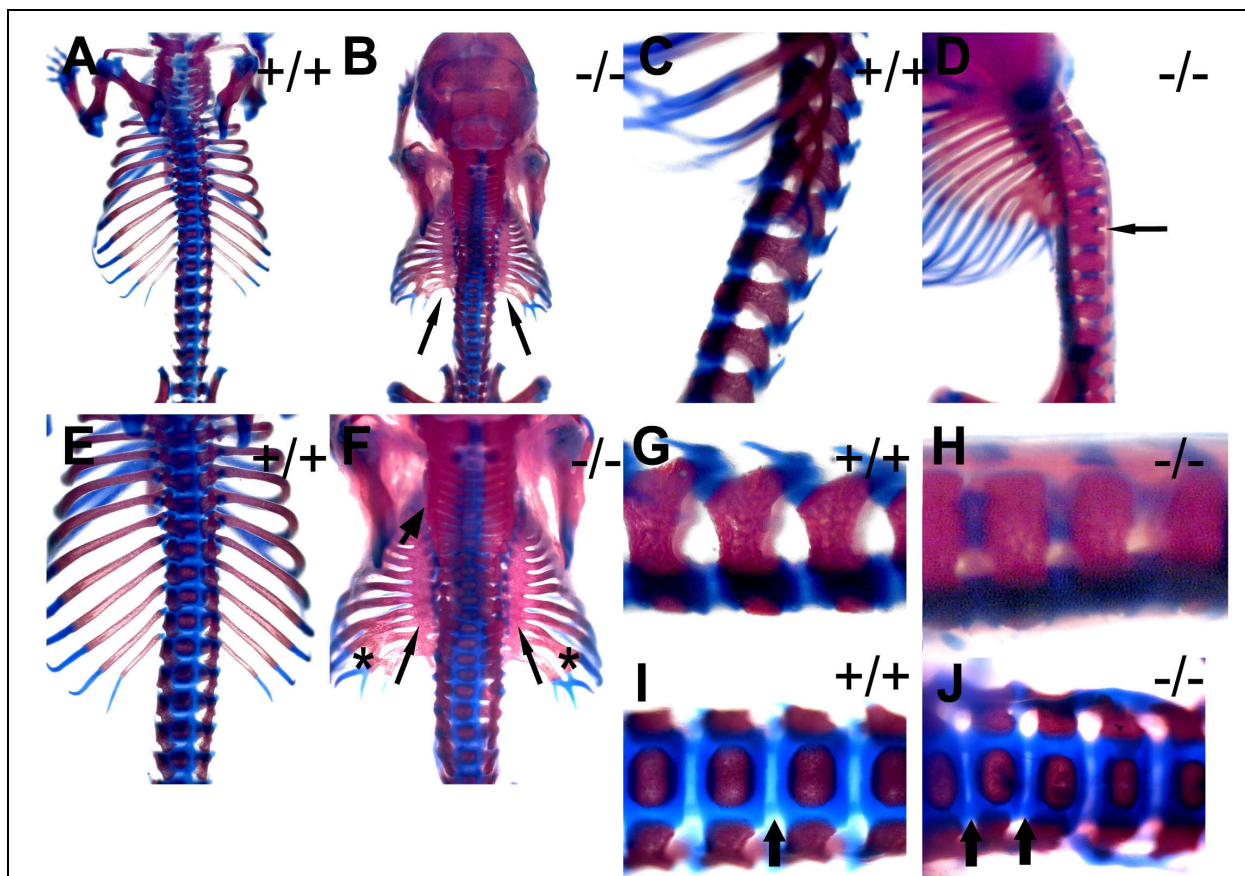
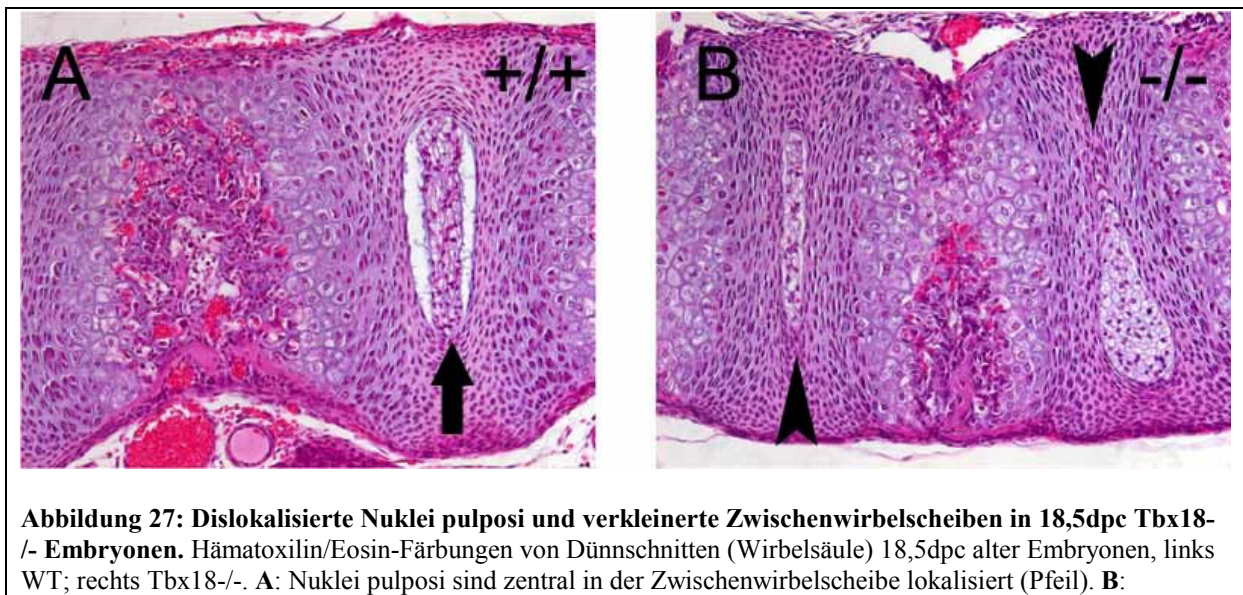


Abbildung 26: Die lateralen Elemente der Wirbelsäule und die proximalen Rippen sind in mutanten Embryonen durch ein Knochenband verbunden. A: Dorsale Aufsicht auf Tbx18^{+/+} Skelettpräparation. B: Dorsale Aufsicht auf Tbx18^{-/-} Skelettpräparation; Pfeile markieren proximale Rippen. C: Laterale Ansicht der Wirbelsäule im lumbalen Bereich von Tbx18^{+/+} Embryonen. D: Laterale Ansicht der Wirbelsäule von Tbx18^{-/-} Embryonen; Pedikel im zervikalen und thorakalen Bereich sind durch ein Knochenband miteinander verbunden. E: Vergrößerung von (A). F: Vergrößerung von (B); Pfeilkopf: Pedikel im zervikalen Bereich sind durch ein knöchriges Band verbunden; Pfeile: proximale Rippen sind durch ein Knochenband verbunden; Sternchen: Fusionen der distalen Rippen. G: Laterale Ansicht von Wirbeln im lumbalen Bereich; asymmetrische Anordnung von Pedikel. H: Laterale Ansicht von Wirbeln im lumbalen Bereich von Tbx18^{-/-} Embryonen; Pedikel weisen eine symmetrische Form auf. I: Vergrößerung von (E), lumbaler Bereich; Pfeil: knorpelige Zwischenwirbelscheiben. J: Vergrößerung von (F), lumbaler Bereich; Pfeile: knorpelige Zwischenwirbelscheiben sind verkleinert in Tbx18^{-/-} Embryonen.

Für eine genauere histologische Untersuchung der Wirbelsäule wurden HE-Färbungen von Dünnschnitten 18,5dpc alter Embryonen angefertigt. Die Analyse bestätigte, daß die Zwischenwirbelscheiben mutanter Embryonen z.T. und die Nuclei pulposi ebenfalls reduziert bzw. dislokalisiert sind (Abbildung 27). Die Nuclei pulposi sind in Tbx18^{+/+} Embryonen zentral in der Zwischenwirbelscheibe angeordnet, wo hingegen in mutanten Embryonen die Nuclei pulposi oft nach dorsal oder ventral (Abbildung 27B, Pfeilkopf) verschoben sind.



Um zu untersuchen, ob die Expansionen der lateralen Wirbelelemente und der proximalen in Tbx18^{-/-} Embryonen durch ein verändertes Knochenwachstum verursacht werden, wurde eine Skelettanalyse von 13,5dpc alten Embryonen durchgeführt.

3.3.2.2 Skelett-Analyse von 13,5dpc alten Embryonen

Am Tag 13,5dpc der Embryonalentwicklung der Maus ist das Skelett noch nicht verknöchert und besteht aus Knorpel. Erst anschließend wird durch endochondrale Ossifikation dieses knorpelige Skelett durch ein Knochenskelett ersetzt. Ein Defekt im knorpeligen Vorseklett könnte auf einen Defekt in einem Musterbildungsprozess in der frühen Embryogenese hindeuten, wohingegen ein korrekt angelegtes Vorseklett, eher auf einen Defekt in einem späteren Prozeß der Skelettentwicklung deuten würde. Aus diesem Grund wurde eine Knorpelpräparation von 13,5dpc alten Embryonen durchgeführt.

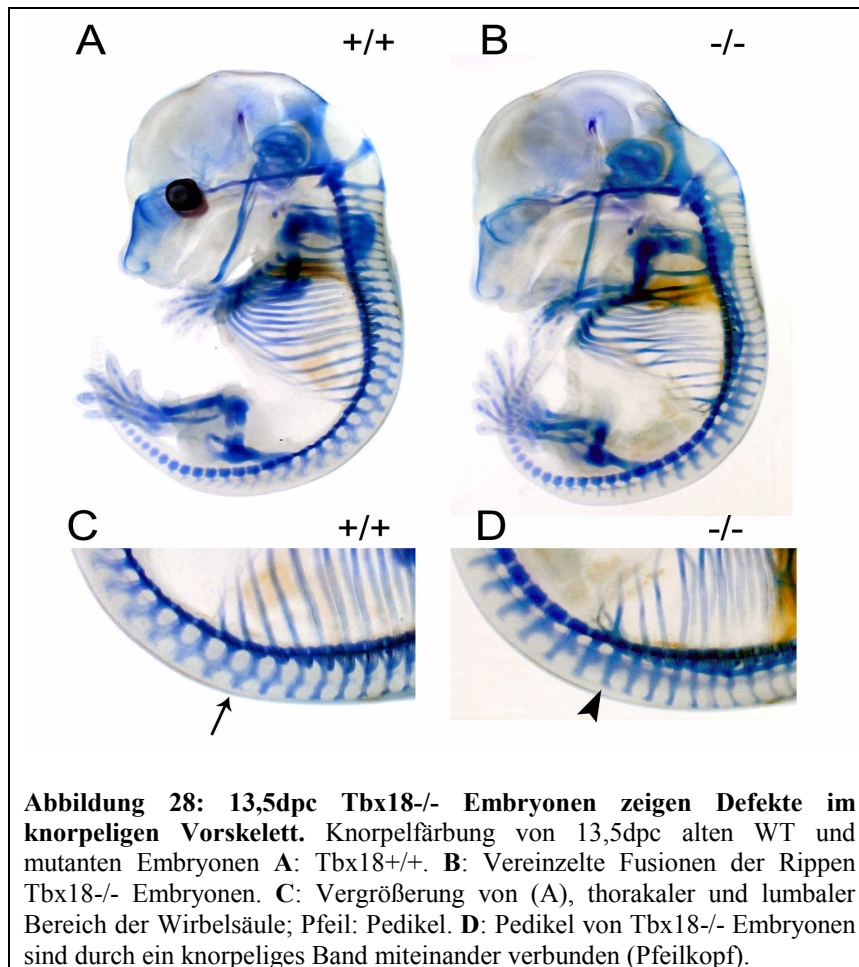
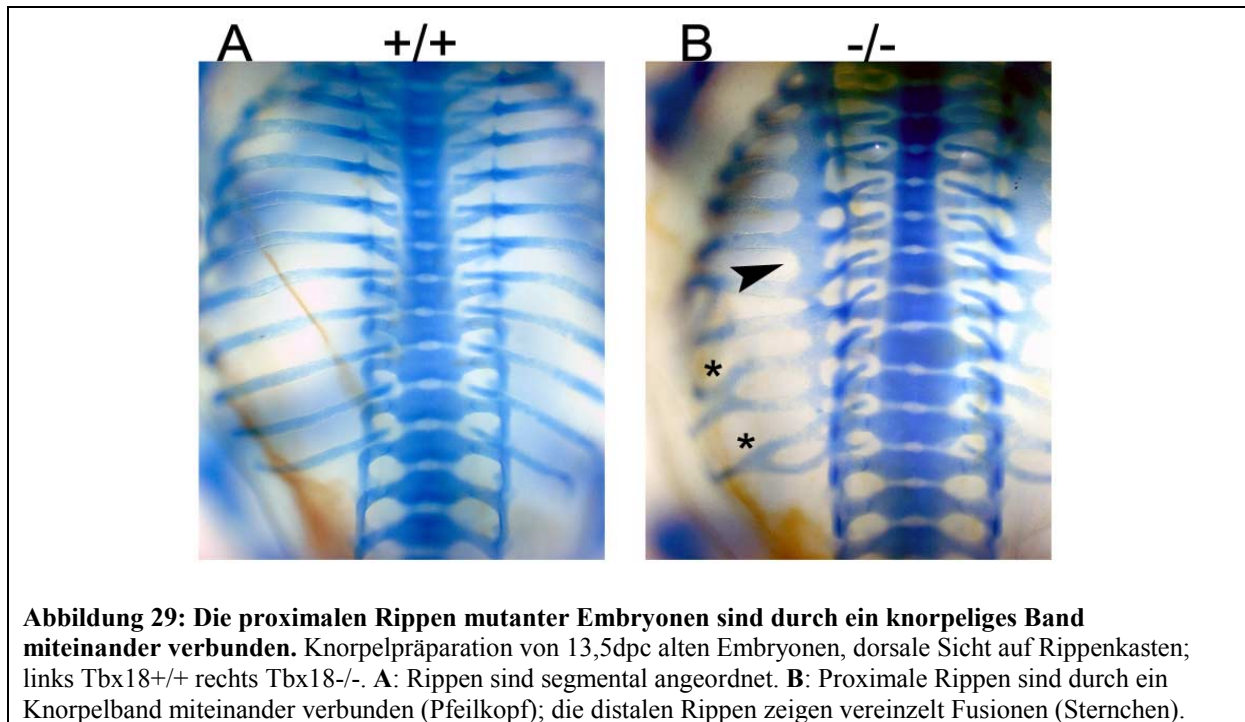


Abbildung 28: 13,5dpc Tbx18^{-/-} Embryonen zeigen Defekte im knorpeligen Vorsekelett. Knorpelfärbung von 13,5dpc alten WT und mutanten Embryonen **A:** Tbx18^{+/+}. **B:** Vereinzelt Fusionen der Rippen Tbx18^{-/-} Embryonen. **C:** Vergrößerung von (A), thorakaler und lumbaler Bereich der Wirbelsäule; Pfeil: Pedikel. **D:** Pedikel von Tbx18^{-/-} Embryonen sind durch ein knorpeliges Band miteinander verbunden (Pfeilkopf).

Die Abbildung 28B zeigt, daß in Tbx18^{-/-} Embryonen das knorpelige Vorsekelett angelegt wird und eine metamerische Organisation aufweist. Jedoch zeigen schon in diesem Embryonalstadium die (distalen) Rippen z.T. Fusionen. Es konnte keine unterschiedliche Anzahl an Wirbeln und Rippen in mutanten Embryonen im Vergleich zu Tbx18^{+/+} Embryonen beobachtet werden. Vom zervikalen bis in den thorakalen Bereich der Wirbelsäule zeigen Tbx18^{-/-} Embryonen ein knorpeliges Band, welches die Pedikel miteinander verbindet (Abbildung 28B). Die polarisierte Form der Pedikel in Tbx18^{+/+} Embryonen (Abbildung 28C, Pfeilkopf) ist in mutanten Embryonen durch eine annähernd symmetrische Form ersetzt (Abbildung 28D, Pfeilkopf). Die proximalen Rippen mutanter Embryonen sind ebenfalls durch ein kontinuierliches, knorpeliges Band miteinander verbunden (Abbildung 29B; Pfeilkopf). Die Rippenköpfe mutanter Embryonen, die an die Wirbelkörper grenzen, sind jedoch nicht betroffen und zeigen eine segmentale Natur. Im distalen Bereich zeigen die Rippen von Tbx18^{-/-} Embryonen z.T. Fusionen (Abbildung 29B, Sternchen). Damit sind im axialen Skelett mutanter Embryonen am Tag 13,5dpc der

Embryonalentwicklung die gleichen Elemente betroffen wie in den Embryonen am Tag 18,5dpc.



Die Skelettanalyse von 18,5dpc und 13,5dpc alten Embryonen zeigt, daß mutante Embryonen Veränderungen in den lateralen Elementen der Wirbelsäule, den Pedikeln und den proximalen Rippen aufweisen. Es ist festzustellen, daß genau jene Elemente des axialen Skelettes in *Tbx18*^{-/-} Embryonen expandiert sind, die Derivate des Skelerotoms darstellen, daß sich aus der posterioren Somitenhälfte ableitet. Da *Tbx18* in der anterioren Somitenhälfte exprimiert wird, scheint die Ausbreitung der Elemente, die aus der posterioren Somitenhälfte hervorgehen, eine indirekte Konsequenz aus dem Verlust von *Tbx18* in den mutanten Embryonen zu sein. Um zu untersuchen, ob sich der Skelettphänotyp auf einen Prozeß während der Somitogenese zurückzuführen ist, wurde eine histologische Untersuchung von 10,5dpc und 11,5dpc alten Embryonen vorgenommen.

3.3.3 Histologische Beschreibung von 10,5dpc und 11,dpc Embryonen

Am Tag 11,5dpc der Embryonalentwicklung der Maus zeigen differenzierte Somiten in WT Embryonen ein periodisches Muster von wenig-stark kondensierten und stärker kondensierten Kompartimenten (Abbildung 30A). Die posteriore Somitenhälfte zeigt eine starke Kondensation, während die anteriore

Somitenhälfte eine sehr viel geringere Kondensation aufweist. Die Segementierung des paraxialen Mesoderms ist für die korrekte Etablierung des peripheren Nervensystems notwendig. Spinalnerven und Neuralleistenzellen wandern exklusiv nur durch die anteriore Somitenhälfte zu ihren peripheren Zielen, da repulsive Kräfte eine Migration durch die posteriore Somitenhälfte verhindern. (s. Einleitung; vergl. Abbildung 30C).

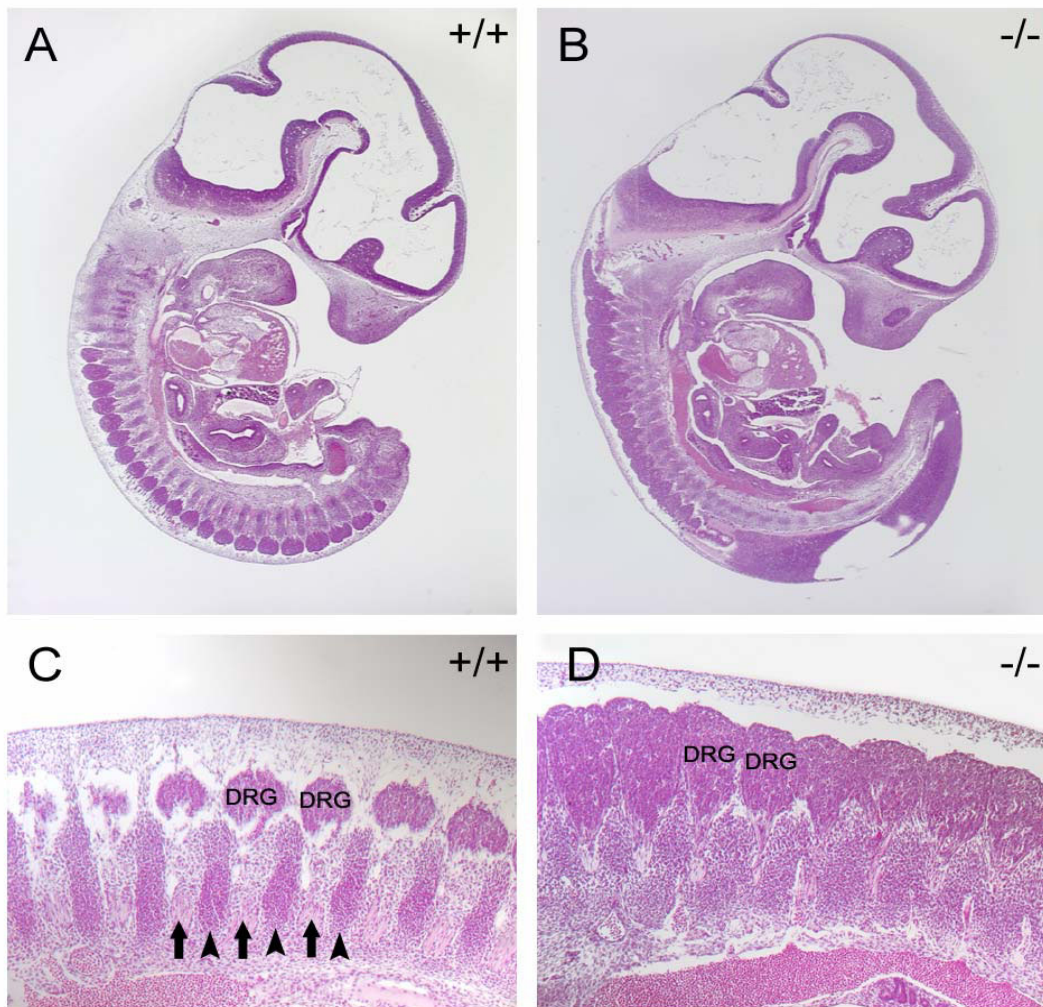
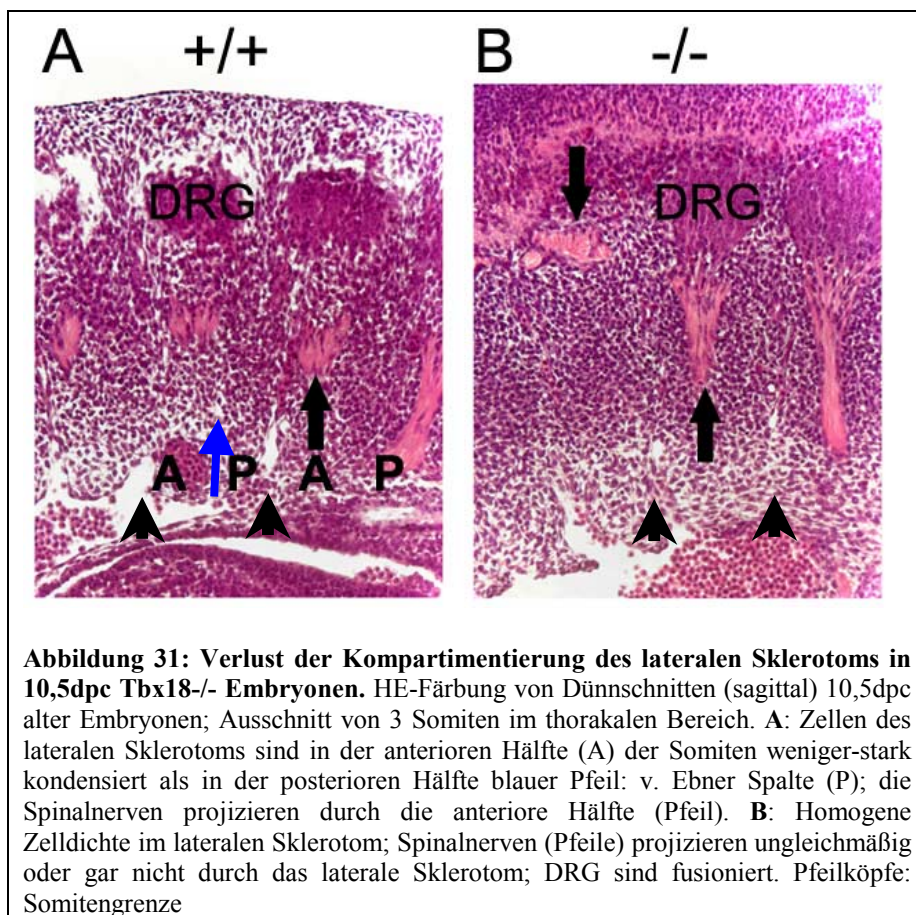


Abbildung 30: 11,5dpc mutante Embryonen zeigen fusionierte dorsale Wurzelganglien und eine homogene Zelldichte im lateralen Sklerotom. HE-Färbung von Dünnschnitten (sagittal) 11,5dpc alter Embryonen **A:** Regelmäßige Anordnung von stark kondensierten und weniger-stark kondensierten Kompartimenten. **B:** Fusion der dorsalen Wurzelganglien (DRG) und Verlust der unterschiedlich kondensierten Kompartimente im lateralen Sklerotom. **C:** Vergrößerter Ausschnitt der Somiten des thorakalen Bereiches; metamerische Anordnung von wenig-stark kondensierten Kompartimenten (anterior; Pfeil) und stärker kondensierten Kompartimenten (posterior; Pfeilkopf). Die Spinalnerven projizieren durch die anteriore Somitenhälfte. **D:** Fusion der DRG und unregelmäßige Projektion der Spinalnerven; homogene Zelldichte im lateralen Sklerotom.

Die metamere Abfolge unterschiedlich stark kondensierter Kompartimente im lateralen Sklerotom ist in *Tbx18*^{-/-} Embryonen durch eine homogene Zelldichte ersetzt. Eine Zuordnung von anterioren und posterioren Hälften ist kaum möglich.

Teile des peripheren Nervensystems, die dorsale Wurzelganglien (engl. Dorsal root ganglia; DRG), sind in mutanten Embryonen entlang fast der gesamten Körperachse miteinander fusioniert. Die Projektion der Spinalnerven ist in mutanten Embryonen unregelmäßig; z.T. gelingt es einigen Spinalnerven gar nicht, durch das Sklerotom zu projizieren.



Die Abbildung 31 zeigt, daß schon in 10,5dpc alten mutanten Embryonen die Zelldichte in anteriorer und posteriorer Somitenhälfte annähernd gleich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichte zwischen den anterioren und posterioren Somitenhälften, ist in den WT Embryonen die intrasomitische Grenze oder von Ebner Furche sichtbar (Abbildung 31A; blauer Pfeil). In den Somiten von mutanten Embryonen ist diese intrasomitische Grenze nicht mehr erkennbar (Abbildung 31).

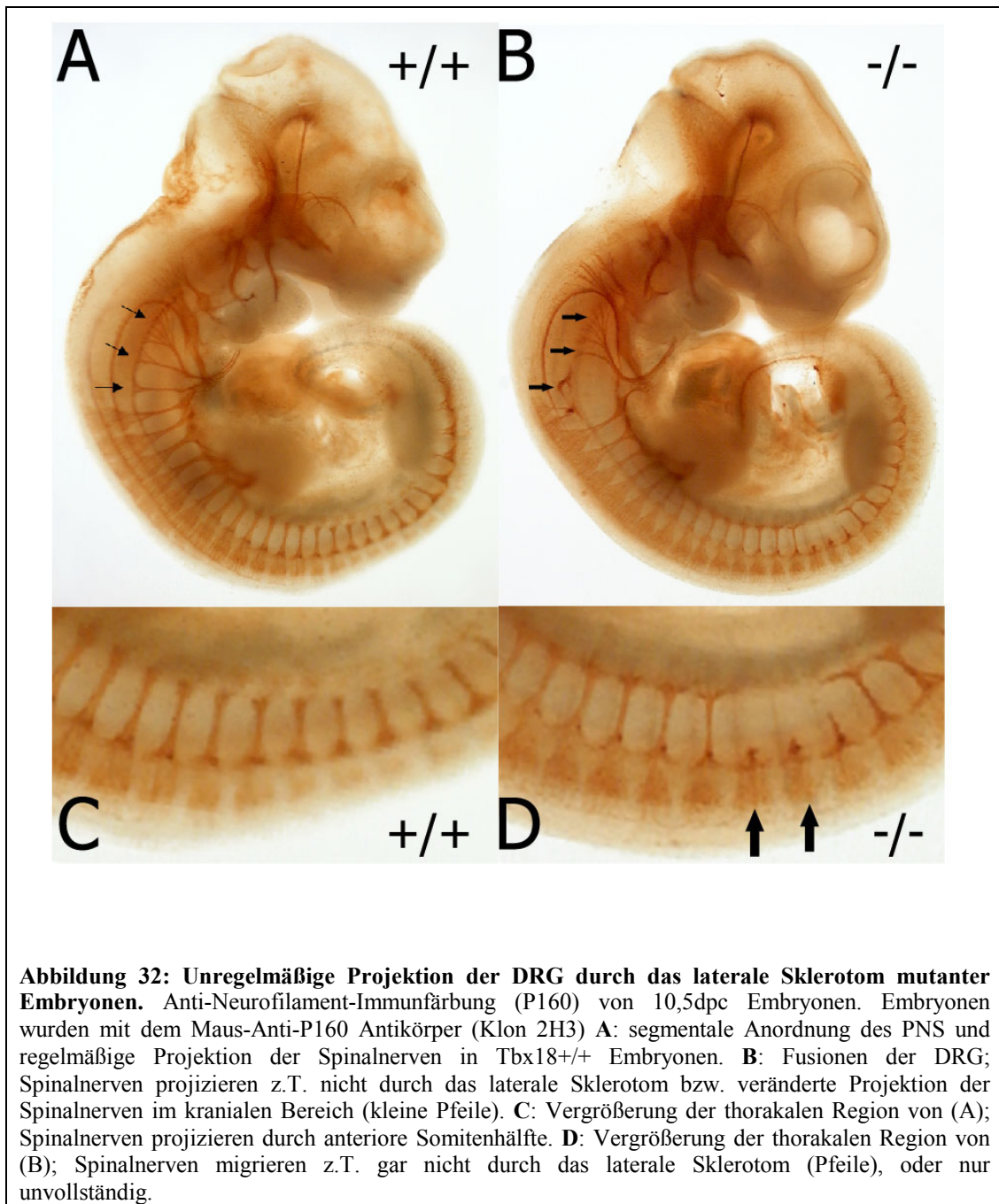
Die Projektion der Spinalnerven ist ebenfalls stark beeinträchtigt, so daß es einigen Spinalnerven gar nicht gelingt, durch das laterale Sklerotom zu projizieren. Die normalerweise segmental angelegten DRG sind in den mutanten Embryonen miteinander fusioniert.

Für eine genauere Analyse des peripheren Nervensystems wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt.

3.3.4 Untersuchung der Anlage des peripheren Nervensystems

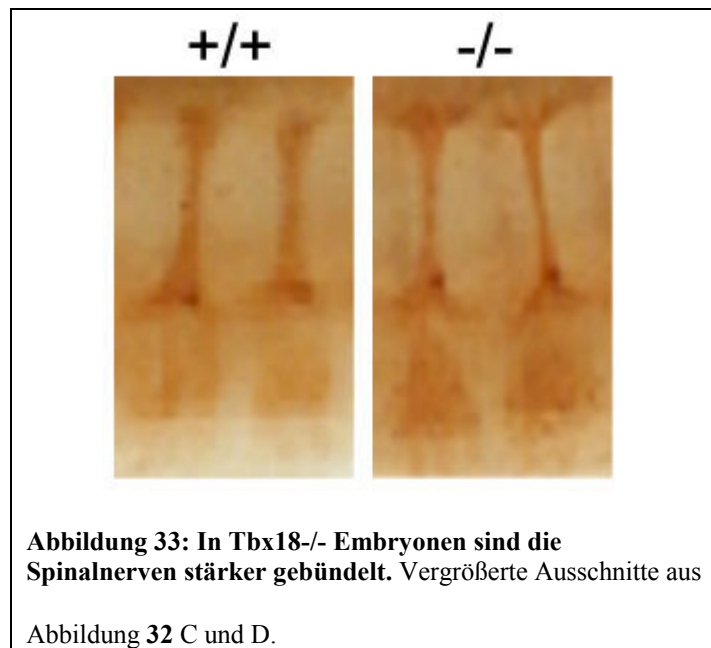
Die Analyse des Peripheren Nervensystems (PNS) mittels Anti-Neurofilament-Immunfärbung, diente als indirekter Nachweis für eine korrekte Etablierung der anterioren und posterioren Somitenhälfte.

In 10,5dpc alten mutanten Embryonen zeigen die Spinalnerven sowohl im kranialen, als auch im Bereich des Rumpfes eine veränderte Projektion (Abbildung 32B, kleine Pfeile). Die DRG sind in mutanten Embryonen fast entlang der gesamten Körperachse miteinander fusioniert.



Die Projektion der Spinalnerven von durch die anteriore Somitenhälfte ist innerhalb eines Tbx18 mutanten Embryos sehr variabel, einzelne Nerven projizieren gar nicht durch die Somiten, wohingegen andere nur teilweise in das Sklerotom einwandern können (Abbildung 38B u. D, Pfeile). Generell treten diese Defekte meist in der kranialen und thorakalen Region auf. Die Spinalnerven, die durch das Sklerotom projizieren können, erscheinen in Tbx18^{-/-} Embryonen stärker gebündelt zu sein als in Tbx18^{+/+} Embryonen (Abbildung 32). Der Phänotyp ist nicht nur innerhalb eines Embryos sehr variabel, sondern auch zwischen verschiedenen Embryonen. Es

konnten Embryonen analysiert werden, bei den alle Spinalnerven in das Sklerotom einwandern konnten, diese jedoch sehr stark kondensiert waren. In anderen mutanten Embryonen konnten alle Spinalnerven im thorakalen Abschnitt, nicht in das Sklerotom einwandern. Bei den hier abgebildeten Embryonen handelt es sich um einen repräsentativen Embryo mit einem Phänotyp, der in den meisten Fällen auftrat und darin bestand, daß nur einige Spinalnerven nicht in das Sklerotom einwandern.



Die Analyse des PNS hat gezeigt, daß in mutanten Embryonen die Passage der Spinalnerven durch die anteriore Somitenhälfte beeinträchtigt ist. Ferner konnte anhand der histologischen Untersuchung von Tbx18^{-/-} Embryonen nachgewiesen werden, daß die Zelldichte - augenscheinlich - in anteriorer und posteriorer Somitenhälfte angeglichen ist. Um zu klären, ob eine erhöhte Zellproliferation in der anterioren Somitenhälfte und/oder eine erhöhte Apoptose in der posterioren Somitenhälfte einen Einfluß darauf hat, wurde eine Proliferations- und Apoptose-Analyse durchgeführt.

3.3.5 Molekulare Analyse des Somitenphänotyps

Für die molekulare Charakterisierung des Somitenphänotyps, wurden u.a. Experimente gemacht, um Proliferation bzw. Apoptose und die Expression von Markergenen mittels *in situ* Analyse nachzuweisen. Bei der Proliferationsanalyse erfolgte die Markierung von proliferativen Zellen durch BrdU-Einbau und

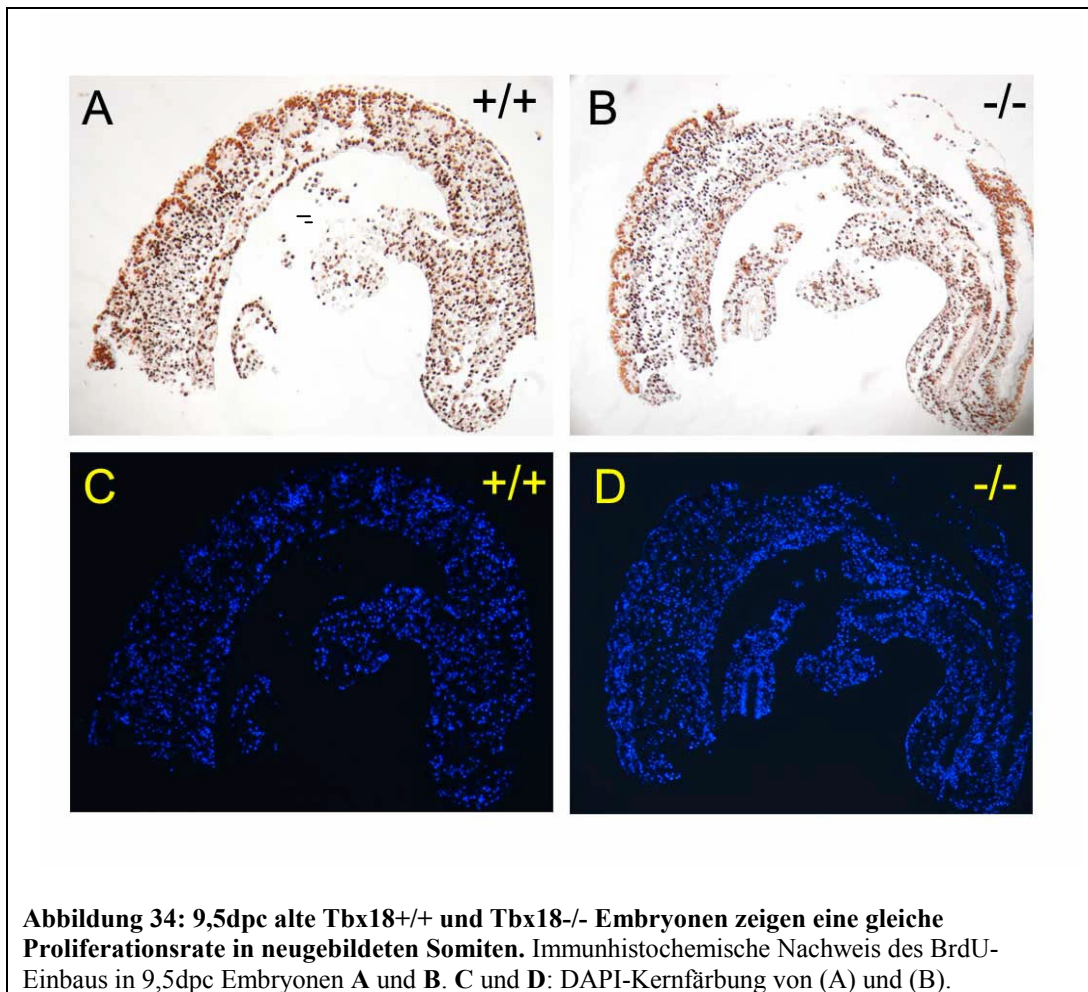
anschließender immunhistochemischen Detektion, um eine Aussage über die unterschiedliche Proliferationsrate zwischen Tbx18^{+/+} und Tbx18^{-/-} Embryonen zu machen. Für den Nachweis von apoptotischen Zellen wurde die TUNEL-Methode eingesetzt, die es erlaubt, fragmentierte DNA apoptotischer Zellen immunhistochemisch nachzuweisen.

Es wurde ebenfalls eine *in situ* Expressionsanalyse von Markergenen des Notch/Delta-Signalweges bzw. von Differenzierungsmarkern für die dorso-ventrale Differenzierung der Somiten durchgeführt.

3.3.5.1 Proliferationsanalyse in Tbx18 Embryonen

Mittels eines immunhistochemischen Assays wurde der Einbau des Nukleotidanalogs Bromdesoxyuridin in mitotische Zellen nachgewiesen. Mitotisch aktive Zellen, die sich in der Synthesephase (S-Phase) befinden, können das Bromdesoxyuridin (BrdU) in ihr Genom einbauen. Ein Vergleich des BrdU-Einbaus zwischen Tbx18^{+/+} und Tbx18^{-/-} Embryonen sollte klären, ob eine veränderte Proliferationsrate in mutanten Embryonen zum Phänotyp beiträgt. Der BrdU-Einbau oder auch BrdU-Markierungsrate korreliert mit der Proliferationsrate der Zellen. Die Analyse wurde mit 9,5dpc und 10,5dpc alten Embryonen durchgeführt. Aufgrund der frühen Expression von Tbx18 in den Somitomeren und den neugebildeten Somiten könnte, bei einer direkten Kontrolle der Proliferation durch Tbx18, ein Effekt schon in den neugebildeten Somiten 9,5dpc alter Tbx18^{-/-} Embryonen nachweisbar sein. Deshalb wurde bei der Proliferationsanalyse 9,5dpc alter Embryonen die 10-12 zuletzt gebildeten Somiten untersucht.

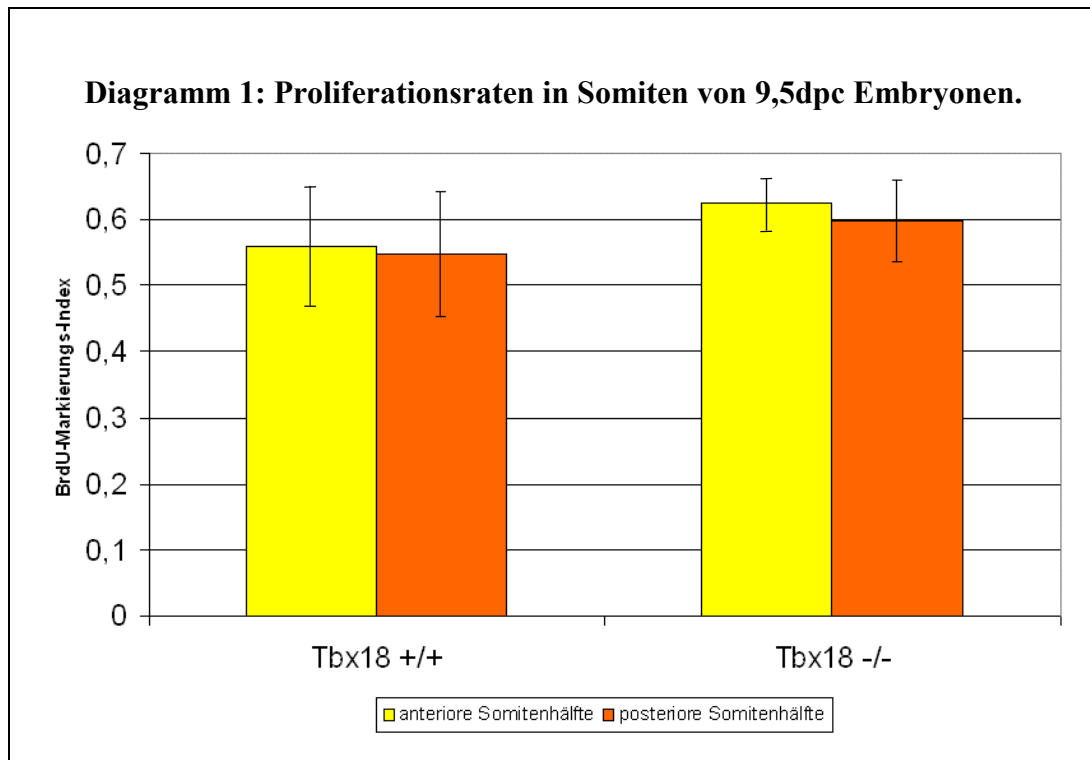
Die unterschiedlichen Proliferationsraten sind ein Charakteristikum des Sklerotoms von differenzierten Somiten. Der Differenzierungsprozeß der DV-Achse in Dermomyotom und Sklerotom erfolgt späterer, als die Etablierung der AP-Polarität (s. Einleitung). Mit einer differenzierten Analyse der Proliferationsraten von epithelialen Somiten (in 9,5dpc) und differenzierten Somiten (in 10,5dpc) sollte untersucht werden, ob Tbx18 in dem einen oder anderen Prozeß eine Rolle in der Kontrolle der Proliferation besitzt. In 10,5dpc alten Embryonen wurden deshalb die Somiten des zervikalen und thorakalen Bereichs untersucht.



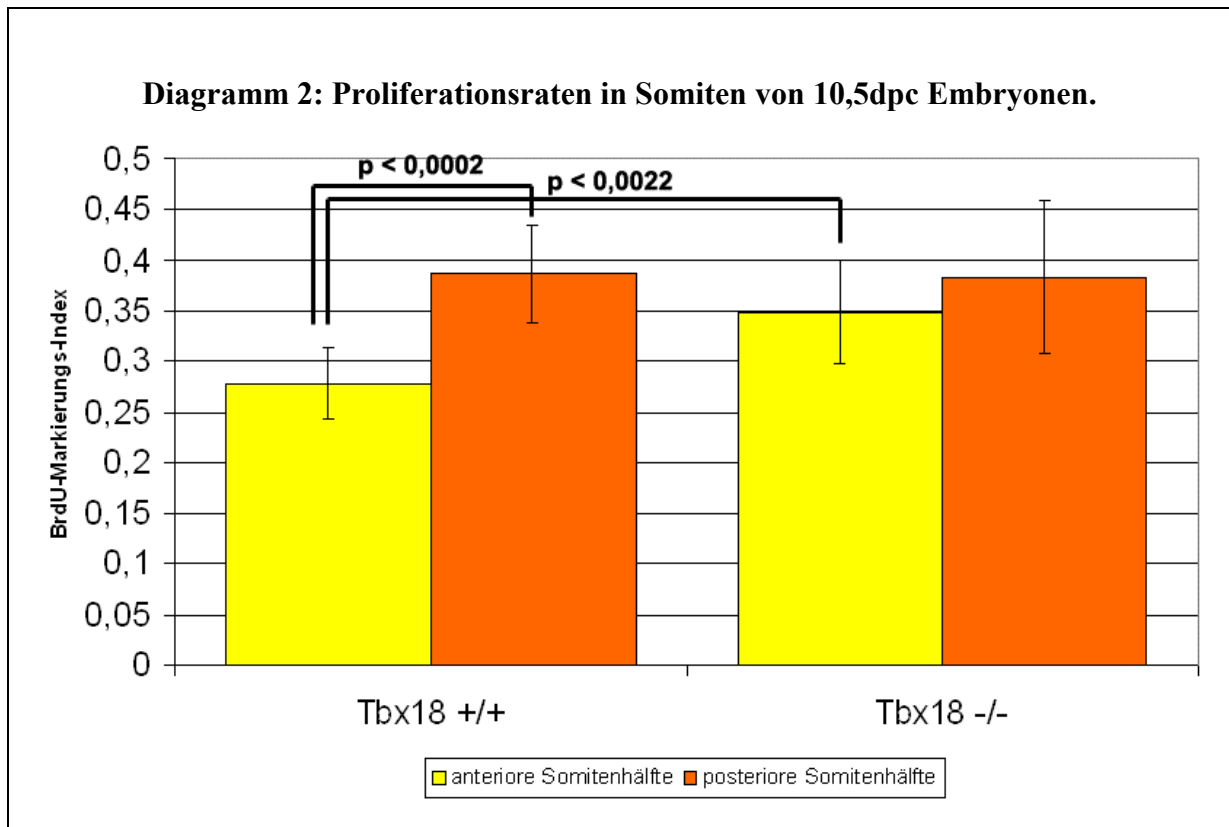
Die Proliferations-Analyse von Somiten in 9,5dpc alten Embryonen erbrachte eine BrdU-Markierungsrate in Tbx18^{+/+} Embryonen in der anterioren Somitenhälfte von $0,561 \pm 0,091$ und in der posterioren Somitenhälfte von $0,548 \pm 0,094$. In der anterioren Somitenhälfte mutanter Embryonen, konnte eine Markierungsrate von $0,624 \pm 0,041$ bzw. in der posterioren Hälfte eine Rate von $0,599 \pm 0,062$ beobachtet werden (siehe auch

Diagramm 1). Daraus läßt sich erkennen, daß in neugebildeten Tbx18^{+/+} Somiten eine gleichförmige Proliferationsrate in der anterioren und posterioren Somitenhälfte herrscht.

In den Somiten von Tbx18^{-/-} Embryonen ist die leicht erhöhte BrdU-Markierungsrate nicht signifikant gegenüber der von Tbx18^{+/+} Embryonen. Damit existiert kein substantieller Unterschied zwischen den Proliferationsraten beider Somitenhälften von Tbx18^{+/+} und Tbx18^{-/-} Embryonen. Damit scheint Tbx18 keinen unmittelbaren Einfluß auf die Proliferationsrate, weder direkt in anterioren Somitenhälften, noch indirekt in posterioren Somitenhälften, von neugebildeten Somiten zu haben.



In den zervikalen und thorakalen Somiten von 10,5dpc alten Tbx18+/+ Embryonen zeigte sich eine verringerte BrdU-Markierungsrate mit einem Wert von $0,278 \pm 0,036$ in der anterioren Hälfte und $0,386 \pm 0,048$ in der posterioren Somitenhälfte. Die ermittelten Werte zwischen anteriorer und posteriorer Somitenhälfte waren statistisch signifikant (Studentscher T-Test, $p < 0,0002$). Die verringerte Proliferationsrate in der anterioren Somitenhälfte gegenüber der posterioren erklärt die unterschiedlichen Zelldichten der anterioren und posterioren Kompartimente von zervikalen und thorakalen Somiten. Dieser Befund wurde auch anhand der histologischen Untersuchung bestätigt.(s. auch Abbildung 30 und Abbildung 31).



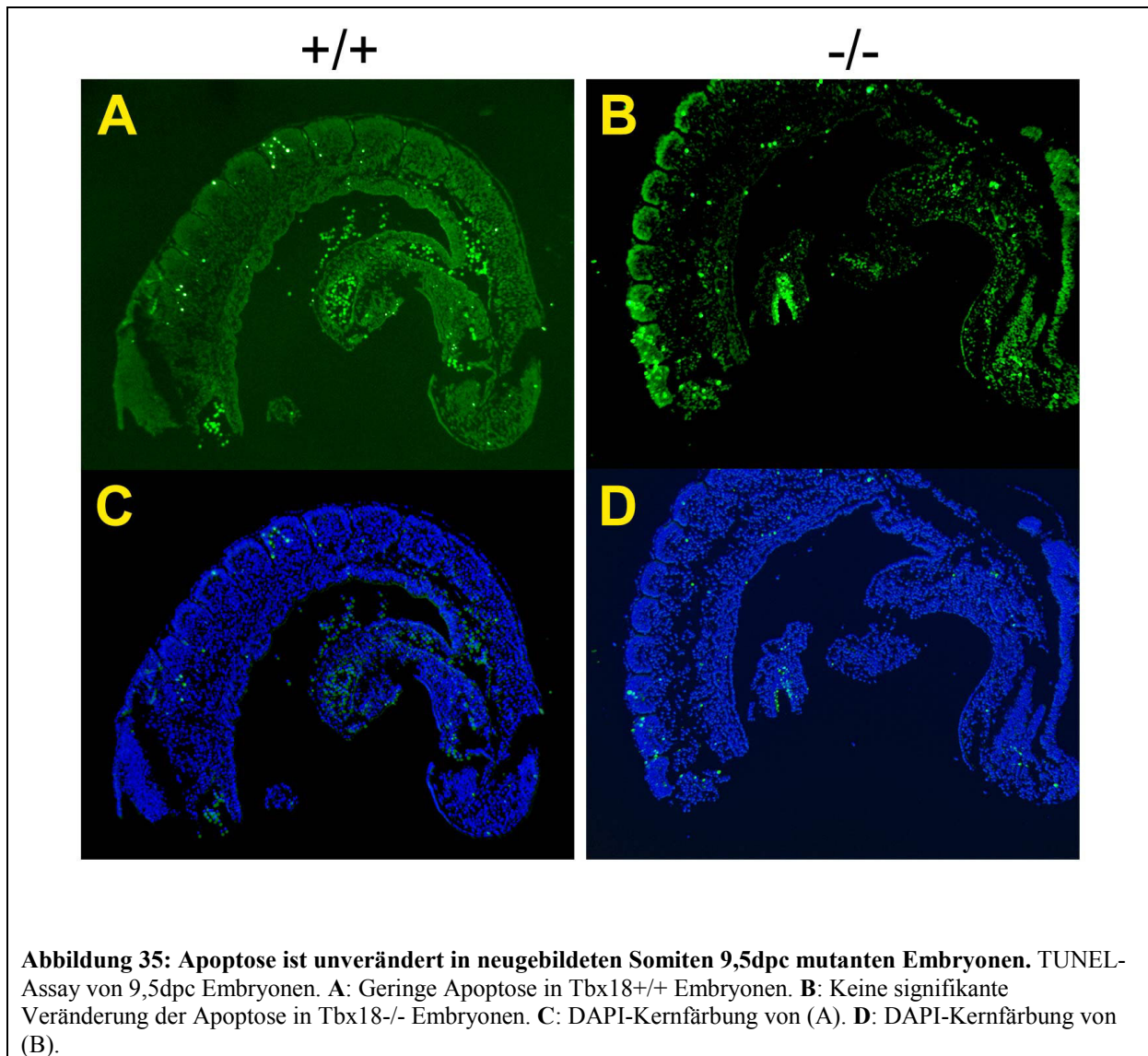
Die BrdU-Markierungsrate in der anterioren Somitenhälfte von Tbx18^{-/-} Embryonen war signifikant ($p < 0,0022$) gegenüber der von Tbx18^{+/+} Embryonen erhöht. Die Markierungsrate in der anterioren Hälfte erreichte mit einem Wert von $0,348 \pm 0,051$ fast die gleiche Rate wie in der posterioren Somitenhälfte: $0,383 \pm 0,076$.

Die Proliferationsrate in der posterioren Somitenhälfte ist zwischen Tbx18^{+/+} und Tbx18^{-/-} Embryonen praktisch unverändert. Damit kann die Angleichung der Zelldichte zwischen anterioren und posterioren Somitenhälften in Tbx18^{-/-} Embryonen als Folge der veränderten Proliferationsrate der Zellen der anterioren Somitenhälfte interpretiert werden.

3.3.5.2 Apoptose-Untersuchung in Tbx18 Embryonen

Es wurde ebenfalls untersucht, ob eine veränderte Apoptoserate einen Beitrag zum Somitenphänotyp leistet. Dazu wurde die sogenannte TUNEL-Methode verwendet. Diese Methode detektiert Zellen, die sich im Endstadium des apoptotischen Signalweges befinden, in dem die Zellen Doppelstrangbrüche der DNA aufweisen. Die Addition von Biotin-markierten Nukleotiden an die 3'-Termini der DNA durch die Terminale Transferase, kann durch eine immunhistochemische Analyse

nachgewiesen werden. Bei dieser Analyse wurde ebenfalls zwischen neugebildeten und differenzierten Somiten unterschieden.

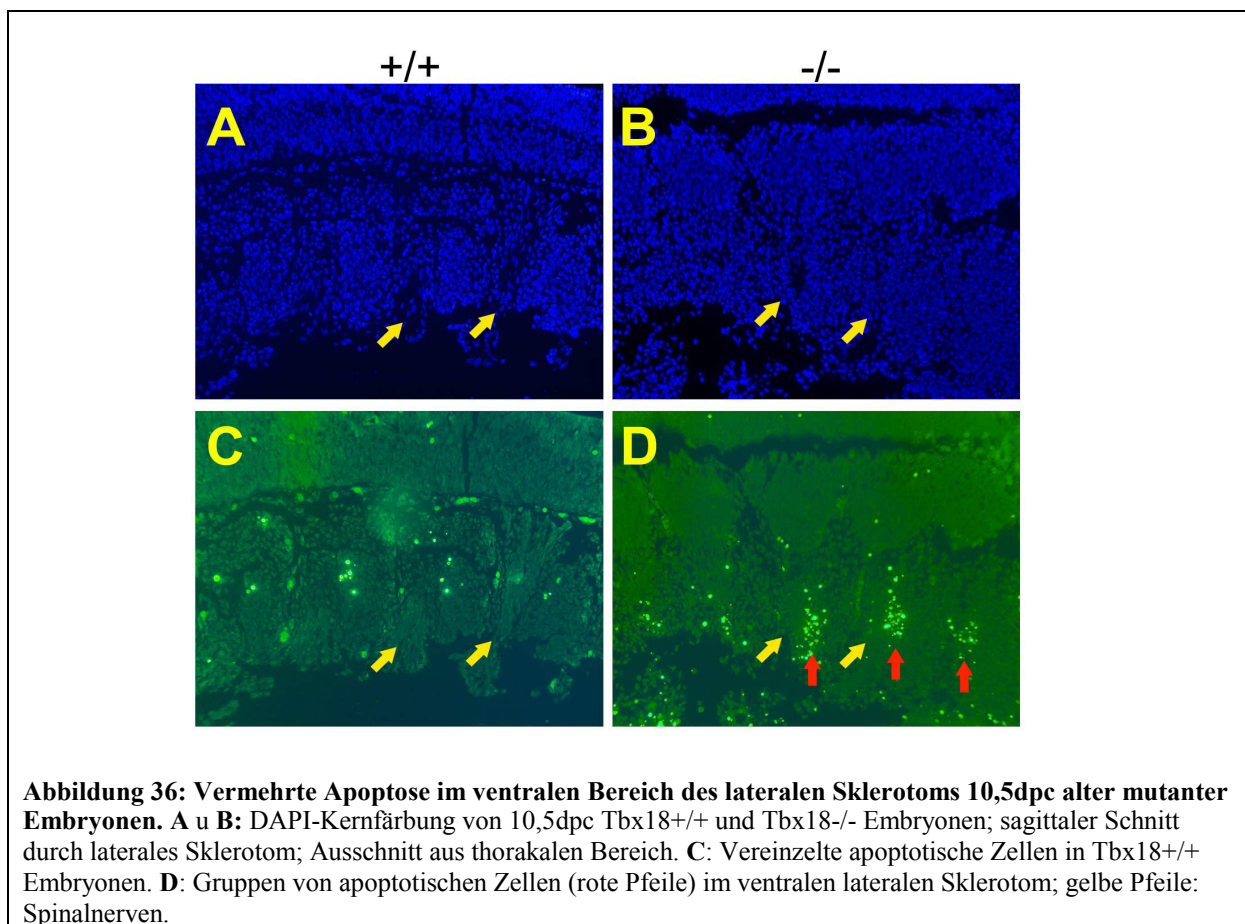


In Tbx18^{+/+} Embryonen treten in diesem Entwicklungsstadium im präsomitären Mesoderm und in den neugebildeten Somiten kaum apoptotische Zellen auf (Abbildung 35). Bei der Apoptose-Untersuchung der 10-12 zuletzt gebildeten Somiten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tbx18^{+/+} und Tbx18^{-/-} Embryonen beobachtet werden. Damit scheint Tbx18 keinen unmittelbaren Einfluß auf Apoptose in epithelialen Somiten zu besitzen.

In den differenzierten Somiten des thorakalen Bereichs 10,5dpc alter Tbx18^{+/+} Embryonen treten einzelne apoptotische Zellen im lateralen Sklerotom auf (

Abbildung 36C). In mutanten Embryonen, treten jedoch ganze Gruppen von apoptotischen Zellen im lateralen Sklerotom auf. Diese Gruppen sind im ventralen Bereich des lateralen Sklerotoms lokalisiert und grenzen an die Spinalnerven. Eine DAPI-Kernfärbung (und die geringe Hintergrundfärbung im TUNEL-Assay) erbrachte deutlich, daß es sich bei diesen Zellen nicht um apoptotische Zellen der Spinalnerven sondern um apoptotische Zellen des Sklerotoms handelt (Abbildung 36B u. D).

Damit treten im lateralen Sklerotom mutanter Embryonen vermehrt apoptotische Zellen in einem Kompartiment auf, in dem in WT Embryonen *Tbx18* exprimiert wird.



3.3.5.3 Expressionsanalyse von Genen aus dem Notch/Delta Signalweges

Durch eine Vielzahl von genetischen Experimenten konnte gezeigt werden, daß der Notch/Delta-Signalweg essentiell für die Etablierung der anterioren-posterioren Polarität der Somiten ist (s. Einleitung). Da *Tbx18* u.a. in der anterioren Somitenhälfte neugebildeter Somiten exprimiert wird und die oben beschriebenen Experimente auf

einen möglichen Verlust (der Identität) der anterioren Somitenhälfte hindeuteten, wurde eine „whole mount“ Expressionsanalyse mit Komponenten des Notch/Delta-Signalweges durchgeführt.

Delta like-1 (Dll1) kodiert für einen Liganden des Notch-Rezeptorsystems und ist stark im PSM und in der posterioren Hälfte neugebildeter, epithelialer Somiten exprimiert (Bettenhausen et al. 1995). *Dll3*, ebenfalls ein Notch-Ligand, ist in der Somitogenese im PSM exprimiert und in neugebildeten Somiten auf die anteriore Somitenhälfte beschränkt (Dunwoodie et al. 1997). Mitglieder der Notch-Rezeptor Familie sind Transmembranproteine, die durch die Liganden der Delta- bzw. Serrate-Familie aktiviert werden. *Notch1* (Williams et al. 1995) und *Notch2* (Weinmaster et al. 1992) werden im anterioren Bereich des PSM koexprimiert. *Notch2* ist darüber hinaus auch in der anterioren Hälfte neugebildeter Somiten exprimiert. *Mesp2*, kodiert für einen basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor und zeigt eine dynamische Expression im anterioren PSM mit einer Ausdehnung von einer Somitenlänge, die sich dann progressiv auf die anteriore Hälfte des neuzubildenden Somiten zurückzieht (Saga et al. 1997). *Cerberus-1 (Cer1)* ist ein sezerniertes Glykoprotein und besitzt eine antagonistische Funktion auf Nodal-, BMP- und Wnt-Signalwege (Glinka et al. 1998, Piccolo et al. 1999). *Cer1* wird in den anterioren Hälften der beiden Somitomeren S0 und S-1 bzw. in den anterioren Hälften neugebildeter Somiten exprimiert (Biben et al. 1998). *Ephrin B2 (E B2)*, ein Transmembranprotein und Ligand für Ephrin-Rezeptoren wird sowohl im anterioren PSM, als auch in der posterioren Somitenhälfte neugebildeter Somiten exprimiert (Wang et al. 1997). *EphA4* (vormals *Sek-1* genannt) ist ein Mitglied der Eph-Rezeptortyrosinkinase-Familie und zeigt eine Expressionsdomäne sowohl im PSM als auch in der anterioren Hälfte der neugebildeten Somiten exprimiert (Nieto et al. 1992).

Die Expressionsanalyse in den Somiten 10,5dpc alter Embryonen zeigte, daß keiner der untersuchten Marker in *Tbx18*^{-/-} Embryonen verändert ist (Abbildung 37).

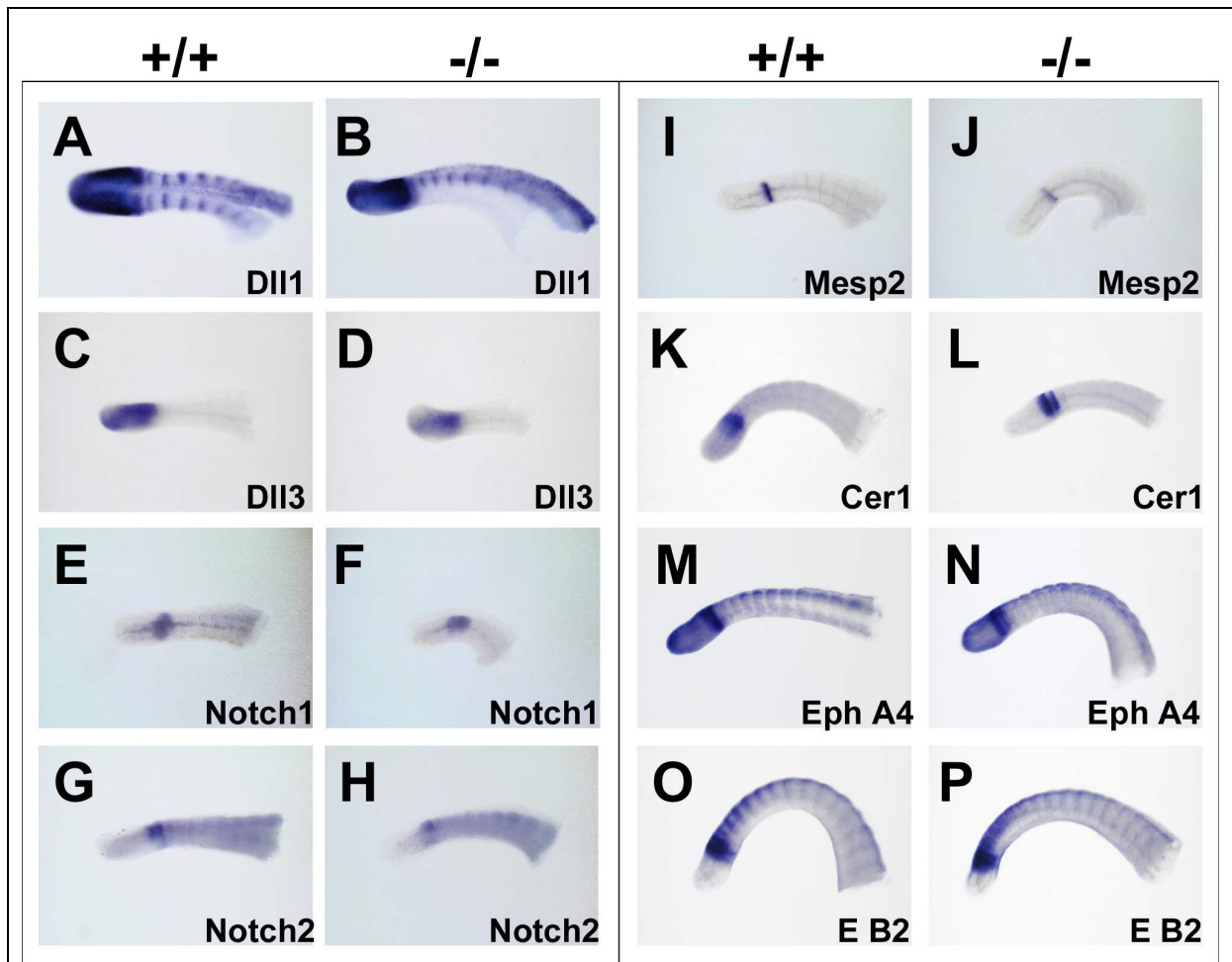


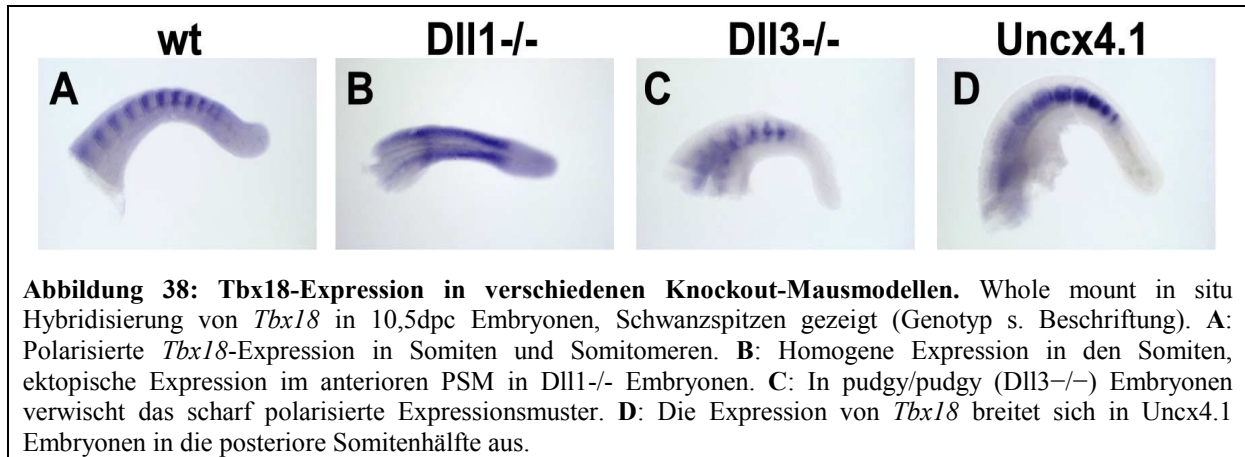
Abbildung 37: Expressionsanalyse von Komponenten des Notch/Delta- und Ephrin-Signalweges zeigen keine Unterschiede zwischen *Tbx18*^{+/+} und *Tbx18*^{-/-} Embryonen. „Whole mount“ *in situ* Hybridisierungsanalyse von Markergenen für die frühe Somitenentwicklung; Vergleich der Expression in Schwanzspitzen von 10,5dpc WT und mutanten Embryonen. Die Expression von Markergenen in mutanten Embryonen (B, D, F, H, J, L, N, P) ist unverändert gegenüber WT Embryonen (A, C, E, G, I, K, M, O).

Damit scheint *Tbx18* keinen direkten Einfluß auf die Etablierung der anterioren-posterioren Polarität (AP-Polarität) der Somiten durch den Notch/Delta-Signalweg zu haben. Es muß aufgrund der Markeranalyse angenommen werden, daß die Etablierung der AP-Polarität in mutanten Embryonen zumindest etabliert wird.

3.3.5.3 *Tbx18*-Expressionsanalyse in Mausmutanten des Notch/Delta Signalweges

Ob die Expression von *Tbx18* von Notch/Delta-Signalweg abhängig ist, wurde anhand einer Expressionsanalyse in verschiedenen Knockout-Modellen untersucht. Die in WT polarisierte *Tbx18*-Expression in Somiten und den Somitomeren Embryonen (Abbildung 38A), weicht in Somiten von *Dll1*^{-/-} Embryonen einer homogenen Expression in den gesamten Somiten (Abbildung 38B) bzw. einer ektopischen Expression im anterioren PSM. Die ausgebreitete Expression von *Tbx18*

in die posteriore Somitenhälfte in *Dll1*^{-/-} Embryonen läßt den Schluß zu, daß *Dll1* eine Repressorfunktion auf die Expression von *Tbx18* in diesem Kompartiment ausübt.



In homozygoten *pudgy*-Embryonen (*Dll3*^{-/-}) ist das *Tbx18*-Expressionsmuster weniger stark polarisiert als in WT Embryonen (Abbildung 38C). Damit scheint *Dll3* für eine korrekte *Tbx18*-Expression insofern verantwortlich zu sein, daß *Dll3* das polarisierte Expressionsmuster von *Tbx18* schärft.

Uncx4.1 ist ein Gen der Paired-Homöobox Familie. *Uncx4.1* wird während der Somitogenese in der posterioren Hälfte von neugebildeten und epithelialen Somiten exprimiert und ist nachher auf das posteriore Kompartiment des lateralen Sklerotoms beschränkt (Neidhardt. et al 1997). Die Expression von *Tbx18* ist in WT Embryonen auf die anteriore Somitenhälfte neugebildeter Somiten beschränkt, breitet sich in homozygoten *Uncx4.1* Embryonen in die posteriore Somitenhälfte ektopisch aus. Das deutet darauf hin, daß *Uncx4.1* – ähnlich wie *Dll1* – eine Repressorfunktion auf die *Tbx18*-Expression ausübt.

Die Expressionsanalyse hat gezeigt, daß der Verlust von *Tbx18* keine Auswirkungen auf die Expression von Komponenten des Notch/Delta-Signalweges hat. Damit scheint eine Rolle an der Etablierung der AP-Polarität durch *Tbx18* ausgeschlossen zu sein. Vielmehr scheint *Tbx18* selber ein Zielgen des Notch/Delta-Signalweges zu sein, da die Expression von *Tbx18* in Knockout-Modellen stark verändert ist. Damit wird die Etablierung der AP-Polarität in *Tbx18*^{-/-} Embryonen zumindest initiiert.

3.3.5.4 Expressionsanalyse von Differenzierungsmarkern

Somiten besitzen neben der anterior-posterioren Polarität auch eine Polarität entlang der dorso-ventralen Achse (DV-Achse). Unter dem Einfluß von Wnt-Signalen aus dem Oberfächenektoderm wird das Dermomyotom spezifiziert, daß den Transkriptionsfaktor *Pax3* daraufhin exprimiert. Aus dem Myotom-Kompartiment entsteht die Körpermuskulatur. *Myogenin* ist ein bHLH-Transcriptionsfaktor, der in diesem Kompartiment exprimiert wird (Edmondson et al. 1989). *Pax1* ist ein Marker für das medio-ventrale Sklerotom, aus dem sich Teile der Wirbelkörper bilden (Deutsch et al. 1988; Borycki et al. 1997; Wallin et al. 1994). Es wurde gezeigt, daß *Scleraxis* das Kompartiment markiert, aus dem sich die Sehnen entwickeln, die Knochen und Muskulatur miteinander verbinden (Brent et al. 2003).

Die Skelettanalyse von 18,5dpc alten Embryonen hat gezeigt, daß ektopisches Knochenmaterial im axialen Skelett von mutanten Embryonen auftritt. Um zu untersuchen, ob eine fehlerhafte DV-Differenzierung dafür verantwortlich ist, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit den oben beschriebenen Markergenen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob die DV-Kompartimentierung in mutanten Embryonen angelegt werden.

Die Abbildung 39 zeigt, daß keines der untersuchten Markergene signifikant in seiner Expression in mutanten Embryonen verändert ist. Sowohl die Intensität als auch das Expressionsmuster von *Myogenin* (Abbildung 39, A u. B), von *Pax3* (Abbildung 39, E u. F) und *Scleraxis* (Abbildung 39, G u. H) sind gleichförmig. Lediglich das Expressionsmuster von *Pax1* scheint im thorakalen Bereich in WT Embryonen leicht segmentiert und in mutanten Embryonen etwas homogener in seiner Expression zu sein. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Etablierung der einzelnen Kompartimente normal in *Tbx18*^{-/-} Embryonen stattfindet. Die in *Tbx18*^{-/-} Embryonen ausgebreiteten Knochenelemente, lassen sich somit nicht auf eine Expansion des Sklerotoms zurückführen.

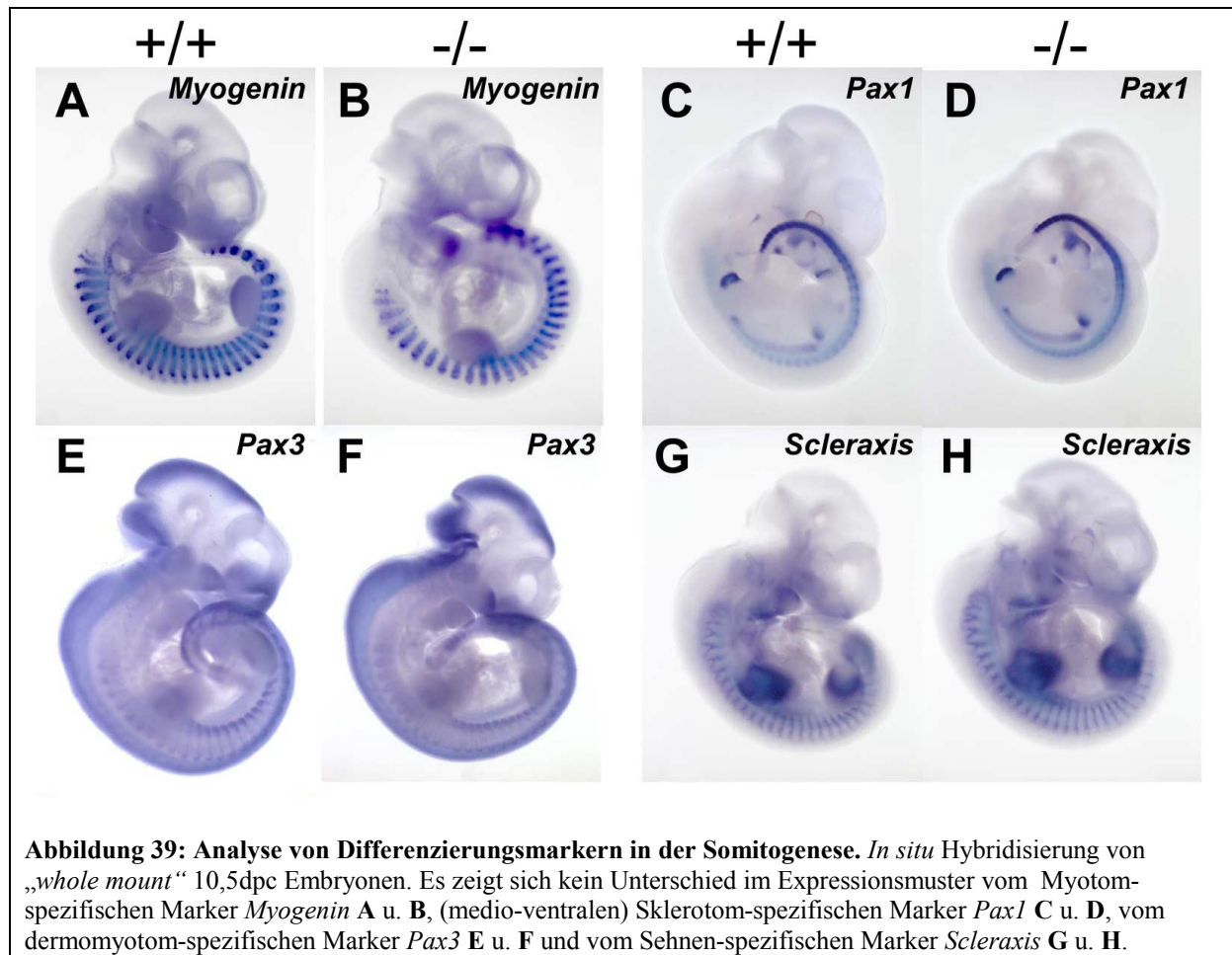


Abbildung 39: Analyse von Differenzierungsmarkern in der Somitogenese. *In situ* Hybridisierung von „whole mount“ 10,5dpc Embryonen. Es zeigt sich kein Unterschied im Expressionsmuster vom Myotom-spezifischen Marker *Myogenin* A u. B, (medio-ventralen) Sklerotom-spezifischen Marker *Pax1* C u. D, vom dermomyotom-spezifischen Marker *Pax3* E u. F und vom Sehnen-spezifischen Marker *Scleraxis* G u. H.

3.3.5.5 Expressionsanalyse von Markergenen des lateralen Sklerotoms

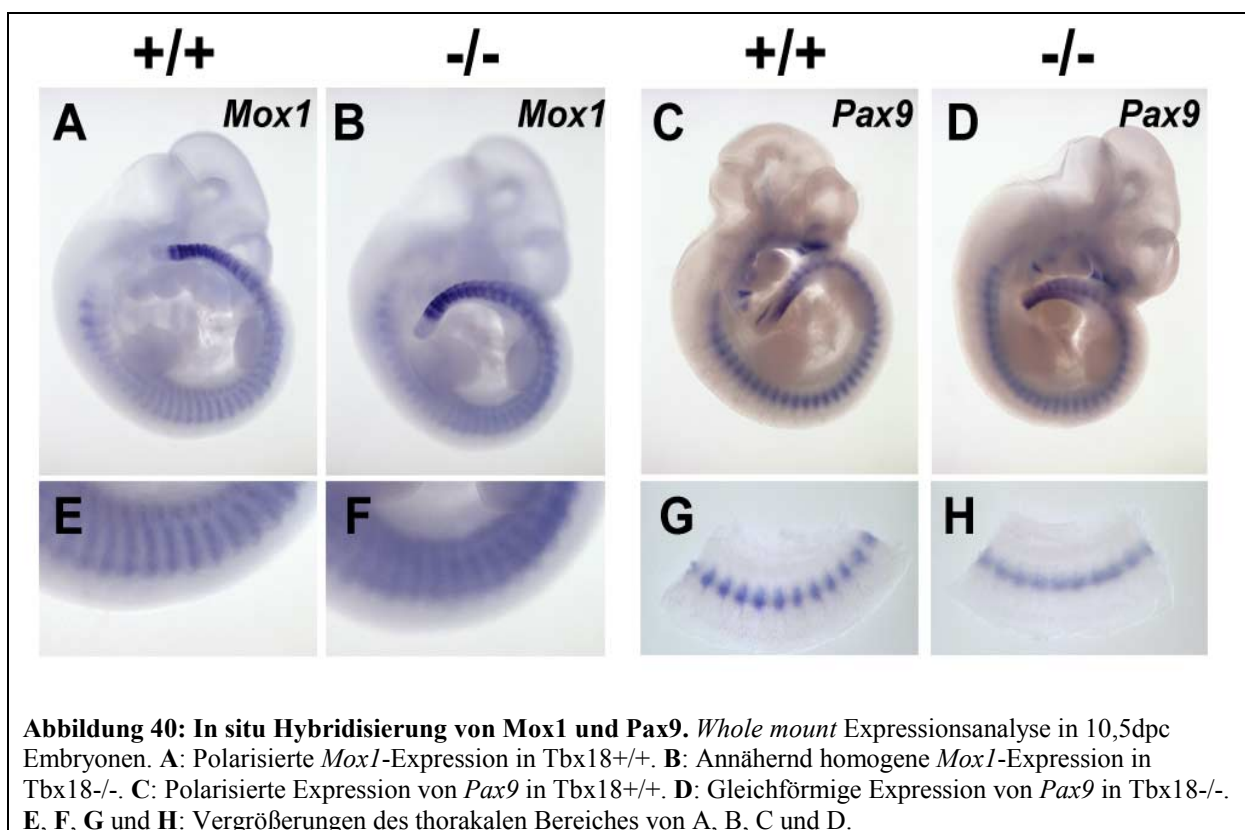
Da die Skelettanalyse von 13,5dpc und 18,5dpc Embryonen gezeigt hat, daß mutante Embryonen Defekte in den proximalen Rippen und den lateralen Anteil der Wirbel, den Pedikeln aufweisen. Es wurde deshalb eine Expressionsanalyse mit Markergenen, die in der Entwicklung des lateralen Sklerotoms eine Rolle spielen, durchgeführt.

Mox1 und *Pax9* sind Transkriptionsfaktoren und werden in einem polarisierten Muster in den Somiten exprimiert (Candia et al. 1992 und Neubüser et al 1995). Die Expression *Mox1* ist in der posterioren Somitenhälfte stärker als in der anterioren Hälfte. Auch *Pax9* zeigt eine polarisierte Expression im ventro-lateralen Sklerotom mit einer stärkeren Expression in der posterioren Somitenhälfte.

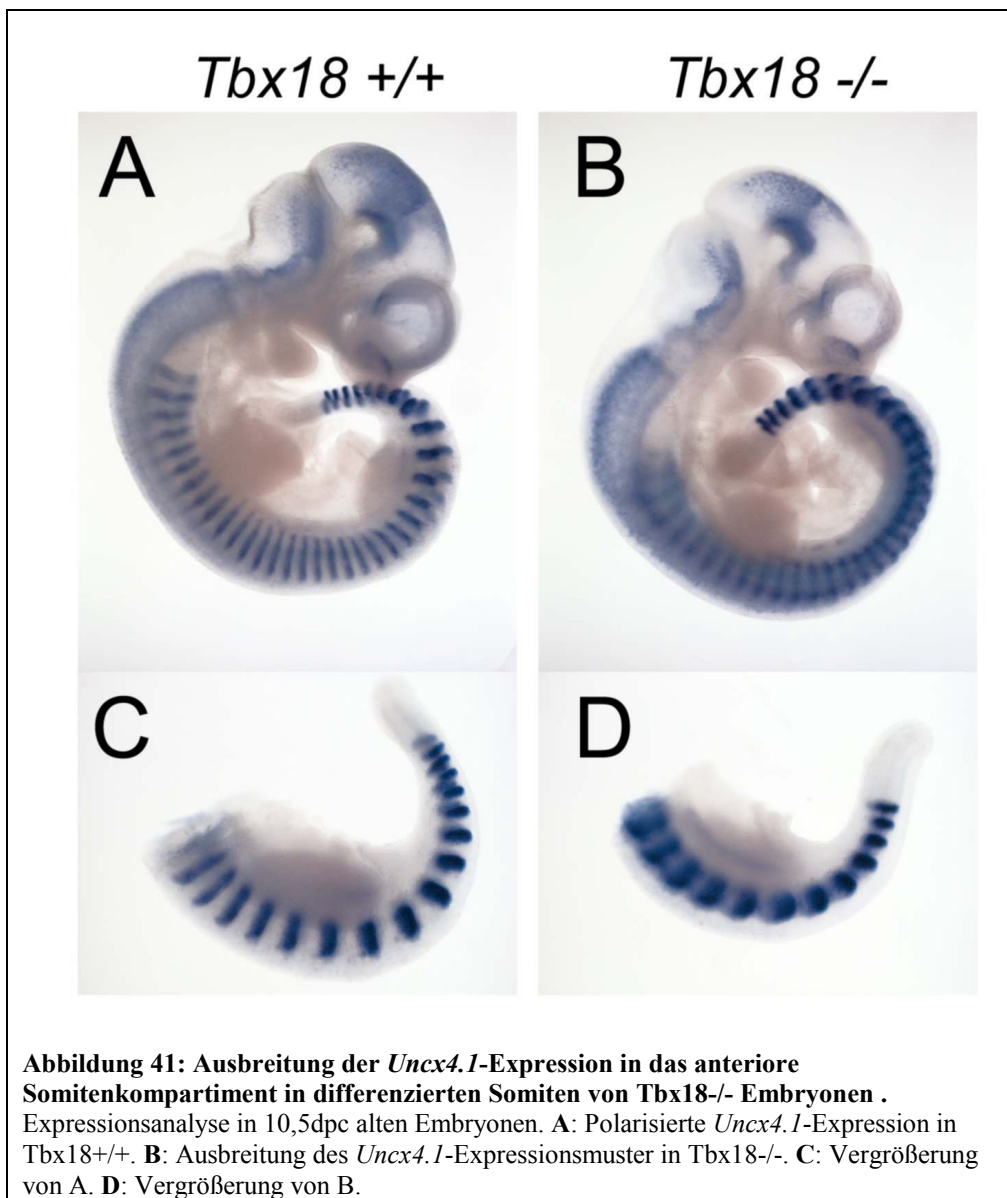
Uncx4.1 wird – neben weiteren Domänen- in neugebildeten Somiten zunächst in der gesamten posterioren Somitenhälfte exprimiert. In differenzierten Somiten ist die *Uncx4.1*-Expression dann auf das posteriore Kompartiment des lateralen Sklerotoms reduziert.

In neugebildeten Somiten mutanter Embryonen zeigt die Expression von *Mox1* ein fast normal polarisiertes Expressionsmuster, das jedoch nach anterior in differenzierten Somiten immer gleichförmiger wird. Die Expression von *Mox1* ist in mutanten Embryonen (Abbildung 40B u. F) im thorakalen Bereich fast gleichförmig (Abbildung 40A u. E).

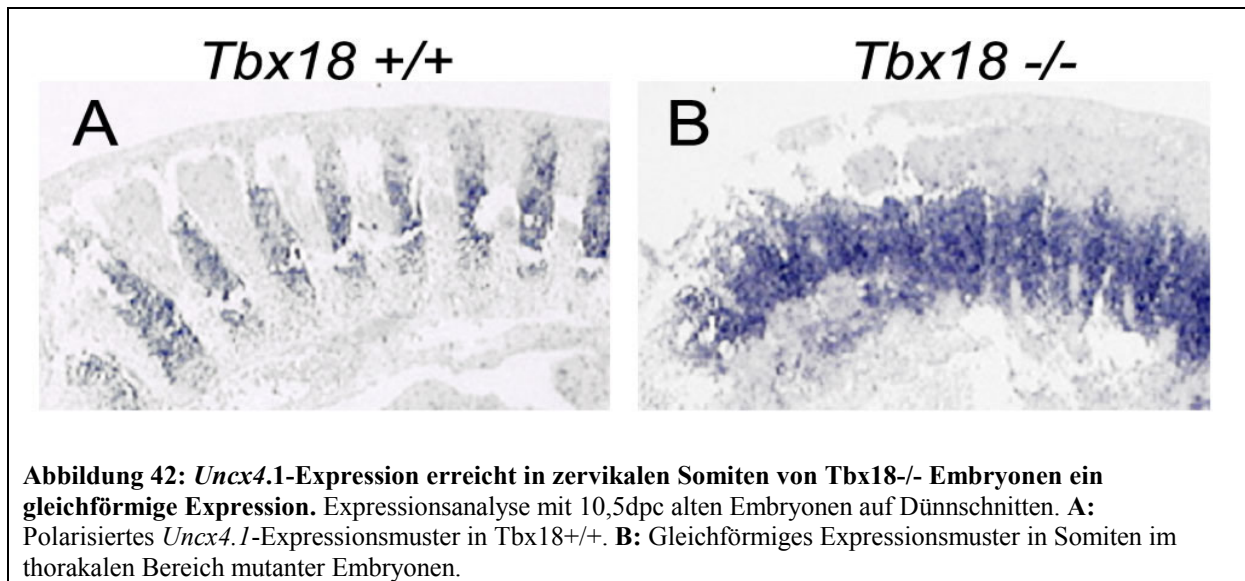
Pax9 ist in Somiten mutanter Embryonen in einem polarisierten Muster exprimiert, daß jedoch mit zunehmender Differenzierung der Somiten in ein gleichförmiges Muster übergeht (Abbildung 40D). Somiten von mutanten Embryonen weisen im thorakalen Bereich eine fast gleichförmige Expression von *Pax9* auf (Abbildung 40H).



Die Expression von *Uncx4.1* zeigt in ersten 3-5 neugebildeten Somiten mutanter Embryonen ein polarisiertes Expressionsmuster. Auffällig ist jedoch, daß sich die *Uncx4.1*-Expression in differenzierten Somiten in die anteriore Somitenhälfte kontinuierlich ausbreitet (s. Abbildung 41). Das polarisierte Expressionsmuster von *Uncx4.1* wird in *Tbx18* $-/-$ Embryonen angelegt, jedoch breitet sich dieses dann progressiv, mit der fortschreitenden Differenzierung der Somiten in die anteriore Somitenhälfte aus.



In den Somiten von *Tbx18*^{-/-} Embryonen ist die Ausbreitung der *Uncx4.1* Expression soweit fortgeschritten, daß eine gleichförmige Expression in beiden Somitenhälften erreicht ist (Abbildung 42).



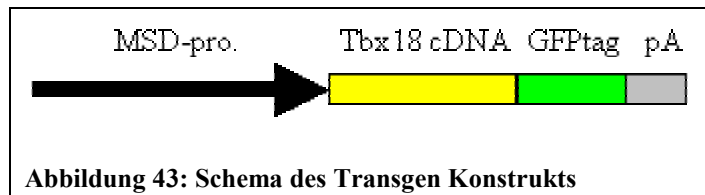
3.4 Ektopische Expression von *Tbx18*

3.4.1 Erzeugung einer transgenen Maus mit einer ektopischen *Tbx18*-Expression unter Kontrolle des MSD-Promoters

Die Ausbreitung der Pedikel und der proximalen Rippen korrelieren mit der Ausbreitung von Markergenen des lateralen Sklerotoms. Damit ist *Tbx18* notwendig für die Aufrechterhaltung der anterior-posterioren Kompartimentgrenze innerhalb der Somiten. Um zu untersuchen, ob *Tbx18* diesen Prozeß auch vermitteln kann, wurde anhand einer ektopischen Expression von *Tbx18* in der Maus untersucht.

Mit diesem Experiment sollte analysiert werden, ob die forcierte Expression von *Tbx18* in der posterioren Somitenhälfte einen Effekt auf die Somitogenese bzw. Wirbelsäulenentwicklung hat. Dazu wurde die *Tbx18*-cDNA unter dem Mesoderm-Enhancer/Promoter von *Delta-like-1* (*Dll1*) exprimiert. Dieser Promoter besitzt das Enhancer-Element für die mesodermale Expression mit dem Minimalpromotor von *Dll1*. Der Promoter erlaubt eine gleichförmige Expression – neben der Expression im PSM – sowohl in der anterioren als auch in der posterioren Somitenhälfte.

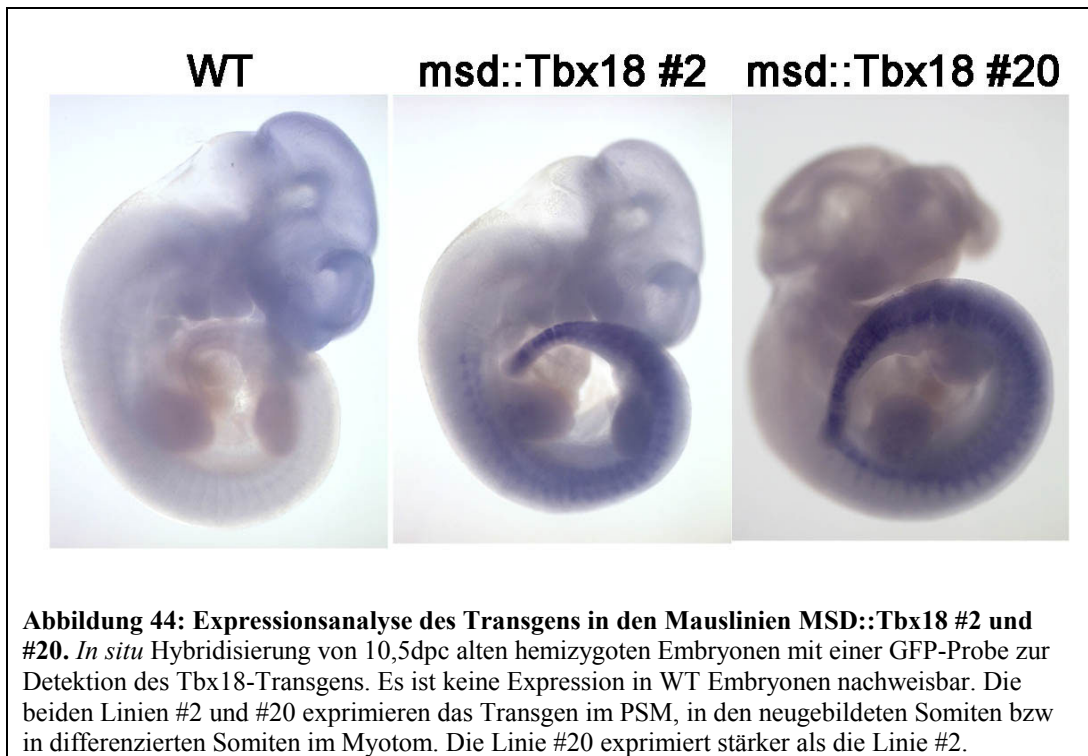
Um die Expression des Transgens von der endogenen *Tbx18*-Expression zu unterscheiden, wurde ein Fusionstranskript mit GFP (GFP-tag) in das Konstrukt eingefügt (s.a. Material und Methoden bzw. Abbildung 43).



Das linearisierte Konstrukt wurde anschließend in Pronukleus injiziert um die Mauslinie MSD::*Tbx18* zu generieren. Es konnten mehrere Gründerlinien etabliert werden, die nach dem Auskreuzen gegen NMRI-Mäuse in der F1-Generation, keinerlei äußere Veränderungen auswiesen.

Um zu untersuchen, ob die ektopische Expression von *Tbx18* einen Einfluß auf die Skelettentwicklung hat wurden Präparationen von 18,5dpc alten Embryonen durchgeführt. Nach einer Skelettanalyse von 18,5dpc alten hemizygoten Mäusen konnte zwei Linien (#2 und #20) identifiziert werden, die leichte Veränderungen im axialen Skelett aufwiesen. Beide MSD::*Tbx18*-Mauslinien wurden auf die Expression des *Tbx18*-Transgens untersucht. Dazu wurde eine GFP-*in situ* Hybridisierung von 10,5dpc alten Embryonen durchgeführt.

Die Abbildung 44 zeigt, daß das Transgen in heterozygoten Embryonen beider Maus-Linien im PSM, in neugebildeten Somiten und im Myotom differenzierter Somiten exprimiert ist. Da in transgenen Linien die Stärke des Phänotyps oft mit der Expression korreliert, wurde für die molekulare Analyse homozygote Embryonen der Linie #20 benutzt. Für die Identifizierung von homozygoten Embryonen aus *inter se* Verpaarungen heterozygoter Elterntiere wurde ein Genotypisierungsprotokoll entwickelt.

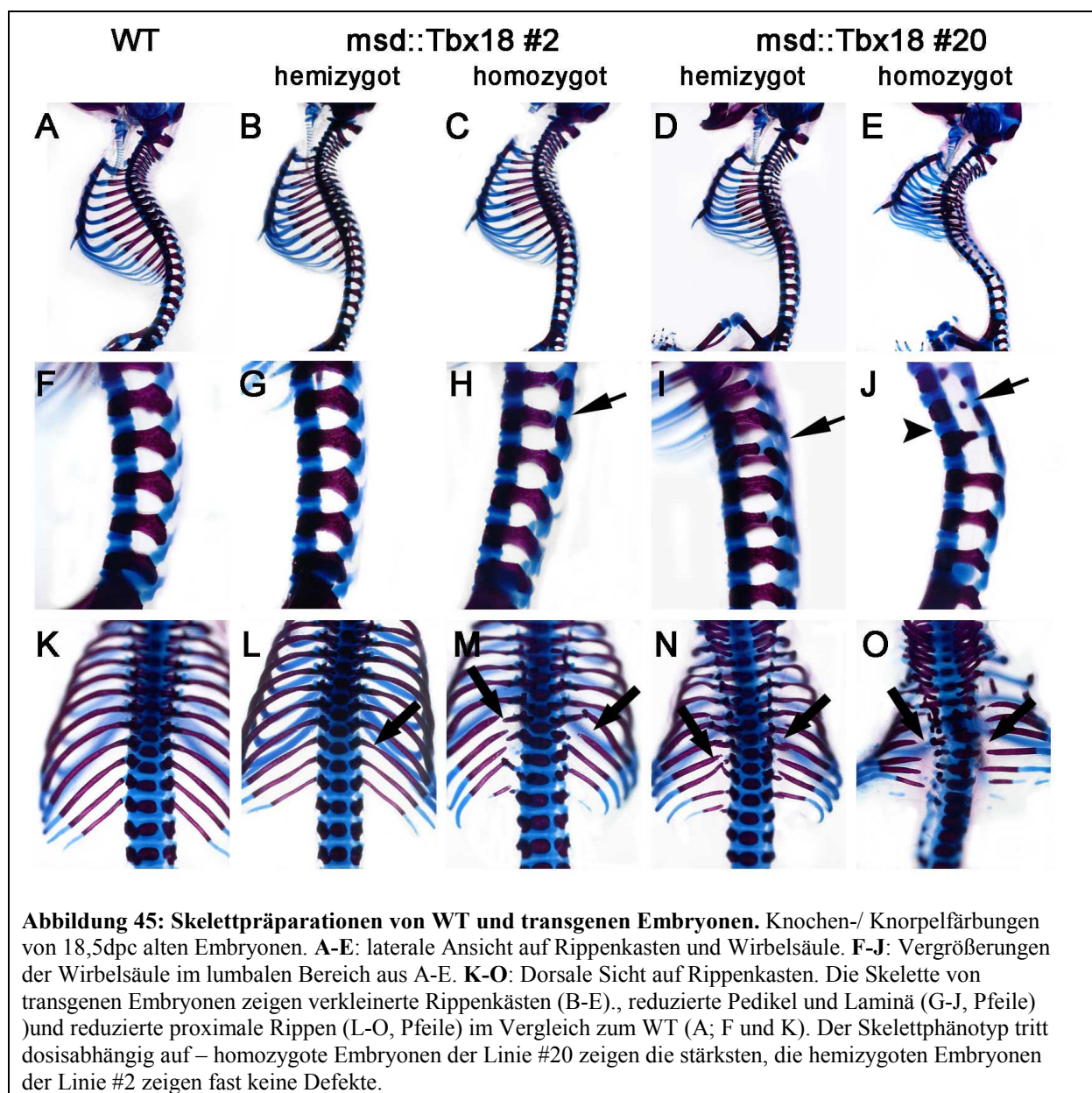


3.4.2 Skelettanalyse von transgenen Mäusen

Um die genauen Auswirkungen der forcierten *Tbx18*-Expression auf die Entwicklung des Skelettes zu untersuchen, wurde eine Skelettanalyse durchgeführt. Für die Skelettanalyse wurden heterozygote Elterntiere verpaart und anschließend 18,5dpc alte Embryonen gesammelt. Die Abbildung 45 zeigt, daß die Skelette von MSD::*Tbx18* Embryonen verschiedene Defekte aufweisen. Hemizygoten Embryonen der Linie MSD::*Tbx18* #2 zeigen die geringsten Defekte und zwar in der Art, daß die proximalen Rippen und die lateralen Elemente der Wirbel, die Pedikel, leicht reduziert sind (Abbildung 45B, G u. L). In homozygoten Embryonen sind diese Defekte stärker. Bis in den lumbalen Bereich hinunter sind die Pedikel z.T. nicht komplett verknöchert. Besonders im dorsalen Bereich sind die Pedikel nur unzureichend verknöchert (Abbildung 45C u. H, Pfeil). Der Brustkasten homozygoter Embryonen ist verkleinert und die Wirbelsäule zeigt eine leicht veränderte Krümmung (Abbildung 45C). Die proximalen Rippen sind z.T. stark reduziert bzw. gar nicht mehr vorhanden (Abbildung 45M).

Heterozygote Embryonen der Linie MSD::*Tbx18* #20 zeigen (fast) die gleichen Defekte im axialen Skelett, wie die homozygoten Embryonen der Linie #2. Die homozygoten Embryonen der Linie #20 zeigen die deutlichsten Defekte bezüglich

des axialen Skeletts. Damit korreliert die Ausprägung der Defekte mit der Dosis der Transgen-Expression. Der Brustkasten von hemizygoten und homozygoten Embryonen der Linie #20 ist stark verkleinert und die Wirbelsäule zeigt eine stark veränderte Krümmung (Abbildung 45D u. E). Als Konsequenz erscheint die Körperlänge dieser Embryonen verkürzt. Während die Pedikel hemizygoter Embryonen teilweise reduziert sind, sind in homozygoten Embryonen der Linie MSD::*Tbx18* #20 die Pedikel fast entlang der gesamten Körperachse reduziert bzw. nicht mehr vorhanden (Abbildung 45J, Pfeil). Die Zwischenwirbelscheiben sind ebenfalls im Vergleich zum WT leicht reduziert (Abbildung 45J, Pfeilkopf).



Die Defekte im axialen Skelett von MSD::Tbx18 Mäusen manifestieren sich somit hauptsächlich im lateralen Anteil der Wirbel, den Pedikeln und in den proximalen Rippen. Wirbelkörper und die distalen Rippen sind offensichtlich von der Transgen-Expression nicht betroffen. Damit fehlen in den MSD::Tbx18 Mäusen genau jene Elemente des axialen Skelettes, die in den Tbx18^{-/-} Embryonen expandiert sind. Mit den proximalen Rippen und den Pedikeln fehlen in den Tbx18::MSD Mäusen die Elemente, die sich aus dem Sklerotom der posterioren Somitenhälfte ableiten.

3.4.2 Molekulare Untersuchung von transgenen Mäusen

Da sich die Pedikel und proximalen Rippen aus der posterioren Somitenhälfte ableiten lassen, wurde mittels einer *in situ* Expressionsanalyse sowohl die dorso-ventrale Differenzierung der Somiten als auch die Etablierung der AP-Polarität untersucht. Für die dorso-ventrale Spezifikation der Somiten wurde eine Expressionsanalyse mit *Myogenin* und *Pax9* durchgeführt und für die AP-Spezifikation eine Analyse mit *Dll1* und *Ephrin B2* durchgeführt.

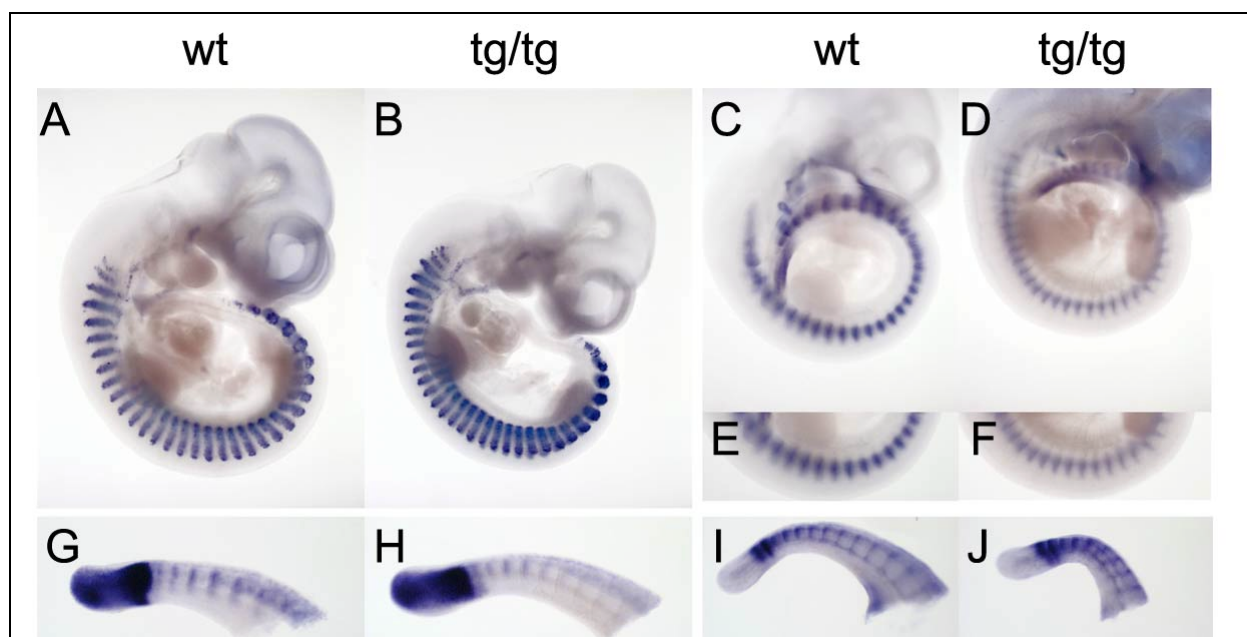


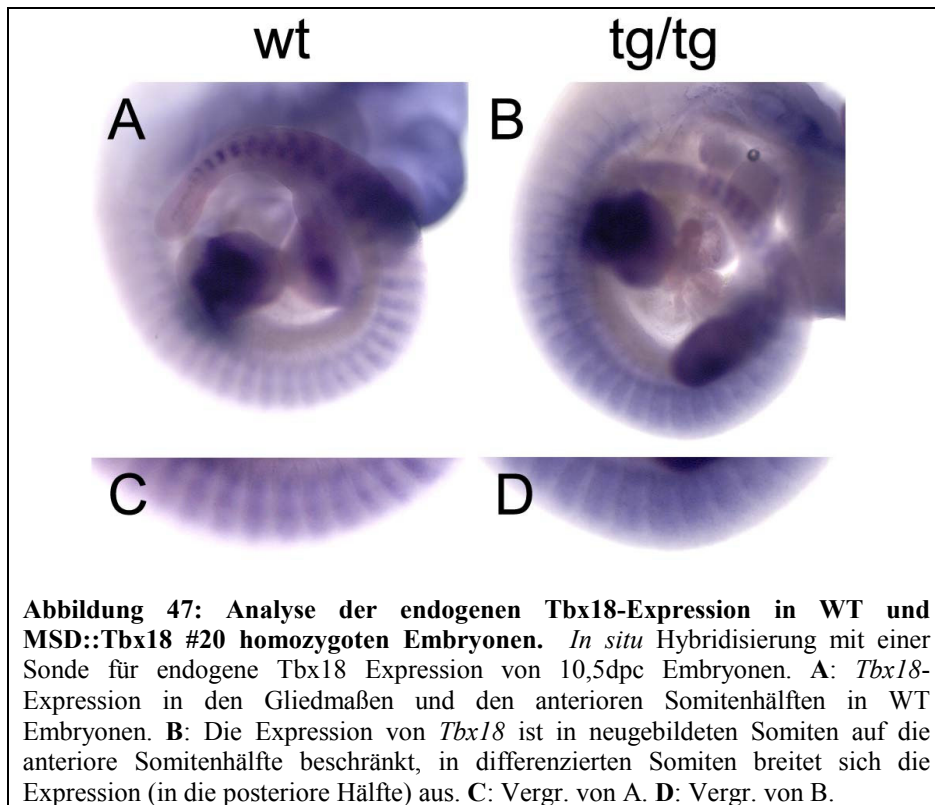
Abbildung 46: Expressionsanalyse von Differenzierungsmarkern in MSD::Tbx18. In situ Hybridisierung von 10,5dpc alten WT und MSD::Tbx18 #20 homozygoten Embryonen (tg/tg). **A:** Myogenin-Expression in wt. **B:** Unveränderte Myogenin Expression in tg/tg. **C:** Pax9-Expression in wt. **D:** Polarisierte Pax9-Expression wird in tg/tg Embryonen angelegt, jedoch in differenzierten Somiten beschränkt auf posteriore Somitenhälfte. **E:** Vergrößerung des thorakalen Bereiches von C. **F:** Vergrößerung des thorakalen Bereiches von D. **G:** Dll1-Expression in wt. **H:** Dll1-Expression in tg/tg wird in neugebildeten Somiten angelegt, jedoch dann runterreguliert. **I:** Ephrin B2-Expression in wt. **J:** Ephrin B2-Expression in tg/tg wird in neugebildeten Somiten angelegt, jedoch dann runterreguliert.

Die Expression von *Myogenin* ist unverändert in transgenen Embryonen. Das myotomale Kompartiment wird also normal in MSD::*Tbx18* Embryonen angelegt. Die Expression von *Pax9* ist in neugebildeten Somiten transgener Embryonen unverändert (Abbildung 46C u. D), jedoch zeigt die Expression in differenzierenden Somiten von MSD::*Tbx18* Embryonen eine leicht erhöhte Polarisierung. (Abbildung 46E u. F). Ein Einfluß der Transgen-Expression auf die dorso-ventrale Spezifikation kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden

Die Expression sowohl von *Dll1*, als auch die Expression von *Ephrin B2* ist in neugebildeten Somiten transgener Embryonen unverändert. In differenzierenden Somiten (>3) erscheinen die Expressionsdomänen in den posterioren Somitenhälften jedoch verkleinert. Damit scheint die ektopische Expression von *Tbx18* in der posterioren Somitenhälfte keinen unmittelbaren Effekt auf die Etablierung der AP-Polarität der Somiten zu haben. In differenzierenden Somiten werden die Expressionsdomänen von *Dll1* und *Ephrin B2* noch weiter auf den hinteren Anteil der posterioren Somitenhälfte reduziert.

Mit Hilfe einer *Tbx18-in situ* Probe, die die endogene *Tbx18*-Expression detektiert wurde untersucht, ob die ektopische *Tbx18*-Expression Einfluß auf die endogene *Tbx18*-Expression hat. Eine Ausbreitung der endogenen *Tbx18*-Expression in MSD::*Tbx18* Mäusen könnte auf einen autoregulatorischen, transkriptionellen Regulationsmechanismus hindeuten.

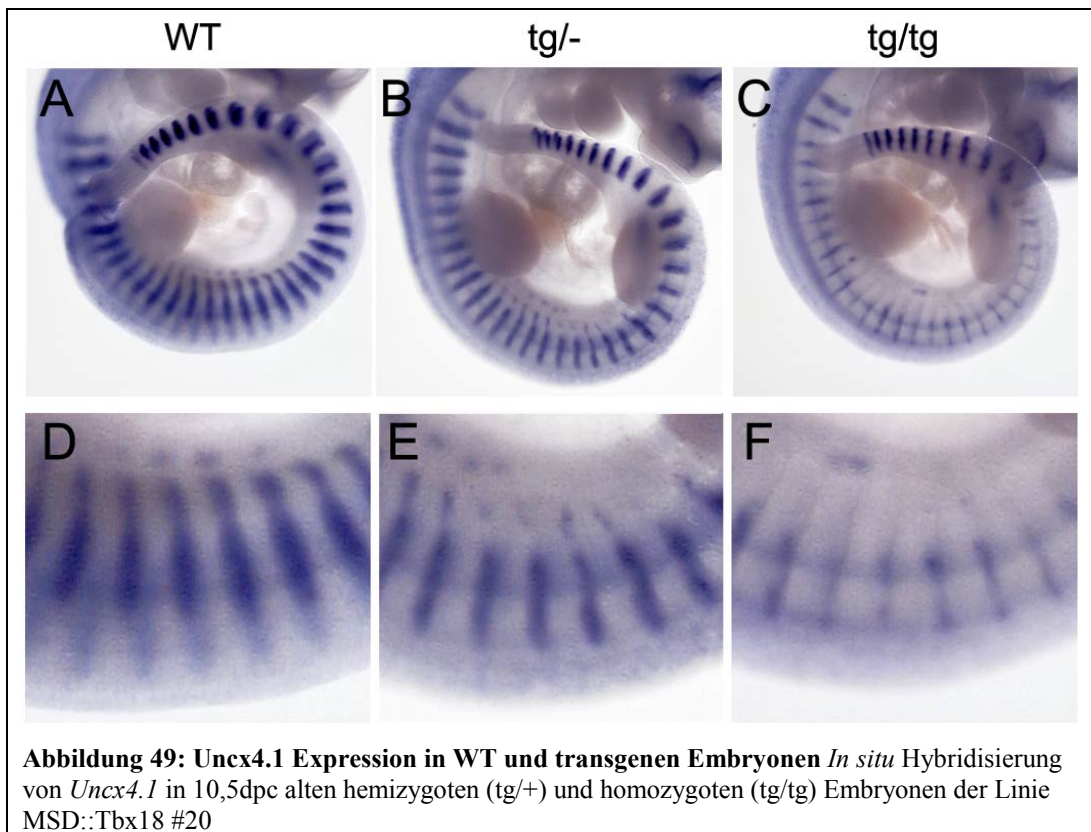
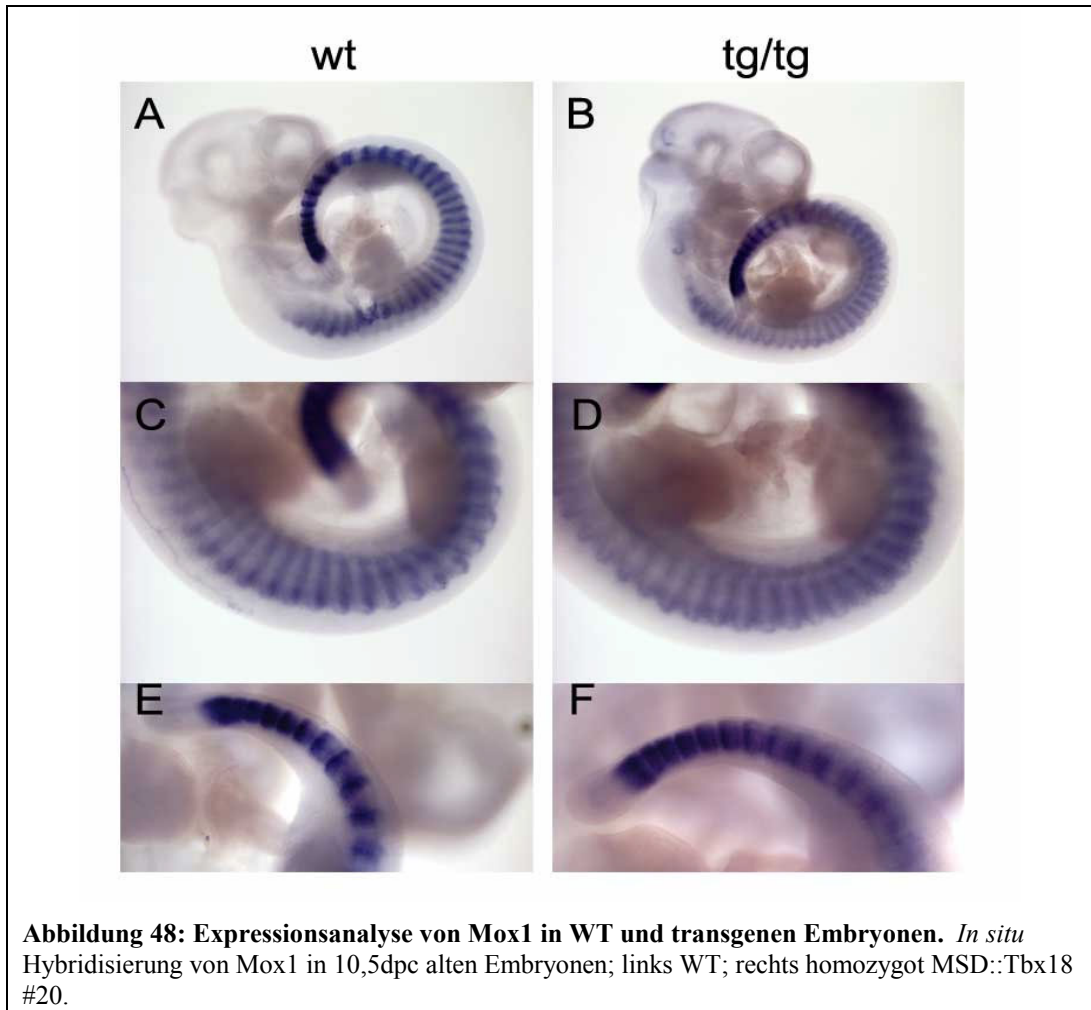
Die Abbildung 47 zeigt, daß die endogene *Tbx18*-Expression in neugebildeten Somiten auf die anteriore Somitenhälfte beschränkt ist. In Somiten im thorakalen Bereich breitet sich die *Tbx18*-Expressionsdomäne in die posteriore Hälfte aus. Es konnte nicht geklärt werden, ob sich die Expressionsdomäne bis in die posteriore Somitenhälfte ausbreitet, oder ob es zu einer Ausbreitung der anterioren Somitenhälfte - auf Kosten der posterioren Hälfte - kommt.



Die Reduktion der und proximalen Rippen in MSD::Tbx18 Mäusen beruht somit nicht auf einer fehlerhaften AP- bzw. DV-Spezifizierung. Da jedoch Knochenelemente in diesen Mäusen reduziert sind, die sich aus dem lateralen Sklerotom ableiten lassen, wurde eine Markergenanalyse von Markern des lateralen Sklerotoms durchgeführt.

Die Expression von *Mox1* ist in homozygoten MSD::Tbx18 Embryonen signifikant verändert. Zwar wird die polarisierte Expression von *Mox1* in neugebildeten Somiten angelegt, jedoch wird diese in differenzierenden Somiten durch eine schwächere und annähernd gleichförmige, homogene Expression ersetzt (Abbildung 48).

Die Expression von *Uncx4.1* wurde in hemizygoten und homozygoten Embryonen der Linie MSD::Tbx18 #20 untersucht. In hemizygoten und homozygoten Embryonen ist die *Uncx4.1* Expression in neugebildeten Somiten (<6) auf die gesamte posteriore Somitenhälfte ausgebreitet. In älteren, differenzierenden Somiten (>6) werden die *Uncx4.1*-Expressionsdomänen immer weiter auf das hintere Ende der posterioren Somitenhälften reduziert. (Abbildung 49E u. F). Im zervikalen und thorakalen Bereich – besonders von homozygoten Embryonen – ist die *Uncx4.1*-Expression auf einen schmalen Streifen in der posterioren Somitenhälfte reduziert. Die ektopische Expression von Tbx18 in der posterioren Somitenhälfte führt somit zu einer fortschreitenden Reduzierung der *Uncx4.1*-Expressionsdomäne. Dies erklärt, warum Pedikel und proximale Rippen in den MSD::Tbx18 Mäusen reduziert sind.



3.4.3 Untersuchung des peripheren Nervensystems von transgenen Mäusen

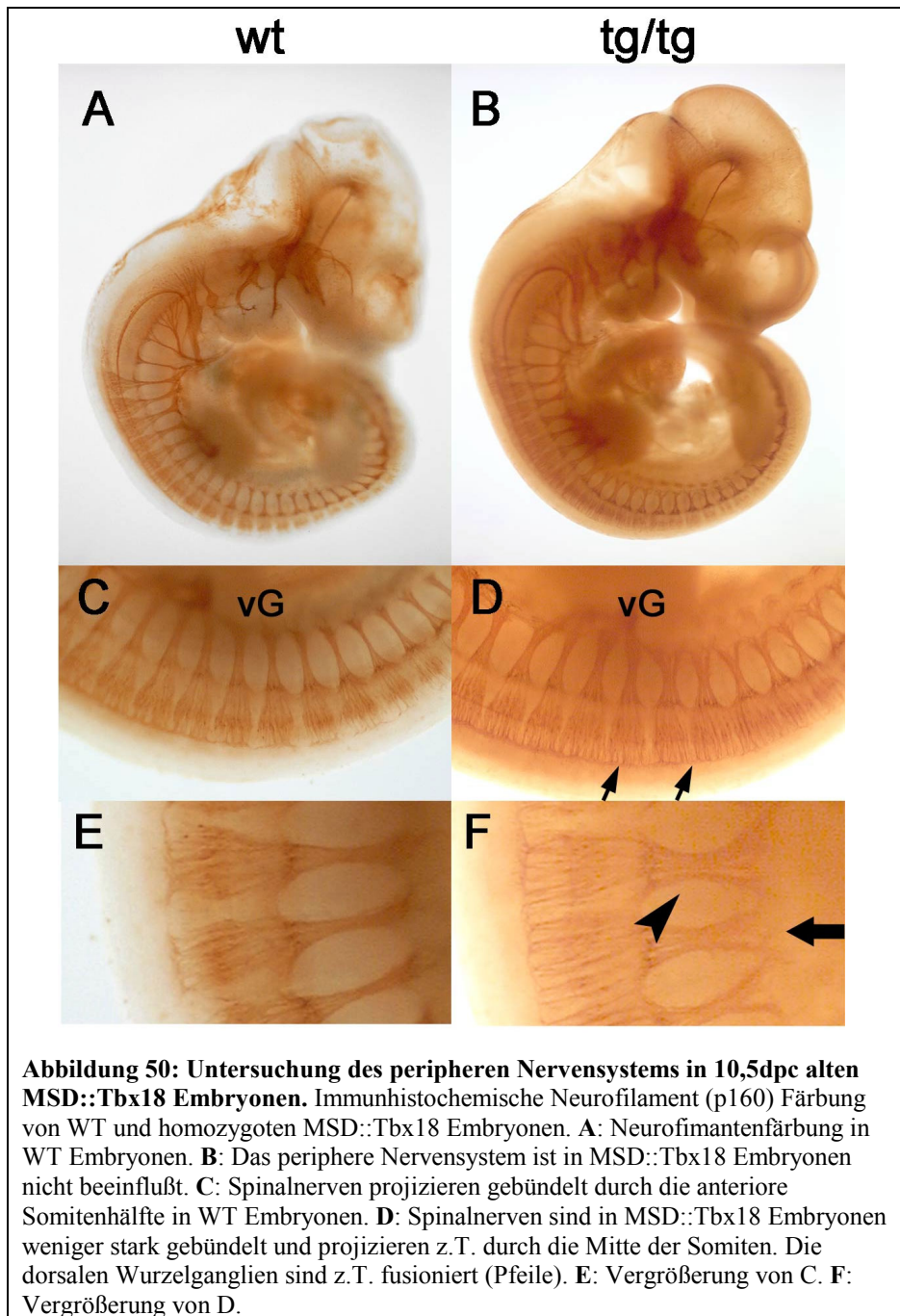
Da die Spinalnerven und Motorneurone exklusiv durch die anteriore Somitenhälfte migrieren, ist die Anlage des PNS ein indirekter Nachweis für die Etablierung der AP-Polarität von Somiten geeignet. In MSD::Tbx18 Embryonen wurde durch eine immunhistochemische Analyse die Entwicklung des peripheren Nervensystems untersucht.

Die Abbildung 50 zeigt, daß die dorsalen Wurzelganglien von 10,5dpc alten WT Embryonen segmental angeordnet sind und die Spinalnerven durch die anteriore Somitenhälfte projizieren. In homozygoten MSD::Tbx18 Embryonen projizieren die Spinalnerven nicht mehr durch die anteriore Somitenhälfte, sondern migrieren z.T. durch die Mitte der Somiten (Abbildung 50F, Pfeilkopf). Die Spinalnerven sind in transgenen Embryonen auch deutlich weniger stark gebündelt und breiten sich im ventralen Bereich der Somiten aus (Abbildung 50F, Pfeil). Im Extremfall ist diese Ausbreitung so stark, daß einzelne Axone sogar lateral projizieren und sich somit nicht mehr entlang der dorso-ventralen Achse ausbreiten.

Da *Tbx18* in den transgenen Mäusen mit Hilfe des MSD-Promoters exprimiert wird und somit nur in den Somiten ektopisch exprimiert wird, ist das periphere Nervensystem kranialen Bereich in MSD::Tbx18 Embryonen unverändert gegenüber WT Embryonen (Abbildung 50A u. B).

Die ektopische Expression von *Tbx18* in den gesamten Somiten von MSD::Tbx18 Mäusen hat zur Folge, daß sich die Elemente reduziert sind, die aus dem Sklerotom der posterioren Somitenhälfte hervorgeht. Molekular zeigt sich ein reziprokes Verhalten von Markergenen zwischen *Tbx18* mutanten und MSD::Tbx18 Mäusen.

Daraus läßt sich schließen, daß *Tbx18* nicht nur notwendig für die AP-Polarität ist, sondern auch diesen Prozeß selber vermitteln kann.



4. Diskussion

4.1 Tbx18 kodiert für ein DNA-bindendes Protein mit einer spezifischen DNA-Bindesequenz

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Tbx18-Protein um ein nukleäres Protein handelt. Ferner konnte gezeigt werden, daß Tbx18 über eine spezifische DNA-Bindungsstelle verfügt. Da Tbx18 zu der Familie der T-box Faktoren gehört und alle bisher untersuchten T-box Faktoren als Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden, ist anzunehmen, daß Tbx18 ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert.

Für einen Transkriptionsfaktor ergeben sich grundlegende Fragestellungen, wie dieser reguliert wird bzw. welche Zielgene von dem Transkriptionsfaktor reguliert werden. Der Schwerpunkt der Analyse wurde auf die DNA-Bindungseigenschaften gelegt, um ein Verständnis über mögliche Zielgene und deren Regulation seitens Tbx18 zu bekommen. Die Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von Tbx18 hat gezeigt, daß die sogenannte T-Halbseite (TTTCACACCT) das notwendige Motiv für die DNA-Bindung darstellt, jedoch nicht hinreichend für die DNA-Bindung des Tbx18-Proteins ist.

Vergleicht man die DNA-Bindungsstellen von verschiedenen T-box Proteinen, so konnte für alle bis jetzt untersuchten T-Box Faktoren gezeigt werden, daß diese an T-Halbseite bzw. an Variationen binden können (Kispert et al., 1993; Sinha et al., 2000; Ghosh et al., 2001; Lingbeek et al., 2002). Dabei können einige T-box Faktoren wie Tbx2, VegT und Eomesodermin unter *in vitro* Bedingungen direkt an T-Halbseiten, andere T-box Faktoren wie T und Tbx1 an paarige, meist palindromisch angeordnete T-Halbseiten binden (Sinha et al., 2000).

Studien, in denen die DNA-Bindungseigenschaften des T-Proteins untersucht wurden, haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. Casey et al. (1999) benutzten für die Protein/DNA-Interaktionsstudien des *Xenopus* T-Homologs ein bakteriell exprimiertes Protein, daß nur die T-box von Xbra beinhaltet. Mit diesem Konstrukt konnte eine DNA-Bindung an die T-Halbseite nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Interaktionsstudien, die mit dem Gesamt-Protein durchgeführt wurden, keine Bindung an die T-Halbseite nachgewiesen werden (Kispert A et al., 1993; Papapetrou et al., 1997). Für das T-Protein kann somit

aufgrund von biochemischen und kristallographischen Analysen angenommen werden, daß es als Homodimer zumindest unter *in vitro* Bedingungen an die palindromische T-Bindungsstelle bindet. (Müller et al. 1997).

Aufgrund der vergleichenden Analyse von Tbx18 mit dem T-Protein kann für das Tbx18-Protein angenommen werden, daß es ebenfalls als Homodimer an die palindromische P18-Bindungsstelle binden kann. Da das Migrationsverhalten der T/DNA-Komplexe vergleichbar der Tbx18/DNA-Komplexe ist, deutet dies auf eine Dimerisierung des Tbx18-Proteins auf der Tbx18-Bindungsstelle hin.

An die T-Halbseite kann das Tbx18-Protein nur in Gegenwart eines geeigneten Antikörpers binden. Der Antikörper könnte mit seinen zwei Antigen-bindenden Regionen eine DNA-unabhängige Dimerisierung induzieren und somit eine Konformationsänderung induzieren, die es dem Tbx18-Protein erlaubt, an die T-Halbseite zu binden.

Für das T-Protein konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, daß es ebenfalls an die Tbx18-Bindungsstelle (P18) mit hoher Affinität binden kann. Das Tbx18-Protein besitzt somit im Bezug auf die DNA-Bindung eine Präferenz gegenüber der Orientierung der Halbseiten besitzt, wohingegen das T-Protein bezüglich der Orientierung dieser Halbseiten tolerant für die DNA-Bindung ist. Damit scheint die Sequenzspezifität von T-box Faktoren durch die T-box Domäne gewährleistet zu werden. Die Komplexbildung von T-box Faktoren an paarige T-Halbseiten - palindromischer oder repetitiver Natur - scheint jedoch von weiteren Domänen außerhalb der T-box mitbestimmt zu werden. Betrachtet man die unterschiedliche Größe der C-Termini von T-box Faktoren, könnte diese strukturelle oder kinetische Unterschiede ausmachen, die die Erkennung von T-Halbseiten für verschiedener T-box Faktoren ausmachen.

Die Tatsache, daß die Bindungsstellen-Selektion von Tbx18 zu einer Anreicherung von Fragmenten mit jeweils einer stark und einer weniger stark konservierten T-Halbseite erbracht hat, läßt auf einen kooperativen Bindungscharakter schließen. Bei diesem Mechanismus wird zuerst eine hoch-affine Bindungsstelle durch einen T-box Faktor besetzt werden, dies erlaubt dann die Bindung eines weiteren Moleküls auch an eine niedrig-affine Bindungsstelle. Da es kaum Bindungsstellen im Genom der Maus gibt, die genau der palindromischen Bindungsstelle von Tbx18 entsprechen, ist dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich.

Zur weiteren Stabilisierung ist die Bindung eines Faktors notwendig, der aber dann aufgrund der kooperativen Bindung auch an weniger affine Bindungsstellen binden kann.

Kusch et al. (2002) konnten zeigen, daß das Drosophila-Homolog des T-Proteins den orthopedia-Promoter reguliert. Dieser Promoter besitzt mehrere T-Bindungsstellen, von denen einige synergistische Aktivierungen, andere additive Aktivierungen durch das T-Protein aufweisen.

Bis heute konnte für keinen T-box Faktor ein Zielgen identifiziert werden, das eine perfekte (oder mehrere) palindromische T-Bindungsstellen oder invertierte T-Bindungsstellen bzw. Tbx18-Bindungsstellen als cis-regulatorische Sequenzen aufweist. Es konnten wohl aber T-Halbstellen mit verschiedenen Orientierungen und Abständen in Promotoren von T-box Faktor-Zielgenen identifiziert werden (Casey et al., 1998). Für das T-Protein konnte mit Hilfe von chimären Promotoren in Zellkultur gezeigt werden, daß die Abstände von T-Halbseiten einen Einfluß auf die expressionsmodulierenden Eigenschaften des T-Proteins haben (Kispert et al., 1995). In *Xenopus* wird das eFGF-Gen durch Xbra transkriptionell reguliert. Die funktionellen Bindungsstellen für das Xbra-Protein sind zwei T-Halbseiten im Promoter, die rund 1kb voneinander getrennt sind. Dies schließt eine direkte Dimerisierung beider Proteine aus. Es könnte jedoch eine Dimerisierung durch eine Schleifenbildung der DNA induziert werden, durch die die Bindung von Xbra- dann garantiert werden könnte. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Kofaktoren, die Bindung von T-box Faktoren beeinflussen. Mittlerweile konnten für verschiedene T-box Faktoren Kofaktoren identifiziert werden, die die DNA-Bindung bzw. die transaktivierenden Eigenschaften beeinflussen (Habets et al. 2002; Stennard et al. 2003).

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß das Tbx18- und das T-Protein *in vitro* keine Heterodimere bilden. Dies ist deshalb bemerkenswert, da die für die Dimerisierung des Xbra-Proteins wichtigen Aminosäuren im Tbx18-Protein stark konserviert sind. Diese Kontaktflächen könnten jedoch bei einer Bindung an die Tbx18-Bindungsstelle (invertierte T-Bindungsstelle) kaum zur Stabilität des Komplexes beitragen. Folglich wird die Dimerisierung von T-box Faktoren von weiteren Faktoren abhängen - als einzig von der T-box Domäne.

Möglich ist, daß T-box Faktoren auf einigen Bindungsstellen selber Homodimere bilden können, auf anderen Bindungsstellen jedoch nur zusammen mit weiteren

Kofaktoren. Die Rekrutierung von unterschiedlichen Kofaktoren könnte auch erklären, weshalb Tbx18 über unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Geweben bzw. Organen besitzt. Insbesondere die antiapoptotische Funktion von Tbx18 im lateralen Sklerotom könnte durch einen Kofaktor, der im Sklerotom exprimiert ist und mit Tbx18 interagiert, erklärt werden.

Die hier vorgelegte Studie zeigt, daß Tbx18 wie andere T-box Faktoren auch an T-Halbbindungsstellen binden können. Tbx18 benötigt zur DNA-Bindung eine palindromische Bindungsstelle mit zwei Halbseiten, die eine invertierte Sequenz im Vergleich zur T-Bindungsstelle aufweist. Für alle bisher untersuchten T-box Faktoren konnte gezeigt werden, daß diese an T-Bindungsstellen bzw. Variationen davon binden können. Die Suche nach Zielgenen von T-box Faktoren erweist sich deshalb als schwierig, weil aus dem bloßen Vorhandensein von T-Halbseiten in einem Promoter nicht darauf geschlossen werden kann, welcher T-box Faktor an diesen Promoter binden kann. Jedoch können Promotoren als mögliche Kandidaten für T-box Faktoren identifiziert werden, wenn sich T-Halbseiten in der Promoterregion befinden. Ob ein Gen jedoch ein direktes Zielgen für einen T-box Faktor darstellt, muß deshalb für jeden Faktor individuell untersucht werden.

4.2 Die Regulation von Tbx18 in der Somitogenese

Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Reporter-gen-Mauslinien und einer *in situ* Genexpressionsanalyse konnte ein Mechanismus für die Regulation der somitischen Tbx18 Expression aufgezeigt werden.

Die beiden für die Generierung der Mauslinien Tbx18.LacZ und Tbx18.GFP verwendeten Targeting-Konstrukte weisen neben den unterschiedlichen Reporter-genen einen weiteren Sequenzunterschied im 5'-UTR Bereich auf. Durch die Insertion einer IRES-LacZ-Kassette in die 5'-UTR fehlen dem Tbx18.LacZ-Konstrukt gegenüber dem Tbx18.GFP-Konstrukt 150bp. Der Verlust dieser 150bp im LacZ-Konstrukt führt zu einem Verlust der frühen somitischen Expression in Tbx18.LacZ heterozygoten Embryonen. Da alle weiteren LacZ-Expressionsdomänen vorhanden sind, kann darauf geschlossen werden, daß sich innerhalb dieser 150bp ein notwendiges Enhancerelement für die frühe somitische Expression von Tbx18 befindet. Dies wird dadurch unterstützt, weil in der Tbx18.GFP Linie, in der dieser

Teil nicht deletiert ist, die somitische Expression vergleichbar der endogenen *Tbx18*-Expression angelegt wird.

Die LacZ-Expressionanalyse in heterozygoten Embryonen zeigt auch, daß *Tbx18* im lateralen Sklerotom einer weiteren evtl. Sklerotom-spezifischen Regulation unterliegt. Mögliche Prozesse wären induktive Vorgänge, bei denen sezernierte Faktoren wie Shh aus dem Notochord, die Expression *Tbx18* im Sklerotom induzieren könnten. Da keine weiteren Experimente zu dieser *Tbx18*-Expressionsdomäne gemacht wurden, bleibt eine Diskussion darüber nur spekulativ.

Ein genaueres Bild konnte von der transkriptionellen Regulation von *Tbx18* in neugebildeten Somiten gewonnen werden. Die *in situ* Markergen-Analyse hat gezeigt, daß *Tbx18* durch den Notch/Delta-Signalweg reguliert wird, selber diesen aber nicht kontrolliert. Dies ist auch deshalb bemerkenswert im Hinblick auf die Wirkung von T-box Faktoren, da sich im *Dll1*-Promoter funktionelle T-Bindungsstellen befinden, die ja auch potentielle Bindungsstellen für *Tbx18* darstellen könnten (Hofmann et al., 2004). Die Expressionsanalyse zeigt deutlich, daß *Dll1* selber nicht von direkt *Tbx18* reguliert wird.

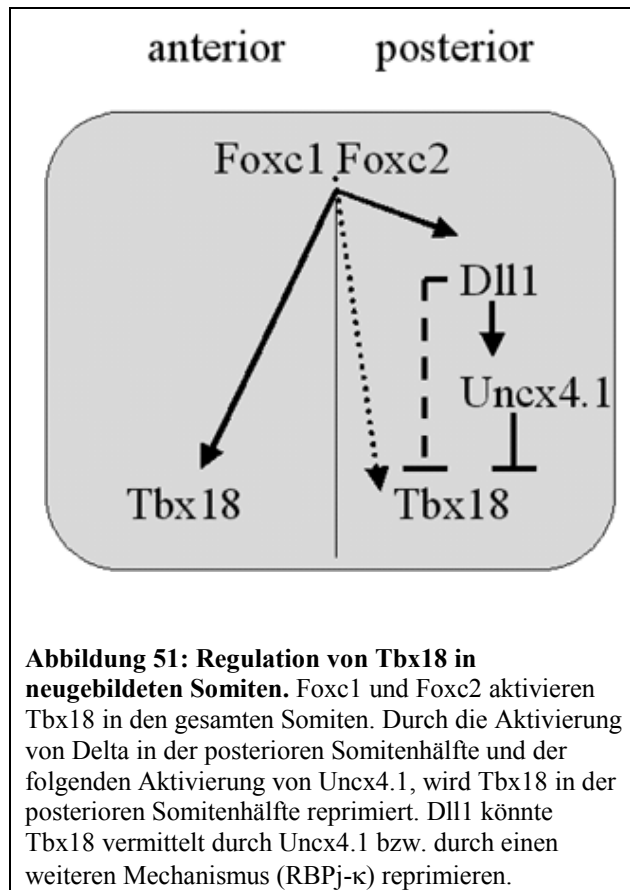
Der Notch/Delta-Signalweg besitzt eine Repressor Funktion auf die *Tbx18*-Expression in der posterioren Somitenhälfte von neugebildeten Somiten. Da es sich bei Notch und Delta um transmembran Rezeptoren bzw. Liganden handelt, muß die transkriptionelle Regulation von weiteren Faktoren übernommen werden. RBPj- κ ist ein transkriptioneller Repressor und wird durch den Notch-Signalweg kontrolliert (Dou et al. 1994). Die DNA Bindungsstelle von RBPj-kappa konnte von Tun et al. (1994) charakterisiert werden. Da sich mehrere potentielle Bindungsstellen für RBPj-kappa im *Tbx18*-Lokus befinden, ist eine Regulation seitens des Notch-Signalweges über RBPj-kappa ein möglicher Mechanismus für die transkriptionelle Repression von *Tbx18* in der posterioren Somitenhälfte.

Ein weiterer Faktor für die transkriptionelle Repression könnte *Uncx4.1* darstellen, da sich die *Tbx18*-Expression ektopisch in die posteriore Somitenhälfte von *Uncx4.1*-/- Embryonen ausbreitet. Die *Uncx4.1* Expression wird selber durch *Dll1* in der posterioren Somitenhälfte aktiviert (A. Kispert pers. Komm.). Damit könnte *Uncx4.1* auch der Mediator des Notch/Delta-Signalweges in der posterioren Somitenhälfte sein. Es liegen keine Informationen über die molekularen Eigenschaften von *Uncx4.1* vor, ob es sich dabei um einen transkriptionellen Repressor oder einen Aktivator

handelt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen, ob *Tbx18* ein direktes Zielgen von *Uncx4.1* darstellt.

In *Dll1*^{-/-} und *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen breitet sich die *Tbx18*-Expression ektopisch in die posteriore Somitenhälfte aus. Diese Beobachtung läßt sich z.T. dadurch erklären, daß in diesen mutanten Embryonen der Repressor von *Tbx18* in der posterioren Somitenhälfte fehlt. Da der Verlust eines Repressors nicht unmittelbar zu einer Aktivierung der *Tbx18*-Expression führen muß, ist es möglich, daß es einen „somitenweiten“ transkriptionellen Aktivator für *Tbx18* gibt. Nach diesem Modell würde zunächst die Expression von *Tbx18* im gesamten Somiten angelegt werden, jedoch in der posterioren Somitenhälfte durch den Notch/Delta-Signalweg reprimiert werden. Das Resultat wäre ein polarisiertes Expressionsmuster von *Tbx18* in den Somiten. Mögliche Kandidaten für diese „somitenweiten“ Faktoren sind die beiden Mitglieder der Forkhead-Transkriptionsfaktor Familie, *Foxc1* und *Foxc2*. Beide Gene werden im anterioren PSM und in neugebildeten Somiten exprimiert und besitzen somit ein überlappendes Expressionsmuster mit *Tbx18*. Eine Funktion von *Foxc1* und *Foxc2* in der Somitogenese konnte besonders deutlich durch einen Doppel-Knockout beider Gene nachgewiesen werden (Kume et al., 2002). Doppel homozygote Embryonen zeigen einen kompletten Verlust der Segmentierung des paraxialen Mesoderm. Ursächlich dafür ist eine veränderte Expression von Komponenten des Notch/Delta-Signalweges. In doppel-homozygoten Embryonen wird jedoch auch die Expression von *Uncx4.1* und von *Tbx18* nicht angelegt. Somit scheinen beide Faktoren von *Foxc1* und *Foxc2* abhängig zu sein. Ob *Foxc*-Faktoren dies jedoch direkt bewirken oder dies über weitere Faktoren vermitteln, bleibt zu untersuchen. Es muß in Betracht gezogen werden, daß *Foxc1* und *Foxc2* notwendig für die Spezifizierung der paraxialen Mesoderms notwendig sind und somit über eine sehr frühe Funktion in der Somitogenese besitzen. Beide Faktoren sind aufgrund der z.Zt. vorliegenden Daten geeignete Kandidaten, um transkriptionelle Aktivatoren für *Tbx18* zu sein. In den ersten 150bp der 5'-UTR von *Tbx18* befinden sich potentielle Forkhead-DNA-Bindungsstellen.

Dies könnte einen Mechanismus darstellen, indem *Foxc*-Faktoren an den 150bp Enhancer binden und die somitische Expression von *Tbx18* ermöglichen. Ein mögliches Modell zur somitischen *Tbx18*-Expression zeigt die Abbildung 51.

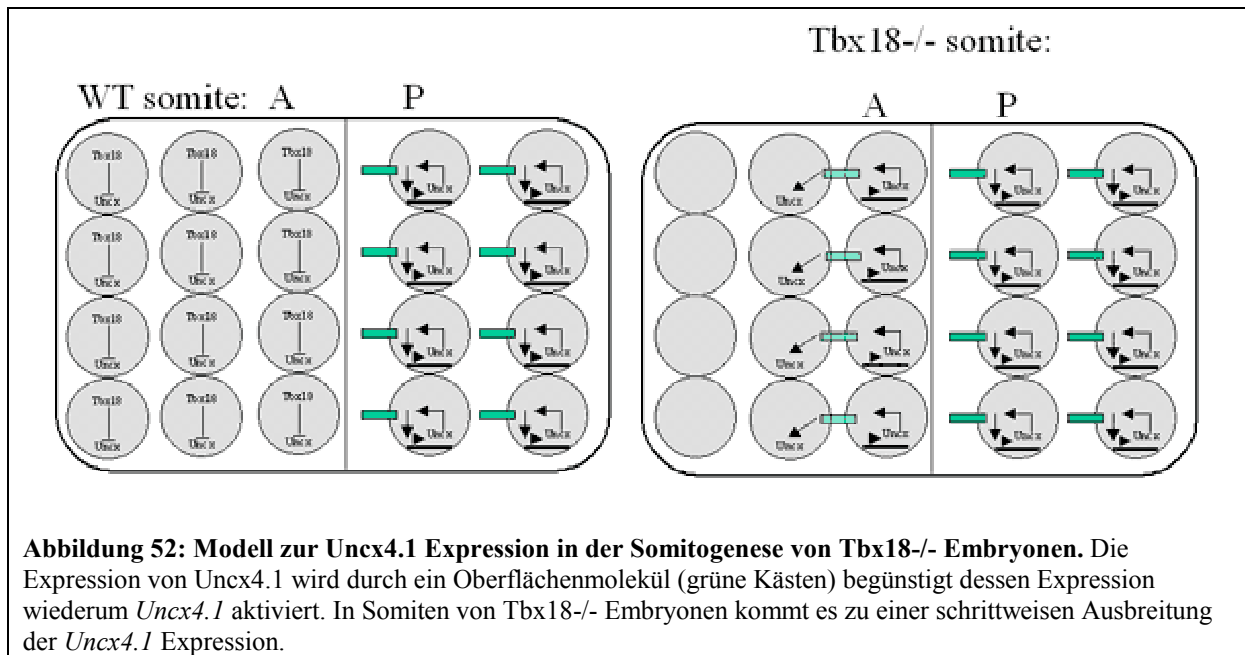


In 10,5dpc alten *Tbx18*^{-/-} Embryonen wird die somitische *Tbx18* Expression in den anterioren Somitenhälften von neugebildeten Somitenhälften angelegt. Das deutet darauf hin, daß die Initiation der *Tbx18*-Expression nicht von *Tbx18* selber abhängt. Jedoch wird die streifenförmige *Tbx18*-Expression innerhalb von 5-6 Somiten zuerst immer schmaler, um dann gänzlich zu verschwinden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß *Tbx18* notwendig für die Aufrechterhaltung seiner eigenen Expression in den Somiten ist.

Ein anderes Modell würde *Uncx4.1* als Repressor favorisieren, der sich aufgrund des Verlustes von *Tbx18* in den homozygoten Embryonen in die anteriore Somitenhälfte ausbreitet und die Expression von dem *Tbx18*-Lokus (LacZ oder GFP) unterbindet. Für dieses Modell spricht, daß die *Uncx4.1* Expression innerhalb der ersten 5-6 Somiten in *Tbx18*^{-/-} Embryonen normal angelegt wird, diese sich dann jedoch in die anteriore Somitenhälfte ausbreitet. In dem gleichen Maße, wie sich die *Uncx4.1* Expression nach anterior ausbreitet, reduziert sich dann die GFP-Expression in den anterioren Somitenhälften von *Tbx18*^{-/-} Embryonen. Die ektopische Ausbreitung der *Tbx18*-Expression in die posteriore Somitenhälfte in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen kann durch die Wirkung von *Uncx4.1* als Repressor für *Tbx18* beschrieben werden.

Umgekehrt ist die schrittweise Reduktion der GFP-Expression zusammen mit der Ausbreitung der *Uncx4.1*-Expression mit einem klassischen Verständnis eines transkriptionellen Repressors nur schwer zu vereinbaren. Der Verlust von *Tbx18* in den *Tbx18*^{-/-} Embryonen sollte zu einer gleichmäßigen Aktivierung von *Uncx4.1* führen, die zwar zeitlich verzögert sein sollte, jedoch nicht graduell.

Ein mögliches Modell könnte sein: *Uncx4.1* könnte in der posterioren Somitenhälfte die Expression eines sekundären Faktors wie z.B. eines Oberflächenmoleküls oder sezernierten Faktors kontrolliert, dessen Vorhandensein sich wiederum positiv auf die *Uncx4.1* Expression auswirkt. Zwischen beiden Faktoren besteht ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Im WT ist es die Funktion von *Tbx18*, die Expression von *Uncx4.1* und damit des sekundären Faktors zu verhindern. Dadurch könnten auch unterschiedliche adhäsive und repulsive Eigenschaften beider Somitenhälften spezifiziert werden – ein Zusammenhang, der im Rahmen der Funktion von *Tbx18* weiter diskutiert wird. In *Tbx18*^{-/-} Embryonen wird eine Reprimierung von *Uncx4.1* durch *Tbx18* in der anterioren Somitenhälfte nicht mehr gewährleistet. *Uncx4.1* könnte in dieser anterioren Somitenhälfte über keine eigenen transkriptionellen Aktivator besitzen und somit nicht ektopisch aktiviert werden. Die Zellen am posterioren Ende der anterioren Somitenhälfte könnten jedoch den sekundären Faktor in Form eines Oberflächenmoleküls oder sezernierten Faktors wahrnehmen. Als Konsequenz könnte dann in diesen Zellen die *Uncx4.1*-Expression aktiviert und damit auch die Expression dieses sekundären Faktors in einem dünnen Streifen in den posterioren Zellen der anterioren Somitenhälfte induziert werden. Dieses hätte einen „Schneeballeffekt“ zur Folge (siehe Abbildung 52), bei der sich diese Induktion von Oberflächenmolekül und *Uncx4.1* Expression schrittweise fortsetzt. Bis jetzt konnte jedoch kein weiteres Molekül mit solchen Eigenschaften beschrieben werden. Der Vorteil dieses Modell wäre, daß es ohne einen sekundären Gradienten innerhalb der anterioren Somitenhälfte auskommt.



Ein Modell, bei dem ein molekularer Gradient – einem Morphogen gleich - eine schrittweise Ausbreitung von *Uncx4.1* in die anteriore Somitenhälfte zur Folge hätte, wäre ebenfalls ein plausibles Modell. Dieses Modell muß jedoch die Etablierung eines solchen Gradienten erklären. Ein solches Modell würde jedoch noch mehr Komplexität erfordern und es liegen z.Z. keine plausiblen Daten dafür vor.

4.3 Die Funktion von Tbx18 in der Somitogenese

Die Untersuchung des Skelettphänotyps von Tbx18^{-/-} Embryonen hat gezeigt, daß *Tbx18* notwendig für die Entwicklung des axialen Skelettes ist. Der Skelettphänotyp läßt sich auf einen Defekt in der Somitogenese zurückführen. Die Expansionen der Pedikel und der proximalen Rippen in Tbx18^{-/-} Embryonen entlang der Wirbelsäule korrelieren mit der Expansion von Markergenen des lateralen Sklerotoms in die anteriore Somitenhälfte. Dadurch kann der Phänotyp nicht nur als Konsequenz des Verlustes von Tbx18 betrachtet werden, sondern als Gewinn einer Funktion von *Uncx4.1*. Da *Uncx4.1* für die Entwicklung der Pedikel und der proximalen Rippen notwendig ist (Leitges et al. 2000; Mansouri et al 2000), sind die Expansionen dieser Skelettelemente auf die *Uncx4.1* Ausbreitung in den Somiten zu interpretieren.

Die Markergenanalyse zeigt klar, daß der Notch/Delta-Signalweg in den neugebildeten Somiten von Tbx18^{-/-} Embryonen unverändert ist und das die anteriore-posteriore Polarität in den neugebildeten Somiten etabliert wird. Diese AP-Polarität bleibt jedoch im Falle der Tbx18^{-/-} Embryonen nicht erhalten, sondern bricht

– verdeutlicht durch die Expansion der Markergene des lateralen Sklerotoms - zusammen. Somit ist *Tbx18* für die Identität des anterioren Kompartimentes und damit auch für die Aufrechterhaltung der AP-Polarität innerhalb der Somiten notwendig. Betrachtet man *Tbx18* und *Uncx4.1*, sowohl deren komplementäre Expressionsmuster als auch ihr gegenseitige Regulation, kann man diesen beiden Genen die Funktion der Aufrechterhaltung der AP-Polarität zuordnen.

Der Verlust von *Tbx18* hat keinerlei Konsequenz auf die dorso-ventrale Differenzierung der Somiten in Dermomyotom und Sklerotom. Die Expression von Markergenen für das laterale Sklerotom wie *Mox1*, *Pax9* und *Uncx4.1* werden in *Tbx18*^{-/-} Embryonen zwar angelegt, werden jedoch mit zunehmender Differenzierung der Somiten weniger stark in ihrer Expression fokussiert. Sowohl *Mox1* als auch *Pax9* sind somit wahrscheinlich keine direkten Zielgene für *Tbx18* in Frage. Da jedoch mit dem Verlust von *Tbx18* ein Verlust der Aufrechterhaltung der AP-Polarität einhergeht, breiten sich diese Markergene jedoch aus. Die Frage, wie *Tbx18* die Aufrechterhaltung des anterioren Kompartiments gewährleistet, wurde schon z.T. unter dem Aspekt der Regulation von *Tbx18* (Abschnitt 4.2) diskutiert.

Ein anderer möglicher Mechanismus wäre dadurch zu erklären, daß *Tbx18* für die Regulation von Faktoren verantwortlich ist, die eine Vermischung von Zellen aus beiden Kompartimenten verhindert. Dafür kämen besonders Oberflächenmoleküle in Betracht, die unterschiedliche adhäsive bzw. repulsive Eigenschaften hätten. Auch Faktoren, die die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix beeinflussen, sind mögliche Zielgene, die durch *Tbx18* reguliert werden könnten. Der Verlust eines repulsiven Charakters in der anterioren Somitenhälfte in *Tbx18*^{-/-} Embryonen könnte zu Migration von Zellen aus der posterioren Somitenhälfte in die anteriore Somitenhälfte führen. Diese Aufgabe könnte durch Ephrine bzw. den Ephrin-Rezeptoren vermittelt werden, von denen gezeigt werden konnte, daß diese repulsive Kräfte aufeinander ausüben können. Sollten sich diese migratorischen Zellen an ihrem neuen Ort, herkunftsgebunden entwickeln - also Pedikel und proximale Rippen formen - , dann wäre dies eine plausible Erklärung für den Skelettphänotyp von *Tbx18*^{-/-} Embryonen. Dieses Modell würde auch erklären können, weshalb die Proliferationsrate in den anterioren Somitenhälften in *Tbx18*^{-/-} Embryonen erhöht ist. Die einwandernden Zellen aus der posterioren Somitenhälfte besitzen eine höhere Proliferationsrate und tragen somit zu dieser Erhöhung der

Proliferationsrate in der anterioren Hälfte bei. Dadurch wäre eine Angleichung der Zelldichten in beiden Kompartimenten *Tbx18*^{-/-} Embryonen zu erklären.

Eine Proliferations-Untersuchung, die eine Unterscheidung von Zellen aus beiden Kompartimenten berücksichtigt, könnte Aufschluß darüber geben, ob dies tatsächlich der Fall ist. Dazu müßten Zellen einerseits markiert werden und anschließend die Proliferationsrate bestimmt werden.

Ein solches „Migrations-Modell“ könnte auch die Ausbreitung der Sklerotom-Markergene erklären, da Zellen, die diese Markergene exprimieren, sich durch Migration ausbreiten. Dieses Modell verlangt jedoch einen Mechanismus, bei dem die Zellen aus der posterioren Somitenhälfte eine schnelle und vor allem gerichtete Migration in die anteriore Somitenhälfte durchführen. Gleichzeitig müßte durch eine stark erhöhte Proliferation in der posterioren Somitenhälfte der Verlust der fortmigrierenden Zellen kompensiert werden, um die Zelldichte in der posterioren Somitenhälfte aufrechtzuhalten. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Sowohl der transkriptionsabhängige Mechanismus (s. Abschnitt 4.2) als auch der migrationsbedingte Mechanismus der Aufrechterhaltung der AP-Polarität kommen prinzipiell zum gleichen Ergebnis. In Somiten von WT Embryonen wird die durch den Notch/Delta-Signalweg etablierte AP-Polarität durch *Tbx18* und *Uncx4.1* aufrechterhalten. Durch den Verlust eines dieser beiden Gene kommt es zu einer Verlagerung der Grenze. Bei einem Funktionsverlust von *Tbx18* expandiert das posteriore Kompartiment – sichtbar anhand der *Uncx4.1* Expression - auf Kosten des anterioren Kompartiments. Umgekehrt, im Fall des Verlustes von *Uncx4.1* expandiert *Tbx18* in das posteriore Kompartiment. Da es sich bei der Aufrechterhaltung durch *Tbx18* um einen aktiven Prozeß handelt, deutet die *Uncx4.1* Expression in den MSD::*Tbx18* Mauslinien an. Die ektopische Expression von *Tbx18* führt zu einer Reduktion der *Uncx4.1* Expressionsdomäne und somit zu einer Verkleinerung des posterioren Kompartiments. Interessanterweise tritt dieser Prozeß nicht unmittelbar auf, sondern die *Uncx4.1* Expression wird in den neugebildeten Somiten von MSD::*Tbx18* Embryonen zunächst polarisiert in einer gesamten Somitenhälfte angelegt, jedoch innerhalb von 5-6 Somiten drastisch auf das posteriore Ende der Posterioren Somitenhälfte reduziert. Als Konsequenz sind in diesen Embryonen, die Pedikel und proximalen Rippen stark reduziert. Funktionell stellt die Allel MSD::*Tbx18* damit ein Hypomorph von *Uncx4.1* dar.

In WT Embryonen formen die anteriore Somitenhälften aus einem Somiten zusammen mit den posterioren Somitenhälften des benachbarten Somiten einen Wirbelkörper. Dieser Prozeß, der als Resegmentierung bekannt ist, versetzt somit die Skelettelemente um eine halbe Somitenlänge relativ zum Myotom. Wenn aufgrund des Verlustes von *Tbx18* oder *Uncx4.1* die Grenzen der Somitenhälften nicht mehr korrekt aufrechterhalten bleiben, könnten die Skelettphänotypen auch als ein Ergebnis einer fehlerhaften Resegmentierung betrachtet werden. In *Tbx18*^{-/-} Embryonen wird eine reduzierte anteriore Somitenhälfte mit der expandierten Somitenhälfte eines benachbarten Somiten zu einem Wirbel zusammengefaßt. Als Konsequenz besitzt dieser Wirbel expandierte Pedikel und proximale Rippen.

Im umgekehrten Fall fügt der Resegmentierungsprozeß in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen, expandierte anteriore Somitenhälften mit reduzierten posterioren Somitenhälften zu einem Wirbel zusammen. Die Elemente, die aus der posterioren Somitenhälfte stammen, sind dementsprechend reduziert. Ähnliches gilt auch für die Mauslinie MSD::*Tbx18*.

Tbx18 und *Uncx4.1* besitzen bezüglich ihrer Expression und ihrer Funktion in der Skelettentwicklung Voraussetzungen, um ein molekulares Raster für den Prozeß der Resegmentierung des Sklerotoms vorzugeben. Deren gegenseitige Regulation kann im Fall von *Uncx4.1* als transkriptioneller Repressor von *Tbx18* interpretiert werden. Umgekehrt bleibt der Mechanismus, wie *Tbx18* die Ausbreitung von *Uncx4.1* kontrolliert, unverstanden. Beide Gene werden in neugebildeten Somiten in einem polarisierten Muster exprimiert, daß durch den Notch/Delta-Signalweg etabliert wird. Die AP-Polarität der Somiten wird durch die gegenseitige Kontrolle von *Tbx18* und *Uncx4.1* kontrolliert. Bei einem Verlust jeweils eines dieser beiden Gene kommt es zu einer Ausbreitung des jeweils anderen Gens. Als Folge kommt es zu einer Verschiebung der Kompartimentgrenzen innerhalb der Somiten. Die Wirbel werden durch den Resegmentierungsprozeß aus sklerotomalen Zellen einer anterioren Somitenhälfte und aus Zellen einer posterioren Somitenhälfte eines angrenzenden Somiten gebildet. Sind die Kompartimente, wie im Falle von *uTbx18*^{-/-} Mäusen, nicht korrekt vorhanden wird durch die Resegmentierung „ungleich“ große Elemente miteinander zu einem Wirbel zusammengefügt.

Damit scheint *Tbx18* eine wichtige Funktion für den Prozeß der Resegmentierung des Sklerotoms und damit der Wirbelsäulenentwicklung zu haben.

5. Literaturverzeichnis

Aoyama, H. & Asamoto, K. (1988). Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. <i>Development</i> 104, 15–28
Aulehla, A. & Johnson, R. L. (1999). Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation. <i>Dev. Biol.</i> 207, 49–61
Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, Kemler R, Gossler A, Kanzler B, Herrmann BG (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. <i>Dev Cell.</i> 3,395-406
Bagnall KM, Higgins S, Sanders EJ (1988) The contribution made by a single somite to the vertebral column: experimental evidence in support for resegmentation using the chick-quail chimera model. <i>Development</i> 103:69–85
Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB (1997) Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar mammary syndrome. <i>Nat. Genet.</i> 1997 3,311-5
Barnes GL, Hsu CW, Mariani BD, Tuan RS (1996) Chicken Pax-1 gene: Structure and expression during embryonic somite development. <i>Differentiation</i> 61:13–23
Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G, Silengo M, Pereira A, Krieger J, Mesquita SF, Kamisago M, Morton CC, Pierpont ME, Muller CW, Seidman JG, Seidman CE (1999) Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> 96,2919-24
Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J.A., and Gossler, A. (2000). Distinct regulatory elements direct Delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. <i>Mech. Dev.</i> 95: 23–34.
Bergemann, A. D., Cheng, H.-J., Brambilla, R., Klein, R. and Flanagan, J. G. (1995). Elf-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. <i>Molecular and Cellular Biology</i> 15, 4921-4929
Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., and Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. <i>Genes & Dev.</i> 15: 2642–2647
Bessho Y, Sakata R, Komatsu S, Shiota K, Yamada S, Kageyama R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. <i>Genes Dev.</i> 15,2642-7
Bettenhausen B, Hrabe de Angelis M, Simon D, Guenet JL, Goßler A (1995) Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. <i>Development</i> 121:2407–2418
Borycki AG, Strunk K, Savary R, Emerson CP Jr (1997) Distinct signal/response mechanisms regulate pax 1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites. <i>Dev Biol</i> 185:185–200
Brand-Saberi B, Ebensperger C, Wilting J, Balling R, Christ B (1993) The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos. <i>Anat. Embryol.</i> 188:239–245
Braybrook C, Doudney K, Marcano ACB, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, Goodfellow PJ, Moore GE, Stanier P. (2001). The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. <i>Nat Genet</i> 29:179–83
Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. <i>Cell</i> 113:235–248
Burgess R, Rawls A, Brown D, Bradley A, Olson EN (1996). Requirement of
Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, Leitges M, Gossler A, Kispert A (2004) The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. <i>Genes Dev.</i> 18:1209–1221
Candia AF, Hu, J., Crosby J, Lalley, P. A., Noden, D., Nadeau, J. H., and Wright, C. V. E. (1992). Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. <i>Development</i> 116, 1123–1136
Capdevila J, Tabin C, Johnson RL (1998). Control of dorso-ventral somite patterning by Wnt-1 and b-catenin. <i>Dev. Biol.</i> 193:182–194
Carpenter M.K., Cui X., Hu Z., Jackson J. (1999). In vitro expansion of a Multipotent Population of

Human Neural Progenitor Cells. <i>Experimental Neurology</i> 158: 265-278
Casey ES, O'Reilly MA., Conlon FL., Smith JC (1998). The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. <i>Development</i> 125, 3887–3894
Casey ES, Tada M, Fairclough, L, Wylie, CC, Heasman, J, Smith, JC (1999). Bix4 is activated by VegT and mediates endoderm formation in <i>Xenopus</i> development. <i>Development</i> 126, 4193–4200
Chernoff EAG, Hilfer SR (1982). Calcium dependence and contraction in somite formation. <i>Tissue Cell</i> 14:435–449.
Chesley P (19325). Lethal action in the short-tailed mutant in the house mouse. <i>Doc. Exp. Biol. Med.</i> 29, 437-438
Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. <i>Nature</i> 383, 407-413
Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML (1997). Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse <i>Tbx1</i> gene. <i>Genomics</i> 43, 267–277
Christ B (1975). Die Entwicklung der Körperwandmetamerie, experimentelle Untersuchungen an Hühnerembryonen. Habilitationsschrift, Ruhr-Universität, Bochum
Christ B, Jacob HJ, Jacob M (1972) Experimentelle Untersuchungen zur Somitenentstehung beim Hühnerembryo. <i>Z Anat Entwickl.-Gesch.</i> 138:82–97
Christ B, Wilting J (1992) From somites to vertebral column. <i>Ann Anat</i> 174:23–32
Christ B, Huang R, Wilting J (2000) The development of the avian vertebral column. <i>Anat. Embryol.</i> 202:179–194
Bodo Christ, Ruijin Huang, Martin Scaal (2004). Formation and differentiation of the avian sclerotome. <i>Anat Embryol</i> 208, 333–350
Christ B, Huang R, Scaal M. (2004). Formation and differentiation of the avian sclerotome. <i>Anat. Embryol. (Berl)</i> 208:333-50
Christoffels VM, Hoogaars WMH, Tessari A, Clout DEW, Moorman AFM, Campione M (2004). T-Box Transcription Factor <i>Tbx2</i> Represses Differentiation and Formation of the Cardiac Chambers. <i>Dev Dyn</i> 229, 763–770
Conlon, R.A., Reaume, A.G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. <i>Development</i> 121: 1533–1545
Cooke J (1975). Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, <i>Xenopus laevis</i> . <i>Nature</i> 254, 196-199
Deutsch U, Dressler GR, Gruss P (1988) Pax 1, a member of paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. <i>Cell</i> 53:617
Dobrovolskaja-Zavadskaja N (1927). Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caeactère (facteur) héréditaire, non viable. <i>C. R. Soc. Bio. T</i> 97, 114-119
Dockter J, Ordahl CP (2000). Dorsoventral axis determination in the somite: a re-examination. <i>Development</i> 127, 2201–2206
Dou S, Zeng X, Cortes P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Honjo T, Vales LD (1994). The recombination signal sequence binding protein RBP-2N, function as a transcriptional repressor. <i>Mol. Cell. Biol.</i> 14, 3310-3319
Dubrulle, J., McGrew, M. J. & Pourquie, O. (2001). FGF signalling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. <i>Cell</i> 106, 219–232
Dubrulle J, Pourquie O (2004). Coupling segmentation to axis formation. <i>Development.</i> 2004 131,5783-93
Dunwoodie, S.L., Henrique, D., Harrison, S.M., and Beddington, R.S. (1997). Mouse <i>Dll3</i> : A novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. <i>Development</i> 124, 3065–3076
Durbin L, Sordino P, Barrios A, Gering M, Thisse C, Thisse B, Brennan C, Green A, Wilson S, Holder N (2000). Anteroposterior patterning is required within segments for somite boundary formation in zebrafish. <i>Development</i> 127, 1703-1713
Durbin L, Brennan C, Shiomi K, Cooke J, Barrios A, Shanmugalingam S, Guthrie B, Lindberg R, Holder N (1998).

Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. <i>Genes. Dev.</i> 12, 3096-3109
Ebensperger C, Wilting J, Brand-Saberi B, Mizutani Y, Christ B, Balling R, Koseki H (1995) Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. <i>Anat. Embryol.</i> 191:297–310
V von (1888) Urvirbel und Neugliederung der Wirbelsäule, <i>Sitzungsber Akad Wiss Wien III/97</i> :194–206
Ebner V von (1888) Urvirbel und Neugliederung der Wirbelsäule. <i>Sitzungsber Akad Wiss Wien III/97</i> :194–206
Edmondson, D.G. and Olson, G.R. (1989). A gene with homology with the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. <i>Genes & Dev.</i> 3: 628–640
Evans DJR (2003) Contribution of somitic cells to the avian ribs. <i>Dev. Biol.</i> 256:114–126
Evrard, Y. A., Lun, Y., Aulehla, A., Gan, L. & Johnson, R. L. (1998). Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning. <i>Nature</i> 394, 377–381
Ewan KBR, Everett AW (1992) Evidence for resegmentation in the formation of the vertebral column using the novel approach of retroviral-mediated gene transfer. <i>Exp. Cell. Res.</i> 198:315–320
Fan C-M, Tessier-Lavigne M (1994) Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. <i>Cell</i> 79:1175–1186
Flint OP, Ede DA, Wilby OK, Proctor J (1978). Control of somite number in normal and amputated mutant mouse embryos: an experimental and a theoretical analysis. <i>J. Embryol. Exp. Morph.</i> 45: 189–202
Forsberg H, Crozet F, Brown NA (1998). Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, develop precede somite boundary formation. <i>Curr. Biol.</i> 8, 1027–1030
Furumoto TA, Miura N, Akasaka T, Mizutani-Koseki Y, Sudo H, Fukuda K, Maekawa M, Yuasa S, Fu Y, Moriya H, Taniguchi M, Imai K, Dahl E, Balling R, Pavlova M, Gossler A, Koseki H. (1999) Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. <i>Dev. Biol.</i> 210, 15–29
Gessler M, Knobloch K.-P, Helisch A, Amann K, chumacher N, Rohde E, Fischer A, Leimeister C (2002) mouse gridlock: No aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 ^{-/-} mice. <i>Curr. Biol.</i> 12: 1601–1604
Ghosh TK, Packham EA, Bonser AJ, Robinson TE, Cross SJ, Brook JD (2001). Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. <i>Hum. Mol. Genet.</i> 10, 1983-1994
Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan PA, Blumenstock C, Niehrs C (1998). Dickkopf1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. <i>Nature</i> 391, 357–362
Goldstein RS, Teillet MA, Kalcheim C (1990) The microenvironment created by grafting multiple rostral half-somites is mitogenic for neural crest cells. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 87:4476–4480
Gossler A, Hrabe de Angelis M (1998) Somitogenesis. <i>Curr. Top. Dev. Biol.</i> 38:225-287
Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM (2002). Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. <i>Genes. Dev.</i> 2002 16,1234-46
Habets PE, Moorman AF, Clout DE, Van Roon M, Lingbeek M, Van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM (2002). Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. <i>Genes. Dev.</i> 16, 1234–1246
Haines N, Irvine KD (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. <i>Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.</i> 4,786-97
Hatada Y, Stern CD (1994). A fate map of the epiblast of the early chick embryo. <i>Development</i> 120, 2879-2889
Hatta K, Takagi S, Hajime F, Takeichi M (1987) Spatial and temporal expression pattern of n-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. <i>Dev. Biol.</i> 120:215–227
Henkemeyer M, Marengere LEM, McGlade J, Olivier JP, Conlon R, Holmyard D, Letwin K, Pawson T (1994) Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. <i>Oncogene</i> 9:1001–1008

Herrmann B G, Labeit S, Poustka A, King T R, Lehrach H (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. <i>Nature</i> 343, 617-622
Hirano S, Hirako R, Kajita N, Norita M (1995) Morphological analysis of the role of the neural tube and notochord in the development of somites. <i>Anat. Embryol.</i> 192:445–457
Hofmann M, Schuster-Gossler K, Watabe-Rudolph M, Aulehla A, Herrmann BG, Gossler A. (2004). WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. <i>Genes. Dev.</i> 18,2712-7
Hogan BLM, Beddinton R, Constantini F, Lacy E (1994). <i>Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual</i> . Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Holley SA, Geisler R, Nusslein-Volhard C (2000). Control of <i>her1</i> expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. <i>Genes. Dev.</i> 14, 1678–1690
Holtzer H, Matheson DW. (1970) Induction of chondrogenesis in the embryo. In: Balazs EA, editor. <i>Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix</i> . New York: Academic Press
Holtzer H, Detwiler SR (1953). An experimental analysis of the development of the spinal column, III. Induction of skeletogenous cells. <i>J. Exp. Zool.</i> 123, 335–369
Horikawa, K., Radice, G., Takeichi, M., and Chisaka, O. (1999). Adhesive subdivisions intrinsic to the epithelial somites. <i>Dev. Biol.</i> 215: 182–189
Hrabe de Angelis, M., McIntyre II, J., and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. <i>Nature</i> 386: 717–721
Huang R; Zhi Q, Wilting J, Christ B (1994) The fate of somitocoele cells in avian embryos. <i>Anat. Embryol.</i> 190, 243–250
Huang R, Zhi Q, Neubüser A, Müller TS, Brand-Saberi B, Christ B, Wilting J (1996) Function of somite and somitocoele cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryo. <i>Acta. Anat.</i> 155,231–241
Huang R, Zhi Q, Brand-Saberi B, Christ B (2000a) New experimental evidence for somite resegmentation. <i>Anat. Embryol.</i> 202,195–200
Huppert S, Le A, Schroeter EH, Mumm SJ, Saxena MT, Milner AL, Kopan R (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing deficient Notch1 allele. <i>Nature</i> 405, 966–970
Ikeya M, Takada S (1998) Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. <i>Development</i> 125,4969–4976
Ishibashi M, Ang S-L, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F (1995) Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to upregulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. <i>Genes. Dev.</i> 9, 3136-3148
Jiang YJ, Aerne BL, Smithers L, Haddon C, Ish-Horowicz D, Lewis J (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. <i>Nature</i> 408, 475–479
Jouve C, Palmeirim I, Henrique D, Beckers J, Gossler A, Ish-Horowicz D, Pourquie´ O (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. <i>Development</i> 127, 1421–1429
Keynes RJ, Stern CD (1984) Segmentation in the vertebrate nervous system. <i>Nature</i> 310,786–789
Kidd S, Lieber T, Young MW (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in <i>Drosophila melanogaster</i> embryos. <i>Genes. & Dev.</i> 12, 3728–3740
Kispert A, Herrmann BG (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. <i>EMBO J.</i> 12, 3211-3220
Kispert A, (1995). The Brachyury protein: a T-domain transcription factor <i>Sem. Dev. Biol.</i> 6, 395-403
Kusumi K, Sun ES, Kerrebrock AW, Bronson RT, Chi DC, Bulotsky MS, Spencer JB, Birren BW, Frankel WN, Lander ES (1998). The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. <i>Nat. Genet.</i> 19, 274-278
Koseki H, Wallin J, Wilting J, Mizutani Y, Kispert A, Ebensperger C, Herrmann BG, Christ B, Balling R (1993) A role of Pax-1 as a mediator of notochordal signals during the dorso-ventral specification of vertebrae. <i>Development</i> 119, 649–660
Kraus F, Haenig B, Kispert A (2001) Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene <i>Tbx 18</i> . <i>Mech. Dev.</i> 100:83–86
Kume T, Jiang H, Topczewska JM, Hogan BL (2001) The murine winged helix transcription factors,

Foxc1 and Foxc2, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. <i>Genes. Dev.</i> 15, 2470-82
Kusch T, Storck T, Walldorf U, Reuter R (2002). Brachyury proteins regulate target genes through modular binding sites in a cooperative fashion. <i>Genes. Dev.</i> 2002 16, 518-29
Lecourtois M, Schweisguth F (1998) Indirect evidence for Delta- dependent intracellular processing of notch in <i>Drosophila</i> embryos. <i>Curr. Biol.</i> 8, 771-4
Leimeister C, Dale K, Fischer A, Klamt B, Hrabe´ de Angelis M, Radtke F, McGrew MJ, Pourquie´ O, Gessler M (2000). Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. <i>Dev. Biol.</i> 227, 91–103
Leitges M, Neidhardt L, Haenig B, Herrmann BG, Kispert A (2000) The paired homeobox gene <i>Uncx4.1</i> specifies pedicles transverse processes and proximal ribs of the vertebral column. <i>Development</i> 127,:2259–2267
McGrew, M. J., Dale, J. K., Fraboulet, S. & Pourquie, O. (1998).The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. <i>Curr. Biol.</i> 8, 979–982
Mansouri A, Voss AK, Thomas T, Yokota Y, Gruss P (2000) <i>Uncx4.1</i> is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of Pax-9. <i>Development</i> 127,2251–2258
McGrew MJ, Dale JK, Fraboulet S, Pourquie O (1998). The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos. <i>Curr Biol.</i> 8, 979-82
Meier S (1979). Development of the chick mesoblast. Formation of the embryonic axis and establishment of the metameric pattern. <i>Dev. Biol.</i> 73, 25-45
Meinhardt H (1986). Models of segmentation. In: Bellairs R, Ede DA, Lash JW, editors. <i>Somites in developing embryos</i> . New York: Plenum Press., 179–189
Monsoro-Burq AH, Le Douarin N. Related (2000). Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. <i>Curr. Top. Dev. Biol.</i> 2000 48, 43-75
Müller CW, Herrmann BG (1997). Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. <i>Nature</i> 389, 884-888
Murtaugh LC, Chyung JH, Lassar AB (1999). Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. <i>Genes. Dev.</i> 13, 225–237
Neidhardt L, Lisper A, Herrmann BG (1997) A mouse gene of the paired-related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. <i>Dev. Genes. Evo.l</i> 207,330–339
Neubüser A, Koseki H, Balling R (1995). Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. <i>Dev. Biol.</i> 170, 701-716
Nieto, M.A., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P., and Wilkinson, D.G. (1992). A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. <i>Development</i> 116, 1137–1150
Ohta K, Nakamura M, Hirokawa K, Tanaka S, Iwana A, Suda T, Ando M, Tanaka H (1996). The receptor tyrosine kinase, <i>Cek8</i> , is transiently expressed on subtypes of motor neurons in the spinal cord during development. <i>Mech. Dev.</i> 54, 59-69
Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1999). <i>Hes1</i> and <i>Hes5</i> as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. <i>EMBO J.</i> 18, 2196-2207
Packard DS-Jr, Zheng RZ, Turner DC (1993). Somite pattern regulation in the avian segmental plate mesoderm. <i>Development</i> 117, 779–791
Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowicz D, Pourquie´ O (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. <i>Cell</i> 91, 639–648
Papaioannou VE (2000). T-box genes in development: from hydra to humans. <i>Intl. Rev. Cytol.</i>
Papapetrou C, Edwards YH, Sowden, JC (1997). The T transcription factor functions as a dimer and exhibits a common human polymorphism Gly–177–Asp in the conserved DNA-binding domain. <i>FEBS Lett.</i> 409, 201–206
Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM (1999). The head inducer <i>Cerberus</i> is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. <i>Nature</i> 397, 707–710
Pollock R, Treisman R (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA binding

specificities. <i>Nucleic Acids Res.</i> 18, 6197-6204
Pourquie O. (1998). Clocks regulating developmental processes. <i>Curr. Opin. Neurobiol.</i> 5,665-70
Pourquie, O. (2001). Vertebrate somitogenesis. <i>Annu. Rev. Cell Dev. Biol.</i> 17: 311–350
Pourquie O (2003). Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? <i>Int. J. Dev. Biol.</i> 47, 597-603
Primmitt DRN, Norris WE, Carlson GJ, Keynes RJ, Stern CD (1989) Periodic segmental anomalies induced by heat-shock in the chick embryo are associated with the cell cycle. <i>Development</i> 105,119–130.
Psychoyos D, Stern CD (1996). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. <i>Development</i> 122,1523–1534
Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. <i>Dev. Biol.</i> 181, 64–78
Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J (1992) Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. <i>Dev Biol</i> 154:377–387
Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Chervas P, Artavanis-Tsakonas S (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. <i>Cell</i> 67, 687–699
Remak, R. 1850. Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbelthiere. Erste Lieferung über die Entwicklung des Hünchens im Ei. Reimer, Berlin.
Saga Y, Hata N, Kobayashi S, Magnuson T, Seldin M, Taketo MM (1996). Mesp1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. <i>Development</i> 122, 2769–2778
Saga, Y., Hata, N., Koseki, H., and Taketo, M.M. (1997). Mesp2: A novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. <i>Genes & Dev.</i> 11, 1827–1839
Sawada A, Fritz A, Jiang Y, Yamamoto A, Yamasu K, Kuroiwa A, Saga Y, Takeda H (2000). Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites. <i>Development</i> 127, 1691–1702
Schoenwolf G C, García-Martínez V, Dias MS (1992). Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. <i>Dev. Dyn.</i> 193, 235-248
Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain . <i>Nature</i> 393, 382–386
Schubert FR, Mootosamy RC, Walters EH, Graham A, Tumiotto L, Munsterberg AE, Lumsden A, Dietrich S (2002). Wnt6 marks sites of epithelial transformations in the chick embryo. <i>Mech Dev.</i> 114, 143-8
Selleck MAJ, Stern CD (1991). Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. <i>Development</i> 112, 615-626
Serth K, Schuster-Gossler K, Cordes, R, and Gossler A (2003). Transcriptional oscillation of Lunatic fringe is essential for somitogenesis <i>Genes & Dev.</i> 17, 912–925
Showell C, Binder O, Conlon F (2004). T-box genes in early embryogenesis. <i>Dev. Dyn.</i> 229, 201-218
Sinha S, Abraham S, Gronostajski RM, and Campbell CE (2000). Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. <i>Gene</i> 258, 15–29
Sosic D, Brand-Saberi B, Schmidt C, Christ B, Olson EN (1997). Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- neural tube-derived signals. <i>Dev. Biol.</i> 185, 229–243
Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. <i>J. Mol. Biol.</i> 40, 121
Stennard F A Costa M W, Elliott D A, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreithe K, Dolle P, Bruneau BG (2003). Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. <i>Dev. Biol.</i> 262, 206-224
Stern, C.D. and Keynes, R.J. (1987). Interactions between somite cells: The formation and maintenance of segment boundaries in the chick embryo. <i>Development</i> 99, 261–272
Stern CD, Hatada Y, Selleck MA, Storey KG (1992). Relationships between mesoderm induction and the embryonic axes in chick and frog embryos. <i>Dev. Suppl.</i> pp. 151–56
Stockdale F E, Nikovits W, Christ B (2000). Molecular and cellular biology of avian somite development. <i>Dev. Dyn.</i> 219, 304-321

Takahashi, Y., Koizumo, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., and Saga, Y. (2000). Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. <i>Nat. Genet.</i> 25, 390–396
Takeichi M (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. <i>Development</i> 102, 630–655
Tam PP, Zhou SX (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. <i>Dev. Biol.</i> 25, 124-32
Technau U, Bode HR, (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. <i>Development</i> 126, 999-1010
Teillet M, Watanabe Y, Jeffs P, Duprez D, Lapointe F, Le Douarin NM (1998). Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. <i>Development</i> 125, 2019–2030
Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, Kawaichi M (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jk. <i>Nucleic Acids Res.</i> 22, 965-971
Wagner J, Schmidt C, Nikovits W Jr, Christ B (2000) Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by Wnt-expression. <i>Dev. Biol.</i> 228, 86–94
Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R (1994). The role of Pax-1 in axial skeleton development. <i>Development</i> 120, 1109-1121
Wang HU, Anderson DJ (1997) Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest cell migration and motor axon outgrowth. <i>Neuron</i> 18, 383
Wilting J, Kurz H, Brand-Saberi B, Steding G, Yang YX, Hasselhorn MM, Epperlein HH, Christ B (1994) Kinetics and differentiation of somite cells forming the vertebral column: studies on human and chick embryos. <i>Anat. Embryol.</i> 190, 573–581
Winnier G E, Hargett L., Hogan, BLM (1997). The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo. <i>Genes. Dev.</i> 11, 926-940
Yi CH, Terrett, JA, Li QY, Ellington K, Packham EA, Armstrong-Buisseret L, McClure P, Slingsby T, Brook JD (1999). Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: EOMES, TBX6, TBX18, and TBX19. <i>Genomics</i> 55, 10-20
Zhang, N. & Gridley, T. (1998). Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. <i>Nature</i> 394, 374–377

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig durchgeführt habe und keine anderen als die angegebenen Institutionen und Hilfsmittel verwendet habe. Zusätzlich erkläre ich, daß diese Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, den 28.3.2005

Markus Bussen

Lebenslauf

Name: Bussen
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 22.09.1974
Geburtsort: Emsdetten
Eltern: Ernst-Ferdinand Bussen und Ursula Bussen, geb. Teiselmann
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung:

1982-1985 Grundsschule: Friedensschule Wettringen
1985-1994 städtisches Gymnasium Ochtrup
1994 Abitur

Studium:

1995-1999 Studium an der Universität zu Köln, Fach Biologie
1999-2000 Diplomarbeit: Institute for metabolic diseases, Rockefeller University,
New York, USA
Mai 2001 Diplom

Seit 2001-2005 Doktorrand bei Prof. Kispert; 2000-2001 Max-Planck-Istitut, Freiburg;
ab März 2001 im Institut für Molekularbiologie der MHH, Hannover
Anfertigung der Doktorarbeit:
„Die funktionelle Analyse des T-box Transkriptionsfaktors Tbx18 in
der Somitogenese der Maus“

Stipendien:

1997-2000 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Veröffentlichungen: 1) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism.; Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, Ananthanarayanan M, Shneider BL, Suchy FJ, Shefer S, Bollileni JS, Gonzalez FJ, Breslow JL, Stoffel M.; Nature Genetics; 2001, Apr; 27(4)

2) The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments; Markus Bussen, Marianne Petry, Karin Schuster-Gossler, Michael Leitges, Achim Gossler, Andreas Kispert; Genes & Development; 2004, Mai 15.; 18(10)