

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg**

**vorgelegt von
Marcus-Oliver Schupp
aus Kiblegg im Allgäu
April 2009**

Thema:

**Neurogenese in Zentralen Nervensystem der Wirbeltiere –
Molekulare Mechanismen zur regionsspezifischen Expression von
neurogenin1 im Embryo des Zebrafischs *Danio rerio***

**Gutachter: Prof. Dr. Uwe Strähle
Prof. Dr. Gabriele Petersen**

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungszentrum Karlsruhe (in der Helmholtz-Gemeinschaft) am Institut für Toxikologie und Genetik im Zeitraum von April 2005 bis April 2009 unter Anleitung von Prof. Dr. Uwe Strähle durchgeführt.

Für meine Eltern

Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.

CHARLES DARWIN

Zusammenfassung

Während der Embryonalentwicklung von Vertebraten kontrollieren drei hoch konservierte Enhancer die raumzeitliche Expression orthologer *neurog1*-Gene. In Anamniota wie dem Zebrafisch wird die Transkription des proneuralen Gens nach Bildung der Neuralplatte durch zwei dieser *cis*-regulatorischen Elemente gesteuert. Transgenanalysen zeigen, dass der distale LSE-Enhancer *neurog1* im Telencephalon und der proximale LATE-Enhancer im Diencephalon der Gehirnanlage aktiviert (Blader et al., 2003). Pax6 aktiviert die diencephale *neurog1*-Expression durch direkte Interaktion mit LATE, und es wird vermutet, dass diese Interaktion zur Kooptation von *neurog1* im lateralen Telencephalon der Maus und damit zur Evolution des Neocortex in Amniota entscheidend beigetragen hat. Jedoch müssen andere mit Pax6 kooperierende Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein, einerseits, weil *neurog1* in anderen Regionen auch unabhängig von Pax6 exprimiert wird, andererseits, weil Pax6 allein zur *neurog1*-Aktivierung nicht ausreicht, etwa im Telencephalon des Zebrafischs (Blader et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie weitere Transkriptionsfaktoren (TFs) in die Regulation der regionspezifischen *neurog1*-Expression im Diencephalon des Zebrafischs durch Interaktion mit dem LATE-Enhancer involviert sind. Eine Kombination aus Sequenzanalyse, Mutationsanalyse mit Reportertransgenen und Koexpressionsanalyse potentieller TF-Kandidaten weist auf eine Beteiligung von Homeodomänen-TFs der POU-Klasse (POU-TFs) an der LATE-vermittelten Regulation von *neurog1* hin:

Bioinformatische Analysen identifizieren POU-Bindestellen im stromabwärts der Pax6-Bindestelle benachbarten und in Vertebraten vollkommen konservierten LATE-Fragment, die selektiv mit rekombinantem Pou50-Protein physisch interagieren. Deletion dieses Fragments im LATE-Reporter induziert ektopische Transgenaktivität spezifisch im Telencephalon, was beweist, dass die ancestrale LATE-Funktion nicht auf diencephale Aspekte der *neurog1*-Expression beschränkt ist. LATE kooperiert hierbei mit dem LSE-Enhancer. Eine eigens für die Koexpressionsanalyse entwickelte Methode zur virtuellen 3D-Visualisierung von Genaktivitäten konnte nachweisen, dass in der ektopischen Transgendomäne *neurog1*, Pax6 und POU-TFs koexprimiert sind. Überdies kann die ektopische Transgen- und endogene *neurog1*-Aktivität spezifisch im Telencephalon durch HDAC-Inhibition reproduziert bzw. verstärkt werden. Die präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass LATE ein direktes Ziel nicht nur positiv, sondern auch negativ regulierender Signale darstellt, und weisen darauf hin, dass neben transkriptioneller Aktivierung durch Kooptation auch die Aufhebung transkriptioneller Repression für die Evolution des Neocortex entscheidend war.

Summary

During embryonic development of vertebrates three highly conserved enhancers control the spatiotemporal expression of orthologous *neurog1* genes. After formation of the neural plate, in amniota such as zebrafish, the transcription of the proneural gene is driven by two of these *cis*-regulatory elements. Transgenic analyses have shown that the distal LSE enhancer activates *neurog1* in the telencephalon and the proximal LATE enhancer in the diencephalon of the brain *anlage* (Blader et al., 2003). Pax6 activates diencephalic *neurog1* expression via direct interaction with LATE, and it is assumed that this interaction was crucial for the co-option of *neurog1* in the lateral telencephalon of the mouse, and therefore for neocortex evolution in amniota. However, other factors cooperating with Pax6 must be engaged in this process, as on the one hand, other regions express *neurog1* independently of Pax6, and on the other hand, Pax6 is not sufficient for the activation of *neurog1*, as in case of the zebrafish telencephalon (Blader et al., 2004).

The scope of the present study was to investigate whether and how other transcription factors (TFs) are involved in the regulation of region-specific *neurog1* expression in the diencephalon of the zebrafish embryo through interaction with the LATE enhancer. A combined experimental approach consisting of sequence analysis, mutational analysis of reporter transgenes together with co-expression analysis of potential TF candidates points to an involvement of POU-specific homeodomain TFs (POU-TFs) for the LATE-mediated regulation of *neurog1*:

Bioinformatic analyses identify POU binding sites inside a LATE fragment flanking the upstream Pax6 binding site that is fully conserved between vertebrates and that is able to physically interact selectively with recombinant Pou50 protein. Deletion of this fragment induces ectopic LATE reporter activity specifically in the telencephalon providing evidence for an ancestral function of LATE not to be limited to diencephalic aspects of *neurog1* expression. At the same time, LATE cooperates with the LSE enhancer. The ectopic transgene domain co-expresses *neurog1*, Pax6, and POU-TFs, as shown by results obtained from a method especially developed here for computer-aided 3D visualisation of gene expression. Moreover, this ectopic transgene and endogenous *neurog1* activity in the telencephalon is reproduced and reinforced by HDAC inhibition, respectively. The presented data unambiguously indicate that LATE is not only a target of positively but also negatively acting positional cues, suggesting that besides transcriptional activation by co-option also breakup of transcriptional repression was critical for neocortex evolution.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Prinzipien der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) in Vertebraten.....	1
1.2 Neurale Induktion und Spezifikation.....	3
1.3 Regionalisierung der Gehirnanlage	5
1.4 Proneurale Gene verbinden Musterbildung und Neurogenese.....	8
1.5 Regulation der Genexpression	14
1.6 Evolution und Identifikation <i>cis</i>-regulatorischer Elemente.....	21
1.7 Der <i>neurogenin1</i>-Locus in Vertebraten	31
1.8 Zielsetzung der Arbeit	34
2. Material und Methoden.....	35
2.1 Material.....	35
2.1.1 Chemikalien	35
2.1.2 Stamm- und Pufferlösungen.....	35
2.1.3 Enzyme	40
2.1.4 Antikörper	41
2.1.5 Bakterienstämme	41
2.1.6 Plasmide	41
2.1.7 Kitsysteme.....	42
2.1.8 Geräte.....	43

2.1.9	Oligonukleotide	44
2.1.9.1	Adapteroligonukleotide für GFP-Expressionsvektoren	44
2.1.9.2	Primersequenzen für LATE-Deletionen	45
2.1.9.3	Primersequenzen für 8.4-EGFP-Reporterkonstrukte	45
2.1.9.4	DNA-Fragmente für Assay zur DNA-Protein-Interaktion	45
2.1.9.5	Primersequenzen zur Herstellung rekombinanter Proteine	46
2.1.9.6	Morpholino-Oligonukleotide	48
2.1.10	Datenbanken und Computerprogramme	48
2.2	Methoden	49
2.2.1	DNA-Techniken	49
2.2.1.1	Mini/Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Kitsystem).....	49
2.2.1.2	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Kochmethode).....	50
2.2.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
2.2.1.4	Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	52
2.2.1.5	Aufreinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung	54
2.2.1.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	54
2.2.1.7	Präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen (Gelelution).....	55
2.2.1.8	Quantifizierung von DNA im Agarosegel.....	56
2.2.1.9	Quantifizierung von DNA im Photometer.....	56
2.2.1.10	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren.....	57
2.2.1.10.1	Klonierung via Restriktionsverdau und Ligation	57
2.2.1.10.2	Klonierung via <i>Gateway</i> ®.....	57
2.2.1.10.3	Klonierung in den pGEM®-T- <i>Easy</i> -Vektor.....	58
2.2.1.10.4	Klonierung in den TOPO®-Vektor.....	58
2.2.1.11	Transformation in <i>E. coli</i> und Selektion positiver Klone.....	59
2.2.1.12	Blau-Weiß-Selektion	59
2.2.1.13	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	60
2.2.1.14	DNA-Analyse mittels Testverdau	60
2.2.1.15	DNA-Analyse mittels PCR.....	61
2.2.1.16	DNA-Sequenzierung	61
2.2.1.17	Konstruktion der GFP-Expressionsvektoren (Meganuklease-System).....	62
2.2.1.18	Umstellung vom Meganuklease- auf das <i>Tol2</i> -System.....	64
2.2.1.18.1	Konstruktion von 3.1-EGFP-Reporterkonstrukten	64
2.2.1.18.2	Konstruktion von 8.4-EGFP-Reporterkonstrukten	64
2.2.2	Markierungstechniken	64
2.2.2.1	Radioaktive Markierung rekombinant erzeugter Proteine	64

2.2.2.2	Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden für Protein-DNA-Interaktionsassays	65
2.2.2.3	Herstellung markierter cRNA-Sonden	65
2.2.3	RNA-Techniken	66
2.2.3.1	Herstellung von mRNA für die Mikroinjektion.....	66
2.2.3.2	Gelelektrophoretische Auftrennung und Quantifizierung von RNA	67
2.2.4	Protein-Techniken	68
2.2.4.1	Herstellung rekombinanter Proteine <i>in-vitro</i>	68
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	68
2.2.4.3	Western-Blot	69
2.2.4.4	Autoradiographie.....	70
2.2.5	Assay zur Protein-DNA-Interaktion	70
2.2.6	Haltung der Zebrafische.....	71
2.2.7	Ernten von Zebrafischembryonen	71
2.2.8	Erzeugung transgener Zebrafische durch Mikroinjektion	72
2.2.8.1	Herstellung von Injektionslösungen.....	72
2.2.8.2	Injektion.....	72
2.2.8.3	Identifizierung stabil transgener Linien.....	73
2.2.9	Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden	74
2.2.10	Untersuchung mit Trichostatin A	74
2.2.11	Färbetechniken an Zebrafischembryonen	75
2.2.11.1	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	75
2.2.11.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	77
2.2.11.3	Antikörperfärbung.....	78
2.2.12	Mikroskopie zur Analyse und Dokumentation	79
2.2.12.1	Lichtmikroskopie	79
2.2.12.2	Digitale konfokale Lasermikroskopie	79
2.2.12.3	Digitale 3D-Rekonstruktion.....	81
3.	Ergebnisse	82
3.1	Potentielle TF-Bindestellen in LATE (<i>In-silico</i>-Analyse).....	82
3.1.1	Vorhersage von TF-Bindestellen mit <i>MatInspector</i>	82
3.1.2	Detektion regulatorischer Motive mit dem <i>WeederH</i> -Algorithmus.....	86
3.1.3	Detektion regulatorischer Motive mit dem <i>Footprinter</i> -Algorithmus	90
3.1.4	Zusammenfassung der <i>In-silico</i> -Analyse.....	91
3.1.5	Auswahl ZNS-spezifischer TF-Kandidaten	93

3.2	Koexpressionsanalyse (<i>In-situ</i>-Analyse).....	95
3.2.1	Entwicklung und Etablierung einer Färbemethode zur gleichzeitigen Darstellung der Expression von TF-mRNA und GFP-Transgen	95
3.2.2	Vergleich der Fluoreszenzsignale von <i>gfp</i> -mRNA und GFP-Protein	98
3.2.3	Vergleich der Aktivität von GFP-Reportern mit der endogenen <i>neurogl</i> -Expression.....	99
3.2.4	Koexpression von TF-Kandidaten mit dem LATE-GFP-Reporter	102
3.2.5	Zusammenfassung der Koexpressionsanalyse	116
3.3	Mutationsanalyse der LATE-Sequenz (<i>In-vivo</i>-Analyse).....	118
3.3.1	Mutationsanalyse im 3.1-Kontext	118
3.3.1.1	Vergleich der Expressionsmuster zwischen Ausgangskonstrukt pBL3.1 und modifiziertem Referenz-LATE-Reporter	118
3.3.1.2	Vergleich der Expressionsmuster von Referenz- und mutierten LATE-Reportern	120
3.3.1.3	Umstellung auf das <i>Tol2</i> -Transgenesesystem.....	127
3.3.2	Mutationsanalyse im 8.4-Kontext	129
3.3.3	Zusammenfassung der LATE-Mutationsanalyse	132
3.3.4	Analyse des Effektes von Deletion 6.....	133
3.4	Analyse zur Protein-DNA-Interaktion (<i>In-vitro</i>-Analyse).....	137
3.5	<i>Knock down</i> der <i>lef1</i>-, <i>dlx2a</i>- und <i>pou50</i>-Expression	141
3.6	Untersuchung mit Trichostatin A	142
4.	Diskussion	146
5.	Literatur.....	161
	Abkürzungen und Bezeichnungen.....	175
	 Danksagungen	 176

1. Einleitung

1.1 Prinzipien der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) in Vertebraten

Die Entwicklung des Nervensystems der Wirbeltiere beginnt mit dem Prozess der neuralen Induktion. Als Antwort auf Signale des nach Hans Spemann benannten „Organisators“ (aus mesodermalem Gewebe der oberen Urmundlippe des Amphibienkeims) nehmen Zellen ein neurales Schicksal an. Die neural-induzierende Aktivität des Spemann-Organisators wurde erkannt durch seine Fähigkeit, nach der Transplantation auf einen anderen Embryo eine zweite Körperachse zu erzeugen (Spemann und Mangold, 1924). Heute, nach mehr als 80 Jahren intensiver Forschung, wird die Erzeugung von Neuronen (Neurogenese) als Prozess verstanden, der viele Schritte umfasst und auf dem Zusammenspiel vieler Signalwege zur Generierung von Neuronensubtypen mit spezifischen Genexpressionsprofilen beruht. Induktion basiert auf Signalkaskaden, wobei extrazelluläre Signale die intrazelluläre Aktivierung und Expression von Genen veranlassen, vor allem von Transkriptionsfaktoren (TFs), die Schicksal und Identität von Zellen im Verlauf ihrer Entwicklung bestimmen. TFs als Signaleffektoren kontrollieren durch physische Interaktion mit genregulatorischer DNA die zeitliche und räumliche Genexpression und befähigen so Zellen, selbst Signale auszusenden bzw. bestimmen deren Kompetenz, auf Signale zu reagieren. Signalsubstanzen sind Morphogene, welche die Entwicklung unterschiedlicher Strukturen und Zelltypen in die Wege leiten und durch ihr räumliches Konzentrationsmuster eine geordnete regionale Organisation und Differenzierung des Embryos ermöglichen. Bei Morphogenen handelt es sich um sekretierte Proteine unter anderem der TGF- β (*transforming growth factor β*)-, FGF (*fibroblast growth factor*)-, WNT (*wing-less*)- und HH (*hedgehog*)-Familien. Techniken zur Visualisierung der Aktivität von Genen mittels Nachweis von mRNA-Transkripten durch *In-situ*-Hybridisierung oder von Proteinen durch Antikörperfärbung ermöglichen die Bestimmung sowohl wichtiger Schritte während der neuralen Entwicklung als auch des Entwicklungsstatus von Zellen.

Neurale Induktion führt zur Bildung der Neuralplatte, eines epithelialen Verbandes undifferenzierter neuraler Vorläuferzellen, welche pan-neurale Gene exprimieren (z.B. *sox2*). Aus diesen proliferativen Zellen entstehen schließlich individuelle postmitotische Neurone verschiedener Identitäten. Gleichzeitig findet die fortschreitende Regionalisierung respektive Musterung der Neuralplatte statt, wobei extrazelluläre Signale und intrazelluläre

Faktoren die Ausrichtung auf die Raumachsen dorsal-ventral (rück-/bauchseits) sowie anterior-posterior (vorne-hinten) und im Verlauf der Neurulation eine immer feinere Aufteilung der Gehirnanlage in spezialisierte Unterbezirke (Kompartimente) bewirken. Neurogenese ist also mit Vorgängen der Musterbildung verknüpft. Die Entwicklung des Nervensystems ist somit ein Prozess der Selbstorganisation, des Aufbaus komplexer aus einfachen Strukturen.

Abb. 1 illustriert den Verlauf der Neurogenese in stark vereinfachter Form (Erklärung siehe Legende), und die folgenden Abschnitte gehen detaillierter auf die einzelnen Schritte ein.

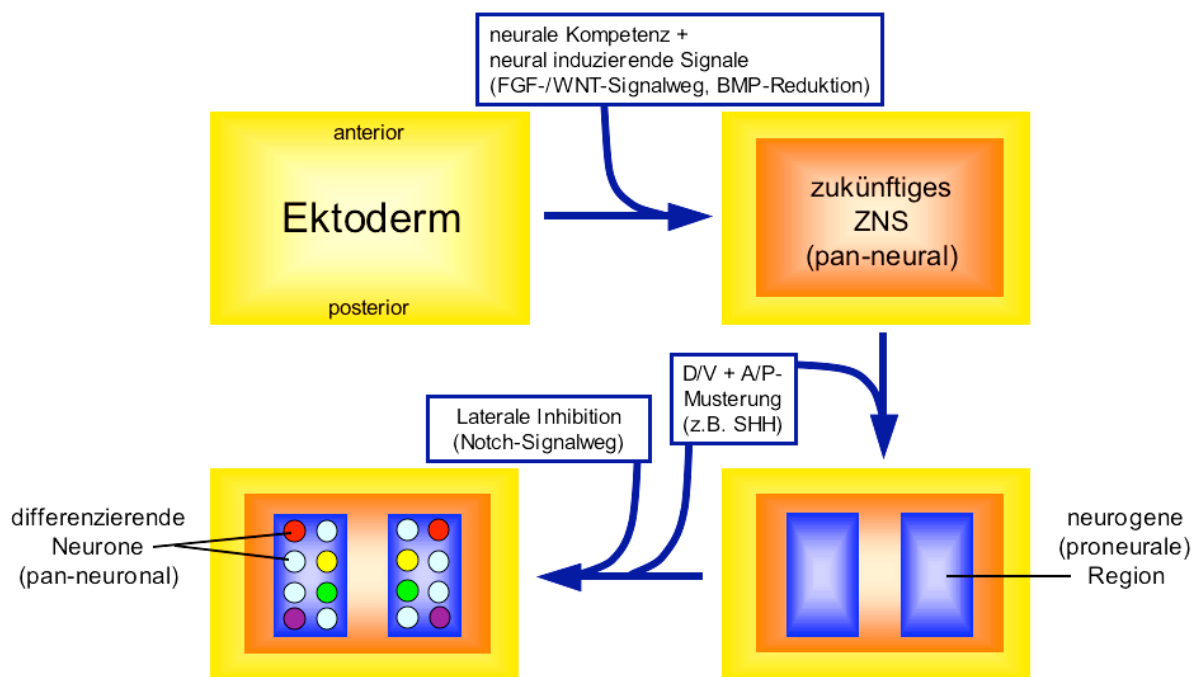


Abb. 1: Überblick zur Neurogenese.

Neural-induzierende Signale lösen im Ektoderm (gelb) die Bildung neuraler und pan-neurale Gene (z.B. *sox2*) exprimierender Vorläuferzellen in der Neuralplatte (orange) aus. Diese Signale schwächen BMP-Signale teilweise ab und induzieren anteriore neurale Gene. Zusätzliche Signale sind für die Zuweisung posteriorer Charakters notwendig (hier nicht gezeigt). Anteroposteriore und dorsoventrale Musterungsprozesse definieren anschließend neurogene Regionen (blau), welche proneurale Gene (z.B. *neurog1*) exprimieren. Differenzierende Neurone verlassen den Zellzyklus, wobei der Mechanismus der lateralen Inhibition in Nachbarzellen den Notch-Signalweg aktiviert und damit deren Differenzierung hemmt, was die Anzahl und räumliche Verteilung von Neuronen reguliert. Ex- und intrinsische Musterungssignale spezifizieren die Identität neuronaler Subtypen, welche sowohl pan-neuronale als auch subtypspezifische Gene exprimieren (z.B. *N-tubulin* bzw. *Isl1/2*). Abkürzungen: FGF, fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; D/V, dorsoventral; A/P, anteroposterior; SHH, sonic hedgehog; ZNS, Zentralnervensystem) (nach Diez del Corral und Storey, 2001; verändert).

1.2 Neurale Induktion und Spezifikation

Zum Spemann-Organisator in Amphibien äquivalente Regionen wurden auch in anderen Vertebratenklassen gefunden: der Embryonschild bei Knochenfischen (Luther, 1935) und der Hensenknoten bei Vögeln und Säugern (Waddington, 1932). Alle sind in der Lage eine Neuralplatte zu induzieren, nicht nur bei der selben Art, sondern auch nach Transplantation in andere Klassen (Waddington, 1933 und 1934). Dies impliziert, dass die Mechanismen der neuralen Induktion innerhalb der Vertebraten konserviert sind.

Es wurde vorgeschlagen, dass der neurale Charakter die Grundeinstellung embryonaler Zellen darstelle und durch BMP-Signale unterdrückt werde (Hemmati-Brivanlou und Melton, 1997; Tropepe et al., 2001). BMP-Proteine (*bone morphogenetic proteins*) der TGF- β -Familie sind klassische Morphogene, die in konzentrationsabhängiger Weise allgemein dorsoventrale Musterungsprozesse regulieren und die epidermale (d.h. nicht-neurale) Differenzierung fördern, wohingegen BMP-Antagonisten (z.B. Noggin, Chordin und Follistatin) neurale Zellschicksale begünstigen. BMP-Antagonisten als Organisationsignale induzieren die Expression neural-spezifischer Gene und führen zur pseudo-stratifizierten epithelialen Morphologie der Neuralplatte (Neuroepithel, Neuroektoderm). Allerdings sind noch mindestens zwei weitere Signalwege an der neuralen Induktion beteiligt, die die BMP-Aktivität modulieren: der FGF- sowie der WNT-Signalweg. FGF-Signale fördern nicht nur die Expression von Chordin und Noggin und unterdrücken die Expression des *bmp*-Gens selbst (Bainter et al., 2001), sondern auch die Aktivität von stromabwärts gelegenen Genen (Effektoren) des BMP-Signalwegs, Transkriptionsfaktoren (TF) aus der Smad-Proteinfamilie (Itoh et al., 2000). Schon früher wurde gezeigt, dass nach der Abschwächung von FGF-Signalen weder Chordin noch Noggin neurales Gewebe induzieren können (Sasai, 1996). Starke WNT-Signale können die zellulären Antworten auf FGF-Signale blockieren und damit die neurale Induktion verhindern, wohingegen schwache WNT-Signale die FGF-vermittelte Förderung der Expression von BMP-Antagonisten nicht zu unterdrücken vermögen (Wilson und Edlund, 2001). Überdies werden FGF-Signale für die Initiation der neuralen Induktion sogar noch vor der Gastrulation benötigt (Streit et al., 2000). Somit scheinen diese Signale eine Art „prospektiven“ Status zukünftigen neuralen Gewebes zu definieren und ihm damit neurale Kompetenz zu verleihen. Später wird die Identität neural induzierter Zellen durch BMP-Antagonisten (und wahrscheinlich andere Signale) gefestigt (Stern et al., 2002). Parallel mit BMP-Antagonisten besitzen Mitglieder der IGF (*insulin growth factors*)-Familie die Fähigkeit zu neuraler Induktion (Pera et al.,

2001). Mechanismen der Zellzykluskontrolle scheinen ebenfalls Einfluss auf die Spezifikation neuralen Gewebes zu haben (Bally-Cuif und Hammerschmidt, 2003).

Die neurale Spezifikation wird maßgeblich durch die Expression von Transkriptionsfaktoren (TFs) beeinflusst (Bainter et al., 2001). Δ Np63, ein direktes Ziel und somit Effektor des BMP-Signalwegs, wird im zukünftigen nicht-neuralen Ektoderm exprimiert, ist selbst ein transkriptioneller Repressor und hat einen negativen Einfluss auf die neurale Entwicklung (Bakkers et al., 2002). Umgekehrt wurden auch pan-neurale TFs identifiziert, die die neurale Bestimmung von Zellen fördern und kompetentes Ektoderm in neurales Gewebe umwandeln (Sasai, 1998). Dazu gehören u.a. die HMG (*high mobility group*)-Proteine SoxD und Sox2 (Mizuseki et al., 1998a+b), das *coiled-coil*-Protein Geminin (Kroll et al., 1998), das POU-Domänen-Protein POU2 (Matsuo-Takasaki et al., 1999) und das *zink finger*- und Homeodomänen-Protein Kheper (Muraoka et al., 2000). Die meisten operieren als transkriptionelle Aktivatoren, die die Expression proneuraler Gene (siehe unten) fördern (Sasai, 1998). Bei Kheper handelt es sich hingegen um ein Repressorprotein, das wahrscheinlich die Expression von *bmp* blockiert. Die Aufklärung der Genregulationsmechanismen, welche die Expression dieser TFs kontrollieren, kann wichtige Hinweise über den Ursprung noch unbekannter neural induzierender Signale liefern. Denn bisher war es nicht möglich, die Expression von *sox2* durch Manipulation von BMP-, FGF- oder WNT-Signalwegen ektopisch (in Zellen, die *sox2* normalerweise nicht exprimieren) direkt zu induzieren (Linker und Stern, 2004).

Die eben aufgeführten Sachverhalte verdeutlichen die Vielfalt ineinandergreifender Regulationsmechanismen zur Steuerung des neural induzierenden Prozesses. Der präzise zeitliche Ablauf sowie die räumliche Verteilung von Signalen zur Kontrolle der Expression von Schlüsselgenen sind von entscheidender Bedeutung. Ohne Frage ist die Modulation der BMP-Aktivität für eine normale neurale Entwicklung äußerst wichtig. BMP-Signale müssen scheinbar (mindestens) drei Mal inhibiert werden: Zuerst in einem sehr frühen Stadium (Blastula oder früher) durch den WNT-Signalweg auf der Dorsalseite des Embryos, wodurch dessen dorsoventrale Polarität und die Position des neural-induzierenden Organisations festgelegt wird; außerdem erlangen dadurch verschiedene Ektodermbereiche Kompetenzen, unterschiedlich auf spätere Signale zu antworten. Während des Gastrula-Stadiums müssen BMP-Level am Rand der Neuralplatte für deren Lagefixierung und mediolaterale Musterung reguliert werden; dies geht einher mit der dorsoventralen Musterung darunter liegenden Mesoderms (Quelle u.a. von HH-Signalen). Am Übergang vom Gastrula- zum Neurula-Stadium müssen BMP-Signale innerhalb der Neuralplatte für die Expression von *sox2*

unterdrückt werden, wobei offenbar keine BMP-Antagonisten als extrazelluläre Signalmoleküle beteiligt sind, sondern wahrscheinlich intrazelluläre TFs. Zahlreiche regulatorische Sequenzelemente steuern die zeitliche und gewebsspezifische Expression des *sox2*-Gens, wobei zwei Elemente die frühe *sox2*-Expression in der Neuralplatte kontrollieren und viele konservierte TF-Bindestellen enthalten. Diese stellen möglicherweise die direkten transkriptionellen Ziele von bisher unbekanntem instruktiven neuronalen Induktionssignalen dar (Stern, 2005; Uchikawa et al., 2003; Kida et al., 2004).

1.3 Regionalisierung der Gehirnanlage

Das konzertierte Zusammenspiel morphogenetischer Signale bestimmt die regionale Organisation des sich entwickelnden Nervensystems. Bereits während der neuronalen Induktion wird die anteroposteriore Polarität des Neuroektoderms spezifiziert. Im Verlauf der Gastrulation, der Unterteilung des Embryos in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, regulieren vertikale und planare Signale aus primären Organisator-Regionen (Spemann-Organisator, perineurales Ektoderm, axiales Mesoderm, ventrales Endoderm und möglicherweise andere) in kombinatorischer Weise die Etablierung der anteroposterioren sowie mediolateralen Polarität der entstehenden Neuralplatte (Stern, 2001 und 2005).

Neurulation bezeichnet den Ablauf morphogenetischer Bewegungen, wodurch aus der Neuralplatte über die Zwischenstadien Neuralkiel und Neuralstab die Neuralröhre entsteht. Die Neurulation des Zebrafischs folgt hierbei mit geringen Abweichungen dem Schema der klassischen primären Neurulation (Lowery und Shive, 2004).

Die mediolateralen Koordinaten der Neuralplatte entsprechen schließlich den dorsoventralen Koordinaten der Neuralröhre (Tanabe und Jessel, 1996). Deren dorsoventrale Achse wird durch die antagonistische Wechselwirkung zwischen dorsalisierenden Faktoren – BMP-Signale aus dem nicht-neuralen Ektoderm (Lee und Jessel, 1999) – und ventralisierenden Faktoren – SHH (*Sonic hedgehog*)-Signale aus dem Notochord (Abkömmling mesodermalen Gewebes) und später aus der ventralen Mittellinie der Neuralröhre selbst – festgelegt (Echelard et al., 1993; Krauss et al., 1993; Roelink et al., 1995). Die Neuralröhre kann in vier longitudinal verlaufende Domänen mit unterschiedlichen morphologischen und molekularen Eigenschaften gegliedert werden: ventral die Bodenplatte (gekennzeichnet durch *shh*-Expression), gefolgt von Basal- und Alarplatte (Grenzverlauf markiert durch

Expression des TF Nkx2.2) und dorsal die Firstplatte (*bmp*- und *wnt1*-Expression) (Kuhlenbeck, 1973; Puelles und Rubenstein, 1993; Barth und Wilson, 1995; Shimamura et al., 1995). Als Quelle morphogenetischer Signale fungieren First- und Bodenplatte im weiteren Entwicklungsverlauf als sekundäre Organisationszentren für die dorsoventrale Musterung der Neuralröhre (Jessell und Sanes, 2000; Chizhikov und Millen, 2004; Strähle et al., 2004).

Entlang der anteroposterioren Achse erfolgt zunächst die Spezifikation in Abschnitte des zukünftigen Gehirns und Rückenmarks. Die Gehirnanlage gliedert sich anschließend weiter auf in Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Nachhirn). Signale aus weiteren sekundären Organisationszentren etablieren und verfeinern die anteroposteriore Regionalisierung der Gehirnanlage (Abb. 2). Die bisher am besten charakterisierten Signalzentren sind die ANB (*anterior neural border*; Shimamura und Rubenstein, 1997), die ZLI (*Zona limitans intrathalamica*; Shimamura et al., 1995) und die MHB (*midbrain hindbrain boundary* = Isthmusorganisator; Brand et al., 1996). Die ANB liegt am anterioren Pol zwischen epidermalem Ektoderm und Prosencephalon, sendet u.a. FGF-Signale und spielt eine wichtige Rolle bei der Regionalisierung des anterioren Prosencephalons (= Telencephalon) (Rubenstein et al., 1998; Shanmugalingam et al., 2000). Die ZLI exprimiert wie die Bodenplatte *shh* und trennt im posterioren Prosencephalon (= Diencephalon) den ventralen vom dorsalen Thalamus (Kuhlenbeck, 1937; Figdor und Stern, 1993). Das sich posterior an das Diencephalon anschließende Mesencephalon wird vom Rhombencephalon durch die MHB getrennt. Die MHB ist die Quelle von FGF- und WNT-Signalen und trägt wesentlich zur Musterung dieses Neuroektodermbereichs bei (Joyner et al., 2000; Wurst und Bally-Cuif, 2001).

Sekundäre Organisator-Regionen als Signalzentren vermitteln also nach der Gastrulation die Regionalisierung entlang der rostrokaudalen Achse zur Strukturierung anteriorer Bereiche der Gehirnanlage. Die von ihnen ausgehenden morphogenetischen Signale beeinflussen maßgeblich Schicksal und Identität neuroepithelialer Zellen (Echevarría et al., 2003).

Neurale Vorläuferzellen antworten auf abgestufte induktive Signale der an der frühen Regionalisierung beteiligten Morphogene, indem sie die spezifische Konzentration der Signale in eine gemusterte Expression von TFs übersetzen (Gurdon und Bourillot, 2001). Basierend auf morphologischen Merkmalen und regionspezifischen Expressionsmustern von TFs wurde das „Prosomer-Modell“ entwickelt, welches einen metameren Grundplan der Gehirnanlage beschreibt (Rubenstein et al., 1994; Puelles und Rubenstein, 2003).

Noch wichtiger war die Feststellung, dass bestimmte TFs entscheidend die regionale Identität von Unterabschnitten der Gehirnanlage bestimmen und die Bildung sekundärer Organisator-Regionen veranlassen (siehe Abb. 2). Die Musterung der vorderen Neuralplatte erfolgt in einem mehrstufigen Prozess: In der frühen Neuralplatte induzieren primäre Morphogensignale die Expression der TFs *Six3* im anterioren und *Irx3* im posterioren Prosencephalon. Die gegenseitige Repression beider Faktoren positioniert eine Grenze im Diencephalon, die spätere ZLI (Kobayashi et al., 2002). Zwei analoge Prozesse führen zur Bildung weiterer Grenzgebiete in der Gehirnanlage: Die wechselseitige Hemmung zwischen *Otx2* und *Gbx2* führt zur Bildung der MHB (Broccoli et al., 1999; Millet et al., 1999; Katahira et al., 2000) und zwischen *Pax6* und *Pax2* bzw. *En1* der DMB (*diencephalic mesencephalic boundary*) (Matsunaga et al., 2000).

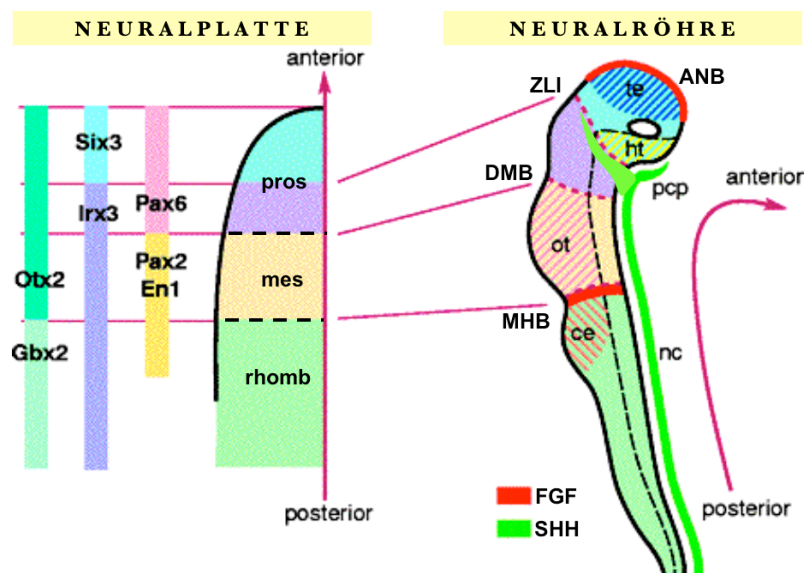


Abb. 2: Induktion kombinatorischer TF-Expressionsmuster zur Regionalisierung der anterioren Neuralplatte in diskrete Unterbezirke und Etablierung sekundärer Signalzentren in der Gehirnanlage (ANB: anterior neural border; DMB: di-/mesencephalic boundary; MHB: midbrain hindbrain boundary; ZLI: Zona limitans intrathalamica). ce, Cerebellum; FGF, fibroblast growth factor; ht, Hypothalamus; mes, Mesencephalon; nc, Notochord; ot, Tectum opticum; pcp, Prächordalplatte; pros, Prosencephalon; rhomb, Rhombencephalon; SHH, sonic hedgehog; te, Telencephalon) (nach Kobayashi et al., 2002; verändert).

Die drei antagonistischen Systeme operieren unabhängig voneinander und definieren abgegrenzte Bezirke entlang der anteroposterioren Neuralplatte, wobei jeder Bezirk eine charakteristische TF-Signatur erhält. Alle beteiligten TFs verfügen über Homeodomänen zur Bindung genregulatorischer DNA. Durch diesen Prozess erlangen die jeweiligen Bezirke Kompetenzen, unterschiedlich auf sekundäre induktive Signale zu reagieren, wodurch eine Verfeinerung der Regionalisierung im weiteren Entwicklungsverlauf ermöglicht wird (Kobayashi et al., 2002)

1.4 Proneurale Gene verbinden Musterbildung und Neurogenese

In Vertebraten steuert der Ablauf der Neurogenese die korrekte Position, Anzahl, Verbindung und physiologischen Eigenschaften Tausender unterschiedlicher Neurone. Der nächste Schritt in der neuralen Entwicklung besteht also in der Entscheidung, wann und wo aus undifferenzierten neuralen Vorläuferzellen spezialisierte Neurone hervorgehen. In niederen Vertebratenspezies (Anamniota, z.B. Frosch und Fisch) beginnt die Neurogenese bereits im frühen Neuralplattenstadium (primäre Neurogenese), wohingegen in Säugetieren (Amniota, z.B. Maus und Mensch) die ersten postmitotischen Neurone erst nach Abschluss der Neurulation gebildet werden (sekundäre Neurogenese). Neurogene Prozesse in der Neuralplatte von Anamniota sind vergleichbar mit jenen in Imaginalscheiben der Taufliege *Drosophila melanogaster*, und offenbar wurden viele molekulare Mechanismen zur Kontrolle der Neurogenese während der Evolution bewahrt (Bertrand et al., 2002; Chitnis, 1999; Hassan und Bellen, 2000).

Bereiche im Neuroektoderm, in denen Neurogenese stattfindet, werden als neurogene Regionen bezeichnet und durch die Expression von Genen mit „proneuraler Aktivität“ (proneurale Faktoren) angezeigt, welche die Bildung von Neuronen fördern. Proneurale Faktoren bilden eine Familie gewebsspezifischer TFs, die ein zusammengesetztes *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Motiv enthalten, wobei die *basic*-Domäne DNA kontaktiert und die *helix-loop-helix*-Domäne ubiquitäre bHLH-Partner (E-Proteine) rekrutiert. Heterodimere aus proneuralen und E-Proteinen binden an E-Box-Motive in genregulatorischer DNA (Konsensussequenz CANNTG) und steuern so die Transkription ihrer neuronalen Zielgene. Proneurale Faktoren sind notwendig und ausreichend für die Entwicklung von Neuronen. Die ektopische Expression einzelner Familienmitglieder ist ausreichend, um naive neurale Zellen des Neuroektoderms in differenzierte Neurone umzuwandeln. (Lee et al., 1995; Ma et al., 1996; Takebayashi et al., 1997). Darüberhinaus konnten Experimente in der Maus (*Mus musculus*) und *Drosophila* zeigen, dass das Fehlen eines proneuralen Gens, oder zweier redundanter proneuraler Gene, die Entwicklung bestimmter neuronaler Vorläufer und differenzierter Neurone verhindert (Jarman et al., 1993; Ma et al., 1998; Fode et al., 2000; Inoue et al., 2002). Proneurale Faktoren gehören somit zu den entscheidenden Regulatoren neuronaler Determinierung und Differenzierung.

Sehr gut verstanden ist die Funktion proneuraler Faktoren in *Drosophila*. Im Neuroektoderm des künftigen peripheren Nervensystems der Taufliege befinden sich als „proneurale

Cluster“ (PNC) bezeichnete Zellgruppen, in denen sich durch einen Aussonderungsprozess, den Mechanismus der lateralen Inhibition, einzelne Vorläuferzellen (Neuroblasten) zu Neuronen entwickeln (Artavanis-Tsakonas et al., 1990). PNCs sind charakterisiert durch die Expression proneuraler Gene wie z.B. *achaete-scute* und *atonal*, die transkriptionelle Aktivatoren der bHLH-Proteinfamilie codieren und für die Entwicklung sensorischer Neuronensubtypen nötig sind (Campuzano und Modolell, 1992; Jarman et al., 1993). Die Selektion eines einzelnen Neuroblasten im PNC erfolgt durch laterale Inhibition, vermittelt durch das Delta/Notch-Signalsystem (= Notch-Signalweg): Im zukünftigen Neuroblast regulieren proneurale Faktoren sowohl ihre eigene, als auch die Expression des in der Zellmembran verankerten Notch-Rezeptorliganden Delta. Vermehrte Delta-Expression aktiviert den Notch-Rezeptor benachbarter Zellen, was eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst und zur Inhibition der Expression proneuraler Faktoren in den Nachbarzellen führt (Artavanis-Tsakonas et al., 1990). Als Resultat nehmen bis auf den Neuroblasten alle benachbarten Zellen schließlich ein epidermales (nicht-neurales) Schicksal an. Vermittler der neuralen Inhibition sind transkriptionelle Repressoren (ebenfalls bHLH-Proteine), die der *Enhancer of split [E(spl)]*-Genkomplex codiert. Mit der Aktivierung durch Delta wird die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors abgespalten. Die intrazelluläre Notch-Domäne ist ein TF, transloziert in den Nukleus und aktiviert zusammen mit Kofaktoren (u.a. Suppressor of hairless, [Su(H)] aus der CSL-Proteinfamilie) die Expression anti-neuraler E(spl)-Faktoren, welche mit Beteiligung des Korepressors Groucho sowohl die Transkription proneuraler Aktivatoren als auch Expression von Delta selbst inhibieren. Dadurch erhält der künftige Neuroblast noch weniger (neural hemmende) Delta-Signale, was die Expression proneuraler Faktoren weiter stabilisiert. Gleichzeitig erhöht der Neuroblast die Delta-Expression, wodurch benachbarte Zellen wiederum mehr hemmende Signale empfangen. Dieser Rückkopplungseffekt verstärkt den anfänglich geringen Unterschied an Delta-Expression zwischen den beteiligten Zellen (Heitzler et al., 1996). Das Delta/Notch-System repräsentiert also ein Grundprinzip biologischer Musterbildung: Laterale Inhibition schafft Sieger und Verlierer. Dennoch erlaubt die Regulation der Aktivität und Präsenz von Ligand bzw. Rezeptor eine Modulation der zeitlichen und räumlichen Aktivität sowie Sensitivität des Notch-Signalwegs. Dies schließt Möglichkeiten zur Integration von Einflüssen anderer Signalwege ein, z.B. des WNT-Signalwegs (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Axelrod et al., 1996; Romain et al., 2001; Ilagan und Kopan, 2007).

Neurogene Musterungsprozesse in der Neuralplatte niederer Vertebraten zeigen eine starke Ähnlichkeit zu denjenigen in *Drosophila*. Wie in der Taufliege markiert im Zebrafisch die Expression proneuraler Gene Regionen neuraler Vorläuferzellen, aus denen definierte Neuronen durch laterale Inhibition hervorgehen. Überdies sind die daran beteiligten Faktoren zueinander homolog: Beispielsweise ist das proneurale Gen *neurog1* des Zebrafischs eng mit dem proneuralen *Drosophila*-Gen *atonal* verwandt und codiert einen TF der bHLH-Familie. Im posterioren Bereich der Neuralplatte ist *neurog1* in drei longitudinalen Streifen, einem medialen und zwei flankierenden lateralen, exprimiert und kennzeichnet Bereiche, in denen später jeweils primäre Motor- und Interneurone sowie sensorische Neurone entstehen. Innerhalb proneuraler Domänen werden die zukünftigen Neurone durch das Delta/Notch-System selektiert: *neurog1*-exprimierende Zellen exprimieren gleichzeitig den Notch-Liganden Delta (sowie andere paraloge Proteine, z.B. Serrate), der in Nachbarzellen der Notch-Signalweg aktiviert, welcher zur Expression anti-neuraler transkriptioneller Repressoren führt, der sog. Her-Faktoren (*Hairy and Enhancer of split-related*). Diese bHLH-Proteine sind zu den hairy/E(spl)-Faktoren in *Drosophila* homolog, inhibieren teilweise direkt und unter Beteiligung Groucho-verwandter Korepressoren die Transkription proneuraler Gene und damit die Neurogenese (Ma et al., 1996; Chitnis und Kintner; 1996; Blader et al., 1997; Haddon et al., 1998; Appel und Eisen, 1998; Takke et al., 1999; Hans et al., 2004).

Proneurale Domänen werden durch inter-proneuralen Domänen voneinander getrennt, welche keine proneuralen Gene exprimieren und in denen keine Neurogenese stattfindet. Im Gegensatz zu proneuralen Domänen ist die Unterdrückung der neurogenen Entwicklung in inter-proneuralen Domänen nicht vom Notch-Signalweg abhängig, sowohl in *Drosophila*, als auch in Vertebraten. In *Drosophila* ist das anti-neurale Gen *hairy* für die Unterdrückung der Neurogenese im Bereich zwischen proneuralen Domänen zuständig. Dabei wird die Expression von *hairy* durch einen Antagonismus von HH- und DPP (*decapentaplegic* = BMP-Homolog)-Signalen reguliert, welcher die nötige räumliche Positionsinformation erzeugt (Orenic et al., 1993; Kwon et al., 2004). Ähnliche Funktionen erfüllen *hairy*-verwandte Faktoren in Vertebraten: Im Zebrafisch hemmen Her3 und Her9 BMP-abhängig proneurale Genaktivität in inter-proneuralen Domänen, Hes1 verhindert die Neurogenese im zukünftigen Riechepithel der Maus, und im Frosch *Xenopus* schützt die (wahrscheinlich von maternalen Faktoren gesteuerte) Expression von *ESR6e* künftige Epidermiszellen vor einem neuronalen Schicksal (Bae et al., 2005; Cau et al., 2000; Chalmers et al., 2002). Im Zebrafisch

zeigt auch der Bereich der MHB, ein sekundäres Signalzentrum in der anterioren Neuralplatte, anti-neurale Genaktivität. Hier hindert Her5 Zellen an der Beendigung des Zellzyklus, wirkt somit proliferativ, hemmt gleichzeitig proneurale Genaktivität und inhibiert damit die neurale Determination, ohne jedoch auf Musterungsprozesse Einfluss zu nehmen. Vielmehr integriert Her5 lokale Musterungsinformationen zur Unterdrückung der Neurogenese (Geling et al., 2003).

Die genannten Beispiele belegen die Konservierung von Mechanismen zur Musterung neurogener Bereiche und verdeutlichen, dass die Expressionsdomänen proneuraler Gene bereits im Neuralplattenstadium (oder früher) durch die Aktivität anti-neuraler Gene unabhängig von lateraler Inhibition etabliert werden. Anti-neurale Faktoren stehen unter dem Einfluss von Musterungssignalen aus primären und sekundären Organisatorzentren und übersetzen diese Informationen in eine lokale Kontrolle der Neurogenese und Proliferation. In diesem Sinne agieren anti-neurale bHLH-Proteine als sogenannte „Vormusterungs-Faktoren“ (*pre-pattern factors*) zur Inhibition der Expression ihrer proneuralen bHLH-Familienmitglieder. Neben anti-neuralen bHLH-Faktoren sind TFs mit anderen DNA-bindenden Proteindomänen an der Regulation proneuraler Gene beteiligt. In *Xenopus* wurde Zic2, ein unter der Kontrolle des SHH-Signalwegs stehender TF mit DNA-bindender *zink finger*-Domäne, als potentieller Vormusterungs-Faktor und Repressor proneuraler Genexpression identifiziert (Brewster et al., 1998).

Proneurale Faktoren stehen an der Schnittstelle von extrinsischen (extrazellulären) und intrinsischen (zell-autonomen) Signalen, welche die Neurogenese antreiben (Edlund und Jessell, 1999). Wie bereits im Abschnitt über Regionalisierungsmechanismen erläutert, veranlassen extrinsische Signale die domänenspezifische kombinatorische Expression von TFs (Six3 / Irx3, Otx2 / Gbx2, Pax6 / Pax2 oder En1), welche die anteroposteriore Musterung der Gehirnanlage in unterschiedlich kompetente Unterbezirke arrangieren und den in diesen Bezirken lokalisierten neuronalen Vorläufern regionale Identität verleiht. Die molekulare Kontrolle zur Spezifikation von Neuronensubtypen wurde nicht nur in der Gehirnanlage, sondern schon früher in der Rückenmarkanlage der Maus detailliert untersucht, wo spezifische Subtypen aus einer Population proliferierender neuraler Vorläuferzellen hervorgehen, abhängig von ihrer dorsoventralen Position in der Neuralröhre (Vorläufer-Domäne, *progenitor domain*). In Abhängigkeit von und als Antwort auf abgestufte extrinsische Signale (SHH) wird hier, analog zur Gehirnanlage, jede Domäne definiert und charakterisiert durch die paarweise Repression bzw. kombinatorische Expression von Homeodomänen (HD)-TFs (Vorläufer-Faktoren, u. a. Nkx2 / Pax6, Olig2 /

Irx3, Nkx6 / Dbx1), die für die Entwicklung bestimmter neuronaler Subtypen verantwortlich sind. Diese Ergebnisse führten zur Hypothese, dass ein „Homeodomain-Code“ die Identität von Vorläuferzellen definiert (Briscoe et al., 2000). Ein Modell zur Determination des Zellschicksals besagt, dass die jeweilige Kombination an Vorläufer-Faktoren bestimmt, welche stromabwärts gelegenen Gene „de-reprimiert“ werden und als Effektoren der jeweiligen weiteren neuronalen Entwicklung fungieren. Im Szenario einer transkriptionellen Kaskade kontrollieren diese Effektoren dann als „Determinanten“ alle Aspekte der Zellidentität sowie die Expression von Genen, die ihrerseits nur spezielle Bereiche des Identitätsspektrums (wie Zellmigration, Morphologie, Wegfindung wachsender Axone, Neurotransmitter-Phänotyp) regulieren (Lee und Pfaff, 2001).

Proneurale bHLH-Proteine kommen als Vermittler zwischen regionalen Spezifikationsprozessen einerseits und neuronalen Diversifikationsmechanismen andererseits durchaus in Betracht. Tatsächlich regulieren einige Vorläufer-Faktoren nicht nur Differenzierungsprozesse, sondern auch Mechanismen der neuronalen Determination: Pax6 wird benötigt zur Aktivierung der proneuralen Gene *ngn2* in der Maus und *neurog1* im Zebrafisch (Scardigli et al., 2001; Blader et al., 2004). Faktoren der *iroquois*-Familie, deren Mitglieder in *Drosophila* an der Positionierung proneuraler Genexpression in Imaginalscheiben beteiligt sind, übernehmen ähnliche Rollen im Neuroepithel von Vertebraten: Xiro3 (Irx3-Homolog) unterdrückt beispielsweise die neuronale Differenzierung in *Xenopus* (Bellefroid et al., 1998; Cheng et al., 2001; Gomez-Skarmeta et al., 1998; Itho et al., 2002; Wang et al., 2001). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung früh exprimierter und regionale Identität verleihender Homeodomänen-TFs als intrinsische Vorläufer-Faktoren für die Vormusterung neuraler Bezirke und die Regulation proneuraler Genaktivität. Für Pax6 und Her5 konnte außerdem gezeigt werden, dass sie das proneurale Gen *neurog1* im Zebrafisch direkt regulieren, d.h. als TFs aktivieren bzw. inhibieren sie die Transkription von *neurog1* durch physische Interaktion mit dessen genregulatorischen Sequenzen (Geling et al., 2004; Blader et al., 2004).

Mit der Expression proneuraler Gene hat die Vorläuferzelle ein neuronales Schicksal angenommen, sie ist also determiniert. In Zuge dessen wird die Zelle mit allgemeinen neuronalen Merkmalen ausgestattet, wozu proneurale Faktoren einen notwendigen Satz an Zielgenen aktivieren, der zur Modifikation des Zellmetabolismus, Neuordnung der Zytoskelettarchitektur und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt. Die Expression eines gemeinsamen Kernsatzes an Genen verändert die grundlegende Beschaffenheit der

Vorläuferzelle und treibt die Annahme neuronaler Charakteristika an. Dieser Prozess beinhaltet ebenfalls die Autoregulation proneuraler Gene und die Expression neuronal-spezifischer Gene, wodurch die Differenzierung neuronaler Subtypen gefördert wird (Mattar et al., 2004; zur Lage et al., 2004; Reeves und Posakony, 2005).

Proneurale Faktoren sind somit entscheidend an Mechanismen zur Erzeugung neuronaler Diversität beteiligt: In der Maus z.B. reguliert die kreuzinhibitorische Aktivität der proneuralen Gene *ngn1*, *mash1* (*achaete-scute*-Homolog) und *math1* (*atonal*-Homolog) – sozusagen ein „bHLH-Code“ – die Spezifikation ihrer Expressionsdomänen sowie die Identitäten diverser dorsaler Interneurone (Gowan et al., 2001). Eine funktionelle Redundanz wurde für verschiedene proneurale Faktoren ebenfalls gezeigt. Beispielsweise regulieren im Zebrafisch *ash1a* und *neurog1* jeweils unabhängig die Entwicklung von Epihyssenuronen (Cau und Wilson, 2003). Außerdem spezifizieren *Mash1* und *Math3* in redundanter Weise neuronale Schicksale sowohl in Nachhirnneuronen als auch in retinalen Bipolarzellen der Maus (Tomita et al., 2000). Jedoch können proneurale Faktoren einander nicht immer funktionell ersetzen und erfüllen damit eigenständige Funktionen. Wird z.B. die proteincodierende Sequenz von *Ngn2* mit derjenigen von *Mash1* vertauscht, dann nehmen Neuronen im dorsalen Telencephalon ventrale Merkmale an, und Motoneuronen in der Rückenmarkanlage werden zu Interneuronen umprogrammiert (Fode et al., 2000; Parras et al., 2002).

Es gibt zwei grundlegende Modelle, wie eine limitierte Zahl an proneuralen Faktoren Hunderte neuronale Subtypen erzeugen kann. Dieses Phänomen wird damit erklärt, dass einerseits sequenzspezifische Unterschiede, andererseits regionale Determinanten die selektive Aktivierung von Zielgenen durch proneurale Faktoren bestimmt.

Zumindest einige Aspekte der funktionalen Vielfältigkeit proneurale Proteine liegt in ihrer Aminosäuresequenz begründet, da z.B. die Überexpression von *Mash1* die Bildung anderer neuronaler Zelltypen fördert als *Math1*, wobei strukturelle Unterschiede in der HLH-Proteindomäne für diese funktionellen Differenzen benötigt werden (Nakada et al., 2004). In *Drosophila* ist die Abweichung von sieben Aminosäuren in der *basic*-Proteindomäne zwischen *atonal* und *scute* für die selektive Genexpression im Chondrotonalorgan durch *atonal* besonders wichtig (Chien et al., 1996). Interessanterweise ist keiner der differierenden Aminosäurereste zur Bindung regulatorischer DNA in Zielgenen notwendig, weshalb vermutet wird, dass Kofaktoren als regionale Determinanten und Interaktionspartner proneuraler Faktoren eine wichtige Rolle bei der Generierung von Neuronensubtypen übernehmen. Die Kooperation mit Kofaktoren erhöht demnach die

Bindungsspezifität proneuraler TFs an ihre Ziel-DNA. Mash1 und Math3 interagieren z.B. mit dem HD-Protein Chx10 bei der Bildung bipolarer Zellen in der Retina (Hatakeyama et al., 2001). Schon früher wurde ein „LIM-Code“ vorgeschlagen, wobei Kombinationen aus hetero- und/oder homomeren Komplexen verschiedener LIM-HD-Proteine die Differenzierung spezifischer Motoneurone beeinflussen (Jurata et al., 1998). Eine synergistische Kooperation zwischen LIM-HD-Komplexen und proneuralen bHLH-Faktoren (Math3 und Ngn2) zur transkriptionellen Aktivierung des Gens *Hb9*, welches differenzierte Motoneurone markiert, ist hierbei entscheidend. (Lee und Pfaff, 2003).

Die beiden letztgenannten Beispiele konnten zwar eine funktionelle, aber keine physische Interaktion beider TF-Klassen nachweisen. Umgekehrt wurde zwar die physische Interaktion einer Reihe proneuraler Faktoren z.B. in *Xenopus* mit dem HD-Protein Six3 gezeigt, der funktionelle Zusammenhang jedoch nicht untersucht (Tessmar et al., 2002).

Neuronale Diversität wird also durch Mechanismen erzeugt, die abhängig sind von strukturellen Differenzen proneuraler Faktoren untereinander und deren Interaktion mit regionalen Determinanten. In einem Modell, das beide Voraussetzungen verbindet, wird angenommen, dass die strukturellen Differenzen verschiedener bHLH-Familienmitglieder zu deren funktionaler Diversität beitragen, aber die jeweiligen Mitglieder besonders auf regionale Signale angewiesen sind, um bestimmte Zellschicksale zu determinieren. Die Erzeugung neuronaler Vielfältigkeit benötigt somit die Integration struktureller Unterschiede und Musterungsinformationen. Die je nach zellulärem bzw. genetischem Kontext vorhandenen Kofaktoren stabilisieren hierbei möglicherweise die Interaktion von bHLH-Faktoren mit genregulatorischer DNA zur transkriptionellen Kontrolle der Expression ihrer Zielgene (Kiefer, 2005).

1.5 Regulation der Genexpression

Eukaryotische Gene enthalten verschiedene regulatorische DNA-Bereiche zur Steuerung ihrer Expression durch Bindung von Transkriptionsfaktoren (TFs). Der Minimalpromotor eines Gens umfasst den Sequenzbereich, der sich stromaufwärts des ersten Triplets proteincodierender DNA befindet und Motive enthält, welche zum Aufbau eines Proteinkomplexes für die Initiation der RNA-Synthese nötig sind (allgemeine Promotorelemente: z.B. Transkriptionsstartstelle und TATA-Box). Unmittelbar stromaufwärts oder stromabwärts davon befinden sich weitere Promotorelemente zur Bindung aktivierender und

reprimierender TFs (regulatorische oder proximale Promotorelemente, z.B. *upstream activator sequences*, UAS) (Butler und Kadonga, 2002).

Im Gegensatz zu Protisten, in denen Promotorelemente im allgemeinen ausreichend sind für eine geregelte Genexpression, enthalten die Gene in Metazoen zusätzlich höchst strukturierte regulatorische DNA-Elemente, die komplexe Genexpressionsmuster in vielen verschiedenen Zelltypen oder Geweben während der Entwicklung steuern, sogenannte *cis*-regulatorische Elemente oder Module (CREs / CRMs) (Davidson et al., 2001; Levine und Tijan, 2003).

CREs interagieren mit Promotorelementen und können so die Expression von Genen verstärken (*Enhancer*) oder vermindern (*Silencer*) (Banerji et al., 1981; Brand et al., 1985; Seipel et al., 1992). Andere CREs begrenzen die Interaktion von Enhancern bzw. Silencern mit Promotoren, damit die Expression benachbarter Gene nicht beeinflusst wird (Insulatoren, *insulators*, auch *boundary elements* genannt) (Kellum und Schedl, 1991; Dillon und Sabbattini, 2000; Bell et al., 2001). Daneben wurden CREs identifiziert, die die Aktivität von Insulatoren inhibieren (Burgess-Beusse et al., 2002; Zhou und Levine, 1999). Im proximalen Promotorbereich befinden sich zudem Bereiche zur Bindung von TFs, die nicht immer als klassische Aktivatoren oder Repressoren der Genexpression fungieren, sondern für die selektive Rekrutierung von Enhancern zum Minimalpromotor zuständig sind, weshalb Elemente dieser Art als Abfang- oder „Lasso“-Elemente (*tethering elements*) bezeichnet werden (Calhoun et al., 2002). Außerdem existieren „verborgene“ Promotoren (*cryptic promoters*), die nur dann die Transkription initiieren, wenn sie in einen anderen genomischen Kontext gelangen, entweder experimentell, durch Translokation oder induktive Signale, welche die Zellidentität verändern. In diesem Zusammenhang wurde erst kürzlich über eine neue Klasse von Elementen berichtet, sogenannte *transcription balancing sequences*, die entscheidend an der Regulation großer Genkomplexe beteiligt sind und das Zellschicksal beeinflussen (Carvajal und Rigby, 2008).

Ein klassischer Enhancer ist ein kompaktes Element von etwa 200-800 bp Länge und reguliert die Transkription unabhängig von seiner Position und Orientierung (Banerji et al., 1981). Enhancer können viele TF-Bindestellen enthalten, welche gewöhnlich 6-15 bp lang sind (Davidson et al., 2001). Enhancer können über 1 Mbp stromauf- oder abwärts der Transkriptionsstartstelle des von ihm regulierten Gens entfernt liegen. Die Regulierung der Genaktivität über weite Distanzen spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von Morphogenen und wichtigen Kontrollgenen (Selektorgenen) der Entwicklung mit komplexen Expressionsmustern (z.B. *Bmp5*, *Shh* oder *Pax6*), wobei die Enhancer eines Gens sich auch in den Introns benachbarter Gene befinden können, ohne mit deren Expression zu

interferieren. Überdies können Störungen dieser fein abgestimmten Mechanismen Krankheiten verursachen (Mann und Carroll, 2002; Pfeifer et al., 1999; DiLeone et al., 1998; Lettice et al., 2002; Kleinjan et al., 2001; Kleinjan und van Heyningen, 2005).

Die Fähigkeit von Enhancern, mit dem Promotor zu interagieren und die Genaktivität zu modulieren, ist entscheidend davon abhängig, welche Kofaktoren von den Enhancerbindenden TFs rekrutiert werden. Einige Kofaktoren, beispielsweise p300/CBP, besitzen Histonacetylase (HAT)-Aktivität zur Öffnung kondensierten Chromatins und befähigen so TF zur sequenzspezifischen Bindung regulatorischer DNA (Ogryzko et al., 1996). Andere Kofaktoren, z.B. das Adaptorprotein TLE/Groucho, interagieren sowohl mit anti-neuralen bHLH- und Homeodomänen-TFs, als auch mit Histondeacytelasen (HDACs), welche eine kondensierte Chromatinstruktur am Enhancer etablieren und somit die Bindung aktivierender TFs hemmen. Koaktivatoren und Korepressoren können so einerseits durch ihre Interaktion mit sequenzspezifischen TFs, andererseits auch durch Konkurrenz untereinander – moduliert von ex- oder intrinsischen Signalen – einfache AN-AUS-Mechanismen während der Entwicklung generieren (Mannervik et al., 1999; Lee und Pfaff, 2001; Jepsen und Rosenfeld, 2002). Viele Faktoren, die die Chromatin- und Histonstruktur beeinflussen, regulieren die Transkribierbarkeit von Genen nicht nur durch Acetylierung, sondern auch durch Methylierung und Ubiquitinierung von Histonen. Die Kombination spezifischer epigenetischer Histonmodifikationen zur Steuerung der Transkription eines Gens wird üblicherweise als „Histon-Code“ bezeichnet (Berger, 2002; Cho et al., 2004; Egger et al., 2004; Jenuwein und Allis, 2001; Turner, 2002).

Studien in *Drosophila* zeigen, dass Enhancer die Entwicklung steuern, indem sie als molekulare „Computer“ das Zellschicksal kontrollieren. In den Kombinationen aus sowohl aktivierenden als auch reprimierenden TFs, die regionale Kompetenzbezirke im Neuroektoderm markieren, sind sowohl Qualität als auch Quantität der sie erzeugenden extrinsischen Signale codiert. Dieser Code wird von Enhancern dechiffriert und in regionsspezifische Expressionsmuster ihrer jeweils zugehörigen Gene übersetzt (Ghazi und VijayRaghavan, 2000). Extrinsische Signale bzw. in TF-Codes übersetzte intrinsische Signale stellen den jeweiligen Kontext bereit, der kontinuierlich vom Zielgen-Enhancer abgetastet wird, wobei der Enhancer als Information verarbeitender Apparat (Computer) eintreffende Informationen (Inputs) sortiert und diese zu einem eindeutigen ausgehenden Befehl (Output) verarbeitet, der die basale Transkriptionsmaschinerie am Promotor instruiert, das Gen an- oder auszuschalten. Ein gegebender Enhancer muss dabei nicht immer den selben Output zur Folge haben, da je nach (variablem) Signal und/oder Zelltyp

der gleiche Enhancer als eine Art Rheostat seinen Promotor aktivieren oder hemmen kann (Biggar und Crabtree, 2001; Rossi et al., 2000).

Jedoch werden Enhancern i.A. integrative Funktionen zugeschrieben, sodass zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Zellkern ein einziger Informationszustand von einem Enhancer repräsentiert wird, wie z.B. für den menschlichen Interferon- β (IFN- β)-Enhancer gezeigt werden konnte, der als Antwort auf eine virale Infektion die Transkription des IFN- β -Gens antreibt: Die Anwesenheit jeder TF-Bindestelle und deren präzises Arrangement innerhalb des kompakten regulatorischen Elements sind entscheidend, dass die verschiedenen regulatorischen Proteine (sequenzspezifische Aktivatoren und DNA-Konformation verändernde, architektonische Proteine) durch kooperative Interaktionen zu einem eindeutigen und wohldefinierten Nukleoproteinkomplex aneinandergesetzt werden können, dem sogenannten „Enhanceosom“ (Struhl, 2001; Thanos und Maniatis, 1995). Nur das komplett zusammengebaute Enhanceosom kann mit den einzelnen Promotorelementen gleichzeitig interagieren, sodass ein eindeutiger Output zur synergistischen Aktivierung der basalen Transkriptionsmaschinerie zustandekommen kann (Kim und Maniatis, 1997).

Studien zu Genen, welche die Entwicklung regulieren, bieten ebenfalls gute Beispiele für Enhancer als molekulare Computer. Das periodische Streifenmuster des Gens *even-skipped* (*eve*) im Blastoderm-Embryo von *Drosophila* wird erzeugt durch die Aktivität mehrerer modularer Enhancer, an welche allgemein exprimierte transkriptionelle Aktivatoren und regional verteilte Repressoren binden. Diese Enhancer interpretieren Gradienten an regulatorischen TFs und sind je nach Anwesenheit einer bestimmten Zusammenstellung dieser Faktoren aktiv oder inaktiv. Die funktionelle Autonomie der einzelnen modularen Enhancer wird dabei durch den Abstand der jeweiligen Enhancer und den limitierten Aktionsradius (< 100 bp) der beteiligten Repressoren (*short range repression*) sichergestellt. Z.B. ist der Enhancer für den zweiten Streifen (*eve stripe 2 enhancer*) nur in einem schmalen Zellstreifen aktiv, wo die Aktivatoren Bicoid und Hunchback anwesend, jedoch die Repressoren Krüppel, Giant und Sloppy-paired kaum oder gar nicht vorhanden sind. Krüppel, der den *eve stripe 2 enhancer* in zentralen Regionen des Embryos bindet und inaktiviert, interferiert dagegen nicht mit der Aktivität des benachbarten *eve stripe 3 enhancer*, weil dessen Aktivatoren mehr als 100 bp entfernt liegen. Daher wird angenommen, dass jeder Enhancer als einzelne Computereinheit funktioniert und nicht als austauschbare Zusammenstellung unabhängig agierender Elemente. Dies wird noch untermauert durch den Befund, dass die Enhancerfunktion durch Verlust einer einzigen

Aktivator- oder Repressorbindestelle stark gestört wird (Andrioli et al., 2002; Arnosti et al., 1996a/b; Fujioka et al., 1999; Small et al., 1992; Small et al., 1993; Small et al., 1996).

Die Analyse der *cis*-regulatorischen Region des Gens *endo16* im Stachelhäuter *Strongylocentrotus purpuratus* lieferte ein noch detailreicheres Bild zur Funktion von Enhancern während der Entwicklung. Hinsichtlich seines regulatorischen Codes ist *endo16* das wohl am besten verstandene Gen. Detaillierte Mutationsanalysen ergaben, dass seine Expression von einer 2,3 kbp umfassenden und stromaufwärts des Startkodons gelegenen Region kontrolliert wird, die Bindestellen für TFs enthält, welche bestimmte Funktionen erfüllen wie z.B. frühe ausgedehnte Aktivierung, späte Aktivierung, Repression des frühen Elements und Potenzierung der Repressorstellen. Die Region ist in sieben separate Module (A-G) aufgeteilt, deren Aktivitäten in bestimmter Weise kombiniert werden müssen, um einige oder alle Expressionsmuster nachzubilden. Anhand dieser Daten konnten auf Bool'schen Logikoperatoren basierende Modelle entworfen werden, die erfolgreich den Output dieser *cis*-regulatorischen Module (CRMs) simulieren und quantifizierbar machen. Modul A (proximaler Bereich) kontrolliert die initiale Expression im Endoderm des Embryo, integriert regulatorische Transaktionen durch Interaktion mit distalen Modulen und kommuniziert als einziges Modul mit dem basalen Transkriptionsapparat (BTA). Modul B kontrolliert die späte Expression im Mitteldarm. Die beiden Module enthalten zusammen 13 TF-Bindestellen, die von neun verschiedenen TFs gebunden werden, wovon allerdings nur zwei die eigentlich wichtigen Aktivatoren sind: Einerseits ein Homeodomänen-Faktor (Otx), der durch Bindung in Modul A die ausgedehnte frühe *endo16*-Expression, andererseits ein POU-Homeodomänen-Faktor, welcher die späte Mitteldarm-spezifische Expression antreibt. Diese „Treiber“ (*drivers*) stellen zeitliche und räumliche Inputs bereit, die im regulatorischen Output des relevanten CRM und im resultierenden Genexpressionsmuster reflektiert werden. Alle anderen TF bzw. Bindestellen zeigen keine Treiberaktivität, sondern modifizieren die Inputs der Treiber an den jeweiligen Enhancern auf bestimmte Weise. Es konnte gezeigt werden, dass der Empfang von Treiberinputs von den anderen codierten Funktionen abgrenzbar ist, und dass die Kombination logischer Funktionen, die von der Kombination anderer Bindestellen erfüllt werden, explizit die Input-prozessierenden Fähigkeiten des ganzen CRMs reflektieren. So ist es möglich, der funktionellen Bedeutung der raumzeitlich abhängigen Belegung von Bindestellen [*occupancy dependent on space and time, Oc(s,t)*] in CRMs verschiedene Operatorfunktionen zuzuweisen, wobei der Output eines Operators entweder den Wert 1 (Operator an) oder 0 (Operator aus) annehmen kann. Vier Kategorien von Operatoren wurden definiert: 1. transkriptionelle Aktivier-

ungsoperatoren (D-Operatoren; transkriptionelle Aktivierungsfunktion direkt vermittelt durch die Belegung von Treiberbindestellen); 2. BTA-Kontrolloperatoren (F-Operatoren; Operatorfunktionen vermittelt durch Bindestellen, welche die Interaktion mit dem BTA kontrollieren, entsprechend den intrinsischen Eigenschaften der jeweiligen Art DNA-bindender Proteine [und ihrer Kofaktoren]); 3. Operatoren der kombinatorischen Logik (G-Operatoren; Operatorfunktionen, die *qua definitionem* abhängig sind von der Beteiligung mehrerer CRM-Bindestellen, also von der kombinatorischen Interaktion von Proteinen [und ihrer Kofaktoren], die mit diesen Bindestellen interagieren); und 4. externe Kontrolloperatoren (E-Operatoren; permissive oder nicht-permissive Operatorfunktionen, vermittelt durch Bindestellen außerhalb eines CRMs). Beispiele für G-Operatoren sind UND-Operatoren (mehrere Bindestellen müssen belegt sein zur signifikanten Expression), *short range repression* (siehe oben), signalvermittelte Umschaltung (lokal präsentiertes Signal wandelt Aktivierung um in Repression oder umgekehrt, z.B. Notch-Signal), Formation von DNA-Schleifen (*DNA looping*, multimerisierende Proteine binden in verschiedenen distalen CRMs und bringen diese zusammen und somit in die Nähe des BTA) und funktionelle Modulverbindung (*module linker function*, notwendige Bindestellenbelegung für kombinierten Output zweier Module, unabhängig von physischer Assoziation). Beispiele für F-Operatoren sind CRM-Silencer (Repressorbindung verhindert BTA-Aktivierung aller CRMs), Kommunikatoren (CRM-Kommunikation mit anderen Bindestellen außerhalb nötig für BTA-Interaktion), Verstärker (z.B. Input von Modul B zum BTA verstärkt durch Stellen in Modul A, auch Beteiligung von Kommunikatoren oder *module linkers* möglich). Der Einfluss von E-Operatoren lässt sich nicht klar definieren, da dessen permissive Funktionen außerhalb eines CRMs lokalisiert sind. Trotzdem ist auch auf sie die Bool'sche Logik anwendbar. Hierzu zählen beispielsweise alternatives *DNA looping*, der Einfluss von Insulatoren und externer Silencer sowie des Chromatinstatus, wobei dieser als Funktion des epigenetischen Zellgedächtnisses auch Operatorwerte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Der integrierte Gesamt-Output eines CRMs kann als kombinatorisches Resultat der Belegung all seiner Bindestellen und der auf sie anwendbaren Operationen aufgefasst werden, wobei jedoch die zwei wichtigsten Komponenten zum Verhalten eines CRM berücksichtigt werden müssen: zum einen der Aspekt der Bedingtheit (d.h. die Abhängigkeit von der experimentellen Fragestellung und dem Entwicklungsstadium des untersuchten Organismus) und zum andern sein regulatorisches Design, welches je nach Identität und relativer Anordnung der DNA-Bindestellen zueinander sein Potenzial festlegt und damit den festverdrahteten Aspekt (repräsentiert durch die DNA-Sequenz) des genomischen

Kontrollcodes darstellt. Sechs Funktionsprinzipien lassen sich auf alle CRMs anwenden: 1. Das funktionelle Repertoire jedes CRMs ist eine konstante und auf Sequenz basierende Eigenschaft des Organismus. 2. Das spezifische Design jedes CRMs repräsentiert seine elementaren Funktionen. 3. CRMs verarbeiten ständig variierende Treiberinputs. 4. Viele CRM-Funktionen können als Bool'sche Logikoperationen beschrieben werden. 5. Die Belegung von Bindestellen durch TFs ist ursächlich für CRM-Outputs. 6. Die Konsequenzen bei Mutation einer Bindestelle und die Abwesenheit des diese Stelle bindenden Faktors sind gleich, wenn die Faktor-Bindestelle-Interaktion qualitativ eindeutig ist ($0_{cis} = 0_{trans}$) (Istrail und Davidson, 2005; Yuh et al., 1998).

Weil jedes Enhancermodul durch mehrere TFs reguliert wird und jeder TF mit mehreren Modulen interagiert, ist es möglich, von der Genexpression abhängige Entwicklungsprogramme als ineinandergreifende genregulatorische Schaltkreise bzw. Netzwerke zu repräsentieren. Auf diese Weise können die Inputs in jedes Modul dargestellt werden, sodass man sehen kann, wie ein bestimmtes Gen zeitlich und räumlich aktiviert wird. Solche genregulatorische Netzwerke (GRNs) lassen auch überprüfbare Vorhersagen über TF-Bindestellen in *cis*-regulatorischen Sequenzen zu. Die spezifischen Verbindungen in diesen Netzwerken liefern als kausale Struktur-Funktion-Beziehungen Antworten auf die Frage, wie gewisse Aspekte der Entwicklung letztendlich durch die vererbte Genomsequenz kontrolliert werden. Die Netzwerkarchitektur offenbart besondere Systemeigenschaften, welche auf anderen Analyseebenen nicht wahrgenommen können. Diese Eigenschaften beruhen auf der Verknüpfung mehrerer Gene, welche zusammen spezifische Operationen ausführen wie z.B. positive Rückkopplungsschleifen, die als stabile Schaltkreise die Zelldifferenzierung antreiben (Davidson et al., 2002; Oliveri et al., 2004; Ochoa-Espinosa et al., 2005; Levine und Davidson, 2005).

Diese Studien betonen den integrativen, computerartig verarbeitenden Charakter entwicklungsrelevanter CRMs, lassen jedoch andere Gesichtspunkte außer Acht. So gibt es Befunde, die auf die Existenz redundanter regulatorischer Sequenzen innerhalb oder in der Nachbarschaft von Enhancern hinweisen. Z.B. unterstützen nach der Deletion eines Enhancers dessen flankierende Sequenzen die gewebsspezifische Expression der Dotterproteingene *yp1* und *yp2* in *Drosophila* (Piano et al., 1999). Die Ausfallsicherheit gegen den Verlust einzelner Bindestellen in klassischen Enhancern bestätigt die Ansicht, dass diese Elemente aus redundant agierenden Sequenzen aufgebaut sind (Arnosti, 2003).

Neben Mechanismen der Redundanz spielt die Kommunikation mit dem BTA eine wichtige Rolle für den Output von Enhancern. Im Gegensatz zum Bild eines Enhancers als Information verarbeitende Einheit mit eindeutig aktivierendem oder reprimierendem Charakter, die dem BTA entweder AN- oder AUS-Befehle für die Genexpression erteilt, wurde ein Modell entwickelt, wonach Enhancer simultan sowohl aktive als auch reprimierte Zustände anzeigen, welche durch einzeln aufeinanderfolgende oder multiple gleichzeitig ablaufende Interaktionen vom BTA abgelesen und interpretiert werden. Für einen eindeutigen Output benötigen diese Art Enhancer eine exakte Stöchiometrie oder Verteilung an Aktivator- und Repressor-Bindestellen um sicherzustellen, dass alle möglichen Enhancer-Subelemente dieselbe Information bereitstellen. In diesem Fall spielt der BTA keine passive, sondern eher eine aktive Rolle bei der Deutung von Enhancersignalen. Dieses Modell liefert eine Erklärung, warum der Output entwicklungsrelevanter Enhancer trotz rasantem evolutionärem Wandel deren interner Architektur insgesamt konstant bleibt (Ludwig et al., 1998; Ludwig et al., 2000). Der einheitliche Output reflektiert hierbei den Selektionsdruck, Aktivator- und Repressorbindestellen so zu arrangieren, damit ein konsistenter Output gewährleistet wird. Obwohl Zellen zum Zweck regulatorischer Präzision i.A. Enhanceosomen verwenden, ist es nicht unwahrscheinlich, dass eukaryotische Organismen den flexiblen Enhancertyp verwenden, um Vielfältigkeit an Genexpressionsmustern sowie evolutionäre Anpassungsfähigkeit zu erlangen (Kulkarni und Arnosti, 2003).

Die in CREs lokalisierten Erkennungsstellen für TFs sind oft an vielen Positionen nicht starr festgelegt, woraus ein hoher Grad an Degeneration von Konsensus-Bindungssequenzen resultiert. Die Flexibilität im Arrangement und in der Kombination sowohl der *cis*-regulatorischer Regionen innerhalb von Genloci, als auch der TF-Bindestellen in jeweiligen CREs erschweren die Detektion regulatorischer Sequenzen (Davidson, 2001).

1.6 Evolution und Identifikation *cis*-regulatorischer Elemente

Die Evolution neuer phänotypischer Merkmale ist vor allem auf Modifikationen räumlicher Genexpressionsmuster zurückzuführen. Ein Wandel in der Expression eines bestimmten Gens kann entweder durch Änderung seiner *cis*-regulatorischen Sequenz oder durch Änderung der Verwendung und Funktion der seine Expression kontrollierenden *in trans* wirkenden TFs, oder beidem, hervorgerufen werden. Zum Verständnis der Entstehung neuer Phänotypen ist sowohl die Kenntnis der Gene nötig, welche die Merkmalsausbildung

kontrollieren, als auch die Aufklärung der *cis*- und *trans*-Modifikationen, die für Abweichungen in der Genexpression verantwortlich sind. Die molekulare Evolution *cis*-regulatorischer Elemente wird als Hauptquelle morphologischer Diversifikation angesehen, weil Mutationen in CREs Veränderungen in gewebsspezifischen Expressionsmustern produzieren können, ohne schädigende pleiotrope Effekte zu verursachen, welche durch Mutationen in *trans*-regulierenden Faktoren entstehen. Allerdings ist allgemein unklar, ob neue Merkmale vor allem aus der Modifikation schon existierender CREs oder eher aus der Erzeugung von Elementen *de novo* resultieren (Carroll et al., 2005; Davidson, 2001; Duboule und Wilkins, 1998; Stern, 2000).

Die Identifikation und Charakterisierung *cis*-regulatorischer Regionen innerhalb nicht-codierender DNA von Vertebratengenomen bleibt eine Herausforderung der post-genomischen Ära. Die Kontrolle der Entwicklung der Tiere durch CREs bzw. GRNs ist zwar in Invertebraten gut untersucht, aber in Vertebraten ist darüber wenig bekannt. Die Entschlüsselung des *cis*-regulatorischen Codes eines Netzwerks erfordert zunächst die Entdeckung all seiner konstituierenden CREs und deren genomischer Position. Im Gegensatz zur Vorhersage proteincodierender Sequenzen mit ihren charakteristischen Eigenschaften, ihrer evolutionären Konservierung in entfernt verwandten Arten sowie der Verfügbarkeit von cDNAs und ESTs, die ihre Annotation in hohem Maße vereinfachen, ist die computerbasierte Vorhersage nicht-codierender Sequenzen schwierig, weil das Wissen über deren Syntax oder Grammatik unzureichend und somit allein aufgrund der Basensequenz nicht möglich ist. Sowohl die voranschreitende Komplettierung einer stetig wachsenden Anzahl sequenzierter Vertebratengenome als auch die Entwicklung von Hilfsmitteln aus dem Bereich der Bioinformatik für den Abgleich (*alignment*), die Visualisierung und die Analyse genomischer Sequenzen ermöglicht nunmehr nicht nur genomische Vergleiche, sondern auch die Entdeckung mutmaßlicher CREs (Venter et al., 2001; Aparicio et al., 2002; Waterston et al., 2002; Gibbs et al., 2003; Wasserman und Sandelin, 2004). Spezielle, für Sequenz-Alignments entwickelte Algorithmen optimieren diese Vergleiche und beruhen auf den Grundregeln molekularer Evolution von Motoo Kimura, wonach sich funktionale Sequenzabschnitte, deren Basenabfolge sich während der Evolution nur langsam verändert (hinsichtlich Nukleotidsubstitutionen konservierte Sequenzen) von Sequenzen abgrenzen lassen, die sich ohne Selektionsdruck schneller verändern (neutrale Sequenzen) (Kimura und Ohta, 1974).

Selbst wenn solche Elemente relativ kurz in ihrer Sequenzlänge sind, sind sie von der sie umgebenden und sich schneller entwickelnden nicht-codierenden DNA unterscheidbar, vorausgesetzt, die miteinander verglichenen homologen Sequenzen repräsentieren genug evolutionäre Zeit für die Akkumulation von Mutationen an den (wahrscheinlich neutralen) Nukleotidpositionen, auf denen ein geringerer Selektionsdruck lastet. Ein evolutionär konserviertes Element präsentiert sich als ein Block zusammenhängender Basenpositionen, die invariant aus angeglichenen Sequenzen hervortreten. Insofern konservierte Elemente mit *in-trans* wirkenden Faktoren in DNase-Verdau (*DNase footprinting*)-Experimenten und Assays zur DNA-Protein-Wechselwirkung (*band shift assays*) interagieren (Collins und Weismann, 1984; Maniatis et al., 1987; Mantovani et al., 1987; Stöckert et al., 1987), bezeichnet der Begriff *phylogenetic footprinting* stammesgeschichtliche Vergleiche, um konservierte *in-cis* agierende Elemente in nicht-codierenden Regionen homologer Gene aufzuspüren (Tagle et al., 1988).

Der Konservierung nicht-codierender Sequenzen wird funktionale Bedeutung zugemessen, am wahrscheinlichsten bei der Genregulation (Hardison, 2000; Pennacchio und Rubin, 2001). Tatsächlich zeigt ein hoher Anteil experimentell validierter regulatorischer Sequenzen eine hohe Sequenzkonservierung in mehreren Vertebratenklassen. Umgekehrt markiert Sequenzkonservierung den Startpunkt für Funktionsstudien zur Aufdeckung regulatorischer Mechanismen der Genexpression (Williams et al., 1998; Griffin et al., 2002; Nobrega et al., 2003; Uchikawa et al., 2003; Kimura-Yoshida et al., 2004; Kleinjan et al., 2004).

In der komparativen Genomik muss nun zunächst die Entscheidung getroffen werden, welche Organismen für den Vergleich ausgewählt werden. Eine Reihe erfolgreicher paarweiser und mehrerer Arten umfassender Sequenzvergleiche wurde bereits zur Identifizierung neuer Enhancerelemente in Säugetiergenomen unternommen (Hardison et al., 1997; Wasserman et al., 2000; Frazer et al., 2001; Frazer et al., 2004; Dermitzakis et al., 2002; Dermitzakis et al., 2003). Unglücklicherweise und aufgrund unterschiedlicher Mutationsraten im Genom zeigen viele langsam sich entwickelnde Regionen einen bedeutenden Grad an nicht-codierender Sequenzkonservierung, der die kurze evolutionäre Distanz zwischen Säugetieren und die langsame Rate neutraler Divergenz reflektiert (Tautz, 2000). Von etwa 40 % übereinstimmender Genomsequenz zwischen Mensch und Maus unterliegen nur geschätzte 5 % einem Selektionsdruck, was die Erkennung funktionell relevanter Sequenzen sehr erschwert (Waterston et al., 2002). In einem anderen Ansatz

wurden nur solche Sequenzen betrachtet, die eine völlige Übereinstimmung über mindestens 200 bp zeigen und daher als ultrakonserviert bezeichnet werden. Etwa die Hälfte der 481 detektierten Elemente wurde als potentiell regulatorisch eingestuft (Bejerano et al., 2004). Ein sehr erfolgreicher Ansatz zur Steigerung des Auflösungsvermögens komparativer Analysen besteht im Alignment mehrerer sowohl nah als auch entfernt verwandter Arten, wobei über weite evolutionäre Distanzen hinweg auch die am langsamsten sich entwickelnde neutrale DNA ihr Gleichgewicht erreicht hat und dadurch das Signal-Hintergrund-Verhältnis in genomischen Alignments signifikant verbessert wird (Gottgens et al., 2000; Thomas et al., 2003; Gillemans et al., 2003; Chapman et al., 2004). Obwohl es nicht-codierenden Sequenzen zwischen hoch-divergenten Spezies i.A. an Sequenzkonservierung mangelt, gibt es einige Beispiele, wo der Vergleich zwischen Mensch und Kugelfisch (*Fugu rubipes*) hoch-konservierte Sequenzen identifizierte, für die eine Funktion *in-vivo* nachgewiesen werden konnte (Marshall et al., 1994; Rowitch et al., 1998; Kammandel et al., 1999; Bagheri-Fam et al., 2001; Nobrega et al., 2003; Santagati et al., 2003; Kimura-Yoshida et al., 2004). Der letzte gemeinsame Vorläufer von Mensch und Kugelfisch existierte wahrscheinlich vor etwa 450 Millionen Jahren und kann daher als Ausgangspunkt der meisten heute noch vorhandenen Vertebraten angesehen werden (Kumar und Hedges, 1998). Das Kugelfisch-Genom ist außerordentlich kompakt, wobei die intronischen und intergenischen Distanzen im Vergleich zum Mensch-Genom etwa um den Faktor 10 reduziert sind (Brenner et al., 1994). Dies impliziert, dass jede zwischen beiden Spezies konservierte nicht-codierende Sequenz wahrscheinlich für Vertebraten fundamental lebenswichtig ist. Tatsächlich sind ohne Ausnahme alle Beispiele für solche zwischen Mensch und Kugelfisch konservierten Sequenzen mit Genen von TFs assoziiert, die wichtige Aufgaben während der Entwicklung übernehmen (Bejerano et al., 2004; Boffelli et al., 2004). Daher wird angenommen, dass einige Aspekte der Entwicklungsregulation allen Vertebraten gemeinsam sind, und dass Vergleiche kompletter Genome zur Identifikation und Charakterisierung *cis*-regulatorischer DNA und deren Netzwerke sehr leistungsfähig sein können. Beispielsweise wurde eine Funktionalität für 25 zwischen Mensch und Kugelfisch hochkonservierte nicht-codierende Sequenzen nachgewiesen, welche sich im Bereich von Genen befinden, die für Entwicklungsregulatoren codieren (Woolfe et al., 2005).

Im Gegensatz zu ubiquitär exprimierten Haushaltsgenen erhalten Regulatorgene, die zu definierten Zeitpunkten, in spezifischen Geweben und genauen Expressionsleveln die Entwicklung steuern, ihre exakten Expressionsprofile durch die Aktivität mehrerer Enhancerelemente, welche alle in die jeweilige *cis*-Region eingepasst sind. Die Entstehung

oder der Verlust von CREs erfolgt hierbei nicht durch bewusstes Design, sondern ist das Resultat von genetischer Drift und Selektion (Duboule und Wilkins, 1998; Carroll et al., 2001). Die Wiederverwendung von Regulatorgenen (Selektorgenen) in neuen Geweben und Signalwegen ist ein anerkannter Mechanismus zur Evolution größerer Komplexität in höheren Organismen (Mann und Carroll, 2002). Zu einem großen Teil ist dieser Vorgang abhängig vom zufälligen Erscheinen einer neuen Sequenzkombination mit regulatorischer Aktivität in der Nähe eines geeigneten Promotors. Wenn das Element eine Interaktion mit dem Promotor etablieren kann, dabei nicht die bereits vorhandene Regulationskontrolle störend beeinflusst und selbst etwas zum evolutionären Vorteil beiträgt, wird das neue *cis*-Element möglicherweise fixiert. Die Synergie neuer und schon existierender Elemente für das Erreichen verlässlicherer und optimierter Expressionslevel wird ebenso zu Selektionsvorteil und Aufrechterhaltung der Sequenz beitragen. In einigen Fällen, in denen die Wiederverwendung regulatorischer Faktoren für evolutionäre Neuerungen eine Rolle spielt, existiert offenbar eine Korrelation zwischen den relativen Entfernungen von Enhancern zum Promotor und der Funktion des Gens: Z.B. ergab eine elegante Studie des *Hoxd*-Clusters in der Maus, dass die ursprüngliche Rolle des Clusters in der Spezifikation der Morphogenese entlang der Hauptkörperachse besteht, und dass *Hoxd*-Gene später in der Evolution für die Entwicklung neuer Strukturen, in diesem Falle der Extremitäten, kooptiert wurden. Damit übereinstimmend wurde außerdem gezeigt, dass die Regulationskontrollen für die ursprüngliche und kolineare *Hoxd*-Expression innerhalb des Clusters lokalisiert sind, hingegen die kooptierten Expressionsdomänen von Enhancern an entfernten Positionen außerhalb des Clusters gesteuert werden (Kleinjan und van Heyningen, 2005; Spitz et al., 2001)

Neue CREs können nicht nur durch zufällige Sequenzmutation *de novo* entstehen, sondern auch durch genomische Insertionen, z.B. via Retrotransposition (Han et al., 2004; Bejerano et al., 2006). Transponierbare Elemente können aktive Sequenzen aus anderen Teilen des Genoms in das Wirtsgen einbringen und dieses mit neuer regulatorischer Kapazität versehen. Andererseits können Transposoninsertionen auch höchst schädigend sein und Krankheiten auslösen (Druker und Whitelaw, 2004). Ein anderer oft beobachteter Mechanismus für die Erzeugung neuer Genfunktion stellt die Genduplikation mit anschließender funktioneller Divergenz dar, und zwar nicht nur in codierenden, sondern auch und sogar wahrscheinlicher in regulatorischen Regionen. Genduplikationen können lokal durch anomale Rekombinations- oder Replikationsereignisse entstehen und ein oder mehrere benachbarte Gene umfassen (Hurles, 2004). Die Verdopplung von Genen fördert die evolutionäre

Diversifikation und minimiert gleichzeitig das Risiko eines Funktionsverlusts durch komplementäre degenerative Mutationen (Force et al., 1999).

Gelegentlich ereignen sich Chromosomen- oder gar ganze Genomduplikationen: Vor etwa 350 Millionen Jahren fand eine Genomduplikation in einem Vorläufer der Knochenfische statt, gefolgt vom variablen Verlust duplizierter Segmente, und es wird angenommen, dass dieser Prozess eine ausgedehnte Artenbildung begründete, sodass heute die Hälfte aller Wirbeltierarten Knochenfische sind (Robinson-Rechavi et al., 2001; Postlethwait et al., 2004; Volff, 2005; Venkatesh et al., 2006; Semon und Wolfe, 2007). Die Mechanismen zur Retention duplizierter Gene bleiben umstritten. Der Begriff Neofunktionalisation als Gewinn neuer Funktion (zu dem auch Kooption gezählt wird) wird oft diskutiert, aber erst kürzlich wurde Subfunktionalisation als eine neutralere Aufteilung ancestraler Funktionen vorgeschlagen (Force et al., 1999; Woolfe und Elgar, 2007). Das Konzept der evolutionären Divergenz durch Subfunktionalisation und differenziellem Verlust bzw. Retention *cis*-regulatorischer Elemente von duplizierten Genloci wird auch als „Duplikation-Divergenz-Komplementations (DDC)-Modell“ bezeichnet (McEwen et al., 2006; Hurley et al., 2005). Für die Retention des gesamten Funktionsspektrums muss der Verlust duplizierter Elemente geordnet voranschreiten, weil gegenseitig abhängige *cis*-Elemente nur in einer Genkopie verloren gehen dürfen, da sonst die Genaktivität in bestimmten Geweben wahrscheinlich total ausfällt. Z.B. sind einige Elemente von *pax6b* für die raumzeitlich überlappende Expression beider *pax6*-Paraloge im Zebrafisch verlorengegangen, während *pax6a* alle Elemente behalten hat (Kleinjan et al., 2008). Einige Gene für Entwicklungsregulatoren mit einem Netzwerk multipler CREs liegen in sogenannten „Gen-Wüsten“. Beispielsweise umfassen die regulatorischen Domänen von *Dach* und *Sox9* mehr als 1 Mb an genomischer Sequenz ohne erkennbare andere Gene in deren Nachbarschaft (Nobrega et al., 2003; Pfeiffer et al., 1999). Bei anderen sehr gewebsspezifischen Genen dagegen liegen deren CREs häufig in den Introns benachbarter Gene, welche meist ubiquitär oder in anderen Geweben exprimiert sind. Diese Art funktioneller Verflechtung zwischen scheinbar verschiedenen Genen könnte einen Mechanismus bereitstellen, welcher der Konservierung mehrerer benachbarter Gene (Syntanie) zugrunde liegt (Kleinjan et al., 2002; Santagati et al., 2003; Kleinjan und van Heyningen, 2005). Andererseits liefert das DDC-Modell eine Erklärung für Gen-Wüsten, wenn eine schrittweise Degeneration von Exons (ebenfalls duplizierter) benachbarter Gene angenommen wird und somit nur auf regulatorische Elemente selektiert wird, z.B. jener von *pax6a*, die verstreut zwischen den Exons des Nachbargens *elp4* liegen (Kleinjan et al., 2008).

Trotz vorhandener Mechanismen, die einen Einfluss von Enhancern auf die Expression von Nachbargenen unterbinden, sind Gene und ihre CREs nicht immer in diskrete und funktionell isolierte chromosomale Domänen organisiert. Beispielsweise verursachen *cis*-Elemente für die Hypophysen-spezifische Expression des menschlichen *GHN*-Genes die Transkription des benachbarten und normalerweise B-Zell-spezifischen *CD79B*-Genes in der Hypophyse, wo dieses jedoch keine bekannte Funktion erfüllt. Dieser „*bystander*-Effekt“ widerlegt die allgemeine Annahme, dass die Expression in einem bestimmten Gewebe notwendig eine Funktion impliziert. Ein Mangel an Präzision der Genregulation, die zur scheinbar ungeeigneten Expression in Geweben oder Entwicklungssituationen führt, kann möglicherweise von der Zelle toleriert und/oder durch post-transkriptionelle Mechanismen kompensiert werden. Die Prävalenz der Expressionskontrolle über weite Distanzen in höheren Eukaryoten und die Präsenz ausgedehnter Bereiche modifizierten Chromatins sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass transkriptionelle Interaktionen zwischen eng gepackten Genen eher die Regel als die Ausnahme sind.

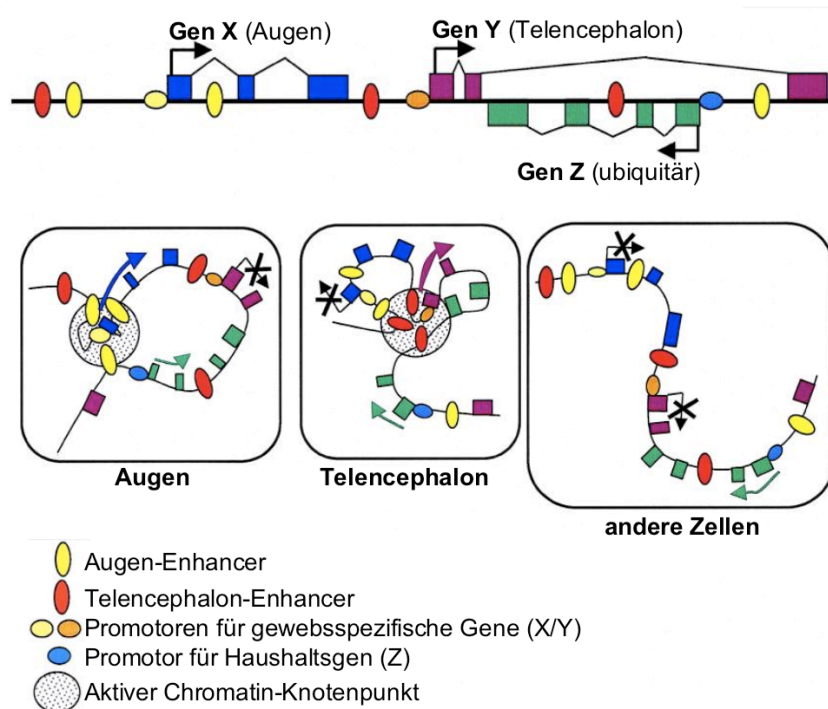


Abb. 3: Modell für die Existenz physisch überlappender, aber unabhängig regulierter „funktionaler Genexpressions-Module“ in der gleichen genomischen Region (hier: hypothetische Region mit zwei gewebsspezifischen Genen und einem Haushaltsgen). Gen X (blaue Exons) sei im Augengewebe, Gen Y (violette Exons) im Telencephalon und Gen Z ubiquitär exprimiert. Die transkriptionelle Aktivität ist von der Bildung einer offenen Chromatinstruktur abhängig, die eine selektive Interaktion zwischen gewebsspezifischen *cis*-Elementen (vertikale Ovale) mit deren gebundenen Transkriptionsfaktor-komplexen und relevanten Promotorelementen (horizontale Ovale) ermöglicht. Geöffnetes Chromatin erlaubt die lokale Konzentration von Transkriptionsfaktoren und chromatinmodifizierender Enzyme. Der Promotor des Haushaltsgens Z ist in allen Zellen aktiv und nicht auf eine gewebsspezifische Chromatinarchitektur angewiesen (nach Kleinjan und van Heyningen, 2005; verändert) .

Im Lichte der Evolution betrachtet haben sich wohl CREs und die Chromatinstruktur eines Genlocus gemeinsam durch positive und negative Selektion zur Gestaltung von Gendomänen entwickelt, wie sie heute beobachtet werden (Bennani-Baiti et al., 1998; Cajiao et al., 2004; Kleinjan und van Heyningen, 2005). Obschon das Konzept eines Gens als physische Einheit mit bestimmter Position auf dem Chromosom in vielen Fällen brauchbar ist, wurde auf Grundlage der alten Definition des Gens als „Vererbungseinheit“ ein neues Modell entwickelt, nach dem Gene als „funktionale Expressionsmodule“ definiert werden, die sowohl transkribierte Regionen als auch deren *cis*-regulatorischen Kontrollsysteme umfassen, wobei diese in verschiedenen Zelltypen abhängig von der lokalen Chromatinarchitektur adäquat funktionieren (s. Abb. 3) (Dillon, 2003; Kleinjan und van Heyningen, 2005).

Vor einigen Jahren wurde der Zebrafisch als Modellsystem zur Untersuchung der Vertebratenentwicklung und menschlicher Krankheiten etabliert (Streisinger et al., 1981; Ingham, 1997; Dooley und Zon, 2000). Der Zebrafisch hat ein kleineres Genom als der Mensch und weist zu ihm eine ähnliche evolutionäre Distanz auf wie der Kugelfisch. Überdies eignet er sich außerordentlich gut für die *in-vivo*-Funktionsanalyse von CREs mittels Transgenese-Techniken im weitgehend transparenten und sich *ex-utero* entwickelnden Embryo (Amacher, 1999). Dazu werden DNA-Reporterkonstrukte (Vektoren) – hergestellt durch Fusion eines mutmaßlichen CREs mit einem geeigneten Promotor sowie der codierenden Sequenz eines Reporterproteins wie GFP (grün fluoreszierendes Protein) oder lacZ (β -Galactosidase) – in frisch befruchtete Eizellen injiziert. Etwa ein bis fünf Prozent der injizierten Gründertiere (P_0 -Generation) geben das Transgen an die nächste Generation (F_1) weiter, wodurch die raumzeitliche Aktivität des nun im Genom aller Zellen stabil integrierten Transgens kann in dieser F_1 -Generation erfasst werden kann (Amsterdam et al., 1995; Lin, 2000). Die Integrations- und Transmissionsrate von Reporterkonstrukten kann verbessert werden, indem das Transgen mit Erkennungsstellen für das Enzym I-Sce I-Meganuklease flankiert und der Reporter zusammen mit dem Enzym koinjiziert wird (Thermes et al., 2002). Eine andere Methode basiert auf der Verwendung von Erkennungsstellen und Koinjektion von mRNA der Transposase *Tol2*, die eine Erhöhung stabil transgener Linien auf bis zu 50 % erwarten lässt (Kawakami et al., 2004; Kawakami et al., 2005). Die Funktion des interessierenden CREs kann dann sehr ausführlich in diesen transgenen Tieren studiert werden. Daneben lässt sich die *cis*-regulatorische Funktion auch direkt in injizierten P_0 -Embryonen analysieren, ohne stabil transgene Nachkommen erzeugen

zu müssen. Die injizierten Embryonen zeigen zwar nur ein mosaikales und transientes Expressionsmuster des Reporters, aber die Verfügbarkeit einer großen Anzahl befruchteter Eier und die simple Mikroinjektionstechnik erlauben funktionelle Untersuchungen von CREs im Mediumdurchsatzverfahren (Woolfe et al., 2005; Sanges et al., 2006).

Algorithmen zur Detektion konservierter Sequenzen vernachlässigen beim Alignment ganzer Genome meist lokale Rearrangements von genomischen Abschnitten. Sehr wenig ist bekannt über die evolutionäre Mobilität von *cis*-regulatorischen bzw. Promotorelementen in Genomen und Genloci. Frühere Studien an ausgewählten Genfamilien haben sich mit der Mobilität von Promotoren (*promotor shuffling*) und CREs (*enhancer shuffling*) befasst, die den Zugewinn oder Verlust individueller Elemente und deren kassettenartigen Austausch zwischen spezifischen Genen beschrieben. Diese Studien ließen jedoch keine allgemeineren Schlussfolgerungen zu, weil über die Genomorganisation vor der Zeit großangelegter Genomsequenzierungen zu wenig bekannt war (Surguchov, 1991; Kermekchiev et al., 1991; Chuzhanova et al., 2000). Auch heutzutage sind gängige und auf BLAST (*basic local alignment search tool*) basierende Programme für Genomalignments zur initialen Detektion konservierter und mutmaßlich funktionaler CREs noch nicht ausgereift (Altschul et al., 1990; Pollard et al., 2004). Erst kürzlich wurde in einem genomweiten Ansatz versucht die Häufigkeit zu bestimmen, mit der CRE-Rearrangements während der Evolution auftreten, und wie dadurch die computerbasierte Identifikation putativ funktionaler Elemente beeinträchtigt wird. Es konnte demonstriert werden, dass 72 % aller analysierten Elemente von Vertebraten im Lauf der Evolution rearrangiert wurden und von diesen ein hoher Anteil regulatorische Aktivität in transgenen Zebrafischembryonen zeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass gegenwärtige Genomvergleiche zwischen weit entfernten Arten (hier Säugetiere und Fische) wohl mindestens 90 % an konservierten nicht-codierenden und meist funktionalen CREs übersehen (Sanges et al., 2006).

Ein sehr wichtiges Problem stellt die bis dato selten gestellte Frage dar, inwieweit Sequenzkonservierung, auch über weite evolutionäre Distanzen hinweg, als Indikator regulatorischer Funktion verwendet werden kann. Es gibt einige Beispiele für erheblich divergierte CREs, die ihre Expressionsspezifität beibehalten haben. Der hohe Grad an Plastizität im Arrangement von Bindestellen in funktionalen CREs, die Rolle der CRE-Promotorinteraktion und -koevolution, Redundanz von Bindestellen bzw. Enhancern, wandelbare TF-Inputs bei konstantem Enhancer-Output durch Drift des Entwicklungssys-

tems (*developmental system drift*), die Möglichkeit zur Degeneration selbst wichtiger TF-Bindestellen durch funktionelle Koevolution von Bindestellen innerhalb eines CREs (stabilisierende Selektion/Drift), auch durch neutrale kompensatorische Mutationen verschiedener, aber funktionell verknüpfter Bindestellen (kompensatorische Selektion/Drift, die zusätzlich von der Populationsgröße abzuhängen scheint, welche die Driftrate bestimmt) sowie der Koevolution von TF-Bindungsdomänen und deren Bindestellen gelten als Erklärungen, wie die regulatorische Logik eines Enhancers trotz Fehlens detektierbarer Sequenzkonservierung erhalten bleiben kann (Carter und Wagner, 2002; Kimura, 1985; Ludwig, 2000; Ludwig 2002; Tautz, 2000; True und Haag, 2001; Kulkarni und Arnosti, 2003; Kimura-Yoshida et al., 2004; Oda-Ishii et al., 2005; Wittkopp, 2006). Zur Beantwortung dieser Frage müssen ausgedehnte genomische Segmente auf ihre Funktion als CREs untersucht werden. Kürzlich wurde dies für den Bereich unternommen, der das *phox2b*-Gen im Zebrafisch umgibt mit dem Ergebnis, dass ein beträchtlicher Teil funktionaler CREs durch Anwendung von Standardkriterien der Konservierung nicht erfasst wird (McGaughey et al., 2008).

Glücklicherweise können funktionale CREs experimentell ohne die vorherige Eingrenzung durch Sequenzanalysen direkt detektiert werden. Methoden der insertionalen Mutagenese basieren auf der zufälligen Integration von Reportertransgenen ins Genom eines Organismus. Insertionen erzeugende Agenzien wie Transposons oder retrovirale Vektoren ermöglichen die hierfür nötige hocheffiziente Transgeneserate. Aus einer großen Anzahl an Reporterinsertionen werden diejenigen ausgewählt, die unter den Einfluss lokaler Kontrollelemente geraten sind. Deren Einfluss ist daran erkennbar, dass der Reporter nach seiner Insertion entweder durch Spleißen Teil eines endogenen Transkripts geworden ist (*gene trapping*), oder durch lokale CREs zu gewebsspezifischer Expression angetrieben wird (*enhancer trapping*). Die letztgenannte Methode wurde zuerst in *Drosophila* mit einem Transposon-abgeleiteten Vektor angewandt, der ein Reporterprotein stromabwärts eines Minimalpromotors codiert (Bellen et al., 1999; Bier et al., 1989; O’Cane et al., 1987; Wilson et al., 1989). Das Reporter-gen wird nur dann exprimiert, wenn der Minimalpromotor durch ein endogenes CRE in der Umgebung der Insertionsstelle angetrieben wird, mit anderen Worten im regulatorischen Einflussbereich eines Enhancers. Die molekulare Identifikation der Insertionsstelle und damit eines Enhancers erfolgt schließlich durch PCR und computergestützten Vergleich der amplifizierten mit der bekannten genomischen Sequenz. Vor kurzem wurden auf Transposons und Retroviren basierende Systeme erfolgreich auch

im Zebrafisch etabliert (Balciunas et al., 2004; Ellingsen et al., 2005; Kawakami et al., 2004; Kawakami et al., 2005; Parinov et al., 2004).

Für konservierte Sequenzen, die in Reporterstudien keine Enhanceraktivität zeigen, wird postuliert, dass diese zusätzliche Funktionen übernehmen, etwa als Silencer zur Repression der Genexpression, der Regulation der Chromatinstruktur (nicht nur durch Bindung sequenzspezifischer TFs, sondern auch zur Bindung an Elemente der Kernmatrix), der Regulation von Splicing-Prozessen oder der Codierung von microRNAs (Feng et al., 2006; Glazko et al., 2003; Glazov et al., 2006; Xie et al., 2005).

Die funktionelle Charakterisierung von restriktiven Silencerelementen gestaltet sich schwieriger als von aktivierenden Enhancerelementen. Eine Enhancer-Trap-Studie verwendete einen ubiquitär aktiven Promotor und schloss aufgrund gewebsspezifischer Expressionsdomänen auf die Insertion des Vektors in den Einflussbereich eines Elements mit Silenceraktivität (Balciunas et al., 2004). Eine Möglichkeit zur gezielten Untersuchung putativer Silencerelemente in Transgeneseassays bestünde demnach darin, diese mit ubiquitär, aber mäßig aktiven Promotoren im GFP-Reporter zu koppeln. Gewebsspezifische Silencer würden in transgenen Embryonen somit zum selektiven Ausfall der Reporterfluoreszenz führen (Gómez-Skarmeta et al., 2006).

Sowohl verbesserte Algorithmen zur Detektion konservierter Sequenzen durch Genomvergleiche zwischen nah und entfernt verwandten Arten und deren Analyse auf funktionelle Relevanz in Reporterstudien, als auch die Enhancer-Trap-Technologie werden in naher Zukunft die Annotation von CREs und damit einhergehend die Decodierung des Codes *cis*-regulatorischer Netzwerke wie schon früher in Invertebraten auch in Vertebraten weiter vorantreiben und also Erkenntnisse über die Evolution organischer Komplexität im Tierreich liefern.

1.7 Der *neurogenin1*-Locus in Vertebraten

Das proneurale Gen *neurogenin1* (*neurog1* = *ngn1*) kann als typischer Entwicklungsregulator bezeichnet werden, dessen Funktion und Regulation in *Drosophila* und Vertebraten ausführlich untersucht worden ist (siehe auch Abschnitt 1.3). Der *neurog1*-Locus codiert einen bHLH-TF, der die Neurogenese sensorischer Neuronen im Zebrafisch und Mäusen

kontrolliert (Blader et al., 1997; Ma et al., 1996). Drei stromaufwärts des Startkodons ATG gelegene, durch Deletionskartierungen identifizierte CREs (LSE, ANPE und LATE) treiben die Expression von Reporter-transgenen in der Neuralplatte des Zebrafischs und reproduzieren das endogene *neurog1*-Expressionsmuster (Blader et al., 2003). Der am weitesten distal lokalisierte Enhancer LSE (*lateral stripe element*, Position –6702 bis –6490 bp stromaufwärts ATG) steuert die Expression in lateralen Streifen der Neuralplatte, aus welcher sich primäre sensorische Neuronen (sog. Rohon-Beard-Neuronen) entwickeln und später im dorsalen Telencephalon. ANPE (*anterior neural plate element*, Position –3476 bis –3122 bp stromaufwärts ATG) wird für die Expression in der anterioren Neuralplatte benötigt. Dieser Enhancer ist ein direktes Ziel des anti-neuralen bHLH-TF Her5, welcher die ANPE-Aktivität unterdrückt und damit die *neurog1*-vermittelte Neurogenese im Bereich der MHB (siehe Abschnitt 1.2 und 1.3) verhindert (Geling et al., 2004). In der Neuralplatte wird die *neurog1*-Expression also durch positiv und negativ regulierende Signale kontrolliert.

Der dritte, proximal gelegene Enhancer ist erst mit beginnender Neurulation im frühen Segmentationsstadium aktiv, nachdem primäre Neuralplattenneuronen die *neurog1*-Expression etabliert haben. Dieser sog. LATE-Enhancer (Position –1774 bis –1368 bp stromaufwärts ATG) wird für die Expression in der Diencephalon- und Rhombencephalonanlage benötigt (Blader et al., 2004). Die Zebrafisch-DNA-Sequenzen von LSE, ANPE und LATE sind hoch konserviert in den *neurog1*-Genen von Mensch und Maus (LSE ca. 61%, ANPE ca. 69%, LATE ca. 70%). Die funktionelle Relevanz dieser strukturellen Konservierung konnte durch Überprüfung der Aktivität der Zebrafisch-Elemente im Maus-Kontext gezeigt werden: Reportertransgene, die 8,4 kb stromaufwärts gelegene und damit

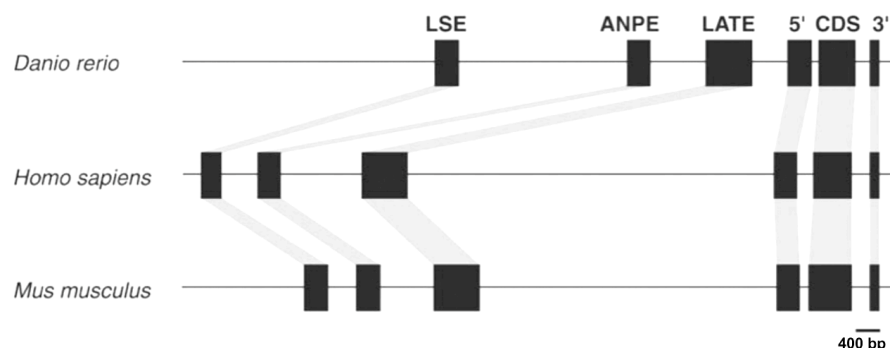


Abb. 4: Schematischer Vergleich regulatorischer Elemente des Zebrafisch *neurog1*-Locus mit Elementen der Loci in Mensch und Maus. Schwarze Boxen zeigen hoch konservierte Regionen. CDS, codierende Sequenz mit 5'- und 3'-untranslatiertem Bereich (nach Blader et al., 2003; verändert).

die drei Enhancer beinhaltende Zebrafisch-Sequenz umfassen, reproduzieren das Muster der endogenen *neurogl1*-Expression im dorsalen und lateralen Telencephalon der Maus. Das weist darauf hin, dass das Zebrafisch-Transgen Ziel der selben Positions- bzw. Musterungssignale wie das endogene Maus-*neurogl1*-Gen darstellt. Im Unterschied zum Zebrafisch ist nicht nur LSE, sondern auch LATE für die Reporterexpression im Maus-Telencephalon zuständig: Die Deletion von LSE allein führt zwar hier zum Ausfall der Reporterexpression im dorsalen Telencephalon, aber erst die Deletion aller drei Elemente zum Ausfall auch im lateralen Telencephalon. Das laterale Telencephalon gilt als der Ursprung der Neocortexentwicklung in Amnioten und scheint in Anamnioten wie Fischen und Amphibien nicht angelegt zu sein (Molnar und Butler, 2002). Die LATE-Region ist hingegen nicht aktiv in der Telencephalonanlage des Zebrafischs, was darauf hindeutet, dass LATE als regulatorisches Modul für die *neurogl1*-Expression im lateralen Telencephalon der Maus rekrutiert (kooptiert) wurde. Im Zebrafisch ist LATE im Diencephalon aktiv; auch die korrespondierende Maus-LATE-Sequenz aktiviert dort Reporterexpression, hingegen nicht im Telencephalon. Darum ist das Diencephalon wohl die ancestrale Domäne der LATE-Aktivität. Weiterhin wurde der Paired-Homeodomänen-TF Pax6 als positiver Regulator der LATE-vermittelten Kontrolle der *neurogl1*-Expression identifiziert, sowohl im Diencephalon des Zebrafischs, als auch im lateralen Telencephalon der Maus – daher auch der Name der LATE-Region (*lateral telencephalic element*). In der Maus ist Pax6 stark in Radialgliazellen des dorsalen und lateralen Telencephalons exprimiert, im Zebrafisch dagegen nur in einigen wenigen Neuronen in der Grenzregion zwischen dorsalem und ventralem Telencephalon (Pallium bzw. Subpallium), aber vor allem im Diencephalon (Stoykova et al., 2000; Wullmann und Rink, 2002). Eine Minderung der Pax6-Expression im Zebrafisch durch Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden (*knock down*) ergibt eine signifikante Reduktion der endogenen *neurogl1*- und Transgen-Aktivität im Diencephalon, und in homozygoten *Pax6*-Mutanten (*small eye*) der Maus wird das Transgen im Telencephalon ebenfalls nicht exprimiert. Durch Protein-DNA-Interaktionsstudien *in vitro* konnte eine Pax6-Bindestelle in LATE identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pax6 sehr wahrscheinlich die LATE-Funktion direkt reguliert und unterstützen die Vermutung, dass eine Änderung in der Pax6-Expression zur Kooption (Neofunktionalisierung) des LATE-Enhancers und somit der *neurogl1*-Expression in einem evolutionär neuen Gehirnkompartment (laterales Telencephalon -> Neocortex) beigetragen hat. Pax6 ist jedoch wahrscheinlich nicht der einzige daran beteiligte Faktor. Andere Pax6-exprimierende Regionen des Embryos (beispielsweise die Augenanlagen) zeigen keine endogene *neurogl1*- oder Transgenaktivität

eines LATE-enthaltenden Reporters. Darüberhinaus ist in der kleinen Zellgruppe des Zebrafisch-Telencephalons Pax6 allein nicht ausreichend *neurogl* zu aktivieren, weshalb zusätzliche mit Pax6 kooperierende Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein müssen. Umgekehrt sind andere *neurogl*- und LATE-Reporter exprimierende Regionen Pax6-negativ. Daraus kann gefolgert werden, dass außerhalb des Telencephalons weitere TFs für die *neurogl*- respektive LATE-Reporter-Regulation im Di- und Rhombencephalon zuständig sein müssen (Blader et al., 2004; Stoykova et al., 2000; Strähle und Rastegar, 2008).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die im letzten Abschnitt dargelegten Sachverhalte bezüglich der LATE-vermittelten Regulation von *neurogl* im Zebrafischembryo führen zur Fragestellung, Zielsetzung und experimentellen Herangehensweise der vorliegenden Arbeit:

Welche TFs außer Pax6 steuern die Diencephalon-spezifische Aktivität des LATE-Enhancers zur Kontrolle der *neurogl*-Expression bzw. welche genetischen Mechanismen sind in diesen Prozess involviert?

Zweck der Arbeit ist also die Identifikation von TFs, die mit der LATE-Sequenz interagieren. Sowohl eine detaillierte Durchsicht der Literatur nach TFs, welche im Diencephalon exprimiert sind, als auch eine computergestützte (*in silico*) Sequenzanalyse zur Aufdeckung potentieller TF-Bindestellen und regulatorischer Motive kann die Anzahl potentieller Kandidaten-TF eingrenzen. Anschließend soll mittels immunhistochemischen und -fluoreszenz basierten Methoden ermittelt werden, ob die ausgewählten TFs in Regionen der LATE-Reporteraktivität koexprimiert sind (*in-situ*-Analyse). Weiterhin wird in Protein-DNA-Interaktionsstudien eine physische Interaktion zwischen TFs und LATE-Fragmenten untersucht (*in-vitro*-Analyse).

Die gezielte Mutation der Enhancersequenz in Reportertransgenen wird Hinweise liefern, welche Unterabschnitte von LATE bzw. mutmaßlichen TFs für die Funktion des Enhancers tatsächlich biologisch relevant sind (*in-vivo*-Analyse). MO-Injektionen zum *knock down* von TF-Kandidaten sollen die funktionelle Analyse ergänzen.

Die Arbeit wird Einsichten über die Funktion eines Diencephalon-spezifischen Enhancers liefern und insbesondere zur Aufklärung von Mechanismen beitragen, welche die Differenzierung neuraler Vorläuferzellen kontrollieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen in Reinstqualität bezogen:

Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Applied Biosciences (Darmstadt), Bio-Rad (München), Difco (Detroit, USA), Fermentas (St. Leon-Roth), Fluka (Buchs, CH), GE Healthcare (Freiburg), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), J.T. Baker (Deventer, NL), LI-COR Biosciences (Bad Homburg), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Metabion (Planegg-Martinsried), Millipore (Schwalbach), PeqLab (Erlangen), Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim), Pharmacia (Freiburg), Perbio (Bonn), Promega (Mannheim), Quiagen (Hilden), Ratiopharm (Ulm), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Santa Cruz (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Heidelberg), Torrey Pines Biolabs (USA).

2.1.2 Stamm- und Pufferlösungen

Die hier erwähnten Lösungen wurden selbst angesetzt. Die Zusammensetzung der Lösungen in verwendeten Kitsystemen kann der jeweiligen Produktinformation entnommen werden.

Steriles Wasser (H₂O) zum Ansetzen aller Lösungen (außer für RNA-Techniken) wurde einer Entsalzungsanlage (Ionentauscher) der Firma Millipore entnommen und autoklaviert.

Nukleasefreies Wasser (z.B. für RNA-Techniken) wurde von der Firma Gibco bezogen.

Fischwasser u.a. zur Haltung von Zebrafischembryonen besteht aus 1/3 Karlsruher Leitungswasser und 2/3 entsalztem Wasser.

Lösungen für DNA-Techniken:

1 N NaOH

4 g NaOH-Plätzchen

ad 100 mL H₂O

0,5 M EDTA (pH 8,0)

37 g EDTA ad 200 mL H₂O

pH eingestellt mit 1 N NaOH

3 M Natriumazetat

10 x Lysozym-Lösung

100 mg ad 10 mL H₂O

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

(pH eingestellt mit 1 N NaOH)

50 x TAE (pH 7,6)

242 g Tris

57 mL Eisessig

50 mM EDTA (pH 8,0)

(pH eingestellt mit Eisessig)

Laufpuffer für Gelelektrophorese

(1 x TAE)

160 mL 50 x TAE

ad 8000 mL H₂O

6 x DNA-Ladepuffer und DNA-Größen-und Massenstandard (DNA-Leiter-Mix)

wurde bezogen von der Firma PeqLab. Der Marker umfasst die Fragmente von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren Länge.

LB-Medium zur Bakterienanzucht

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 mL H₂O

(autoklaviert)

7,5 M Ammoniumazetat

5 M NaCl

14,6 g NaCl ad 50 mL H₂O

Ethidiumbromid

Ethidiumbromidtabletten (BioRad) gelöst

in H₂O; Endkonzentration 10 mg/mL

STET

100 mM NaCl

10 mM Tris (pH 8,0)

1 mM EDTA

5 % Triton X-100

Standardagarosegel

1 % Agarose in 1 x TAE:

2 g Agarose ad 200 mL 1 x TAE

LB-Agar-Platten

15 g Agar

ad 1000 mL LB-Medium

(autoklaviert)

15-20 mL pro 10 cm Petrischale mit gewünschtem Antibiotikum (Zugabe bei 60°C) gießen

Stammlösungen (1000 x) für Bakterienselektion

Kanamycin: 25 mg/mL in H₂O

Ampicillin: 50 mg/mL in H₂O

Spectinomycin: 10 mg/mL in H₂O

Chloramphenicol: 20 mg/mL in Ethanol

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid): 100 mM in H₂O

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid): 50 mg/mL in DMF

(N,N-Dimethylformamid)

- alle Stammlösungen aliquotiert bei -20°C gelagert -

Lösungen für RNA-Techniken:

10 x Formaldehydgelpuffer (pH 7,0)

200 mM 3-[N-morpholino]propansulfon-
säure (MOPS)

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

(pH eingestellt mit 1 N NaOH)

1,2 % Formaldehydgel

1,2 g Agarose

10 mL 10 x Formaldehydgelpuffer

1,8 mL 37 % Formaldehyd

1 x Formaldehydgellaufpuffer

100 mL 10 x Formaldehydgelpuffer

20 mL 37 % Formaldehyd

ad 1000 mL H₂O

2 x RNA-Ladepuffer und RNA-Größen-und Massenstandard wurde bezogen von der Firma Fermentas. Der Marker umfasst die Fragmente von 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 und 200 Basen Länge

Lösungen für Protein-Techniken:

30 % Acrylamid-Mix

Rotiphorese Gel 30 (Firma Roth)

1,5 M Tris (pH 8,8)

91 g Tris ad 500 mL H₂O

pH eingestellt mit 1 N NaOH

10 % Ammoniumpersulfat

5 g ad 50 mL H₂O

1 M Tris-HCl (pH 6,8)

79 g Tris-HCl ad 500 mL H₂O

pH eingestellt mit 1 N NaOH

SDS-PAGE

Denaturierendes Trenngel (10 %)

4,0 mL H₂O

3,3 mL 30 % Acrylamid-Mix

2,5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8)

0,1 mL 10 % SDS

0,1 mL 10 % Ammoniumpersulfat

4 µL TEMED

Denaturierendes Sammelgel (5 %)

2,1 mL H₂O

0,5 mL 30 % Acrylamid-Mix

0,38 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,03 mL 10 % SDS

0,03 mL 10 % Ammoniumpersulfat

3 µL TEMED

10 x SDS-PAGE-Puffer

58 g Tris

290 g Glycin

ad 2000 mL H₂O

1 x SDS-PAGE-Gellaufpuffer

200 mL 10 x SDS-PAGE-Puffer

20 mL 10 % SDS

ad 2000 mL H₂O

2 x SDS-Ladepuffer

1,6 mL 1 M Tris-HCl

4 mL 10 % SDS

2,3 mL 86 % Glycerin

0,4 mL β-Mercaptoethanol

Spatelspitze Bromphenolblau

ad 10 mL H₂O

Western-Blot-Puffer

500 mL 10 x SDS-PAGE-Puffer

500 mL Methanol

ad 5000 mL H₂O

Native PAGE

5 x TBE

54 g Tris

27,5 g Borsäure

20 mL 0,5 M EDTA

ad 1000 mL H₂O

Nicht-denaturierendes Gel (6%)

16,6 mL Acrylamid-Mix

10 mL 5 x TBE

0,7 mL 10 % Ammoniumpersulfat

40 µL TEMED

ad 100 mL H₂O

Lösungen für Färbetechniken an Zebrafischembryonen:

1 x PBS

100 mL 10 x PBS (Gibco)
ad 1000 mL H₂O

1 M CaCl₂

7,4 g CaCl₂-dihydrat ad 50 mL H₂O

PTW

1 x PBS
0,1 % Tween-20

20 x SSC (standard saline citrate)

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat

Proteinase K

100 µg in 10 mL PTW

10 % BSA

1 g in 10 mL H₂O

DMSO

bezogen von Fluka

Waschlösung 1 (ISH/FISH)

50 % Formamid
50% (2 x SSC; 0,1 % Tween-20)

Fixans (4 % PFA)

23 mL 0,2 M NaH₂PO₄ (pH 7,3)
77 mL 0,2 M Na₂HPO₄ (pH 7,3)
6 µL 1 M CaCl₂
8 g Saccharose
8 g Paraformaldehyd (PFA)
ad 200 mL H₂O

Hybridisierungspuffer (ISH/FISH)

50 % Formamid
5 x SSC
500 µg/mL Hefe-RNA
50 µg/ mL Heparin
0,1 % Tween-20
9 mM Zitronensäure

Blockpuffer (ISH/FISH/AKF)

1 x PBS
0,1 % Tween-20
1 % BSA (10 mg/mL)
1% DMSO

BCIP/NBT-Färbepuffer (ISH)

100 mM Tris (pH 9,5)
50 mM MgCl₂
100mM NaCl
0,1 % Tween-20

Waschlösung 2 (ISH/FISH)

2 x SSC
0,1 % Tween-20

Waschlösung 3 (ISH/FISH)

0,2 x SSC
0,1 % Tween-20

Waschlösung 4 (ISH/FISH)

50 % (0,2 x SSC; 0,1 % Tween-20)
50 % PTW

BCIP/NBT-Färbelösung (ISH)

3,5 μ l 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-phosphat (BCIP, von Roche Diagnostics)
2,5 μ l Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, von Sigma)
ad 1 mL Färbepuffer (ISH)

AP-Stopplösung (pH 2,3)

150 mg Glycin
80 μ L Salzsäure (37 %)
ad 20 mL PTW

1 x PTU

0,003 % 1-Phenyl-2-thioharnstoff in
Fischwasser

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen mit Pufferlösungen wurden von den Firmen Fermentas, New England Biolabs und Promega bezogen.

Alkalische Phosphatase aus *shrimp* (SAP): Promega

Ribonuklease Inhibitor (RNAsin): Promega

DNase I (RNase-frei): Promega

Proteinase K: Roche Diagnostics

SP6, T3 und T7 RNA-Polymerase (nicht Kitsystem): Promega

T4 DNA-Ligase: Promega

Taq DNA-Polymerase: Promega

T4 Polynukleotid-Kinase: Fermentas

Die Enzymreaktionen wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, mit den vom Hersteller gelieferten Pufferlösungen durchgeführt.

LR Clonase®: Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Anti-DIG-AP: Alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Digoxygenin-Antikörper
(Fab-Fragment): Roche Diagnostics

Anti-FLUO-AP: Alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Fluorescein-Antikörper
(Fab-Fragment): Roche Diagnostics

Anti-DIG-POD(poly): Peroxidase-Polymer gekoppelter Anti-Digoxygenin-Antikörper:
Roche Diagnostics

Anti-GFP: Antikörper aus dem Kaninchen gegen *green fluorescent protein* (grün fluoreszierendes Protein): Torrey Pines Biolabs (USA, Vertrieb: Acris GmbH, Hiddenhausen)

Anti-Rabbit-Alexa488: mit Fluorochrom gekoppelter Antikörper gegen Kaninchenepitop:
Invitrogen

Anti-FLAG: Antikörper aus der Maus gegen synthetisches FLAG-Epitop: Sigma

Anti-Mouse-IR700: mit Fluorochrom gekoppelter Antikörper gegen Mausepitop:
LI-COR Biosciences

2.1.5 Bakterienstämme

E. coli XL1-blue von Stratagene

E. coli DH5 α von Invitrogen

E. coli TOP10 von Invitrogen

2.1.6 Plasmide

Die aufgeführten Plasmide dienen als GFP-Expressionsvektoren zur Erzeugung transient und stabil transgener Zebrafischembryonen, als Vorlage zur Herstellung von cRNA-Sonden für die *In-situ*-Hybridisierungen und zur Herstellung von mRNA für die Mikroinjektion.

Das Plasmid pBL3.1ngn1(mouseLATE):*gfp* (Blader et al., 2004) bildete das Grundgerüst zur Herstellung von GFP-Expressionsvektoren auf der Basis des Meganuklease-Systems zur Erzeugung transgener Zebrafischembryonen. Es enthält die Erkennungssequenzen für die Meganuklease I-Sce I zur Integration des Transgens in das Zebrafischgenom. Das Transgen umfasste 3,1 kbp der genregulatorischen Sequenz stromaufwärts des *neurog1*-Startkodons,

die sich direkt anschließenden kodierenden Sequenz von GFP und die SV40 polyA-Sequenz. Die Meganukleasestellen flankierten das Transgen.

pBL8.4ngn1:gfp (Blader et al., 1997) diente als Vorlage zur Amplifikation von Unterabschnitten genregulatorischer Sequenzen 8,4 kbp stromaufwärts des *neurog1*-Startkodons.

Das Plasmid pT2KXIG (Kawakami et al., 2004) diente als Basis für die Umstellung auf das *Tol2*-Transposonsystem zur Erzeugung transgener Zebrafischembryonen (s. 2.2.6.2). Es enthält die Erkennungssequenzen für die *Tol2*-Transposase zur Integration des Transgens in das Zebrafischgenom. Auch hier flankieren die *Tol2*-Stellen das Transgen, welches statt GFP die kodierende Sequenz für EGFP enthält.

Die folgenden Plasmide beinhalteten die cDNA-Sequenzen zur Herstellung von Sonden für die *In-situ*-Hybridisierungen. Sie stammen aus der laboreigenen Transkriptionsfaktorbibliothek oder wurden von anderen Labors zur Verfügung gestellt:

pBluescript SK (+/-) (Stratagene),

pCS2+ (1993 konstruiert von Rupp und Weintraub im Fred Hutchinson Cancer Center),

pGEM-T (Promega).

Das Plasmid pCS-TP (Kawakami et al., 2004) enthielt die cDNA zur Herstellung von Transposase-mRNA.

pT2KGG-C1 war der EGFP-Zielvektor mit *gata2*-Minimalpromotor und *Tol2*-Sequenzen zur transienten Expressionsanalyse (Dank an Tom Becker, Bergen).

2.1.7 Kitsysteme

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) zur Minipräparation von Plasmid-DNA,

Quiagen Plasmid Maxi (Quiagen) zur Maxipräparation von Plasmid-DNA,

peqGOLD® Gel Extraction Kit (PeqLab) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen,

mMessage Machine® SP6 (Ambion) zur Herstellung von mRNA,

TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) zur Herstellung rekombinanter Proteine *in-vitro*,

pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) zur schnellen Klonierung von PCR-Produkten in Eingangsvektoren (siehe Abschnitt 2.2.1.19),

Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) zur Umklonierung in EGFP-Zielvektoren (siehe Abschnitt 2.2.1.19)

TSA®Plus Fluorescence Systems (CY3) (Perkin-Elmer) für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen.

2.1.8 Geräte

Technische Details und Hinweise zum Gebrauch der verwendeten Geräte können der jeweiligen Produktinformation des Herstellers entnommen werden.

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller / Vertrieb</u>
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Schüttelinkubator innova®44	New Brunswick Scientific (USA)
Elektrophoresekammern (DNA + RNA)	PeqLab (Erlangen)
Elektrophoresekammern (Proteine)	Bio-Rad (München)
Mini-Protean®3 System	
Elektrophorese Spannungsversorgung	Consort (Belgien)
Geldokumentationssystem	PeqLab (Erlangen)
Kühlzentrifugen 5417 R und 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf (Hamburg)
Blockheizer Stuart®SBH130	Bibbi Sterilin (UK)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Heizmagnetrührer MR3001	Heidolph (Kelheim)
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph (Kelheim)
Wasserbad 6 A	Julabo (Seelbach)
Vortexer Top-Mix 94323	Heidolph (Kelheim)
Mikroinjektionsnadelzieher	Sutter Instruments (USA)
Mikroinjektor femtoJet	Eppendorf (Hamburg)

Szintillationszähler 1414	Wallac Guardian (Finnland)
Geltrockner MGD-5040	VWR International (Darmstadt)
Membranvakuumpumpe MD 4C	VWR International (Darmstadt)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Spektrophotometer NanoDrop®1000	PeqLab (Erlangen)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	Applied Biosystems (USA)
GeneAmp® PCR System 9700	
Stereomikroskop MZ 16 F	Leica Microsystems (Wetzlar)
Stereomikroskop MZ FL III	Leica Microsystems (Wetzlar)
Compound Mikroskop DM 5000 B	Leica Microsystems (Wetzlar)
Konfokales Lasermikroskop TCS SP 2	Leica Microsystems (Wetzlar)
-80°C Gefrierschrank Hera freeze	Heraeus (Hanau)
-20°C Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Adapteroligonukleotide für GFP-Expressionsvektoren

Modifikation von pBL3.1ngn1(mouseLATE):*gfp*:

Plusstrang: 5'-TCGATCTCGAGACCGGTAAGCTTCGTGCAGGCGCCT-3'

Minusstrang: 5'-TCGAAGGCGCCTGCACGAAGCTTACCGGTCTCGAGA-3'

Modifikation von pT2KXIG:

Plusstrang: 5'-CTTCGAAGGATCCGAATTCCCGGGCCAC-3'

Minusstrang: 5'-CATGGTGGCCCGGAATTCGGATCCTTCGAAGGGCC-3'

2.1.9.2 Primersequenzen für LATE-Deletionen

Bezeichnung	Basensequenz 5' -> 3'
Danio-LATE_for	ATTACGGCGCCTTTTTGTTCACGCTGGGAC
Danio-LATE_rev	GTCAGGCTCGAGTAAAGACATCTTTATGAGAC
Primer I	CGAAAGCACAAACGTGTCTC
Primer II	TCTGCAGCAGCATTTTGAGT
Primer IV	GGCTTAAGTTTTATTGAGACAGCCGTACAA
Primer III-1 (Deletion 1-40)	GTGGTCGAAGGCGCCTATTGGAGTGTCGCA
Primer III-1 (Deletion 41-80)	GAATAAGAATAATGCCTCAGAGGCGCAGAA
Primer III-1 (Deletion 81-120)	AATGAGTGACAAAAGAGCTGAAAAGAAGAG
Primer III-1 (Deletion 121-160)	GGACAAGCCGTATAGTTCACCTTATAATCG
Primer III-1 (Deletion 161-200)	CGCACAATGGAACAAGACTCTAAACATTGT
Primer III-1 (Deletion 201-240)	TCATACATGCCTGAACCTATCGCCATAATAC
Primer III-1 (Deletion 241-280)	ATAAATGACTGTGCCCTCTCGCCAAACTAT
Primer III-1 (Deletion 281-320)	GAAAAGCGCCGCAGGTTTTCCAAAGAGGGGC
Primer III-1 (Deletion 321-360)	TCGCCCCTTCATTTTAATAATTAATGAACA
Primer III-1 (Deletion 361-406)	CAATTGAATAAATTGCTCGAGATCGACAAT

2.1.9.3 Primersequenzen für 8.4-EGFP-Reporterkonstrukte

Apa I-LSE+ANPE_for: 5'-CAATGGGGCCCTCGACTCAGACTGTCCCTCTATTG-3'

LSE+ANPE(inkl. Cpo I)_rev: 5'-GATCTGGCCCGGACCGTGCACTTATTGCTC-3'

2.1.9.4 DNA-Fragmente für Assay zur DNA-Protein-Interaktion

Die Mutationen (Transversionen) sind **fett** gedruckt. WT-BS = Wildtypsequenz der (potentiellen) Bindestelle, mut-BS = mutierte Sequenz der Bindestelle, for = Vorwärtsstrang, rev = Rückwärtsstrang:

Bezeichnung	Basensequenz 5' -> 3
Pax6_WT-BS_for	GGCTTTGATATATCATACATGCCTGAAGACTCCC
Pax6_WT-BS_rev	GGGAGTCTTCAGGCATGTATGATATATCAAAGCC
Pax6_mut-BS_for	GGCTTTGATAGCGACGCACGTAAGTCCGACTCCC
Pax6_mut-BS_rev	GGGAGTCGGACTTACGTGCGTCGCTATCAAAGCC
Lef1_WT-BS_for	TTCACCTTATAATCGCTTTGATATATCATACATGC
Lef1_WT-BS_rev	GCATGTATGATATATCAAAGCGATTATAAGGTGAA
Lef1_mut-BS_for	TTCACCTTATCCGATAGGGTTCGCGCGAATACATGC
Lef1_mut-BS_rev	GCATGTATTTCGCGCGACCCTATCGGATAAGGTGAA
homeo/BrnPouIII_WT-BS_for	CTAAACATTGTGTAATTATTTATAAATGACTGTG
homeo/BrnPouIII_WT-BS_rev	CACAGTCATTTATAAATAATTACACAATGTTTAG
homeo/BrnPouIII_mut-BS_for	CTAAACATTGGTGCCGGCGGGCGCCCGGACTGTG
homeo/BrnPouIII_mut-BS_rev	CACAGTCCGGGCGCCCGCCGGCACCAATGTTTAG
Dlx3_WT-BS_for	ATGGAACAATTCACCTTATAATCGCTTTGATATAT
Dlx3_WT-BS-rev	ATATATCAAAGCGATTATAAGGTGAATTGTTCCAT
Dlx3_mut-BS-for	ATGGAACAAGGACAAGGCGCCGATAGTTGATATAT
Dlx3_mut-BS-rev	ATATATCAACTATCGGCGCCTTGTCTTGTTCAT

2.1.9.5 Primersequenzen zur Herstellung rekombinanter Proteine

Der Vorwärtsstrang (_for) enthielt einen Überhang, eine T7-Bindestelle (*kursiv*) und eine Kozak-Sequenz (unterstrichen), gefolgt von der jeweiligen Homologiesequenz (**fett**) ab dem Startkodon der cDNA. Der Rückwärtsstrang (_rev) beinhaltete zwischen der jeweiligen Homologiesequenz (**fett**) und dem Stoppkodon (**fett**) die Kodontripletts für das FLAG-Epitop (*kursiv*).

Bezeichnung	Basensequenz 5' -> 3
Pax6a_for	GTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGG <u>ACCACC</u> ATGCCTCAAAAAGAATACTATAAC
Pax6a_rev	TA <i>ACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTGTAGTCTGGGCCAGTA</i> TTG

Lef1_for	GTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGGACCACCATGGCC GCAGTTGT
Lef1_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGATGTACGCCGTTTTTCAT TC
Pou50_for	GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGGCCACCACCATGGCG ACAACAGCTCAGTATATTCCGCG
Pou50_rev	TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTGGACAGGACTCTGTAG CGTG
Dlx2a_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACCATGAC TGGAGTTTTTGACAGCCTC
Dlx2a_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAAATATGGTCCCGGCGCT AACAG
Emx2_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACCATGTT CAACCCACACCGAAGAGG
Emx2_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCATCGTCTGAGGTGACGTC AATTTC
Hmx3_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGCC CGAAACAACACAGGATACG
Hmx3_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAACCGGTCTGAGGAGGGG CAC
Lhx2_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGAAC TCGACAGGGCTAGAAGTGCG
Lhx2_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGAAGAGGCTGGTTAAGGT GC
Isl1_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGGGA GACATGGGGGATCCACCG
Isl1_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGGCCTCTATAGGACTCGC TAC
Meis2.1_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGCTG ATGGCTCAACGGTACGAAG
Meis2.1_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATGTAGTGCCACTGTCC ATCC

Dbx1a_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGATG ATCCCAAGTGTTATTGCACC
Dbx1a_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTGAGACTGTTATTTTCATC CTCTG
Arx_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGAGC AGTCAGTACGACGACGATAG
Arx_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGCACACTTCTTTCCCTGC AGTG
Otx2_for	CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGCCGCCACATGATG TCGTATCTCAAGCAACCAC
Otx2_rev	TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCAACACTTGGAATTTCCA GGAG

2.1.9.6 Morpholino-Oligonukleotide

Morpholino-Oligonukleotide (MOs) wurden gefriergetrocknet von der Firma Gene Tools, Philomath (USA) bezogen, in H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die MOs sind gegen das Startkodon (**fett** markiert) zur Inhibition der Translation der jeweiligen Proteine gerichtet.

lef1_ATG 5'-CTCCTCCACCTGACAACTGCGGCAT-3'
pou50_ATG 5'-GAATATACTGAGCTGTTGTCGCCAT-3
dlx2a_ATG 5'-TGAGGCTGTCAAAAACCTCCAGTCAT-3'
p53_ATG 5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG-3'

2.1.10 Datenbanken und Computerprogramme

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

NCBI PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>):

Datenbank wissenschaftlicher Veröffentlichungen.

ExPasy/ScanProsite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>):

Vorhersage von Protein-domänen aus Aminosäuresequenzen.

ZFin (<http://zfin.org>): Datenbank des Modellorganismus Zebrafisch.

MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) **und**

Patch (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>):

Datenbankgestützte Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen in DNA-Sequenzen.

WeederH (<http://159.149.109.9/modtools/>):

Auffindung von Motifen und *cis*-regulatorischer Module in homologen DNA-Sequenzen.

ensemble (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/blastview):

Datenbank sequenzierten Zebrafischgenoms.

Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) **und**

OligoAnalyzer (<http://scitools.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>):

Design und Analyse von Oligonukleotiden.

InfranView

Software zur Bilddatenaquisition mittels Lichtmikroskopie.

Leica Confocal Software

Software zur Bilddatenaquisition mittels konfokaler Lasermikroskopie.

Volocity (Version 4.0.2, <http://www.improvision.de>):

Programm zur 3D-Rekonstruktion und -Analyse konfokaler Bilddatenpakete.

Adobe Photoshop (Version 7.0): Programm zur digitalen Bildbearbeitung.

2.2 Methoden

Alle Experimente wurden – sofern nicht anders angegeben – nach den allgemein gebräuchlichen Standardvorschriften für molekulares Arbeiten durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001).

2.2.1 DNA-Techniken

2.2.1.1 Mini/Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Kitsystem)

Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller (Macherey-Nagel für Mini- und Qiagen für Maxipräparationen). Das Prinzip der Präparation beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels einer Silica-Säule.

Die Maxipräparation enthält als zusätzlichen Schritt eine Isopropanolfällung der DNA und Waschen in 80 % Ethanol. Ausbeute an und Reinheitsgrad der erhaltenen Plasmid-DNA waren in beiden Fällen hoch.

2.2.1.2 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Kochmethode)

5 mL Bakterienkultur wurden zentrifugiert und das Bakterienpellet in 300 μ L STET-Puffer plus 30 μ L 10 x Lysozymlösung resuspendiert. Es wurde 90 s bei 100°C im Heizblock gekocht und 60 s auf Eis abgekühlt, gefolgt von 10 min. Zentrifugation bei 13000 g. Pelletierte genomische DNA wurde vorsichtig mit einer kleinen Pipettenspitze entfernt und die noch gelöste Plasmid-DNA mit 300 μ L Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 g, Verwerfen des Überstands und Trocknung des Pellets wurde dieses in 60 μ L TE-Puffer gelöst. Die Lösung enthält die Plasmid-DNA und zu einem großen Anteil auch bakterielle RNA. Die Plasmid-DNA-Lösung war zur Analyse mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung geeignet. Jedoch waren Ausbeute (aufgrund von *low copy*-Plasmiden) und Reinheitsgrad der Plasmid-DNA oftmals zu gering, so dass zur Sequenzierung die DNA-Präparation mittels Kitsystem erfolgte.

2.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Mullis and Faloona, 1987) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Sequenzen *in-vitro*. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass zumindest ein Teil der zu amplifizierenden Sequenz bekannt ist. Mit der bekannten Sequenz als Vorlage (dsDNA = *double strand* DNA) werden zwei einzelsträngige Oligonukleotide (*primers*) synthetisiert, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren und zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind (*forward* bzw. *reverse primer*). Überdies können die Primersequenzen Erkennungsmotive für Restriktionsenzyme bzw. Rekombinationssequenzen für Klonierungen oder einzelne falsche Basen zur gerichteten Mutation einer DNA-Vorlage beinhalten.

Eine PCR besteht aus drei Schritten: Der erste Schritt besteht in der Denaturierung der Vorlage-DNA durch Hitze (95°C), sodass die beiden komplementären DNA-Stränge als Einzelstränge (ssDNA = *single strand* DNA) vorliegen. Im zweiten Schritt hybridisieren die Primer an die entsprechenden komplementären Sequenzen der ssDNA (Anlagerung, *annealing*).

Im Reaktionsansatz sind die Oligonukleotide im Überschuss vorhanden und binden bei einer für sie optimalen Temperatur, üblicherweise zwischen 55 und 61°C. Im dritten Schritt verwendet eine DNA-abhängige DNA-Polymerase die gebundenen Primer als Startpunkt, um den durch die Primer flankierten Sequenzabschnitt der ssDNA-Vorlage selektiv in 5'→3'-Richtung zur dsDNA aufzufüllen (Synthese). Das geschieht durch den Einbau der im Reaktionsansatz vorhandenen Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs = dATP, dCTP, dGTP und dTTP) bei einer für die Polymerase spezifischen optimalen Temperatur, in der Regel 72°C. Die Synthesezeit für die Polymerase hängt von der Länge der Vorlage-DNA ab. Als Faustregel gilt, dass 1 kb in 1 min. synthetisiert wird. Bei zyklischer Wiederholung der drei Schritte dienen die neu synthetisierten DNA-Fragmente wiederum als Vorlage-DNA, was theoretisch zu einer Verdopplung der DNA nach jedem Zyklus führt; es handelt sich also theoretisch um exponentielle Vervielfältigung.

In der Praxis tritt die exponentielle Phase jedoch erst nach dem etwa zwanzigsten Zyklus ein, wenn alle Reaktionskomponenten optimal ausgerichtet sind. Es reichen 30-40 Zyklen aus, um die Vorlagen-DNA auf die gewünschte Menge zu amplifizieren, üblicherweise werden 20-100 ng/μL DNA als Produkt (Amplikon) der PCR erhalten.

Der wesentliche Punkt, der die PCR überhaupt erst ermöglicht, ist die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien, z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Diese Polymerasen überstehen den Denaturierungsschritt ohne Funktionsverlust.

Für die Amplifikation langer DNA-Sequenzen (> 3000 bp) wurde Platinum®-Polymerase der Firma Fermentas verwendet, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, welche eine 1000-fach geringere Fehlerrate beim Einbau der dNTPs bewirkt. Alle anderen PCRs wurden mit Go®-Taq-Polymerase der Firma Promega durchgeführt.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten und Mengen bzw. Endkonzentrationen: 50-100 ng Vorlagen-DNA; 0,2-0,4 μM forward/reverse Primer; 0,2 mM dNTPs; 1x Fertigpuffer, 5% DMSO und 1 Unit Polymerase.

Die PCR-Bedingungen im Standardprotokoll zur Programmierung des Thermocyclers waren wie folgt: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min., anschließend 35 Zyklen mit den drei Schritten: Denaturierung bei 94°C für 30 sec., Anlagerung bei 57°C für 40 sec., Synthese bei

72°C (1 min. pro 1000 bp). Schließlich erfolgte ein terminaler Syntheseschritt mit 2 min. pro 1000 bp und die Abkühlung auf 4°C bis zur Entnahme der Proben.

Im Rahmen dieser Arbeit diente die PCR vor allem der Erzeugung von DNA-Fragmenten zur gerichtete Klonierung in Plasmidvektoren. Dafür müssen die Primer passende Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und einige Basen Überhang enthalten (siehe Abschnitt 2.2.1.14). Außerdem wurde die PCR zur schnellen Ermittlung der erzeugten Konstrukte eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.15).

Nicht zuletzt ermöglichte die PCR die gezielte Mutagenese von DNA-Fragmenten, wie im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

2.2.1.4 Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für diese Methode nach Ito et al. (1994) wird nur ein mutagenisierender Primer benötigt, außerdem drei andere, die für verschiedene Konstrukte unverändert bleiben, falls der selbe Vektor benutzt wird. Es ist die Methode der Wahl, wenn viele Mutagenesen durchgeführt werden müssen, wie eben hier zur Herstellung einer Deletionsserie durch den LATE-Enhancer, bei der 40 Basenpaare jeweils nacheinander deletiert werden sollen. Die Abbildung verdeutlicht die Anordnung der benötigten Primer (I – IV), der Restriktionsschnittstellen (RS1 + 2) und des zu mutierenden Bereichs Δ (MS):



Die Restriktionsschnittstellen müssen in der Vorlage-DNA bereits vorhanden sein, damit das richtige Produkt am Ende der Mutagenese-PCR einfach in den Vektor mit den selben Schnittstellen ligiert werden kann.

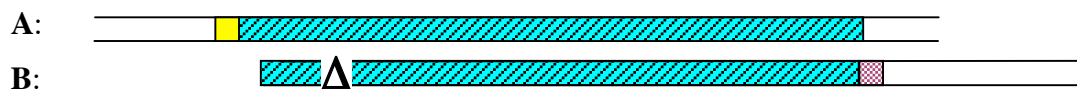
Primer I und II sind jeweils forward- bzw. reverse-Primer und ermöglichen die Amplifikation vor bzw. hinter der gesamten Klonierungsregion.

Primer III ist der mutagenisierende Primer, der jeweils 15 Basen Sequenz vor und hinter des zu deletierenden Bereichs enthält, kurz, in diesem Fall fehlt diejenige Sequenz im Primer, die deletiert werden soll; während der PCR bindet dieser Primer an die Vorlage-DNA in einer

Weise, dass nur die 15 Basen vor und hinter der zu deletierenden Sequenz amplifiziert werden, der Bereich dazwischen fehlt im Produkt, ist deletiert.

Primer IV enthält eine Sequenz, mit der die Schnittstelle RS2 funktionslos wird und dient zur Selektion des richtig mutierten Produkts; die Schnittstelle des mutierten Produkts ist intakt und kann deshalb verdaut und ligiert werden (siehe Abschnitt 2.2.1.17).

Es werden zwei PCR-Schritte durchgeführt. Im ersten Schritt wird – in zwei separaten Reaktionen – mit den Primern I + IV (Reaktion A) bzw. den Primern II + III (Reaktion B) amplifiziert. Folgende Produkte werden gebildet:



Die Produkte werden geleluert (siehe Abschnitt 2.2.1.7), gemischt, und dienen beide als Vorlagen im zweiten PCR-Schritt. Dort werden Primer I + II eingesetzt und nur 13 bis 15 Zyklen amplifiziert. Die Primer werden erst nach 4 Zyklen zugegeben, nachdem die Vorlagen Gelegenheit hatten, durch wiederholtes Denaturieren und Hybridisieren miteinander zu kombinieren. Der zweite PCR-Schritt liefert folgende Produkte:



Produkt 1 ist das gewünschte Produkt, bei ihm sind 40 Basenpaare deletiert (Δ), und es enthält beide Schnittstellen, womit es in den Ausgangsvektor kloniert werden kann. Produkt 2 ist zwar auch anwesend, aber aufgrund des Fehlens der zweiten Schnittstelle kann es nicht kloniert werden und stört daher nicht.

2.2.1.5 Aufreinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Diese Methode war erforderlich für DNA-Lösungen als Ausgangsmaterial z.B zur mRNA-Herstellung *in-vitro* oder Mikroinjektion. Nahezu alle Verunreinigungen, etwa störende RNAsen, werden damit entfernt.

Dazu wurde die gewünschte Menge DNA in 100 μL H_2O gelöst und mit 100 μL Phenol versetzt. Dann wurde solange mit dem Vortexer gemischt, bis eine milchige Emulsion entstand (Vorsicht bei DNA größer als 12 kbp wegen Scherkräften). Zur Trennung von Phenol- und wässriger Phase wurde anschließend 2 min. bei 13000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die DNA und die untere organische Phase die Verunreinigungen. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert – ohne die untere Phase zu berühren – und in ein neues, sauberes Gefäß überführt. Zur Reinigung von Phenolresten wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, beide Phasen wieder gut gemischt und zu deren Trennung wieder zentrifugiert. Erneut wurde die obere Phase (DNA) in ein neues Gefäß gebracht.

Zur Entfernung von Rückständen an Chloroform wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dafür wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben, gemischt, und zur Fällung mindestens 2 h bei -20°C (oder 30 min. bei -80°C) inkubiert. Es folgte Zentrifugation bei 13000 g und Waschen des DNA-Pellets mit 80 % Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA besitzt aufgrund ihrer Phosphatgruppen bei neutralem pH-Wert eine stark negative Ladung und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. In einem Agarosegel ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA abhängig von ihrer Moleküllänge und ihrer Topologie. Agarose ist ein gelierfähiges Polysaccharid, das aus alternierenden Einheiten von β -1,3-verknüpfter D-Galaktopyraose und α -1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro-L-galaktopyranose besteht. Kurze DNA-Fragmente und kompakte DNA-Strukturen (cccDNA = *covalently closed circular* DNA und *supercoiled* DNA) wandern schneller durch das Maschensystem von Agarosegelen als lange Fragmente oder relaxierte Strukturen.

Ethidiumbromid, das zwischen benachbarte Basenpaare einer dsDNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert, ermöglicht die Sichtbarmachung der DNA im Gel. Mit Ethidiumbromid können 5 ng einer 5 mm breiten DNA-Bande detektiert werden.

Routinemäßig wurden 1 %- Gele mit 1 g Agarose und 1 μ L Ethidiumbromid pro 100 mL TAE-Puffer gegossen. 1 %-Gele waren ausreichend zur Analyse von DNA-Längen über 500 bp, für kürzere wurden 1,8 %-Gele verwendet.

Dazu wurde die Agarose mit TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, wodurch die Agarose gelöst wurde. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurde der Lösung Ethidiumbromid zugesetzt, gemischt, und in einen Gelschlitten gegossen. Ein Kamm zum Freihalten von Taschen zur Befüllung mit der zu analysierenden DNA-Proben wurde am oberen Ende positioniert. Nach dem Erstarren (< 40°C) wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. In die Aussparungen, die der Kamm hinterlässt, wurden die Proben pipettiert, welche zuvor mit 1/5 Volumen 6 x Ladepuffer versetzt wurden. Aufgrund seines Glyzeringehalts ermöglicht der Ladepuffer das Absinken der Proben in die Taschen, außerdem kann durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau und Xylen Zyanol FF die Laufstrecke abgeschätzt werden, die während der Elektrophorese zurückgelegt wird. Bromphenolblau migriert entsprechend etwa 500 bp, Xylen Zyanol FF etwa 2000 bp.

Durch Anlegen einer konstanten Spannung im Bereich von 90 bis 140 Volt wurde die Elektrophorese durchgeführt. Nachdem die Bromphenolmarkierung etwa 2/3 des Gels passiert hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel kurz mit Wasser abgespült und zur Dokumentation auf dem UV-Tisch ($\lambda = 280$ nm) photographiert.

Die Abschätzung der Länge eines im Gel aufgetrennten DNA-Fragments erfolgte durch Vergleich mit einem handelsüblichen DNA-Größenstandard (DNA-Leiter-Mix der Firma PeqLab).

2.2.1.7 Präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen (Gelelution)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente können aus Agarosegelen isoliert und für nachfolgende Reaktionen (z.B. Klonierungen oder Markierungen) verwendet werden. Dafür wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden mit UV-Licht der Wellenlänge von 365 nm

sichtbar gemacht werden mussten, um Quervernetzungen der DNA bei kürzerwelligem UV-Licht (280 nm) vorzubeugen.

Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem peqGOLD® Gel Extraction-Kit der Firma PeqLab nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip des Kits beruht auf der reversiblen Bindung der DNA (nach dem Auflösen der Agarose) an eine Silikamatrix in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze.

Abweichend vom Protokoll wurden zur Elution der DNA statt Elutionspuffer nukleasefreies Wasser verwendet, um für nachfolgende kritische Reaktionen (z.B. mRNA-Synthese) Verunreinigungen vorzubeugen und optimale Pufferkonzentrationen zu gewährleisten.

2.2.1.8 Quantifizierung von DNA im Agarosegel

Zur Abschätzung der Konzentration einer DNA-Probe wurde die Helligkeit der Bande der Probe mit der Helligkeit einer Bande des DNA-Größenstandards entsprechender Länge mit bekannter Konzentration verglichen. Die Abschätzung kann im Bereich von 10 bis 200 ng/ μ L erfolgen, höher konzentrierte Lösungen müssen vorher verdünnt werden. Die Bestimmung der DNA-Konzentration ist ungenauer als im Photometer, allerdings kann im Agarosegel zwischen den verschiedenen DNA-Bestandteilen unterschieden werden. Z.B. kann bei der Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten zwischen Produkt und Primerdimeren differenziert werden, was im Photometer nicht möglich ist.

2.2.1.9 Quantifizierung von DNA im Photometer

Das Prinzip der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Gemessen wurde die Absorption einer DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}), wobei eine optische Dichte von 1 der Konzentration von 50 ng/ μ L entspricht. Zusätzlich wurde die Absorption von Proteinen, genauer der aromatischen Seitengruppen einiger Aminosäuren, bei 280 nm Wellenlänge gemessen (A_{280}). Der Quotient aus A_{260} und A_{280} gibt den Grad der Verunreinigung der DNA-Probe mit Proteinen an. Bei reiner DNA sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.10 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

2.2.1.10.1 Klonierung via Restriktionsverdau und Ligation

Zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten (Insert) in Vektoren wurden möglichst zwei unterschiedliche Restriktionsendonukleasen gewählt, die inkompatible überhängende Enden generierten (siehe auch Abschnitt 2.2.1.14). Der Vektor wurde mit diesen nach Angaben des Herstellers komplett verdaut, dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.1.13), geleluert und die Konzentration bestimmt. PCR-generiertes oder aus Restriktionsverdau stammendes Insert wurde ebenfalls geleluert und die Konzentration bestimmt. Anschließend wurden 100 ng Vektor mit einem bis zu doppelten Überschuss an Insert zusammen in einem Gesamtvolumen von 20 μL nochmals 30 min. mit den selben Enzymen verdaut, die dann 10 min. bei 80°C inaktiviert wurden. Schließlich erfolgte die Zugabe von 1 Unit T4-DNA-Ligase, ATP (Endkonzentration 1 mM) und DTT (Endkonzentration 10 mM). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, und die Ligase am nächsten Tag 10 min. bei 70°C inaktiviert. Der Ansatz war nun bereit zur Transformation in *E. coli* (siehe Abschnitt 2.2.1.11).

Zur Anleitung der Konstruktion der GFP-Expressionsvektoren der LATE-Deletionsanalyse siehe Abschnitt 2.2.1.17.

2.2.1.10.2 Klonierung via *Gateway*®

Bei der Klonierung der EGFP-Expressionsvektoren kam die *Gateway*®-Technik (Invitrogen) zum Einsatz. Im Eingangsvektor waren die Amplikons von Erkennungssequenzen für spezifische Rekombinationsstellen des Bakteriophagen λ , sogenannten *attachment sites* (att-Stellen), flankiert. Diese benötigt der Phage nach Infektion eines Bakteriums für die Integration seiner DNA in das Genom seines Wirts. Im Bakteriengenom sind ebenfalls solche att-Stellen vorhanden, die von einem bestimmten Enzym des Phagen, der Integrase, erkannt werden. Die Integrase verursacht an den att-Stellen Doppelstrangbrüche sowohl in der Phagen-, als auch in der Bakterien-DNA und katalysiert so den Einbau der Phagen-DNA in das Bakteriengenom. Dabei werden die Sequenzen zwischen den att-Stellen ausgetauscht, es handelt sich also um eine Rekombinationsreaktion. Die *Gateway*®-Kloniertechnik beruht auf diesem Prinzip und ermöglicht so vermittels der Clonase® den Einbau von mit att-Stellen

flankierten DNA-Sequenzen in spezielle Zielvektoren, welche auch att-Stellen besitzen. Variationen der att-Stellen erlauben die gerichtete Klonierung.

Zur Anleitung der Konstruktion der EGFP-Expressionsvektoren (Zielvektoren) siehe Abschnitt 2.2.1.19.

2.2.1.10.3 Klonierung in den pGEM®-T-*Easy*-Vektor

Die mit GoTaq®-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte tragen an ihren 3'-Enden ein einzelnes Desoxyadenosin (A-Überhang). Für die Ligation dieser Amplikons wurde der pGEM®-T *Easy*-Vektor (Promega), ein an seinen 3'-Enden mit entsprechendem Desoxythymidin-Überhang modifizierter T-Vektor (T-Überhang), verwendet. Die Ligation erfolgte mit der aus dem Kit stammenden T4-Ligase im vom Hersteller mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 μL über Nacht bei 4°C (TA-Klonierung). Danach wurde die Reaktion für 10 min. bei 70°C inaktiviert und schließlich in *E. coli* transformiert. In der Regel wurden bis zu 50 % der erhaltenen Klone positiv getestet.

2.2.1.10.4 Klonierung in den TOPO®-Vektor

Auch bei diesem Verfahren handelt es sich um die TA-Klonierung (siehe vorheriger Abschnitt), allerdings unterstützt hier ein Enzym den Klonierungsprozess zusätzlich. Der TOPO®-Vektor trägt am 3'-Ende das Motiv CCCTT, wobei das letzte T den T-Überhang bildet. Das Enzym Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus bindet dsDNA am CCCTT-Motiv und schneidet das Phosphodiester-Rückgrat in einem Strang, wobei die entstehende Energie in der kovalenten Bindung zwischen 3'-Phosphat der DNA und einem Tyrosylrest der Topoisomerase gespeichert wird. Das 5'-Hydroxyl-Ende eines zu klonierenden Inserts (mit A-Überhang am 3'-Ende) kann die kovalente Bindung attackieren, die Enzymreaktion umkehren die gespeicherte Energie für den effizienten Einbau des Inserts in den Vektor nutzbar machen. Das erspart auch den Einsatz von Ligase.

In einer typischen Reaktion wurden bis zu 2 μL frisches PCR-Produkt mit jeweils 0,5 μL TOPO®-Vektor und mitgelieferter Salzlösung vermischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte direkt die Transformation in *E. coli*. Die Klonierungseffizienz lag zwischen 90 und 100 %.

2.2.1.11 Transformation in *E. coli* und Selektion positiver Klone

Für die Transformation wurden 50 μL einer Suspension kompetenter Bakterien des Stammes *E. coli* XL-1-blue mit Plasmid-DNA (1-100 ng) oder 2-6 μL Ligationsansatz vermischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 40 sec. (Poren der Bakterienmembran öffnen sich). Nach weiteren 2 min. auf Eis (Poren schließen sich) wurden 550 μL LB-Medium zugegeben und für die Expression des jeweiligen Antibiotikumresistenzgens für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Schließlich erfolgte das Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthalten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei Blau-Weiß-Selektion (siehe nächster Abschnitt) wurden vor dem Ausplattieren 20 μL X-Gal-Lösung (50 mg/mL) und 100 μL IPTG-Lösung (100 mM) auf den Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag sollten gut voneinander abgegrenzte Kolonien (Klone) auf der Platte sichtbar gewesen sein. Diese Kolonien trugen die transformierte Plasmid-DNA mit Resistenzgenen und konnten auf Selektivmedium wachsen.

Zur Überprüfung der transformierten Plasmid-DNA wurden entweder nach Kultivierung einer Einzelkolonie und anschließender Plasmidpräparation Testverdaus (siehe Abschnitt 2.2.1.14) durchgeführt, oder Kolonien direkt mittels PCR getestet (siehe Abschnitt 2.2.1.15).

2.2.1.12 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Identifizierung von Bakterien, die Plasmid-vektoren mit Insert tragen. Vektoren für die Blau-Weiß-Selektion (u.a. pGEM®-T-*Easy*) haben ihre multiple Klonierungsstelle für Fremd-DNA (Insert) im Leseraster des *lacZ*-Gens, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Werden Bakterien mit diesen Vektoren transformiert und auf LB-Platten ausplattiert, welche zuvor mit dem chromogenen Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) und IPTG (Isopropyl- β -D-Thio-Galaktosid) versehen wurden, spaltet die β -Galaktosidase ihr Substrat X-Gal enzymatisch zu Galaktose und den Indigo-Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-3-Indol, durch den sich die transformierten Bakterien blau färben. IPTG dient als Induktor für das *lacZ*-Gen.

Durch Integration von Fremd-DNA an der multiplen Klonierungsstelle des Vektors wird das Leseraster des *lacZ*-Gens unterbrochen. Es kann somit keine funktionsfähige β -Galaktosidase

mehr gebildet werden, sodass die mit jenen Vektoren transformierten Bakterien in Gegenwart von X-Gal farblos bleiben. Farblose Bakterien tragen somit Vektoren mit Insert und können so selektioniert werden.

2.2.1.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vorbeugung einer Selbstligation von verdaulichem Vektor mit kompatiblen DNA-Enden oder von nicht komplett verdaulichem Vektor mit inkompatiblen DNA-Enden in einem Ligationsansatz, wurde die Vektor-DNA an ihren 5'-Enden dephosphoryliert.

Dazu wurde die Vektor-DNA nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme mit 1 Unit *Shrimp* Alkalischer Phosphatase (SAP) der Firma Promega 1 h bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde dann für 10 min. bei 70°C inaktiviert. Zum Schluss erfolgte die Aufreinigung der Vektor-DNA mit dem peqGOLD® Gel Extraction Kit der Firma PeqLab.

2.2.1.14 DNA-Analyse mittels Testverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische dsDNA-Sequenzen und schneiden dort durch Hydrolyse beide DNA-Stränge so, dass an der Schnittstelle immer ein 5'-phosphoryliertes und ein 3'-hydroxyliertes Ende entsteht. Die Enden können 5'- oder 3'-überhängend (z.B. Hind III bzw. Kpn I) oder glatt (z.B. Sma I) sein. Auf diese Weise kann die DNA bei bekannter Sequenz spezifisch fragmentiert werden. Dies ermöglicht sowohl die Ausstattung von PCR-Produkten mit Schnittstellen zur gerichteten Klonierung in einen Vektor, der mit den selben Schnittstellen in seiner multiplen Klonierungsstelle versehen ist, als auch die Überprüfung dieser klonierten Konstrukte.

Zur Überprüfung der Konstrukte würde das zirkuläre Plasmid in der Regel einerseits mit einem Enzym geschnitten, das die DNA zur Bestimmung der Gesamtmolekülgröße linearisiert (ein Schnitt zur Auflösung aller *nicked-circles*- und *supercoil*-Strukturen des Plasmids), und andererseits mit den Enzymen, welche ein eingefügtes DNA-Fragment wieder aus dem Konstrukt befreien.

Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers und unter Benutzung der mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge variierte je nach Aktivität des entsprechenden Enzyms, der Qualität und der Menge der zu restringierenden DNA.

Für einen typischen Testverdau wurden bis zu 1 μg DNA aus einer Plasmidisolierung mit 5 Units Enzym, dem dazu passenden Puffer und Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 μL für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann für 10 min. bei 80°C inaktiviert. Schließlich wurde der Reaktionsansatz mit 4 μL Gelladepuffer (6 x) versetzt und gelelektrophoretisch analysiert. Das so erhaltene Bandenmuster zeigte das korrekte Plasmidkonstrukt an.

2.2.1.15 DNA-Analyse mittels PCR

Zur schnellen Überprüfung hinsichtlich des Vorhandenseins klonierter Inserts in Plasmidkonstrukten ohne vorherige Plasmidpräparation kam wieder die PCR zum Einsatz. Anstatt aus Bakterien präparierter Plasmid-DNA diente ein Teil der Bakterienkolonie von der Agarplatte als Vorlagen-DNA. Im ersten Denaturierungsschritt brechen die Bakterien auf und geben so die Plasmid-DNA frei. Hierfür wurde mit einer kleinen Pipettenspitze vorsichtig eine kleine Menge Bakterienkolonie in den PCR-Ansatz überführt.

Zur Überprüfung der richtigen Orientierung des Inserts im Vektor wurde das Primerpaar so gewählt, dass ein Primer im Vektor und der andere im Insert bindet. Im Falle des korrekten Konstrukts wurde ein PCR-Produkt definierter Größe gebildet. Dieses Vorgehen war bei der Klonierung in pGEM®-T- und TOPO®-Vektoren notwendig. Bei der gerichteten Klonierung mittels inkompatibler DNA-Enden genügte es bisweilen, nur das Primerpaar des Inserts zu verwenden, da hier dessen Orientierung im Vektor schon durch die Wahl der Schnittstellen vorgegeben war.

2.2.1.16 DNA-Sequenzierung

Die endgültige Überprüfung eines Plasmidkonstrukts erfolgte durch DNA-Sequenzierung. Die Ermittlung der Basensequenzen wurde von den Firmen GATC (Konstanz) oder Quiagen (Hilden) durchgeführt. Standardprimer wurden von den Firmen bereitgestellt. Falls nötig wurden spezielle Primer zusammen mit den Proben verschickt.

2.2.1.17 Konstruktion der GFP-Expressionsvektoren (Meganuklease-System)

Im Plasmidvektor pBL3.1(mouseLATE):*gfp* musste zuerst eine von Xho I und Hind III umgebene Sal I-Schnittstelle eliminiert werden (1), damit die Maus-LATE-Sequenz, die ebenfalls von Sal I-Schnittstellen eingerahmt wird, im nächsten Schritt durch ein Adapteroligonukleotid ersetzt werden konnte, welches das Einsetzen der ursprünglichen Zebrafisch-LATE-Sequenz bzw. der verschiedenen LATE-Deletionsfragmente ermöglichte (2). Durch den Einbau des Adapters wurden ebenfalls die Sal I-Schnittstellen eliminiert. Der Adapter beinhaltet sowohl eine Nar I- und eine Xho I-Schnittstelle zur gerichteten Klonierung der mittels PCR erzeugten LATE-DNA-Fragmente, als auch eine Schnittstelle für Age I. Nach Einbau des Adapters wurde der Vektor mit Nar I und Xho I verdaut, dephosphoryliert und gereinigt und somit bereit für die Ligation der LATE-Fragmente (3).

(1):

1 μg pBL3.1(mouseLATE):*gfp* wurde mit jeweils 5 Units Xho I und Hind III im passenden Puffer für 2 h verdaut und nach Ethanol-fällung in 10 μL Wasser gelöst. Die überhängenden Enden wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt: Zugabe von 0,5 μL dNTPs (25 μM), 1 Unit Klenow, in 20 μL Gesamtvolumen mit passendem Puffer für 20 min. bei 37°C inkubiert und für 10 min. bei 70°C inaktiviert. Dann wurden 3 Units T4-Ligase zugegeben und der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 100 μL mit passendem Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Transformation, Selektion und Überprüfung des richtigen Vektors wurde dieser weiterverwendet für den Austausch der Maus-LATE-Sequenz durch den Adapter.

(2):

10 μg Vektor wurden mit 20 Units Sal I in einem Gesamtvolumen von 30 μL mit passendem Puffer für 2 h verdaut und nach Ethanol-fällung mit 1 Unit SAP und passendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 μL für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert. Es folgten Gelelution und Konzentrationsbestimmung. Parallel wurden jeweils 1 μg Plus- und Minusstrang des Adapteroligonukleotids separat mit 20 Units T4-Polynukleotid-Kinase (Promega) mit 5 mM ATP mit passendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 25 μL für 30 min. bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 3 μL 50 mM EDTA gestoppt. Zur Hybridisierung beider Stränge wurden beide Reaktionen gemischt, auf 65°C im

Heizblock für 10 min. erhitzt, dann für weitere 3 min. bei 37°C inkubiert und schließlich auf Raumtemperatur abgekühlt.

Der phosphorylierte und hybridisierte Adapter wurde über eine Silikamatrix gereinigt und war nun bereit für die Ligation mit dem Sal I-verdauten und dephosphorylierten Vektor: 100 ng Vektor wurden mit 50 ng Adapter, 1 Unit T4-Ligase in passendem Enzympuffer in einem Gesamtvolumen von 10 μ L über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Hitzeinaktivierung der Ligase erfolgte durch Zugabe von 2 Units Sal I ein halbstündiger Verdau, um unter Umständen religierten Vektor ohne Insert vor der anschließenden Transformation zu linearisieren. Linearisierte Vektor-DNA wird schlechter in Bakterien eingeschleust als zirkuläre DNA. Auf diese Weise wurde die Wahrscheinlichkeit der Transformation korrekter Konstrukte erhöht. Das richtige Adapter-konstrukt wurde durch Testverdau und DNA-Sequenzierung identifiziert.

(3):

Nun erfolgte die Klonierung der ursprünglichen Zebrafisch-LATE-Sequenz als Referenz-GFP-Reporterkonstrukt und parallel der Deletionsfragmente. Die LATE-Sequenz umfasste 406 bp, darum wurden zehn Fragmente mit Deletionen von jeweils 40 bp nacheinander und nicht überlappend mittels Mutagenese-PCR erzeugt, wobei die zehnte Deletion 46 bp umfasste. Die jeweiligen Fragmente enthielten an ihren Enden Schnittstellen zur gerichteten Klonierung (5'-Ende: Nar I; 3'-Ende: Xho I).

100 ng Nar I- und Xho I-verdauter, dephosphorylierter und geleluierter Adaptervektor wurden mit 100 ng geleluertem PCR-Produkt und jeweils 5 Units Nar I und Xho I in einem Gesamtvolumen von 20 μ L mit passendem Puffer für 30 min. bei 37°C verdaut und anschließend hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde dann mit 1 Unit T4-Ligase, ATP (Endkonzentration 1 mM) und DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung wurden 5 Units Age I hinzugefügt und nochmals 30 min. bei 37°C verdaut, um religierten Adaptervektor ohne Insert zu linearisieren. Es folgten Hitzeinaktivierung und Transformation in *E. coli*.

Die GFP-Expressionsvektoren wurden auf die richtige Sequenz überprüft, gereinigt und zur Erzeugung stabil transgener Zebrafischlinien in Zygoten mikroinjiziert (siehe unten).

2.2.1.18 Umstellung vom Meganuklease- auf das *Tol2*-System

2.2.1.18.1 Konstruktion von 3.1-EGFP-Reporterkonstrukten

pT2KXIG wurde mit Apa I und Nco I verdaut und auch hier ein Adapteroligonukleotid eingesetzt, das unter anderen eine Csp45 I-Schnittstelle enthielt, die den Einbau der jeweiligen 3,1 kbp genregulatorischer Fragmente ermöglichte. Die LATE-Sequenz erstreckte sich von Position 1,3 bis 1,7 kbp innerhalb der 3,1 kbp stromaufwärts gelegenen genregulatorischen Sequenz von *neurog1*. Diese 3,1 kbp wurden aus dem Referenz-GFP-Reporterkonstrukt und den jeweiligen Deletionskonstrukten mittels Csp45 I- und Nco I-Verdau isoliert und in den (Apa I und Nco I verdauten) EGFP-Expressionsvektor pT2KXIG subkloniert zum Erhalt von 3.1-Referenz- bzw. 3.1-LATE-Deletions-Reportern des *Tol2*-Systems. Die molekularen Arbeiten erfolgten analog zur Klonierung in Abschnitt 2.2.1.17.

2.2.1.18.2 Konstruktion von 8.4-EGFP-Reporterkonstrukten

Die 3.1-Referenz- bzw. 3.1-LATE-Deletions-Reporter wurden mit Apa I und Cpo I verdaut (die Cpo I-Stelle liegt innerhalb der 3,1 kbp-Sequenz). Die Region von -8,4 kbp (5'-Ende) bis einschließlich Cpo I-Stelle wurden aus pBL8.4ngn1:*gfp* (Blader et al., 1997) amplifiziert, wobei der 5'-Primer eine Apa I-Stelle enthielt. Das Amplikon enthält somit LSE und ANPE mit 5'-Apa I und 3'-Cpo I, und wurde schließlich in die Apa I/Cpo I-verdauten 3.1-Referenz- bzw. 3.1-LATE-Deletions-Reporter ligiert zum Erhalt von 8.4-Referenz- bzw. 8.4-LATE-Deletions-Reportern des *Tol2*-Systems. Die molekularen Arbeiten erfolgten analog zur Klonierung in Abschnitt 2.2.1.17.

2.2.2 Markierungstechniken

2.2.2.1 Radioaktive Markierung rekombinant erzeugter Proteine

Diese Methode erwies sich nützlich zur Bestimmung des korrekten Molekulargewichts rekombinant erzeugter Proteine für Protein-DNA-Interaktionsassays. Hier sei auf Abschnitt 2.2.4.1 verwiesen.

2.2.2.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden für Protein-DNA-Interaktionsassays

Die radioaktive Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden diente der Herstellung von DNA-Sonden zum Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 2.2.5). Sie erfolgte mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (Promega). Die Kinase katalysiert den Transfer einer radioaktiven Phosphatgruppe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ an die 5'-Hydroxylgruppe der Oligonukleotide.

Zuvor jedoch mussten die synthetischen, einsträngigen und komplementären Oligonukleotide zu dsDNA hybridisiert werden. Dazu wurden jeweils 5 μg Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 40 μL vermischt und 5 min. bei 95°C vollständig denaturiert. Dann erfolgte die Hybridisierung bei 60°C für 5 min. und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Kinasereaktion in einem 50 μL -Ansatz mit 1 μg doppelsträngigem Oligonukleotid, 5 μL 10-fach Kinasepuffer, 3 μL $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (entsprechend 30 μCi) und 10 Units Polynukleotidkinase durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min. bei 37°C inkubiert. Die markierten Oligonukleotide wurden durch Zugabe eines zehntel Volumens 3 M Natriumazetat und 2,5-fachen Volumens absoluten Ethanol und zweistündiger Inkubation bei -20°C gefällt und 30 min. bei 13000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und in 50 μL Wasser gelöst.

In einem Szintillationszähler (Wallac Guardian) wurde dann die Aktivität der DNA-Sonde gemessen. Dazu wurde 1 μL Sonde in eine Pipettenspitze gezogen und diese in einem verschließbaren Messröhrchen abgesetzt. Die Messung der β -Aktivität erfolgte für eine Minute mit zwei Replikaten. Die Aktivität sollte 10000 cpm nicht unterschreiten.

2.2.2.3 Herstellung markierter cRNA-Sonden

Die Markierung von einsträngigen RNA-Molekülen erfolgte während ihrer Synthese mittels *In-vitro*-Transkription. Hierbei synthetisierten DNA-abhängige RNA-Polymerasen (T3-, T7- oder SP6-Polymerase) unter Verwendung einer Vorlagen-DNA und bei Anwesenheit der Ribonukleotide ATP, CTP, GTP und UTP einsträngige RNA-Moleküle gewünschter Basensequenz und -länge. Hierbei wurde UTP teilweise durch Digoxigenin-11-UTP bzw.

Fluorescein-11-UTP ersetzt, wodurch die synthetisierten RNA-Moleküle ihre Digoxigenin (DIG) - bzw. Fluorescein (FLUO) -Markierung erhielten.

Für diese Methode wurde der *DIG* bzw. *Fluorescein RNA Labeling Mix* der Firma Roche verwendet. Der (10-fach konzentrierte) Mix enthielt die Ribonukleotide ATP, CTG und GTP mit jeweils 100 mM, UTP mit 65 mM und DIG- bzw. FLUO-11-UTP mit 35 mM.

Als Vorlagen-DNA kam entweder linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt zum Einsatz, welche ein geeignetes Bindemotiv (T3-, T7- oder SP6-Promotor) als Startpunkt der Transkription für die jeweilige RNA-Polymerase enthielten. Zirkuläre Plasmid-DNA wurde zuvor am Endpunkt der Transkription mittels Restriktionsverdau linearisiert.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 0,5 bis 1 μg gereinigte Vorlagen-DNA, 2 μL *RNA Labeling Mix*, 4 μL 5-fach konzentrierten Transkriptionspuffer (mitgeliefert), 40 Units RNA-Polymerase und 40 Units RNase-Inhibitor (Firma Promega) in einem Gesamtvolumen von 20 μL . Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 h inkubiert, danach 1 μL entnommen und auf Bildung von RNA im Agarosegel überprüft. Die restlichen 19 μL wurden zum Verdau der Vorlagen-DNA mit 1 μL DNase (10 Units) versetzt und weitere 20 min. inkubiert. Schließlich erfolgte die Aufreinigung der RNA-Sonde mittels Ethanol-fällung durch Zugabe von einem halben Volumen 7,5 M Ammoniumazetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol. Nach mindestens 1/2 h Fällung bei -80°C und Zentrifugation bei 13000 g und 4°C wurde das getrocknete Pellet in 50 μL Hybridisierungspuffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.3 RNA-Techniken

2.2.3.1 Herstellung von mRNA für die Mikroinjektion

Das Kitsystem enthielt bis auf die Vorlagen-DNA alle benötigten Komponenten zur *in-vitro*-Transkription von mRNA mit 7-Methylguanostinium-Kappen-Analogon.

Die Vorlagen-DNA mit RNA-Polymerase-Bindungsstelle am 5'-Ende und Poly(A)-Signal am 3'-Ende wurde zuvor durch Schnitt mit einer passenden Restriktionsendonuklease stromabwärts des Poly(A)-Signals linearisiert, damit die Transkription dort stoppen konnte. Die linearisierte DNA wurde dann mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt und war so bereit für die folgende Transkription:

1 μg linearisierte und gereinigte Vorlagen-DNA wurden mit nukleasefreiem Wasser, 10 μL 2 x NTP/CAP, 2 μL Enzymmix und zuletzt 2 μL 10 x Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 μL vermischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μL TurboDNase zur Entfernung von Vorlagen-DNA zugegeben und nochmals für 20 min. bei 37°C inkubiert.

Es folgte eine Lithiumchloridfällung zur Aufreinigung der erzeugten RNA durch Zugabe von 30 μL nukleasefreiem Wasser und 30 μL LiCl-Fällungslösung (mitgeliefert). Nach gründlichem Vermischen wurde für mindestens 30 min. bei -20°C abgekühlt, und danach die RNA durch Zentrifugation bei 13000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, nach Trocknung in 25 μL nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung und Quantifizierung von RNA

In-vitro hergestellte mRNA wurde ähnlich wie DNA im Agarosegel analysiert. Anders als DNA bildet RNA leicht Sekundärstrukturen, die vor dem Gellauf durch Denaturieren aufgelöst werden mussten. Außerdem musste im Gel Formaldehyd anwesend sein, um der Renaturierung vorzubeugen.

Für ein 1,2 % Formaldehyd-Agarosegel wurden 1,2 g Agarose und 10 mL Formaldehydgelpuffer mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL gebracht, gemischt und durch Kochen in der Mikrowelle die Agarose geschmolzen. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 1,8 mL 37 % Formaldehydlösung sowie 1 μL Ethidiumbromidlösung zugegeben, gemischt, alles in einen passenden Gelschlitten gegossen und ein Taschenkamm platziert. Nach der Polymerisation wurde das Gel mindestens 1/2 h bei 120 V in Formaldehydgellaufpuffer equilibriert.

Ein Volumen RNA-Probe wurde mit einem Volumen 2-fach konzentriertem Gelladepuffer versetzt, 3 bis 5 min. bei 65°C inkubiert und bis zum Beladen des Gels auf Eis gelagert. Eine Tasche beinhaltete einen Standard zur Längen- und Mengenbestimmung der Probe. Der Elektrophorese erfolgte bei 120 V solange, bis die Bromphenolmarkierung des Ladepuffers etwa 2/3 der Gelstrecke passiert hatte.

Die genaue Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte analog der DNA-Konzentrationsbestimmung in einem spektrophotometrischen System (NanoDrop®1000, PeqLab). Abweichend davon entsprach eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 40 ng/ μL .

2.2.4 Protein-Techniken

2.2.4.1 Herstellung rekombinanter Proteine *in vitro*

Es wurde der TNT® *Quick Coupled Transcription/Translation Systems* Kit der Firma Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Vorlagen-DNA wurde linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt verwendet. Die DNA enthielt am 5'-Ende die Bindestelle für die RNA-Polymerase, gefolgt von der Kozak-Sequenz und dem Startkodon. Das 3'-Ende der Protein-kodierenden Sequenz war um die Sequenz für FLAG zur Detektion erzeugten Proteins verlängert, gefolgt vom Stoppkodon des jeweiligen Proteins.

Zusätzlich erfolgte die radioaktive Markierung des hergestellten Proteins durch den Einbau radioaktiven S-35-Methionins während der *in vitro* ablaufenden Proteinbiosynthese.

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 40 μL Retikulozytenlysat, 100-800 ng Vorlagen-DNA, 1 μL PCR-Enhancer und 1-3 μL ^{35}S -Methionin (entsprechend 10-30 μCi) in einem Gesamtvolumen von 50 μL . Der Ansatz wurde 90 min. bei 30°C inkubiert. 2-4 μL wurden mittels SDS-PAGE (siehe nächster Abschnitt) aufgetrennt. Schließlich erfolgte der Nachweis erzeugten Proteins durch Western-Blot und Detektion mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers (siehe Abschnitt 2.2.4.3) oder nach Trocknung des Gels mittels Autoradiographie (siehe Abschnitt 2.2.4.4).

Der Reaktionsansatz wurde bei -20°C gelagert und kam direkt, d.h. ohne Aufreinigung des rekombinanten Proteins, im Assay zur Protein-DNA-Interaktion zum Einsatz (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Nachweis rekombinant hergestellten Proteins im Retikulozytenlysat wurde der Reaktionsansatz mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichem Gelsystem. Dieses bestand aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proteine und aus einem Trenngel zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Separierung erfolgte in 1 mm dicken und vertikal gelagerten Minigelen der Firma BioRad. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Gels und der Entfernung des Isopropanols wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Taschenkamm platziert. Die Proteinproben wurden

mit dem gleichen Volumen 2 x Ladepuffer versetzt, 10 min. bei 75°C im Heizblock denaturiert und mit einer Hamiltonspritze in die Probenaschen pipettiert. Eine Tasche beinhaltete einen Marker als Größenstandard zur Abschätzung des Molekulargewichts nach Western-Blot oder Autoradiographie. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für etwa 1,5 h.

2.2.4.3 Western-Blot

Hierbei wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (geblottet). Durch den nivellierenden Effekt des SDS trugen alle Proteine eine Nettonegativladung und wanderten aus dem Gel durch den Blotpuffer zur Anode auf die Oberfläche der Membran, wo sie fixiert blieben. Die Präsenz der aufgetrennten Proteine auf der Membran machte diese zugänglich für den spezifischen Nachweis durch Antikörper.

Routinemäßig wurde im Blotpufferbad auf das Gel die mit Methanol aktivierte Membran platziert, oben und unten mit Whatman-Papier belegt und sandwich-artig in der Blotapparatur der Firma BioRad positioniert. Geblottet wurde üblicherweise über Nacht bei 30 V und Raumtemperatur. Schneller ging es unter Zuhilfenahme eines Eiseinsatzes für 1 h bei 100 V. Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran dreimal für 5 min. in PTW-Puffer gewaschen und dann in Blocklösung (*Odyssey* Blockpuffer 1:2 in PBS verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Anti-FLAG-Antikörper (aus der Maus) wurde 1:1000 in Blocklösung verdünnt, die geblockte Membran zusammen mit der Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht im Kühlraum bei 4-8°C inkubiert. Dann wurde die Membran viermal für 10 min. in PTW gewaschen, erneut geblockt und mit IR-Fluorochromgekoppeltem Anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:1000) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PTW und abschließendem Waschen in PBS erfolgte die Detektion des IR-Signals im *Odyssey Imaging System* der Firma LI-COR bei einer Wellenlänge von 700 nm.

Dem Signal der Bande des FLAG-gekoppelten rekombinant hergestellten Proteins wurde mit Hilfe des Größenstandards das Molekulargewicht zugeordnet. Dadurch konnte ermittelt werden, ob das richtige Protein erzeugt wurde.

2.2.4.4 Autoradiographie

Die korrekte Größe eines rekombinant erzeugten Proteins konnte auch durch den Einbau radioaktiv markierten ^{35}S -Methionins ermittelt werden. Nach der Auftrennung des Reaktionsansatzes zur Herstellung rekombinanten Proteins im SDS-Gel wurde dieses 1 h bei 80°C getrocknet. Dann wurde das trockene Gel über Nacht auf einem *Hyperfilm*®MP der Firma Amersham Biosciences exponiert, um die β -Emission dess *in vitro* translatierten Proteins zu detektieren. Auch hier wurde das korrekte Protein durch Vergleich mit einem Größenstandard bestimmt.

Die Autoradiographie diente auch dem Nachweis von radioaktiv markierten Protein-DNA-Komplexen (siehe nächster Abschnitt).

2.2.5 Assay zur Protein-DNA-Interaktion

Diese auch *Bandshift*-Analyse genannte Methode diente dem Nachweis und der Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen *in vitro*. Sie erlaubte die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren und der von ihnen gebundenen genregulatorischen DNA-Abschnitte.

Dafür wurde ein synthetisches, doppelsträngiges und radioaktiv markiertes DNA-Fragment (DNA-Sonde), welches den zu untersuchenden Abschnitt – hier: die Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor – enthält, mit rekombinant erzeugtem Protein inkubiert, anschließend in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Signal mittels Autoradiographie detektiert. Gegebenenfalls gebildete Protein-DNA-Komplexe sollten ein höheres Molekulargewicht aufweisen und daher langsamer im Gel wandern (Verschiebung der im Gel detektierten Bande nach oben = *bandshift*) als ungebundene freie DNA-Sonde.

Zur Charakterisierung des Bindungsspezifität wurde eine DNA-Sonde verwendet, bei der die Transkriptionsfaktorbindestelle mutiert war. Hierbei wurden Purin- mit Pyrimidinbasen ausgetauscht und umgekehrt (Transversionen). Diese DNA-Sonde sollte nicht vom untersuchten Protein gebunden werden und somit keinen *bandshift* verursachen. Darüberhinaus wurden Kompetitorexperimente durchgeführt, bei denen dem Reaktionsansatz, zusätzlich zur radioaktiv markierten DNA-Sonde, ein Überschuss an nicht-markierter DNA-Sonde (Kompetitor) zugesetzt wurde. Band der Kompetitor das Protein, dann nahm die Signalintensität des spezifischen Komplexes ab (homologe Competition). Wurde die

Bindungseigenschaft des Kompetitors durch Mutation verändert, so sollte es zu keiner Beeinflussung der Signalintensität kommen (heterologe Konkurrenz).

Außerdem waren im Reaktionsansatz mindestens 1 μg Poly(dI:dC)- oder Kalbsthymus-DNA anwesend, um unspezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen abzufangen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 10 mM HEPES (pH 7,9), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1,5 % Glycerin, 4 % Ficoll und 2 μg Kalbsthymus-DNA. Es wurden zwischen 40000 und 100000 cpm radioaktiv markierter DNA-Sonde eingesetzt sowie 1-3 μL rekombinant erzeugten Proteins. Bei Konkurrenz waren zunehmende Mengen nicht-markierter Sonde anwesend, entsprechend etwa einem 10- bzw. 100-fachen Überschuss. Das Gesamtvolumen war 30 μL . Die Reaktion wurde 30 min. bei 30°C inkubiert dann in einem 6 % Polyacrylamidgel bei 140 V für etwa 1,5 h aufgetrennt. (Vor dem Beladen wurde das Gel durch das Anlegen dieser Spannung für etwa 2 bis 3 h equilibriert). Nach Trocknung des Gels für 2 h bei 80°C erfolgte die Exposition auf einem Autoradiographiefilm für 4-18 h bei -80°C mit anschließender Analyse des Bandenmusters.

2.2.6 Haltung der Zebrafische

Es wurden Zebrafische der Stämme AB* und AB₂O₂ verwendet und in 10 L-Aquarien-tanks gezüchtet mit maximal 30 Tieren pro Tank. Bis zu 10 Tiere konnten auch in umgebauten 3 L-Mauskäfigen gepflegt werden. Die Tiere erhielten einen Hell/Dunkel-Zyklus mit 14 h hell und 10 h dunkel und wurden von speziell ausgebildeten Angestellten und studentischen Hilfskräften optimal versorgt.

2.2.7 Ernten von Zebrafischembryonen

Für nachfolgende Experimente wurden Embryonen definierter Stadien benötigt. Dazu wurden jeweils ein Männchen und ein Weibchen am Vortag in ein 1 L-Kreuzungstank gesetzt, wobei das Paar durch einen Einsatz mit horizontal angebracht engmaschigem Gitter voneinander getrennt war. Am nächsten Morgen kurz nach Beginn des Lichtzyklus wurde das Paar im oberen Teil des Tanks zusammengebracht, so dass die Paarung stattfinden konnte. Der Beginn des Lichtzyklus sollte ein adäquater Reiz für den Beginn des Paarungsverhaltens sein. Nach erfolgreicher Eiablage des Weibchens und Befruchtung durch

das Männchen fielen die fertilisierten Eier durch das Gitter auf den Boden des Tanks. Das Gitter verhinderte das Auffressen der Eier durch die Eltern. Die Eltern wurden mit dem Gittereinsatz in einen anderen Tank gebracht, so dass nun die Eier gesammelt, in mit Wasser gefüllte Petrischalen überführt und je nach Bedarf verwendet werden konnten.

Weibchen sollten mindestens 10 Tage, Männchen mindestens 5 Tage vor der nächsten Paarung geruht haben.

2.2.8 Erzeugung transgener Zebrafische durch Mikroinjektion

2.2.8.1 Herstellung von Injektionslösungen

Je nach Transgenesesystem wurden unterschiedliche Lösungen angesetzt:

- Für das **I-Sce I-Meganukleasesystem** wurden 200 ng gereinigtes GFP-Reporterkonstrukt mit 1 Unit I-Sce I-Meganuklease, passendem Puffer und 0,5 μL Phenolrotlösung (2%, Endkonzentration 0,1 %) in einem Gesamtvolumen von 10 μL vermischt und bis zur Injektion bei 4°C gelagert.
- Für das **Tol2-Transposonsystem** wurden 250 ng Phenol-Chloroform-gereinigtes EGFP-Reporterkonstrukt mit 250 ng Transposase-mRNA und 0,5 μL Phenolrotlösung (2%) in einem Gesamtvolumen von 10 μL vermischt und bis zur Injektion bei -20°C gelagert.

2.2.8.2 Injektion

Die Injektion erfolgte in frisch befruchtete Eier im Einzellstadium (Zygoten). Mikroinjektionsnadeln wurden mit einem Mikroinjektionsnadelzieher der Firma Sutter aus Glaskapillaren (mit Innenfilament) hergestellt und mit Injektionslösung befüllt. Die Zygoten in der Petrischale wurden soweit durch Absaugen des Fischwassers trockengelegt, damit sie eng beieinander lagen und dadurch soweit immobilisiert waren und mit der Injektionsnadel ohne Verrutschen gestochen werden konnten. Mit Hilfe eines Mikroinjektors der Firma Eppendorf wurden 5-10 nL Lösung in den Dottersack gerade ventral des Zytoplasmas der Zygote manuell injiziert. Die Injektionen wurden unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Alle Zygoten sollten innerhalb kurzer Zeit injiziert worden sein, um ein Austrocknen zu verhindern. Pro GFP-Reporterkonstrukt wurden etwa 300 Zygoten injiziert (EGFP-

Konstrukte jeweils nur etwa 100). Nach der Prozedur wurde zu den Embryonen sofort wieder Fischwasser gegeben und diese über Nacht im Inkubator bei 28°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden diejenigen Embryonen zur weiteren Aufzucht ausgewählt, welche die geringsten Deformationen aufwiesen und eine relativ starke transiente Expression des GFP zeigten. Dazu wurden sie direkt unter dem Stereomikroskop durch Anregung des GFP-Signals überprüft und sortiert. Den gewünschten Kriterien entsprach etwa die Hälfte der injizierten Embryonen welche dann bis zum Erreichen des Adultstadiums (= Parental-generation P₀) gepflegt wurden.

2.2.8.3 Identifizierung stabil transgener Linien

Die Nachkommen der injizierten P₀-Eltern sollten anstatt einer transienten und mosaiken GFP-Expression das vollständige Expressionsmuster des Transgens im Embryo zeigen, welches durch Vererbung über die Keimbahn nun in jeder Zelle gleich vorhanden war.

Mit dem I Sce I-Meganukleasesystem wurde eine Transmissionsrate des GFP-Transgens an die nächste Generation von 1-5 % erwartet. Für mindestens eine stabil transgene Linie mussten also statistisch gesehen die Nachkommen (Filiargeneration F₁) von mindestens 100 injizierten P₀-Eltern auf GFP-Signale überprüft werden. Dazu wurden die adulten P₀ untereinander verpaart und die F₁-Embryonen ungefähr 24 h *post fertilisationem* (hpf) wieder unter dem Stereomikroskop hinsichtlich eines GFP-Signals kontrolliert. Eltern mit GFP-positiven Nachkommen wurden dann separat mit Wildtypfischen verpaart („Auskreuzung“), damit derjenige Elternteil (Gründer) identifiziert werden konnte, welcher das Transgen vererbt. GFP-positive Nachkommen aus dieser Kreuzung wurden dann bis zur Geschlechtsreife gezüchtet und waren also heterozygote Träger des Transgens. Mit der Überprüfung der GFP-positiven Nachkommen (F₂-Generation) dieser adulten F₁ wurde die Etablierung einer stabil transgenen Linie als abgeschlossen betrachtet. Ausschließlich solche Embryonen wurden zur vergleichenden Analyse von GFP-Expressionsmustern herangezogen, welche aus einer Auskreuzung zwischen heterozygoten GFP- und Wildtypfischen stammten (Kontrolle: jeweils 50 % der Embryonen eines Geleges GFP-positiv bzw. -negativ).

Mit dem *Tol2*-Transposasesystem wurde eine Transmissionsrate von mindestens 20 % erwartet. Darum wurden weniger P₀ injiziert und gezüchtet. Höchstens 40 adulte P₀ wurden produziert, kontrolliert und daraus stabile Linien etabliert.

2.2.9 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden

„Morpholinos“ (MOs) sind künstlich hergestellte Oligonukleotide mit 25 Basenpaaren Länge, die an komplementäre Sequenzen von RNA binden. Dabei richtet sich die *antisense*-Sequenz entweder gegen das Startkodon eines Gens und verhindert damit dessen Translation oder gegen die Exon/Intron-Grenzen eines Gens, was das Spleißen der prä-RNA inhibiert. Der strukturelle Unterschied zwischen MOs und DNA liegt darin, dass MOs anstelle des Desoxyribose-Rings einen Morpholino-Ring tragen, und ihre Verknüpfung nicht über eine Phosphat-, sondern eine Phosphordiamidat-Gruppe zustande kommt, was eine Ionisierung im physiologischen pH-Wert der Zelle verhindert. Diese *antisense*-Technologie wird zum *knock down* von Genen verwendet, um deren Funktion im Organismus zu untersuchen (Summerton, 1990; Ekker und Larson, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MOs waren gegen das Startkodon der jeweiligen Gene gerichtet. Sie wurden von der Firma GeneTools (Philomath, USA) synthetisiert und lagen in einer Stocklösung von 3 mM vor.

Die MOs wurden zunächst in verschiedenen Konzentrationen getestet, wofür sie mit 0,1 % Phenolrot versetzt und in Zygoten injiziert wurden. Es wurde dann jene Konzentration für funktionelle Analysen verwendet, welche zwar zu spezifisch phänotypischen, aber nicht unspezifisch toxischen Veränderungen im Embryo führte. Zu hohe Konzentrationen hatten oftmals ein vorzeitiges Absterben der injizierten Embryonen oder stereotype nekrotische Veränderungen im Kopfbereich zur Folge. Dem nekrotischen Phänotyp konnte aber auch durch Koinjektion mit p53-MO vorgebeugt werden (Robu et al., 2007).

2.2.10 Untersuchung mit Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) wurde von der Firma Sigma als 5 mM Stocklösung in DMSO bezogen und in Fischwasser auf 1 μ M verdünnt (Testlösung). Verschieden transgene Embryonen wurden im 18 S-Stadium dechorioniert und jeweils 16-20 Tiere in Vertiefungen einer 24-Well-Platte überführt. Fischwasser wurde mit einer Einweg-Plastikpipette entfernt und entweder mit 500 μ L Testlösung oder 1 μ M DMSO in Fishwasser (Kontrolllösung) ausgetauscht. Außerdem wurden überall 26 μ L 20-fach konzentrierter PTU-Lösung zur Inhibition der Pigmentbildung zugesetzt. Alle zwei Stunden wurde die Transgenexpression unter dem Fluoreszenzstereomikroskop kontrolliert. Nach spätestens acht Stunden erfolgte schließlich die Fixierung in BT-FIX über Nacht bei 4°C mit anschließender Lagerung in 100 % Metha-

nol bei -20°C . Sodann wurde die mRNA-Detektion der Transgene und endogener TFs durch *In-situ*-Hybridisierung mit den Chromogenen NBT und BCIP durchgeführt.

2.2.11 Färbetechniken an Zebrafischembryonen

2.2.11.1 *In-situ*-Hybridisierung

Mit dieser Methode nach Hauptmann und Gerster (1994) können Genaktivitäten durch den Nachweis transkribierter mRNA in fixierten Embryonen sichtbar gemacht werden. Dabei hybridisieren *in vitro* transkribierte Digoxigenin- und/oder Fluorescein-markierte *antisense* RNA-Sonden spezifisch an die jeweilige mRNA unter stringenten Bedingungen (65°C). Nach dem Auswaschen nicht hybridisierter Sonden wurden die mRNA-*antisense*-Sonden-Komplexe mit Anti-Digoxigenin- bzw. Anti-Fluorescein-Antikörpern inkubiert, welche mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt waren. Nicht gebundene Antikörper wurden wiederum ausgewaschen. Die gebildeten mRNA-*antisense*-Sonden-Antikörper-AP-Komplexe konnten schlussendlich durch Inkubation mit gelösten AP-Substraten, welche durch das Enzym in ein farbiges Präzipitat umgewandelt wurden, dargestellt werden.

Es konnten entweder eine mRNA (Einfachfärbung) oder auch zwei gleichzeitig (Doppelfärbung) auf diese Weise im ganzen Embryo detektiert werden. Bei der Einfachfärbung wurden Embryonen mit einer Digoxigenin-Sonde und daraufhin mit dem AP-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert. Ein Gemisch aus Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)- und 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP)-Lösung als AP-Substrate erzeugen eine dunkelviolette Färbung. Wahlweise wurde FastRED® (Sigma) als AP-Substrat verwendet, das eine Rotfärbung produziert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die AP-Reaktion durch Inkubation in stark saurer Stopplösung und Auswaschen des Substrats gestoppt.

Bei der Doppelfärbung wurden Embryonen gleichzeitig mit einer Digoxigenin (DIG)- und einer Fluorescein (FLUO)-Sonde inkubiert. Dann erfolgten die Antikörperbehandlungen, jedoch nacheinander, weil nach der Darstellung des ersten Immunkomplexes dessen AP durch Behandlung mit stark saurem Puffer inaktiviert werden musste. Sodann wurde die Farbreaktion des zweiten Immunkomplexes, natürlich mit anderem Farbstoff als beim ersten, durchgeführt. Üblicherweise wurde zuerst mit FastRED® und dann mit kontrastreichem NBT+BCIP entwickelt.

Im Folgenden sei die Prozedur einer Doppelfärbung detailliert wiedergegeben:

Dechorionierte Embryonen wurden mit dem Erreichen des gewünschten Stadiums (in aller Regel 24 hpf) über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend durch zweimaliges Waschen in eiskaltem 100 % Methanol dehydriert, wonach sie auch bei -20°C gelagert werden konnten. Methanol verstärkte außerdem die Fixierung. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten in einem Volumen von 500 µL in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) auf einem Taumelschüttler bei 10-20 Umdrehungen pro min. Es war auf die horizontale Ausrichtung der Reaktionsgefäße zu achten, damit die Embryonen nicht auf- sondern nebeneinander zu liegen kamen, sodass alle gleichmäßig den jeweiligen Behandlungen ausgesetzt waren.

Die fixierten Embryonen wurden wieder schrittweise rehydriert durch Waschen mit 75 %, 50 % und 25 % Methanol in PBS. Es folgte 4 x Waschen in PTW. Um die Penetrationseffizienz sowohl der Sonden als auch der Antikörper in die Embryonenzellen zu erhöhen, wurden die Embryonen in 10 µg/mL Proteinase K (gelöst in PTW) für 20 min. inkubiert. Der Verdau wurde durch Inkubation mit Fixierlösung für 20 min. bei Raumtemperatur gestoppt. Darauf folgten wiederum vier Waschschrte mit PTW. Die Embryonen waren nun bereit für die Prähybridisierung. Diese wurde nach einmaligem Waschen mit und Inkubation in Hybridisierungslösung ohne Sonden bei 65°C im Heizblock ohne Taumeln für mindestens 2 h durchgeführt. Die Sonden (DIG/FLUO) wurden 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt und 5 min. bei 70°C denaturiert. Die Prähybridisierungs-lösung wurde entfernt und die heiße Sondenlösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C.

Am zweiten Tag erfolgten die stringenten Waschschrte bei 65°C. Dazu kamen nacheinander die erhitzten Waschlösungen (WL) 1-4 (WL 1: 2 x 30 min., WL 2: 1 x 15 min., WL 3: 2 x 30 min., WL 4: 1 x 5 min.) zur Anwendung, die der schrittweisen Verringerung der hohen Salzkonzentration und Entfernung von Formamid sowie nicht-hybridisierter Sonden diente. Die hohe Temperatur sollte dabei auch einer unspezifischen Bindung restlicher Sonden und somit Hintergrundsignalen vorbeugen. Nach Entfernung von WL 4 wurde dreimal mit PTW bei Raumtemperatur gewaschen.

Es folgte nun 2 x Waschen in Blockpuffer und Inkubation darin für mindestens 1 h bei Raumtemperatur zwecks Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen. Vor der Zugabe zu den „geblockten“ Embryonen wurde der AP-gekoppelte DIG-Antikörper 1:4000 ebenfalls in Blockpuffer verdünnt und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur präabsorbiert. Danach wurde die Blocklösung von den Embryonen entfernt und durch die präabsorbierte Antikörperlösung ersetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C statt.

Am dritten Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch 4 x 15 min. Waschen in PTW entfernt (alle Schritte bei Raumtemperatur, sofern nicht anders erwähnt). Nun folgte die Entwicklung des Signals der DIG-Sonde mit FastRED®. Dazu wurde Färbepuffer durch Auflösen der vom Hersteller mitgelieferten Tabletten hergestellt und darin die Embryonen 2 x 5 min. gewaschen. Anschließend erfolgte der Austausch mit FastRED®-Färbelösung (ebenfalls durch Auflösen von Tabletten in Färbepuffer nach Anleitung des Herstellers). Die Inkubation fand im Dunkeln statt. Mit dem Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die AP-Reaktion durch 2 x 10 min. Waschen in saurer AP-Stopplösung und 5 x 5 min. in PTW beendet. Es folgten erneute Blockierung der Embryonen, Präabsorption des AP-gekoppelten Anti-FLUO-Antikörpers (Verdünnung 1:2000 in Blockpuffer) und Antikörperinkubation über Nacht bei 4°C (wie beschrieben für Anti-DIG, siehe oben).

Am vierten Tag wurden die Embryonen wieder 5 x 5 min. in PTW und dann in BCIP/NBT-Färbepuffer gewaschen. Die Entwicklung des Signals der FLUO-Sonde geschah durch Inkubation ohne Taumeln im Dunkeln in BCIP/NBT-Färbelösung bis zur gewünschten Farbintensität, gefolgt vom Abbruch der Reaktion mit AP-Stopplösung und mehrmaligem Waschen in PTW.

Die Embryonen waren nun bereit für die lichtmikroskopische Analyse; bis dahin konnten sie mehrere Wochen in PTW oder Fixierlösung bei 4°C gelagert werden.

2.2.11.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Sinn und Zweck der Fluoreszenztechniken werden im Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellt. Methodisch vorgegangen wurde wie bei der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Einfachfärbung zur Darstellung der Genaktivität mittels Detektion transkribierter mRNA im fixierten Embryo mit folgenden Abweichungen:

Zur Detektion der an spezifischer mRNA hybridisierten *antisense* DIG-Sonde wurde ein mit mehreren Einheiten des Enzym Peroxidase (POD) konjugierter Anti-DIG-Antikörper (Roche Diagnostics) verwendet. Die Verdünnung im Blockpuffer war 1:1000. Zur Entwicklung des Fluoreszenzsignals kam CY3-Tyramid (TSA®-Plus-Kitsystem, Perkin-Elmer) als Substrat und Wasserstoffperoxid als Kofaktor der Peroxidase zur Anwendung. Das als Feststoff gelieferte Tyramid wurde 1:150 in DMSO gelöst (Stocklösung). Nach dem Auswaschen überschüssigen Antikörpers und vor der Entwicklung des Signals wurden die Embryonen 1 x 5 min. mit 0,002 % Wasserstoffperoxid in PTW (Färbepuffer) gewaschen. CY3-Tyramid-

Stocklösung wurde 1:100 in Färbepuffer gelöst und die Embryonen darin für 35 min. in Dunkelheit und bei Raumtemperatur ohne Taumeln inkubiert. Danach wurde die Tyramidlösung mit 500 μL PTW ausgetauscht und nochmals über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es folgten mehrere Waschschrte in PTW mit anschließender Kontrolle des Fluoreszenzsignals unter dem Stereomikroskop. Dazu wurden die Embryonen in PTW auf einen Objektträger mit Vertiefung gebracht und mit Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 547 nm zur Anregung des CY3-Signals bestrahlt.

Die Embryonen konnten nun durch konfokale Lasermikroskopie analysiert und dokumentiert (siehe Abschnitt 2.2.11) oder einer weiteren Antikörperfärbung (siehe folgender Abschnitt) unterzogen werden.

2.2.11.3 Antikörperfärbung

Diese Methode wurde für die gleichzeitige Darstellung der Genaktivitäten eines Transkriptionsfaktors und eines GFP-Transgens im selben Embryo mittels verschiedener Fluoreszenzsignale angewendet. Dabei wurden die das jeweilige GFP exprimierenden Embryonen zuerst mit einer *antisense*-RNA-DIG-Sonde zum Nachweis des gewünschten Transkriptionsfaktors hybridisiert. Nach den stringenten Waschschrten und Blockierung der Embryonen (Tag 2 des FISH-Protokolls) kam statt des POD-gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers jedoch zunächst der Anti-GFP-Antikörper (monoklonaler Primär-Antikörper aus Kaninchen der Firma Torrey Pines Biolabs, USA) zum Einsatz. Allen ab diesem Schritt verwendeten Pufferlösungen wurden 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Heparin zugesetzt, welches einer Degradation von *antisense*-Sonde-mRNA-Komplexen vorbeugen sollte. Vor der Entwicklung des CY3-Signals eines Transkriptionsfaktors wurde also das Signal des GFP-Reporters entwickelt. Zur Detektion gebundenen GFP-Primär-Antikörpers wurde ein mit dem Fluorochrom Alexa®488 gekoppelter Sekundär-Antikörper (der Firma Invitrogen, gerichtet gegen das Kaninchen-Epitop) verwendet. Nach der Kontrolle des Signals unter dem Stereomikroskop durch Anregung mit der Wellenlänge 488 nm erfolgte schließlich die Darstellung der Transkriptionsfaktoraktivität durch Abschluss des FISH-Protokolls wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

2.2.12 Mikroskopie zur Analyse und Dokumentation

Alle Mikroskope der Arbeitsgruppe wurden von der Firma Leica Microsystems erworben. Je nach Zweck standen verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Lichtquellen zur Verfügung.

2.2.12.1 Lichtmikroskopie

Die Beobachtung lebender Embryonen, die noch vom Chorion umhüllt waren, geschah mit Hilfe eines einfachen Stereomikroskops (Modell MZ 16 F) mit Helligkeitquelle und 0,8 – 5-facher Vergrößerung. Es diente hauptsächlich zum Sortieren und Dechorionieren der Tiere. Es erlaubte außerdem die Bestimmung des Entwicklungsstadiums und die Erkennung transgener Linien sowie phänotypischer Veränderungen, die durch die Injektion von MOs und Behandlung mit TSA verursacht wurde. Zur Bilddatenaquisition wurde das Programm InfranView verwendet.

Die zu untersuchenden Embryonen befanden sich dabei in einer Petrischale mit Fischwasser. Plastikpipetten mit einer 2-3 mm großen Öffnung wurden verwendet, um die Embryonen ohne Beschädigung von Schale zu Schale zu transferieren.

Transient oder stabil GFP-transgene Embryonen wurden vor der Weiterzucht oder Fixierung unter einem Stereomikroskop - Modell MZ FL III, mit Helligkeitquelle, 0,8 – 8,8-facher Vergrößerung und einem Modul mit Halogenlampe und Filtersatz (Anregungs- bzw. Sperrfilter) zur Exzitation bzw. Detektion von Fluorochromen (GFP, CY3, Alexa488, etc) - beobachtet.

Dasselbe Mikroskop diente auch zur schnellen Kontrolle fixierter Embryonen nach Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und GFP-Antikörperfärbung, sowie deren Vorbereitung für die konfokale Lasermikroskopie. Dabei wurden die gefärbten Embryonen in PTW-Puffer wiederum mit Plastikpipetten aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf einen Objektträger mit Vertiefung gebracht und die am besten gefärbten Embryonen ausgewählt.

2.2.12.2 Digitale konfokale Lasermikroskopie

Die digitale konfokale Lasermikroskopie ermöglichte die schrittweise dreidimensionale Rasterung durch den mit Fluorochromen gefärbten Embryo. Dabei diente Laserlicht definierter Wellenlänge zur gleichzeitigen Anregung der entsprechenden Fluoreszenzsignale

(Alexa488: 488 nm; CY3: 547 nm), wobei die Signale getrennt und jeweils nur in der Fokusebene (x- und y-Achse) detektiert und digital als Bild gespeichert wurden (512 x 512 Pixel). Durch schrittweise Änderung der Fokusebenen (z-Achse, ungefähr alle 1,5 μm) konnte also ein Stapel Bilder erzeugt werden, der die Fluoreszenzsignale mit hoher Auflösung räumlich repräsentiert. Dieser digitale Datensatz ermöglichte schließlich die computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion der Fluoreszenzsignale und somit der Genaktivitätsmuster (siehe 2.2.12.3).

Die gefärbten Embryonen wurden zunächst unter dem Stereomikroskop für die Einbettung vorbereitet. Dazu wurden sie zuerst aus der PTW-Lösung in 60 % Glycerinlösung überführt, wobei jeweils ein ausgewählter Embryo mit Hilfe der abgebogenen Spitze eines sehr feinen Wolframdrahtes auf die Spitze einer Injektionskanüle geschoben und aus der einen in die andere Lösung gehoben wurde. Der Embryo wurde solange in der Glycerinlösung umherbewegt, bis restlicher anhaftender PTW-Puffer gelöst war und der Embryo am Boden der Vertiefung zu liegen kam. Die Viskosität der Glycerinlösung erleichterte die nun folgende Dottersackentfernung und Präparation des Kopfbereichs.

Zur Entfernung des Dottersacks wurde dieser mit einer feinen Pinzette fest gehalten und mit der Wolframdrahtspitze die Körperachse durch seitliches Wegschieben abgelöst. Dotterreste wurden möglichst vollständig abgeschabt. Dann erfolgte die Abtrennung des Kopfes im Bereich des Rhombencephalons. Nun wurden beide Augen entfernt, ebenfalls mit Hilfe des Wolframdrahtes, dessen abgebogene Spitze in etwa der Form und Größe der Augen entsprach. Dies war der schwierigste Teil der Präparation und gelang nur dann sehr gut, wenn das Embryogewebe durch die 65°C-Schritte der *In-situ*-Hybridisierung entsprechend aufgelockert war.

Der so präparierte Embryo war nun bereit zur Einbettung in Polymountlösung, welche fluoreszenzkonstanzierende Eigenschaften besaß und so das Präparat mindestens einige Wochen haltbar machte. Dazu wurde ein Objektträger mit 0,15 mm dickem Isolierband blasenfrei beklebt und ein etwa 2 x 2 mm große Quadrate mit dem Skalpell wieder ausgeschnitten. In diese Aussparung wurde ein kleiner Tropfen Polymountlösung geträufelt und mit der Drahtspitze verteilt. Der präparierte Embryo wurde wie schon oben beschrieben in den Polymounttropfen überführt und seitlich darin ausgerichtet. Die laterale Orientierung sollte sicherstellen, dass durch Berücksichtigung der Symmetrieverhältnisse alle Fluoreszenzsignale wenigstens bis zur sagittalen Mittellinie des Embryokopfes detektiert werden konnten (die Signale nahmen mit zunehmender Gewebetiefe signifikant ab). Schließlich wurde ein sauberes Deckglas aufgelegt und eine eventuell notwendige

Reorientierung des Embryokopfes durch vorsichtiges horizontales Verschieben des Deckglases erreicht. Das fertige Präparat wurde bis zur Aushärtung der Polymountlösung im Dunkeln bei Raumtemperatur horizontal gelagert.

Zur Aquisition digitaler Bildpakete wurde ein Mikroskop Modell TCS SP2 und routinemäßig ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung und Wasserimmersion verwendet. Zu Beginn der Experimente kamen auch andere Objektive (40- oder 63-fache Vergrößerung mit Öl- bzw. Wasserimmersion) zum Einsatz, jedoch erwies sich zuerst genanntes Objektiv am geeignetsten hinsichtlich Lichtausbeute und Auflösungsvermögen. Zur Anregung von Fluoreszenzsignalen waren je ein Krypton/Argon- und Helium/Neon-Laser in Gebrauch. Für die computergestützte Steuerung des Systems und zur Bilddatenaquisition wurde die Software des Herstellers benutzt (Leica Confocal Software).

2.2.12.3 Digitale 3D-Rekonstruktion

Mit Hilfe des Programms Volocity erfolgte die Umwandlung der durch konfokale Lasermikroskopie erhaltenen Bildpakete in eine virtuelle räumliche Darstellung. Somit wurden die Genaktivitäten repräsentierenden Fluoreszenzsignale zugänglich für eine detaillierte Analyse. Der „digitale Embryo“ konnte z.B. beliebig am Monitor gedreht oder auch durch virtuelle optische Schnitte zerlegt werden (siehe auch einigen Druckversionen dieser Arbeit beigefügte DVD). Sinn und Zweck der Methode werden im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich erläutert.

3. Ergebnisse

3.1 Potentielle TF-Bindestellen in LATE (*In-silico*-Analyse)

3.1.1 Vorhersage von TF-Bindestellen mit *MatInspector*

Die LATE-Sequenz wurde mit verschiedenen im Internet verfügbaren Programmen (*Patch*, *Alibaba*, *TESS* und *MatInspector*) auf TF-Bindestellen überprüft. Diese Programme benutzen Bibliotheken positionsspezifisch gewichteter Matrizen (*position weight matrices*) zur Vorhersage potentieller TF-Bindestellen in DNA-Sequenzen (Stormo, 2000).

Das Programm *MatInspector* wurde hier als dasjenige Programm mit verlässlichstem Deskriptor der Bindungsspezifität eingestuft, weil es auf die größte öffentlich zugängliche Matrizen-Bibliothek zugreift und zur Reduzierung einer Vielzahl redundanter Treffer Matrizen-Familien verwendet (Catharius et al., 2005). Nicht zuletzt ist es das einzige Programm, welches die experimentell verifizierte PAX6-Bindestelle korrekt vorhersagt (Blader et al., 2004).

Zur Suche nach TF-Bindestellen wurde nicht die ganze Matrizen-Bibliothek verwendet, sondern nur die Untergruppe für Vertebraten-Matrizen (519 Matrizen in 154 Familien) gewählt sowie für allgemeine Kern-Promotorelemente (15 Matrizen in neun Familien, z.B. TATA-Box). Der *cut off*-Wert für die Übereinstimmung einer Sequenz mit der Kernsequenz einer Matrize (d.h. der üblicherweise vier am höchsten konservierten Positionen in der Matrize) lag bei 0,75 und derjenige für die ganze Matrize bei 0,85 (jedoch wurde die Voreinstellung „Optimiert“ gewählt, wodurch im Falle einer bereits experimentell validierten Bindestelle der *cut off*-Wert ignoriert und diese somit angegeben wird, obwohl die Übereinstimmung < 0,85). Die Abbildung 5-1 und -2 auf den nächsten beiden Seiten zeigt das Ergebnis einer relativ aktuellen Vorhersage für die LATE-Region (Matrizen-Version 7.1, Juni 2008).

MatInspector identifiziert mit den gewählten Parametern 99 Bindungsstellen in LATE (Plus- und Minusstrang). Die entsprechenden Vertreter aus Familien DNA-bindender Proteine besitzen als DNA-Bindungsdomäne unterschiedlichste Varianten, etwa Leucin-Zipper (z.B. AP-1), *zinkfinger* (z.B. Evi1), HMG-Domäne (z.B. Sox5), POU-Domäne (z.B. Brn2), *forkhead*-Domäne (z.B. FoxI1a), *paired*-Domäne (z.B. Pax6), *winged helix*-Domäne (z.B. Lef1) sowie v.a. Homeo-Domänen (z.B. Lhx3 oder Engrailed).

Family	Further Family Information	Matrix	Q _{off}	Position from - to	Str.	Cons. sim.	Matrix sim.	Sequence (red: chi-value > 60 capitals: core sequence)
VSEKHD	Fork head domain factors	V5XFD3.01	0.82	1 - 17	(-)	1.000	0.896	ccgcgctgAACaaaaaa
VSBRN1	Bm POU domain factors	V5BRN2.01	0.86	16 - 34	(-)	0.966	0.911	tcttTATTCaaatgctcc
VSDCT1	Octamer binding protein	V5OCT1.02	0.85	18 - 32	(-)	0.750	0.852	cttATTCAaatagtc
V5CHRF	Cell cycle regulators: Cell cycle homology element	V5CHR.01	0.92	20 - 32	(+)	1.000	0.962	ctatTTGaaAaag
V5HEF2	MEF2, myocyte-specific enhancer binding factor	V5MEF2.01	0.77	21 - 43	(+)	0.750	0.791	tattgaaTAAcGaataatgat
V5BRNF	Bm POU domain factors	V5BRN5.02	0.77	25 - 43	(-)	1.000	0.778	atagcATTATcttcttca
V5CAIT	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	V5CAIT1.01	0.86	33 - 49	(+)	1.000	0.889	aaTAActgtatggagt
V5OCT3	Octamer binding protein	V5OCT3_4.01	0.81	34 - 48	(+)	1.000	0.848	ataATGctatggag
V5EZF1	E2F-myc activator/cell cycle regulator	V5EZF.01	0.75	53 - 69	(+)	1.000	0.858	gcaggccgGAAaaatg
V5BRNF	Bm POU domain factors	V5BRN5.03	0.76	62 - 80	(+)	0.750	0.829	gaaaTATgagtgcaaaag
V5PBXC	PBX1 - MEIS1 complexes	V5PBX1_MEIS1.02	0.77	64 - 80	(+)	0.750	0.777	aaaaTGAAGgcaaaag
V5AP1E	AP1, Activating protein 1	V5AP1.02	0.87	66 - 76	(+)	1.000	0.878	aatGAGTgca
V5NRZF	Nuclear receptor subfamily 2 factors	V5NRZF1.01	0.82	66 - 90	(+)	0.809	0.821	atgagtgcaaaacCTCgagggcg
V5ZNF	Zinc finger proteins	V5ZNF1.01	0.82	101 - 125	(+)	0.801	0.820	a-gGGGCaagccgatagagctg
V5GRE	Glucocorticoid responsive and related elements	V5GRE.02	0.82	103 - 121	(+)	0.874	0.824	gggGACagccctataga
V5EVL1	EV1-mycloid transforming protein	V5EVL1.07	0.90	123 - 139	(+)	1.000	0.904	ctgaaAAGaaagaaag
V5SRY	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	V5SOX9.02	0.94	144 - 160	(+)	1.000	0.971	ggcgcCAAtgaaacaa
V5DMRT	DM domain-containing transcription factors	V5DMRT7.01	0.81	145 - 165	(-)	1.000	0.890	gtgaATTGctcatgtgpc
V5SOR1	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	V5SOR5.01	0.87	152 - 168	(+)	1.000	0.981	atggaCAATtcaactt
V5VTBP	Vertebrate TATA binding protein factor	OSLTATA.01	0.82	158 - 174	(-)	1.000	0.824	gattTATAggtgaaatg
V5ZFHX	Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors	V5DELTAEF1.01	0.99	159 - 171	(+)	1.000	0.994	aattCACCTata
V5SRF	Serum response element binding factor	V5SRF.01	0.66	160 - 178	(-)	1.000	0.703	aagcgaTATAggtgaaat
V5DLX3	Homeodomain transcription factors	V5DLX3.01	0.91	161 - 177	(+)	1.000	0.911	ttcaacttaTAActgct
V5CLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	V5CLOX.01	0.94	166 - 188	(+)	1.000	0.815	cttaaATCCcttgatataca
V5LEFF	LEF1/TCF	V5LEF1.02	0.91	171 - 187	(-)	1.000	0.965	gatataCAAAgctgatt
V5HOXC	HOX - PBX complexes	V5PBX_HOXA9.01	0.79	175 - 191	(+)	1.000	0.791	gcttTGATatcaatca
V5HOXC	HOX - PBX complexes	V5PBX_HOXA9.01	0.79	176 - 192	(-)	1.000	0.843	ttcttAGGCarigatata
V5PAX5	PAX-4/PAX-5 paired domain binding sites	V5PAX6.01	0.75	184 - 202	(-)	0.754	0.808	agactCTAAAcattgtg
V5FKHD	Fork head domain factors	V5XFD2.01	0.89	200 - 216	(+)	1.000	0.912	ctaaccctgtgaaTAttat
V5CLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	V5CLOX2.01	0.67	205 - 227	(+)	1.000	0.718	aaatcaatcaATGTrag
V5DMRT	DM domain-containing transcription factors	V5DMRT1.01	0.77	205 - 225	(-)	0.934	0.779	taaacctgtGAAattatta
V5CREB	cAMP-responsive element binding proteins	V5E4BM4.01	0.80	206 - 226	(+)	1.000	0.848	aaacatgtGTAatatt
V5HLF	PAR/bZIP family	V5HLF.01	0.84	207 - 223	(+)	1.000	0.939	aaacatgtGTAatatt
V5CEBP	Ccoast/Enhancer Binding Protein	V5CEBP8.01	0.94	208 - 222	(+)	0.940	0.961	aaacatgtGTAatatt
V5PARE	Homeodomain transcription factors	V5PARE.01	0.97	208 - 224	(+)	1.000	0.992	aaacatgtGTAatatt
V5PARE	PAR/bZIP family	V5PARE_HLF.01	0.78	208 - 224	(-)	1.000	0.832	aaataTACaaatgtt
V5BRNF	Bm POU domain factors	V5BRN3.02	0.89	210 - 228	(+)	1.000	0.906	catgtgtTAATtattata
V5BRNF	Bm POU domain factors	V5BRN3.01	0.78	214 - 232	(+)	0.750	0.838	gtgaaTtaTTTAAaagt
V5BRNF	Bm POU domain factors	V5LMLB.01	0.78	214 - 232	(-)	0.750	0.810	catttaaaTAAAtacac
V5BRNF	Lim homeodomain factors	V5LMLB.01	0.91	214 - 230	(-)	1.000	0.943	tttataaaTAAAtacac
V5VTBP	Vertebrate TATA binding protein factor	OSVTATA.01	0.90	215 - 231	(-)	1.000	0.934	atttaTAAaattacac
V5ATBP	AT-binding transcription factor	V5ATBP1.01	0.79	215 - 231	(-)	1.000	0.874	atttataaaTAAAttaca
V5HOME	Homeodomain transcription factors	V5XFD2.01	0.87	215 - 231	(-)	1.000	0.911	cattataTAAAtacac
V5FKHD	Fork head domain factors	V5XFD2.01	0.89	216 - 232	(-)	1.000	0.911	cattataTAAAtacac
V5HOXC	HOX - PBX complexes	V5PBX_HOXA9.01	0.79	216 - 232	(+)	0.750	0.843	gaaTATtataaagt
V5PAX5	PAX-5 B-cell-specific activator protein	V5PAX5.03	0.80	216 - 244	(-)	1.000	0.839	tagggCAcagctcttaaaatcac
V5MEF2	MEF2, myocyte-specific enhancer binding factor	V5MEF2.01	0.77	217 - 239	(+)	0.750	0.773	taattattTAAaagcctgtgc
V5VTBP	Plant TATA binding protein factor	OSPTATA.02	0.90	218 - 232	(-)	1.000	0.951	cattTATAaataat
V5SOR1	SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors	V5HMG.01	0.88	219 - 235	(-)	1.000	0.927	agtCAITtataaataat

Abb. 5-1: Vorhersage für TF-Bindestellen nach *MatInspector* (LATE 1-235). Spalten von links nach rechts: Matrizenfamilie, weitere Familieninformationen, Matrize, optimierter *Cut-off*-Wert, Position von - bis, DNA-Strang, Ähnlichkeit mit Kernsequenz der Matrize, Ähnlichkeit mit Kernsequenz der Matrize, Sequenz (rot: Konservierungsindex >60, Großbuchstaben: Kernsequenz). Rot eingeraht: hoch-konservierte Blöcke aus der Zusammenfassung von *WeederH*- und *Footprinter*-Analyse.

Transcription Factor	Sequence	Score	Position	Conservation Index	Color
V\$PIT1.01	ttatTATaaag	0.941	220 - 232	(+)	Green
OSPTATA.02	tattTATAatgact	0.913	221 - 235	(+)	Green
V\$PBX_HOXA9.01	acaTCACTtataaata	0.806	221 - 237	(-)	Red
V\$PIT1.01	tcatTATaaata	0.941	221 - 233	(-)	Green
V\$ZBP1.01	atgaggCACctctttataaata	0.845	221 - 245	(-)	Red
OSVTBP	atttTAAatgactg	0.948	222 - 238	(+)	Green
V\$AP1B	tataaaTGAQgagccctat	0.810	225 - 245	(+)	Red
V\$TCF11MFG.01	GTCAtt	1.000	228 - 234	(-)	Green
V\$TCF11.01	gccctctgcccAATAcgca	0.677	238 - 260	(+)	Red
V\$CUX2.01	tggGATAgggc	0.987	238 - 250	(-)	Green
V\$GATA1.01	ctGGGgccttttccg	0.755	238 - 250	(-)	Red
V\$NDR.01	gtttGCCAgagctg	0.765	261 - 279	(-)	Red
V\$R8_E2F1_DP1.01	AGGTctctcca	0.802	277 - 289	(+)	Green
V\$FXRE.01	tagttGGCGagagcc	0.846	278 - 294	(-)	Red
V\$E2F4_DP1.01	gtctctgC/AAAtctat	0.886	279 - 295	(+)	Green
V\$E2F.02	gcgcaacCTATtcaaatgag	0.933	285 - 307	(+)	Green
V\$S1.01	gcctatttggaaATAGttggc	0.864	286 - 308	(-)	Red
V\$SRFC4.01	ggggcctCTATtgaatagtt	0.863	290 - 312	(-)	Red
V\$S1.01	actatttc/AAAbag	0.955	292 - 306	(-)	Green
V\$CEBPB.01	aaaatgagGGG	0.960	310 - 322	(-)	Green
V\$GKLF.01	tttGGAaaaaatgaggg	0.950	310 - 328	(-)	Red
V\$NFAT.01	ggAAAaaag	0.976	315 - 325	(-)	Red
V\$NPM4.01	tcgcccctTTGGaaaaa	0.823	319 - 337	(-)	Red
V\$SRF.03	caatttTCAatgca	0.782	344 - 360	(-)	Red
V\$EN1.01	gaataattgaaATTAAgaa	0.761	351 - 373	(+)	Red
V\$CUX2.01	aaAATtgaatattaa	0.839	353 - 369	(+)	Green
V\$XVENT2.01	ttaattatTCAAttat	0.82	353 - 369	(-)	Red
V\$HNF6.01	taattgaaAATtatt	1.000	354 - 370	(+)	Green
V\$ATBF1.01	atTAATtattcaatta	1.000	354 - 370	(-)	Green
V\$XVENT2.01	taattgaaAATtatt	1.000	354 - 370	(+)	Green
V\$S8.01	cATTAtattcaatt	0.790	355 - 371	(+)	Red
V\$HNF1.01	aaatgaaTAATtattg	0.933	355 - 371	(+)	Green
V\$LMX1B.01	aattgaaTAATtattg	0.909	355 - 374	(+)	Green
V\$BRN3.02	tcatTAATtattcaatt	1.000	356 - 372	(-)	Green
V\$BARX2.01	tggtcattTATTcaatt	0.967	356 - 372	(-)	Red
V\$BRN3.01	tgtaataATTAATgaaacatt	0.974	357 - 375	(-)	Red
V\$ISL1.01	tgaataATTAATgaaacatt	0.855	358 - 378	(+)	Red
V\$LHX3.01	tgaataATTAATgaaacatt	0.81	359 - 375	(+)	Red
V\$BRN5.03	gaaTAATtattgaaacatt	0.791	360 - 378	(+)	Red
V\$LMX1B.01	tggtcattTATTcaatt	0.931	360 - 376	(-)	Green
V\$NKS61.01	aTTAAktattc	1.000	360 - 370	(-)	Green
V\$BRIGT.01	gaaataATTAatga	0.955	360 - 372	(+)	Green
V\$ATBF1.01	atgttcatTAATtatt	0.867	361 - 377	(-)	Red
V\$S8.01	atgttcatTAATtatt	1.000	361 - 377	(-)	Green
V\$HMG.01	aalAATtattgaaacatt	0.992	361 - 377	(-)	Green
V\$HMG.01	aalAATtattgaaacatt	0.88	361 - 377	(+)	Red
V\$BRN5.03	aalTAATgaaacattgac	0.768	364 - 382	(+)	Red
V\$FAST1.01	accattgttCAATtatt	0.81	364 - 380	(-)	Red
V\$SOX5.01	aatgaaCAATtattgacgg	0.863	364 - 384	(+)	Red
V\$HMG.01	atgaaCAATtattgacgg	0.984	368 - 384	(+)	Green
V\$HMG.01	atgaaCAATtattgacgg	0.857	380 - 400	(+)	Green
V\$MEIS1_HOXA9.01	AGACtcttcttggag	0.847	389 - 403	(-)	Red
V\$MYT1.01	ataAGAGtctt	0.750	392 - 404	(+)	Green

Abb. 5-2: Vorhersage für TF-Bindestellen nach *MatInspector* (LATE 220-404). Spalten von links nach rechts: Matrizenfamilie, weitere Familieninformationen, Matrize, optimierter *Cut-off*-Wert, Position von - bis, DNA-Strang, Ähnlichkeit mit Kernsequenz der Matrize, Ähnlichkeit mit ganzer Matrize, Sequenz (rot: Konservierungsindex >60, Großbuchstaben: Kernsequenz). Rot eingerahmt: hoch-konservierte Blöcke aus der Zusammenfassung von *WeederH*- und *Footprinter*-Analyse.

Fast ein Viertel aller vorhergesagten Bindestellen befinden sich im mit 28 bp längsten ultrakonservierten Sequenzabschnitt (LATE 208-235). Aufgrund des hohen AT-Anteils finden sich vor allem Bindestellen für TFs mit Homeo- und/oder POU-Domänen sowie für TATA-Box bindende Proteine. Die funktionelle PAX6-Bindestelle liegt gerade stromaufwärts (LATE 184-202), welche wiederum Teil eines hochkonservierten Sequenzabschnitts ist (LATE 170-205) und also von zwei ultrakonservierten Segmenten eingerahmt wird. Ein drittes hochkonserviertes Teilstück am 3'-Ende der LATE-Region (LATE 354-406) enthält ebenfalls überdurchschnittlich viele vorhergesagte Motive für POU- und Homeobox bindende Proteine. Folglich besteht - abhängig einerseits vom verwendeten Deskriptor der TF-Bindenspezifität und andererseits von der Methode zur Auffindung konservierter Sequenzabschnitte - eine Korrelation zwischen der Dichte an vorhergesagten TF-Bindestellen und dem Grad der Konservierung der LATE-Sequenz.

Weiterhin zeigt die Sequenzanalyse mit *MatInspector* ein mehrfaches Vorkommen einiger TF-Bindestellen. So werden beispielsweise für Faktoren mit POU-Domäne zehn Bindungsstellen in LATE vorhergesagt, wobei diese Faktoren gleichzeitig den Plus [+] - und Minusstrang [-] derselben Sequenz binden können, die Bindestellen teilweise bzw. ganz miteinander am selben Strang überlappen und in hoch- bzw. ultrakonservierten Segmenten liegen, z.B. BRN3.01 [+/-] an LATE 214-232 und BRN3.02 [+] an LATE 210-228, daneben BRN3.01 [-], BRN3.02 [+] und BRN5.03 [+] an LATE 356-382. Ein anderes Beispiel geben Lim-Homeodomänen-Faktoren (LATE 214-230 [-] und 355-376 [+/-]). Ähnliches trifft für Vertreter der SOX/SRY-Familie zu, für die fünf Bindestellen angegeben werden mit der Einschränkung, dass komplementäre Stränge nicht gleichzeitig belegt werden (z.B. SOX9.02 [+] an LATE 144-160 und SOX5.01 [+] an LATE 152-168 und 368-384).

Aufgrund konservierter AT-reicher Sequenzen in LATE 166-186, 217-231 und 347-378 gibt es dort insgesamt 26 Bindestellen für Proteine mit Homeodomäne. Diese Beispiele verweisen somit auf Redundanzen vergleichbarer TF-Bindestellen.

Neben der überwiegenden Anzahl Bindestellen für ZNS-spezifische Faktoren wie etwa PAX6 oder Mitgliedern der BRN- oder SOX-Familie werden auch Bindestellen für Faktoren des Immunsystems (z.B. NFAT), Faktoren zur Kontrolle des Zellzyklus (E2F, AP1) oder Myozyten-spezifische Faktoren (MEF2) von *MatInspector* erkannt, was auf einen relativ hohen Anteil falsch-positiver Vorhersagen hinweist.

3.1.2 Detektion regulatorischer Motive mit dem *WeederH*-Algorithmus

Der Algorithmus von *WeederH* detektiert funktionale Motive in einer Sequenz (Referenzsequenz) durch Vergleich mit einer oder mehreren homologen Sequenzen. Dabei wird weder ein Sequenzabgleich (*Alignment*) berechnet, noch werden gewichtete Matrizen verwendet. *WeederH* basiert auf der Idee, dass funktionale Elemente sowohl in ihrer Sequenz, als auch in ihrer Position relativ zu den von ihnen regulierten Genen konserviert sind. Zur Bewertung eines Motivs wird also nicht signifikante Konservierung, sondern eher die signifikante Variation der Konservierung innerhalb der orthologen Sequenzen betrachtet (χ^2 -Wert, Pavesi et al., 2007).

Zunächst wurde überprüft, ob der Algorithmus die experimentell annotierten Enhancer LATE, ANPE und LSE von *neurogl1* erkennt. Dazu wurden die stromaufwärts des Startkodons gelegenen Sequenzen aus dem Zebrafisch (-6796 bp) als Referenz und die homologen Bereiche von *Homo sapiens* (Mensch, -10909 bp), *Mus musculus* (Maus, -8739 bp) und *Xenopus tropicalis* (Krallenfrosch, -11225 bp) eingegeben. Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis, dargestellt als Fensterausschnitt des UCSC-Genombrowsers. *WeederH* detektiert sowohl den Promotor, als auch die Enhancer-Regionen korrekt. Die *WeederH*-500-Spur in Abb. 6 zeigt 500 bp lange Sequenzabschnitte, in denen der χ^2 -Wert für 12er-Motive im Mittel >1 beträgt, übereinstimmend mit den hochkonservierten Bereichen von Mensch und Maus und den experimentellen Daten (Blader et al., 2003).

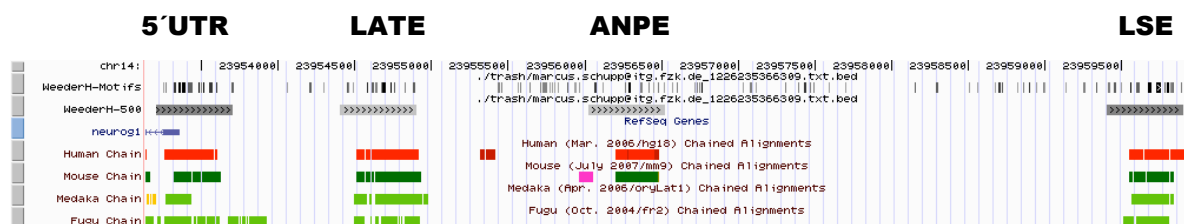


Abb. 6: Vorhersage regulatorischer Motive mit *WeederH*, dargestellt im UCSC-Genombrowser. Die Referenzsequenz war aus Zebrafisch und beinhaltete den stromaufwärts des *neurogl1*-Startkodons gelegenen Bereich (-6796 bps) mit 5'-untranslatiertem Bereich (5'UTR) sowie LATE-, ANPE- und LSE-Regionen. Gezeigt sind die Tracks für chromosomale Position, *WeederH*- und *WeederH*-500-Motive, der 5'-untranslatierte Bereich von *neurogl1* sowie die homologen Regionen aus Mensch und Maus. Zusätzlich sind homologe Regionen aus dem japanischen Reisfisch Medaka (*Oryzias latipes*) und Kugelfisch (*Fugu rubripes*) gezeigt.

LATE besitzt insgesamt einen hohen Grad an Konservierung, daher sollte *WeederH* nun die potentiell funktionalen Abschnitte herausfiltern. Hierfür wurden die homologen LATE-Regionen von Mensch, Maus, *Gallus gallus* (Huhn), Frosch und Zebrafisch verwendet und in *WeederH* eingegeben. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 (nächste Seite) dargestellt.

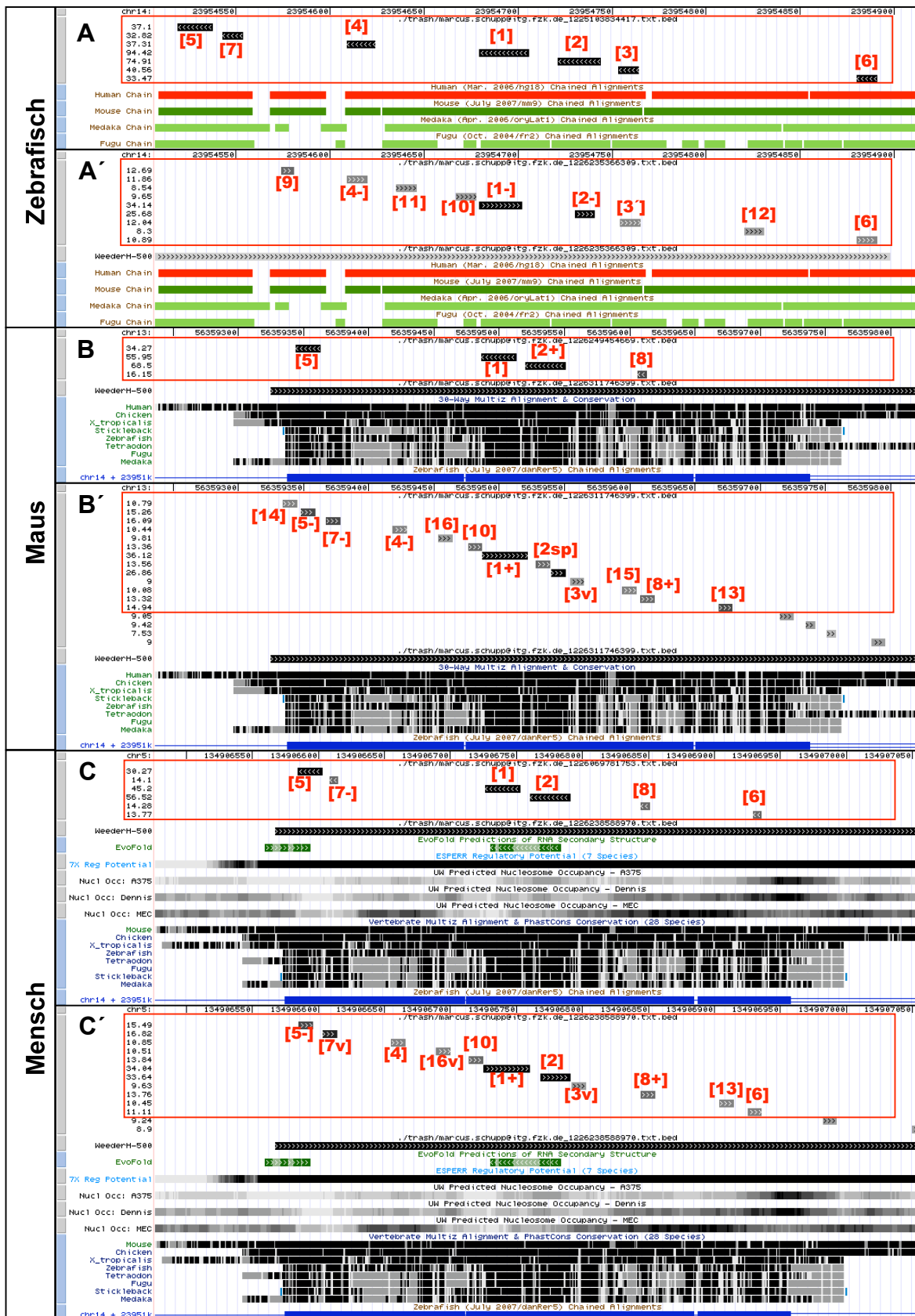


Abb. 7: Vorhersage regulatorischer Motive in der LATE-Region mit *WeederH*. Als Referenzsequenz diente LATE aus Zebrafisch (A), Maus (B) oder Mensch (C) bzw. vom Startkodon stromaufwärts gelegene *neurogl1*-Sequenz inkl. LSE-Region (A', B', C'). Jeweils Angaben zu chromosomaler Position, *WeederH*-Motiven mit χ^2 -Werten (rot eingerahmt), *Weeder-500*-Motiv, Voraussagen zu RNA-Sekundärstrukturen (*EvoFold*, grün), regulatorischem Potential (hellblau), Nukleosomenbelegung (*Nucl Occ*) und zur Konservierung in anderen Spezies (braun in A, A'; grün in B, B'; blau in C, C').

Drei Computermodelle (A375, Dennis und MEC) leiten eine Nukleosomenbelegung allein von der DNA-Sequenz ab und beruhen auf Microarray-Daten aus MNase-Verdau-Assays in menschlichen Zelllinien. Die Modelle A375 und Dennis erkennen aufgrund schwachem MNase-Verdau eher Regionen, die häufig an Nukleosomen binden. Das MEC-Modell aus einem Assay mit starkem MNase-Verdau erkennt hingegen Nukleosom-freie Regionen besser (Gupta et al., 2008). Die ermittelten Werte der Modelle A375 und Dennis sind daher zu denen des MEC-Modells komplementär, wie auch in Abb. 8-A gut zu erkennen ist. Werte ab 1,0 in A375 und Dennis deuten auf eine häufige Nukleosomenbelegung hin, Werte um 0 treffen keine klare Zuordnung, und Werte unter -1,0 sagen zuversichtlich eine nukleosomenfreie Position voraus. Beim MEC-Modell ist die Situation umgekehrt, hier sind Werte über 1,0 eine gute Vorhersage für DNA ohne Nukleosomenbelegung. Für die LATE-Region liegen die A375- und Dennis-Werte klar im negativen und die MEC-Werte im positiven Bereich. Dies ist ein Hinweis auf eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass LATE nicht oft an Nukleosomen gebunden ist daher regulatorische Funktion besitzt. Eine Korrelation zu potentiell regulatorischen Abschnitten aus der *WeederH*-Analyse ist jedoch nicht klar erkennbar.

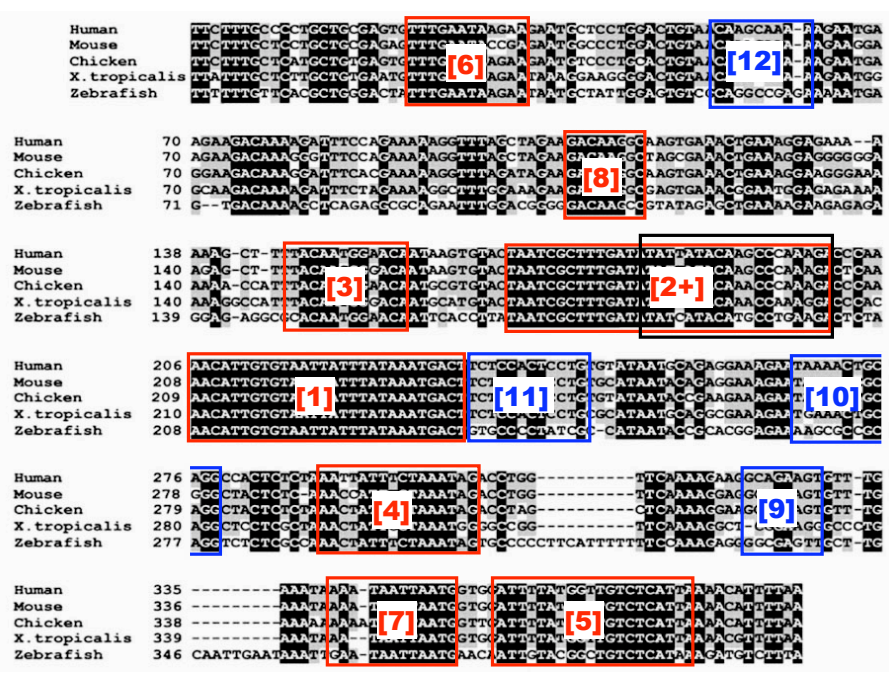


Abb. 9: Zusammenfassung der *WeederH*-Analyse. Alignment homologer LATE-Sequenzen aus Mensch, Maus, Huhn, Frosch und Zebrafisch mit der Angabe vorhergesagter potentiell regulatorischer Motive [1]-[8] (rot eingerahmte Segmente), geordnet nach χ^2 -Wert, und PAX6-Bindestelle (schwarzer Rahmen). Motive [9]-[12] (blau unterlegte Segmente) zusätzlich aus der Analyse der homologen Sequenzen oberhalb des *neurog1*-Startkodons inkl. LSE aus Mensch, Maus, Frosch und Zebrafisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Auswahl an Segmenten in LATE, die möglicherweise funktionelle TF-Bindestellen beinhalten, durch Anwendung des *WeederH*-Algorithmus und Vergleich der Vorhersagen mit zwei Sätzen verschieden langer homologer Sequenzen sowie unter Berücksichtigung der experimentell validierten PAX6-Bindestelle auf höchstens acht hoch konservierte Segmente (LATE 23-34 [6], 107-114 [8], 150-161 [3], 170-202 [2+], 208-235 [1], 290-305 [4], 360-371 [7] und 376-397 [5]) und vier weniger konservierte Abschnitte (LATE 54-63 [12], 236-247 [10], 268-279 [11] und 333-340 [9]) verringert (Abb. 9).

3.1.3 Detektion regulatorischer Motive mit dem *Footprinter*-Algorithmus

Footprinter ist ein Algorithmus zur Entdeckung konservierter Sequenzmotive in orthologen Sequenzen, der den Grad an stammesgeschichtliche Verwandtschaft der betrachteten DNA-Abschnitte in die Berechnung miteinbezieht (Blachette und Tompa, 2003). Die zugrunde liegende Idee ist die Annahme, dass Selektionsdruck regulatorische Elemente dazu veranlasst, sich langsamer zu entwickeln als die sie umgebenden funktionslosen Sequenzen. In *Footprinter* eingegeben werden die homologen Sequenzen, das entsprechende Kladogramm, die gewünschte Motivlänge, die maximale Gesamtzahl an Mutationen und die maximale Anzahl an Mutationen pro Abzweigung im Kladogramm (*parsimony scores*). Dann erfolgt die Ausgabe der ermittelten Motive, deren Konservierung wiederum anhand der *parsimony scores* als signifikant bewertet werden. Hier wurden dieselben homologen LATE-Sequenzen wie bei der *WeederH*-Analyse verwendet (Zebrafisch, Frosch, Huhn, Maus und Mensch). Als Motivlänge wurden zehn bp gewählt, die maximale Gesamtzahl an Mutationen auf zwei und die Anzahl Mutationen pro Abzweigung im Kladogramm auf eins. Diese Einstellungen liefern insgesamt 32 Motive, die in acht Blöcken zusammengefasst sind (siehe Abb. 10-A und -B): LATE 21-31 (zwei Motive), LATE 30-39 (ein Motiv), LATE 63-72 (ein Motiv), LATE 151-160 (ein Motiv), LATE 167-197 (zehn Motive), LATE 205-237 (acht Motive), LATE 290-302 (fünf Motive), LATE 357-371 (sieben Motive) und LATE 380-395 (drei Motive). Einzelne Motive kommen auch mehrfach vor, z.B. dasjenige mit rotem Stern gekennzeichnete, welches auch die PAX6-Bindestelle inkl. der Kernsequenz GCCT im vierten Block enthält. Dieses Motiv kommt allerdings nur im Zebrafisch vor. Außerdem sind die Blöcke 2 und 3 beim Zebrafisch und Block 2 beim Frosch in ihrer relativen Position zu den entsprechenden Blöcken der Mensch-, Maus- und Huhn-Sequenzen verschoben (Abb. 10-A/B blau bzw. rot umrahmt).

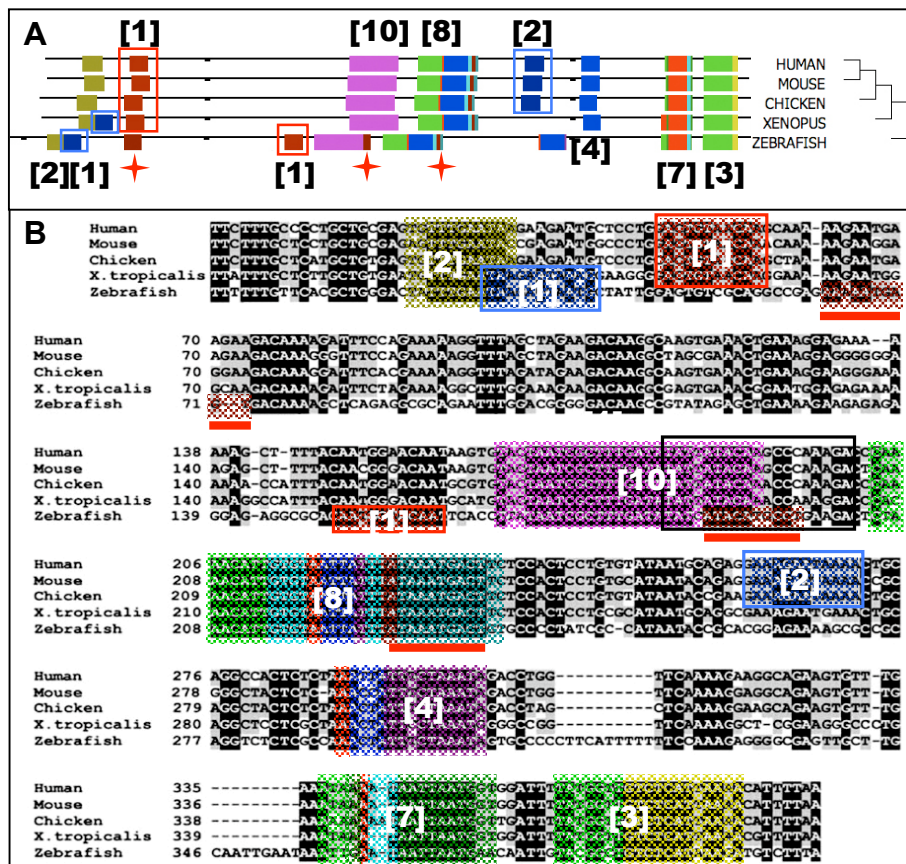


Abb. 10: *Footprinter*-Analyse. Alignment homologer LATE-Sequenzen aus Mensch, Maus, Huhn, Frosch und Zebrafisch mit der Angabe vorhergesagter potentiell regulatorischer Motive (farbig unterlegte Abschnitte in A und B, Anzahl der Motive in Klammern). Korrespondierende Motive sind in gleichen Farben dargestellt bzw. zusätzlich umrahmt in B bzw. mit rotem Stern gekennzeichnet in A. Darstellung als Block-Alignment in A, Darstellung als Sequenz-Alignment in B. Rote Sterne in A = rote Balken in B. Schwarzer Rahmen: PAX6-Bindestelle.

3.1.4 Zusammenfassung der *In-silico*-Analyse

Die verschiedenen Algorithmen verwenden jeweils unterschiedliche Kriterien zur Suche nach potentiell regulatorischen Elementen in LATE und bieten daher Vor- und Nachteile. *MatInspector* benutzt nach Nukleotidpositionen gewichtete Matrizen als Deskriptoren zur Bestimmung einzelner TF-Bindestellen ohne Betrachtung der evolutionären Konservierung der untersuchten DNA-Sequenz. *WeederH* ermittelt nach Signifikanz geordnete Motive in orthologen Sequenzen hinsichtlich ihrer Konservierung in Sequenz und relativer Position; die gefundenen Motive können jedoch mehrere TF-Bindestellen enthalten und stammesgeschichtliche Verwandtschaftsbeziehungen der homologen Sequenzen bleiben unbeachtet. *Footprinter* dagegen berücksichtigt die Phylogenie der Sequenzen, aber die Anzahl ermittelter Motive variiert stark je nach voreingestellter Motivlänge, und eine Signifikanz wird nicht angegeben. Eine Kombination der drei Ansätze sollte daher eine

weitere Reduktion auf Sequenzabschnitte mit relevanten TF-Bindestellen in LATE ermöglichen. Abb. 11 gibt einen Überblick. Die gewählten Abschnitte ergeben sich zunächst aus der übereinstimmenden Vorhersage zwischen *WeederH*- und *Footprinter*-Analyse, wodurch die Abschnitte 9, 10, 11 und 12 (blau in Abb. 9) ausgeschlossen werden können, auch weil sie wenig konservierte Nukleotide enthalten. Abschnitt 8 fällt ebenfalls weg, da *Footprinter* in diesem Block kein Motiv angibt (vgl. Abb. 9). Die verbleibenden sieben Blöcke A-G repräsentieren hingegen die konsistent vorhergesagten Abschnitte, geordnet hinsichtlich Motivanzahl und Zahl vorhergesagter TF-Bindestellen aus der *MatInspector*-Analyse (Abb. 11). Schwankungen um wenige Nukleotide an den oberen und unteren Grenzen sind möglich, weil mehrere TF-Bindestellen pro Block vorhergesagt werden, die für eine spezifische Bindung möglicherweise auch Nukleotide außerhalb der Blöcke benötigen.

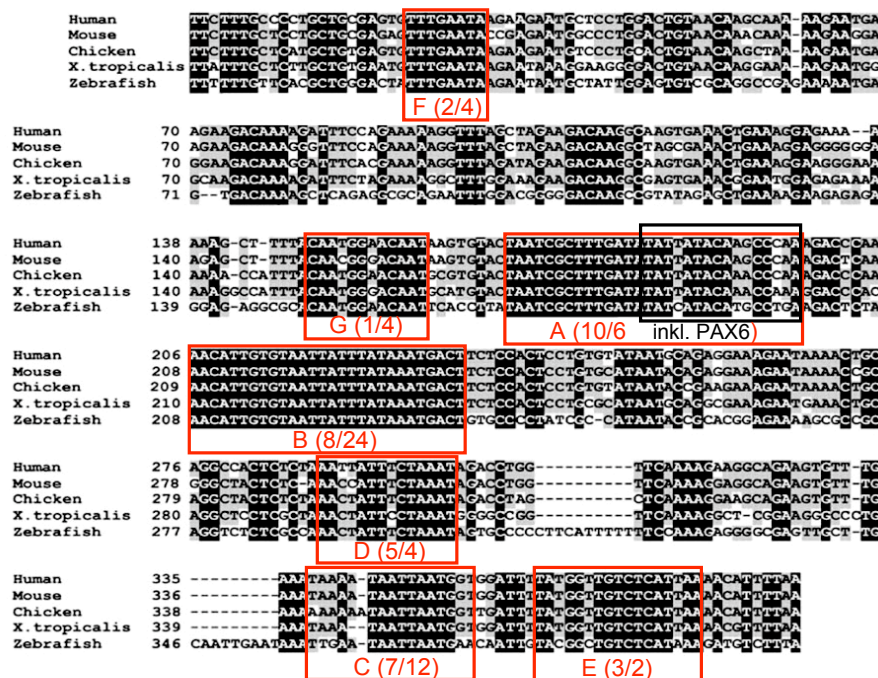


Abb. 11: Zusammenfassung der *In-silico*-Analyse. Alignment homologer LATE-Sequenzen aus Mensch, Maus, Huhn, Frosch und Zebrafisch mit der Angabe potentiell regulatorischer Abschnitte A-G (rot eingerahmte Blöcke, Anzahl vorhergesagter Motive und TF-Bindestellen in Klammern). Roter Balken: PAX6-Bindestelle.

Block A enthält zehn Motive und die experimentell nachgewiesene Pax6-Bindestelle. Block B ist der höchst konservierte Abschnitt und vereinigt 24 vorausgesagte TF-Bindestellen sowie acht Motive. Block C enthält sieben Motive und zwölf TF-Bindestellen, Block D fünf Motive und vier TF-Bindestellen, und Block E drei Motive und zwei TF-Bindestellen. Es folgt Block F mit zwei Motiven und vier TF-Bindestellen und schließlich Block G mit einem Motiv und vier TF-Bindestellen. Die Blöcke sind auch in Abb. 5 der *MatInspector*-Analyse eingezeichnet.

3.1.5 Auswahl ZNS-spezifischer TF-Kandidaten

Die *MatInspector*-Analyse sagt für viele Homeobox enthaltende Proteine TF-Bindestellen voraus. Neben Proteinen mit anderen Klassen DNA-bindender Domänen, wie z.B. *zink finger*-, *forkhead*-, HMG- oder bHLH-Domänen, wurden daher besonders TFs mit Homeodomäne für die weitere Untersuchung in Betracht gezogen. Durch Suche in der Literatur wurden TF-Kandidaten ausgewählt, die im ZNS des Zebrafischs im Zeitfenster vom Beginn der Expression des LATE-GFP-Reporters an, also nach Formation des Neuralrohrs, bis 24 hpf exprimiert sind. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick der ausgesuchten TF-Kandidaten, ihrer DNA-bindenden Domänen sowie ihrer ZNS-spezifischen Expressionsdomänen im 24 hpf Zebrafischembryo mit Referenz der Erstbeschreibung (teilweise ergänzt durch Expressionsdaten von Thisse et al. und eigenen Daten, z.B. bei *her4.2*). Diese TFs wurden für eine detaillierte Expressionsanalyse herangezogen, welche über eine Beteiligung an einer direkten oder indirekten Regulation von *neurogl1* weitere Hinweise liefern sollte.

Tabelle 1: Ausgewählte Transkriptionsfaktoren für die Koexpressionsanalyse.

TF (früherer Name)	DNA-bindende Domäne (Familie)	ZNS-spezifische Expressionsdomänen (24 hpf)	Referenz
arx (<i>aristalless</i>)	Homeo (Paired Homeo, Bicoid Unterfamilie)	ventrales Telencephalon (ganglionische Eminenz), Diencephalon (ventraler Thalamus, Hypothalamus), Bodenplatte	Miura et al., 1997
barhl1.2	Homeo	Zona limitans intrathalamica (ZLI)	Colombo et al., 2006
dbx1a (hlx1)	Homeo (H2.0 Homeo)	Diencephalon (ZLI, dorsaler Thalamus, Pretectum, Tegmentum), Grenze Di-/Mesencephalon, Rhombomergrenzen	Fjose 1994 Seo et al., 1999
dlx2a	Homeo (Distal-less Homeo)	ventrales Telencephalon (ganglionische Eminenzen), Diencephalon (ventraler Thalamus, Hypothalamus)	Akimenko et al., 1994
gbx2	Homeo (Engrailed Homeo)	Mesencephalon (Tectum), MHB, Cerebellum	Ekker et al., 1992
eng2b (eng3)	Homeo (GBX Homeo)	Dorsoposteriores Telencephalon, MHB	Su und Meng, 2002
gsx1 (gsh1)	Homeo (Antp Homeo)	Diencephalon (Hypothalamus), Mesencephalon, Rhombencephalon, Rückenmark (Interneurone)	Cheesman und Eisen, 2004
nkx5.1 (hmx3)	Homeo (H6 Homeo)	Anterovertrales Diencephalon, Seitenlinienprimordien, posteriores Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Adamska et al., 2000
lhx5 (lim5)	Homeo (LIM Homeo)	Anteriores Diencephalon, Telencephalon, Mesencephalon, Rhombencephalon	Toyama et al., 1995
nkx1.2lb (sax2, nkx1.1)	Homeo (NK1 Homeo)	Ventrales Diencephalon, ventrales Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Bae et al., 2004
nkx2.2a	Homeo (NK2 Homeo)	Ventrales Diencephalon, ventrales Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Barth undt Wilson, 1995
oncut1 (hnf6)	Homeo (CUT Homeo)	Telencephalon, ventrales und dorsales Diencephalon, Mesencephalon, Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Thisse et al., 2004

Tabelle 1 (Fortsetzung)

TF (früherer Name)	DNA-bindende Domäne (Familie)	ZNS-spezifische Expressionsdomänen (24 hpf)	Referenz
otpa	Homeo (Paired Homeo, Bicoid Unterfamilie)	Diencephalon (preoptische Region, posteriores Tuberculum), Rhombencephalon	Del Giacco et al., 2006
otx2	Homeo (Paired Homeo, Bicoid Unterfamilie)	Dorsales Diencephalon (ZLI), Mesencephalon (Tectum)	Mori et al., 1994
otx3	Homeo (Paired Homeo, Bicoid Unterfamilie)	Dorsales Diencephalon (Epithalamus), Mesencephalon (Tectum), Retina	Mercier et al., 1995
otx5	Homeo (Paired Homeo, Bicoid Unterfamilie)	Epiphyse, Retina	Masai et al., 1997 Gamse et al., 2002
pax6a (pax[zf-a])	Homeo (Paired Homeo)	Telencephalon (Grenze Pallium/Subpallium), dorsales Diencephalon (ventraler und dorsaler Thalamus, Pretectum), Rhombencephalon, Rückenmarkanlage, Retina	Krauss et al., 1991
pbx4 (<i>lazarus</i>)	Homeo (TALE/PBX)	Tel-, Dien-, Mes- und Rhombencephalon sowie Rückenmarkanlage	Vlachakis et al., 2000
pou50 (zp-50)	POU-Homeo (POU-Klasse 3)	Dorsales Telencephalon, Diencephalon ventraler und dorsaler Thalamus, Tegmentum, Pretectum), Mesencephalon (Tegmentum), Cerebellum, Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Hauptmann und Gerster, 1996
her4.2	bHLH (hairy-E[spl])	Telencephalon, Diencephalon (ventraler und dorsaler Thalamus, Hypothalamus, posteriores Tuberculum, Tegmentum), Cerebellum, Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Takke et al., 1999
her6	bHLH (hairy-E[spl])	Telencephalon, Diencephalon (ventraler und dorsaler Thalamus, Hypothalamus, Tegmentum), Mesencephalon (Tectum), Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Takke et al., 1999 Thisse et al., 2001
her8	bHLH (hairy-E[spl])	Ventrales Telencephalon, Diencephalon ventraler Thalamus, Hypothalamus, Pretectum), Mesencephalon (Tectum, Tegmentum), Cerebellum, Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Gajewski und Voolstra, 2002 Thisse et al., 2004
neurog1	bHLH (hairy-E[spl])	Dorsales Telencephalon, Diencephalon (ventraler und dorsaler Thalamus, posteriores Tuberculum, Pretectum, Tegmentum), Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Blader et al., 1997 Thisse et al., 2001
tal2	bHLH (hairy-E[spl])	Diencephalon (dorsaler Thalamus, Tegmentum), Rückenmarkanlage (laterale Bodenplatte)	Pinheiro et al., 2004
foxb1.2 (<i>mariposa</i> , forkhead3)	Forkhead (winged helix)	Diencephalon (ventraler und dorsaler Thalamus ZLI?, Hypothalamus), Mesencephalon (Tegmentum, MHB, Bodenplatte), Rhombencephalon (Rhombomergrenzen)	Odenthal und Nüsslein-Volhardt, 1998
foxn4	Forkhead (winged helix)	Bulbus olfactorius, Mesencephalon (Tectum), Rhombencephalon (craniale Motorneurone), Retina	Danilova et al., 2004
gata2b	Zinkfinger	Telencephalon, Mesencephalon	Thisse et al., 2004
sp9	Zinkfinger, C2H2-Typ	Ventrales Telencephalon, Diencephalon (ventraler Thalamus), Mesencephalon (MHB), Rhombencephalon	Kawakami et al., 2004b
lef1	HMG	Diencephalon (Hypothalamus, Epithalamus), Mesen- cephalon (Tectum, MHB)	Dorsky et al., 1999 Lee et al., 2006
sox2	HMG	Dorsales Telencephalon, Diencephalon (Hypothalamus, ventraler Thalamus, ZLI), Mesencephalon (dorsales Tectum, MHB), Cerebellum, Rhombencephalon, Rückenmarkanlage, Augen	Okuda et al., 2006 Thisse et al., 2001
sox11b	HMG	Dorsales Telencephalon, Diencephalon (schwach im ventralen Thalamus, stark im dorsalen Thalamus, Pretectum und Tegmentum), ventrales Rhombencephalon, Rückenmarkanlage	Rimini et al., 1999

Tabelle 1 (Ende)

TF (früherer Name)	DNA-bindende Domäne (Familie)	ZNS-spezifische Expressionsdomänen (24 hpf)	Referenz
sox21b	HMG	Dorsales Telencephalon, Diencephalon (ventraler Thalamus, Pretectum), Mesencephalon (Tectum und Tegmentum)	Rimini et al., 1999
tbx2b	T-Domäne	Anteroventrales Telencephalon und Diencephalon, Epiphyse	Dheen et al., 1999 Thisse et al., 2004

3.2 Koexpressionsanalyse (*In-situ*-Analyse)

TF-Kandidaten, die an der *neurog1*-Regulation im Diencephalon beteiligt sind, müssen zur gleichen Zeit in vom LATE-GFP-Reporter markierten Gehirnregionen des Zebrafischembryo exprimiert sein. Für den Nachweis einer Koexpression von TF und GFP-Transgen diente die Kolokalisation beider Aktivitäten mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bzw. -Antikörperfärbung zur bildlichen Darstellung in vollständigen, fixierten Embryonen (*whole mount*). Standardmäßig wurden ausschließlich Embryonen im Prim-5-Stadium (24 ± 1 hpf) verwendet und ein geeignetes Protokoll für diese Analyse entwickelt.

3.2.1 Entwicklung und Etablierung einer Färbemethode zur gleichzeitigen Darstellung der Expression von TF-mRNA und GFP-Transgen

Herkömmliche Protokolle zur Darstellung von Genaktivitäten im ganzen Embryo basieren auf der Verwendung nicht-fluoreszierender Farbstoffpräzipitate und lichtmikroskopischer Dokumentation. Für Kolokalisationszwecke sind diese jedoch nur begrenzt einsetzbar, weil eine Trennung benachbarter Fokusebenen schwierig ist und leicht Signalüberlagerungen verschiedener Genaktivitäten vorgetäuscht werden können. Dies gilt im verstärkten Maße auch für den Einsatz von Fluorochromen, wo die Kombination aus Anregungs- und Sperrfilter zur Anregung und Detektion der Signale entscheidend ist. Die digitale konfokale Lasermikroskopie löst dieses Problem effizient und bietet als entscheidenden Vorteil die computergestützte 3D-Rekonstruktion zur Visualisierung von Genaktivitäten, wodurch deren Signale eindeutiger unterschieden und somit klarere Aussagen hinsichtlich einer Kolokalisation getroffen werden können.

Das Protokoll der *whole-mount*-ISH nach Hauptmann und Gerster (1994) zum Nachweis der TF-Expression wurde aus diesen Gründen so modifiziert, dass anstatt Alkalische-Phosphatase(AP)-vermittelter Präzipitation nicht-fluoreszierender Chromogene eine durch Peroxidase vermittelte Fluorochrompräzipitation die spezifische Detektion beliebiger TF-mRNAs ermöglichte (*whole-mount*-Fluoreszenz-ISH = FISH) (siehe auch 2.2.11.2). Als fluoreszierendes Substrat der Peroxidase wurde dabei CY3-gekoppeltes Tyramid verwendet, das während der Enzymkatalyse in Form hochreaktiver und kurzlebiger Tyramid-Radikale an nukleophile Tyrosinreste kovalent bindet, wodurch ein Verlust an Signallokalisierung durch Diffusion minimiert wird. Außerdem war der die spezifisch gebundenen DIG-markierten TF-*antisense*-mRNA-Sonden erkennende Antikörper nicht nur mit jeweils einer, sondern mit mehreren Peroxidase-Einheiten (als Peroxidase-Polymer) konjugiert, womit eine Vervielfachung der Signalamplifikation sowie eine signifikante Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses erreicht werden konnte (Abb. 12).

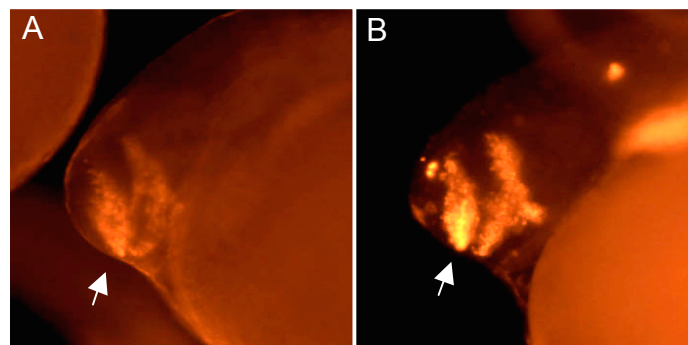


Abb. 12: Modifizierung des FISH-Protokolls. Verwendung von verschiedenen Anti-Digoxigenin-Antikörpern, jeweils konjugiert an einzelne Peroxidase (POD)-Einheit (A) oder an POD-Polymer (B) mit CY3-Tyramid als Fluorochrom. Das jeweilige Signal repräsentiert Expressionsdomänen von *dlx2a* im Tel- und Diencephalon des Zebrafischembryos 24 hpf (Pfeile in A und B). Der an POD-Polymer gekoppelte Antikörper liefert ein sichtbar besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis.

Dies wurde auch dadurch unterstützt, wenn nach Hinzufügen der Substratlösung und Inkubation für 35 min. bei Raumtemperatur anschließend nicht durch mehrmaliges Auswaschen des Substrats die Färbung sofort unterbrochen wurde, sondern die Tyramidlösung nur einmal mit PTW-Waschlösung ausgetauscht und dann über Nacht bei 4°C restliches Substrat von der Peroxidase langsam umgesetzt werden konnte. Erst danach wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen beendet.

Im Anschluss an die Entwicklung des CY3-Signals einer TF-mRNA wurde der Nachweis des GFP-Transgens mittels GFP-Antikörperfärbung durchgeführt. Die CY3-gefärbten

Embryonen überstanden die bereits etablierte Prozedur ohne größeren Verlust ihrer strukturellen Integrität. Der verwendete Sekundärantikörper war an das Fluorochrom Alexa488® konjugiert, dessen Signal vom CY3-Signal wegen der wenig überlappenden Emissionsspektren sehr gut abgrenzbar ist.

Nach der GFP-Färbung mussten die Embryonen für die Mikroskopie präpariert werden. Dazu wurde die Körperachse vom Dottersack getrennt, der Kopfbereich isoliert und die Augen entfernt. Dann wurde das nun freiliegende Neuralrohr in seitlicher Orientierung auf einem Objektträger in Polymount®-Lösung eingebettet und durch Auflegen eines Deckglases immobilisiert. Diese Arbeiten waren erforderlich, um eine optimale Signalausbeute zu erreichen; vor allem die Entfernung der Augen war entscheidend, da diese einen Großteil des Diencephalons bedecken und die embryonale Linse Lichtsignale bricht. Besonderes manuelles und instrumentelles Geschick war bei der Präparation vonnöten, um die interessierenden Gehirnregionen nicht zu verletzen. Die Schwierigkeit der Präparation und der dafür erforderliche Zeitaufwand sind Nachteile der Methode. Trotzdem ist die Methode robust, d.h. das Protokoll eignet sich zur Detektion beliebiger mRNAs und die Fluorochrome CY3 bzw. Alexa488® bleiben mehrere Wochen bei Raumtemperatur und bei Lagerung bei -20°C (Embryonen in 100 % Methanol) über viele Monate im gefärbten Gewebe stabil.

Die in den nächsten Abschnitten vorgestellten Abbildungen zeigen Lateralansichten der mit dem Programm *Volocity* erzeugten 3D-Rekonstruktionen. Es handelt sich bei der Darstellung nicht um summierte Projektionen der aufgenommenen Fluoreszenzsignale, die Kollokalisationen vortäuschen, sondern der Wiedergabemodus (*renderer*) der 3D-Modelle war auf Undurchlässigkeit (*opacity*) eingestellt. Somit repräsentiert die Gelbfärbung wirkliche Überlappungen grüner und roter Signale in derselben Fokusebene und nicht in verschiedenen. Darüberhinaus erlaubt *Volocity* sowohl Drehungen der 3D-Modelle nach allen Freiheitsgraden als auch die Anfertigung beliebiger optischer Schnitte im virtuellen Raum. Zu Zwecken der Darstellung, Beschreibung und Beurteilung kolokalisierter Signale waren diese Funktionen essentiell und Motivation für die Entwicklung der angewandten Färbemethode.

Einigen gedruckten Exemplaren dieser Arbeit ist ein digitaler Datenträger (DVD) mit den aus *Volocity* exportierten 3D-Rekonstruktionen als Videodateien im *mov*-Format (erfordert *QuickTime Player*) und als ursprüngliche *multi-file-library*-Datei (*mvd2*-Format, erfordert *Volocity*) beigelegt.

3.2.2 Vergleich der Fluoreszenzsignale von *gfp*-mRNA und GFP-Protein

Zwischen der Detektion von *gfp*-mRNA und translatiertem Protein, das schließlich mittels Antikörper nachgewiesen werden kann, besteht eine zeitliche Diskrepanz. Translatiertes GFP besitzt außerdem eine wesentlich längere Halbwertszeit als seine mRNA. Daher musste zunächst überprüft werden, ob das Signal des GFP-Proteins mit dem Signal der zeitlich vorangehenden *gfp*-mRNA-Expression ausreichend räumlich übereinstimmt um sicherzustellen, dass Aussagen hinsichtlich einer Koexpression durch Kolo­kalisierung mit der angewandten Methode prinzipiell möglich sind. Abb. 13-A bis -C zeigt das Ergebnis der gleichzeitigen Färbung von *gfp*-mRNA und dem Translationsprodukt des 3.1-GFP-Transgens im Kopfbereich des Embryos 24 hpf mit GFP-Protein (grün in A und C), in GFP-mRNA (rot in B und C), die Kolo­kalisierung beider Signale (gelb in C) sowie ein Schema embryonaler Hirnregionen zur Orientierung (in D, verändert nach Hauptmann und Gerster, 2002). Aufgrund des hohen Grads an Signalüberlagerung in den LATE-abhängigen Expressionsdomänen im Diencephalon lässt sich sagen, dass beide Signale weitgehend zur Deckung kommen und somit davon ausgegangen werden kann, dass die GFP-Antikörperfärbung die momentane Aktivität des GFP-Transgens verlässlich widerspiegelt.

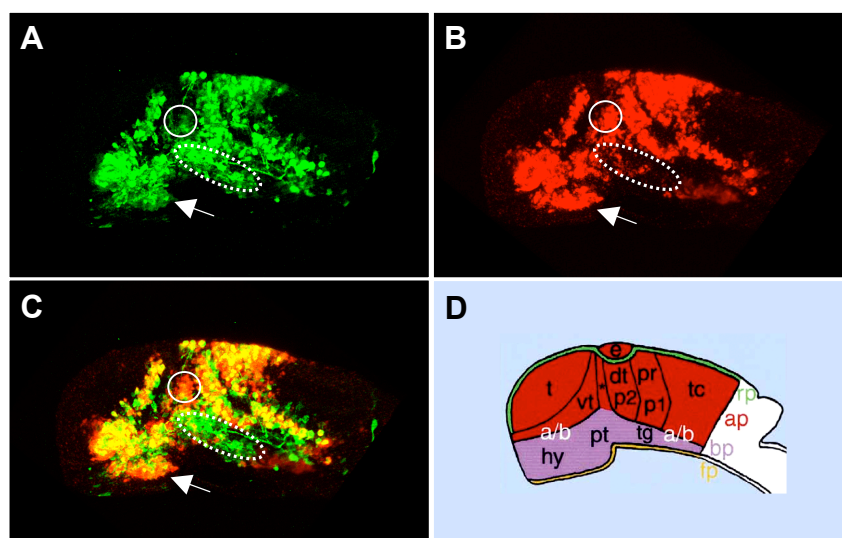


Abb. 13: Vergleich der Fluoreszenzsignale von *gfp*-mRNA und GFP-Protein des 3.1-Reporters. (A): GFP-Antikörperfärbung (grün), (B): *gfp*-mRNA (rot), (C): Kolo­kalisierung beider Signale (gelb), (D): Schema embryonaler Hirnregionen 24 hpf (nach Hauptmann und Gerster, 2002, verändert; a/b: Grenzverlauf Alar-/Bodenplatte, ap: Alarplatte (*alar plate*, rote Regionen), bp: Basalplatte (*basal plate*, violette Regionen), dt: dorsaler Thalamus, e: Epiphyse, fp: Bodenplatte (*floor plate*, gelb), hy: Hypothalamus, pr: Pretectum, pt: posteriores Tuberculum, rp: Firstplatte (*roof plate*, grün), t: Telencephalon, tc: Tectum, tg: Tegmentum, vt: ventraler Thalamus. Der Stern markiert den Verlauf der *Zona limitans intrathalamica* (ZLI).

Dies trifft zu für den ventralen Thalamus, Hypothalamus, posteriores Tuberculum, Epiphyse, dorsaler Thalamus, Pretectum und Tegmentum. Ebenfalls gut zu erkennen ist ein relativ starkes mRNA-Signal dort, wo das Protein-Signal erst im Entstehen begriffen, also noch relativ schwach ausgeprägt ist, z.B. im Bereich ventral des Thalamus (weiß eingekreist in A, B und C) oder im ventralen Teil des Hypothalamus (Pfeilspitzen in A, B und C). Diese Beobachtung verdeutlicht die zeitliche Verzögerung zwischen mRNA- und Proteinsynthese; außerdem erscheint dort die momentane Reporteraktivität am höchsten.

Ein Beleg für die große Stabilität bzw. lange Halbwertszeit GFP-Proteins ist das Auftreten eines für GFP-Protein positiven, jedoch für -mRNA negativen Bereichs ventral des Thalamus, im Bereich des Nucleus des medial-longitudinalen Faszikels (weiß punktierte Ellipse in A, B und C). Dieser Bereich soll darum bei der Kollokalisationsanalyse nicht beachtet werden.

3.2.3 Vergleich der Aktivität von GFP-Reportern mit der endogenen *neurog1*-Expression

Die Beurteilung einer möglichen Beteiligung eines TFs an der Regulation von *neurog1* mittels Koexpressionanalyse von GFP-Reportern erfordert die Klärung der Frage, wie gut GFP-Reporter die endogene Expression von *neurog1* abbilden. Dazu bedarf es einer detaillierten Beschreibung der endogenen Expressionsdomänen und deren Vergleich mit Expressionsdomänen der GFP-Reporter, welche einerseits alle drei bereits identifizierten Enhancer (LSE, ANPE, LATE = 8.4-Reporter), und andererseits nur den LATE-Enhancer (3.1-Reporter) beinhalten. Dies kann Hinweise liefern sowohl hinsichtlich Interaktionen der Enhancer untereinander als auch für die Beteiligung von TFs, die die regionsspezifische *neurog1*-Expression als Aktivatoren positiv oder als Repressoren negativ regulieren.

Embryonen mit 8.4- bzw. 3.1-Reporter wurden auf endogene *neurog1*-mRNA- und GFP-Protein-Expression gefärbt und analysiert. Abb. 14-A zeigt das *neurog1*-mRNA-Signal (rot); A1-5 zeigen das Signal des 8.4-Transgens und B1-4 des 3.1-Transgens (in grün) jeweils zusammen mit dem Signal der *neurog1*-mRNA (in rot), A1-3/5 und B1-3 in Lateral- und A4/B4 in Dorsalansicht (anteriores Kopfende links), C ein Schema zur Orientierung. *neurog1*-positive Domänen (weiß eingekreist in A) finden sich im dorsalen Telencephalon (dTel) und in folgenden diencephalen Regionen: im ventralen Thalamus mit anterolateral gelegener preoptischer Region (vTh / po), im posterioren Tuberculum (ventraler und dorsa-

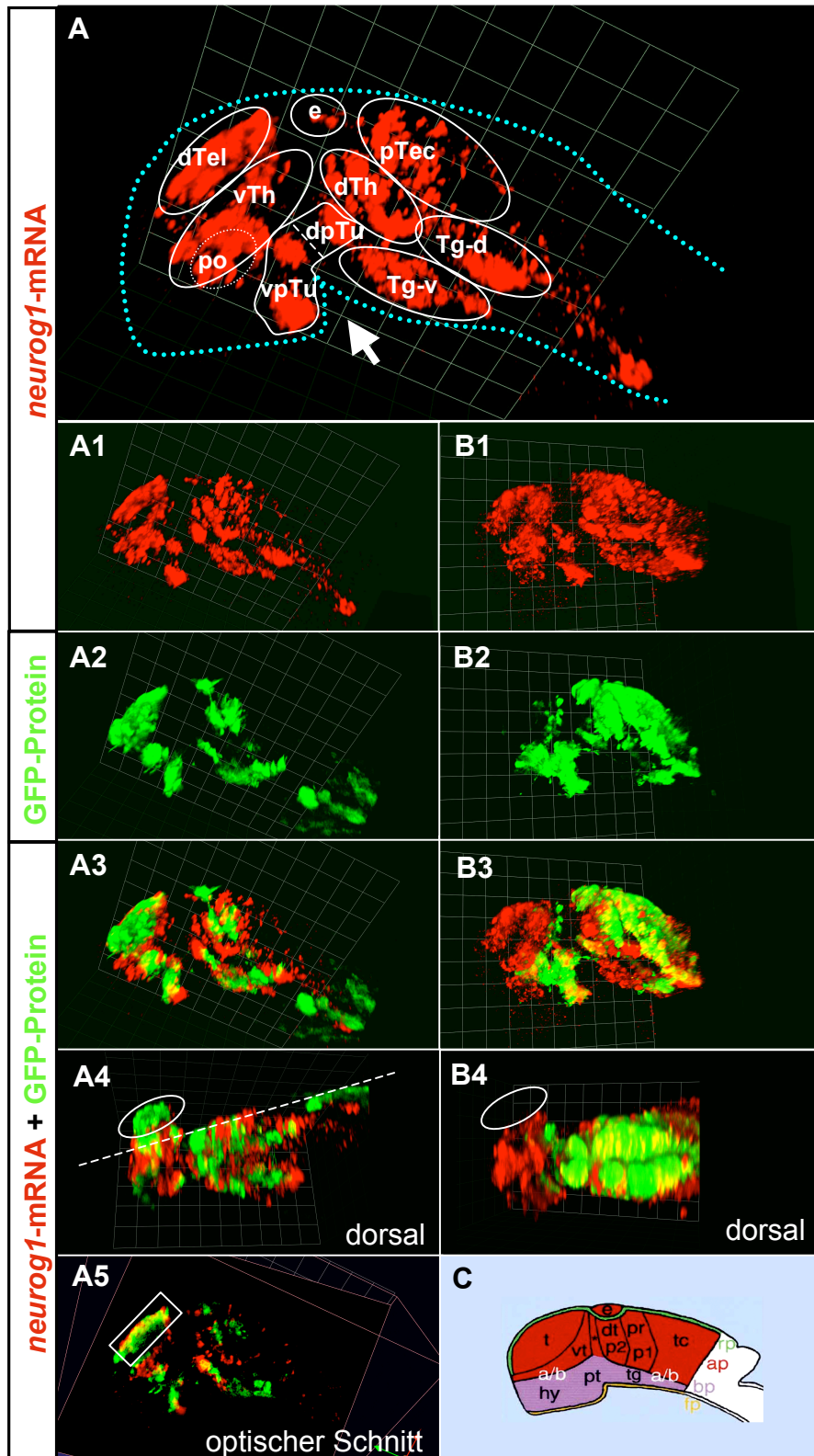


Abb. 14: Vergleich der Aktivität von GFP-Reportern mit der endogenen *neurog1*-Expression.

(A): Zuordnung der Domänen endogener *neurog1*-Expression. (A1-5): Koexpression von *neurog1* und 8.4-Reporter, (B1-4): Koexpression von *neurog1* und 3.1-Reporter. (C): Schema nach Hauptmann und Gerster (2002, verändert, Bezeichnungen entsprechend Abb. 13-D). Lateralansichten (anterior = links) außer (A4) und (B4) (Dorsalansichten, anterior = links). Ebene des Sagittalschnitts (in A5, Telencephalonbereich eingerahmt) angedeutet in (A4), Bulbus olfactorius (BO) eingekreist. BO-Expression nicht in 3.1-Reporter. Abkürzungen in (A): dTel, dorsales Telencephalon; e, Epiphyse; vTh, ventraler Thalamus; po, preoptische Region; dTh, dorsaler Thalamus; pTec, Pretectum; vpTu, ventrales posteriores Tuberculum; dpTu, dorsales posteriores Tuberculum; Tg-v, ventrales Tegmentum; Tg-d, dorsales Tegmentum. Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit.

ler Bereich, vpTu / dpTu) als Teil des Hypothalamus, im dorsalen Thalamus (dTh), der Epiphyse (e), im Pretectum (pTec) und in zwei dorso- bzw. ventrolateralen Streifen des Tegmentums (Tg-d und Tg-v). Die Grenzen des embryonalen Kopfbereichs sind mit blauen Punkten gekennzeichnet. Der Pfeil in A kennzeichnet die cephale Flexur der embryonalen Körperachse, die den Thalamus bzw. Hypothalamus in einen ventralen und dorsalen Bereich aufteilt. A1 zeigt nochmals die *neurog1*-mRNA, A2 den 8.4-Reporter und A3 die Überlagerung beider Signale. Das Muster des 8.4-Reporters stimmt mit dem Muster der endogenen *neurog1*-Expression größtenteils überein: Die preoptische Region, posteriores Tuberculum, Epiphyse, der ventrale Streifen des Tegmentums und vor allem die telencephalische Domäne sind gut repräsentiert, was ein optischer Schnitt durch die letztgenannte Region verdeutlicht (weißes Rechteck in A5, Schnittebene angedeutet in A4). In der Dorsalansicht zeigt der 8.4-Reporter eine zusätzliche dorsolateral gelegene telencephalische Domäne, wahrscheinlich den embryonalen Bulbus olfactorius, in der keine *neurog1*-mRNA nachgewiesen werden kann (weißer Kreis in A4).

Dennoch können die äquivalenten Bereiche beider Muster nicht vollständig zur Deckung gebracht werden, was in den unterschiedlichen Halbwertszeiten von *neurog1*-mRNA bzw. GFP-Protein begründet sein mag. Die restlichen diencephalen Bereiche mit ventralem Thalamus, dem nach kaudal verlängerten Teil des Pretectums und dem dorsalen Streifen des Tegmentums erscheinen durch den 8.4-Reporter unterrepräsentiert. Diese Domänen werden durch den 3.1-Reporter besser abgebildet, besonders das Pretectum und das dorsale Tegmentum zeigen mehr Übereinstimmung zur endogenen Expression (vergleiche A2 und B2 bzw. A3 und B3). Man beachte, dass der in B1-4 dokumentierte Embryo mit 3.1-Transgen zum Zeitpunkt seiner Fixierung höchstens zwei Stunden älter war als jener in A1-5, weshalb speziell in der pretectalen Domäne mehr momentane *neurog1*-Aktivität nachgewiesen werden kann. Diese Zeitdifferenz ist jedoch zu gering, als dass sie die Abweichungen der GFP-Signale zwischen 8.4- und 3.1-Reporter erklären könnte.

Daher seien in Abb. 15 die Muster des 8.4- bzw. 3.1-GFP-Transgens bei Embryonen desselben Entwicklungsstadiums mit der gleichzeitigen Darstellung von GFP-mRNA und-Protein einander gegenüber gestellt. Der Hauptunterschied zwischen den Mustern sind das schon beschriebene Fehlen der telencephalen Domäne beim 3.1-Transgen (Blader et al., 2004).

Weitere und bisher nicht im Detail analysierte Unterschiede sind wie oben bereits erwähnt die nach posterior erweiterte pretectale Domäne, der von der preoptischen Region aus Richtung Epiphyse ziehende Abschnitt des ventralen Thalamus und eine Verlagerung vermehrter Expression vom ventralen auf den dorsalen Bereich des Tegmentums. Dieser

Vergleich beruht auf der Analyse von jeweils mindestens zwei unabhängig generierten transgenen Linien mit hinreichend konsistenten Expressionsmustern (zur Darlegung der Kriterien hierfür siehe auch Abschnitt 3.3.1.1).

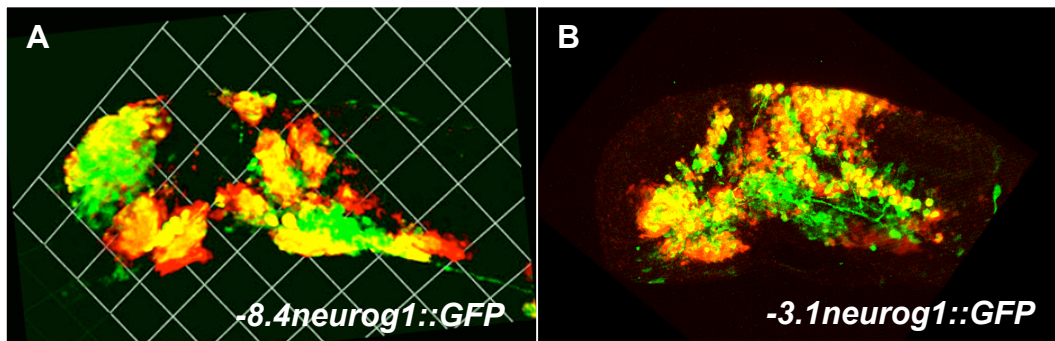


Abb. 15: Vergleich der Expressionsmuster zwischen 8.4-Transgen (A) und 3.1-Transgen (B) in Embryonen 24 hpf. *gfp*-mRNA in rot, GFP-Protein in grün, Kollokalisierung beider Signale in gelb. Skalierungsgitter: 37,6 μ m/Einheit.

Das 3.1-Transgen, das alleine den LATE-Enhancer beinhaltet, rekapituliert also *neurog1*-Expressionsdomänen im Diencephalon vollständiger als das 8.4-Transgen, welches zusätzlich die stromaufwärts gelegenen Enhancer LSE und ANPE enthält.

3.2.4 Koexpression von TF-Kandidaten mit dem LATE-GFP-Reporter

Die Aktivität der zahlreichen ZNS-spezifischen und in Tab. 1 vorgestellten TFs wurden jeweils zusammen mit der durch den LATE-Enhancer angetriebenen Aktivität des 3.1-GFP-Reporters dargestellt. Es folgt eine Beschreibung der Expressionsmuster, die eine genauere Abgrenzung der GFP-positiven Bereiche durch den Abgleich mit den bereits im Detail beschriebenen TFs im Neuralrohr des einen Tag alten Embryo erlaubt. Außerdem kann sowohl die Abstammung der GFP-Domänen aus der Neuralplatte geklärt werden, also ob eine bestimmte Domäne ihren Ursprung in der Boden-, Basal-, Alar- oder Firstplatte hat (longitudinale Zuordnung der GFP-Domänen), als auch die Einordnung der Domänen in das von Puelles et Rubenstein (1993, 2003) entwickelte und von Hauptmann et al. (2000, 2002) auf den Zebrafisch übertragene Modell einer prosomeren Organisation der frühen Neuralröhre ermöglichen (transverse Zuordnung der GFP-Domänen). Dies kann Hinweise geben hinsichtlich eines zumindest mittelbaren Einflusses eines TFs auf die regionsspezifische Expression von *neurog1*. Denn viele der hier untersuchten TFs wurden bereits mit Funktionen bei Prozessen der embryonalen Musterbildung und/oder

Zelltypspezifizierung in Zusammenhang gebracht, wo TFs als Effektoren von Signaltransduktionswegen eine Schlüsselposition einnehmen.

In alphabetischer Reihenfolge werden zuerst die Homeobox-bindenden Faktoren abgehandelt, gefolgt von Mitgliedern der HES-Familie mit bHLH-Domäne, dann Proteinen mit *forkhead*-, *zinkfinger*-, HMG- und schließlich mit T-Domäne. Die Beschreibung konzentriert sich auf rostrale Hirnbereiche von Tel- bis Metencephalon (Cerebellum); kaudal gelegene Bereiche (Rhombencephalon und Rückenmarkanlage) bleiben unbeachtet.

Für die Doppelfärbung wurden Embryonen zweier unabhängiger transgener Linien, die das 3.1-GFP-Transgen entweder homo- oder heterozygot tragen, verwendet. Die ersten Färbungen wurden mit Embryonen durchgeführt, die das Ausgangskonstrukt pBL3.1 tragen (Blader et al., 2004); später wurden transgene Embryonen verwendet, welche das für die Mutationsanalyse modifizierte 3.1-Reporterkonstrukt stabil exprimieren (siehe 2.2.1.17).

Die beiden gezeigten GFP-Expressionsmuster weisen zwar in der Ausdehnung einzelner Domänen geringfügige Abweichungen auf, hinsichtlich Lokalisation und Anordnung der Domänen sind die Muster hinreichend konsistent (siehe auch 3.3.1.1). Embryonen mit dem GFP-Muster des modifizierten Reporterkonstrukts sind in Abb. 16 mit (*) gekennzeichnet.

Unterschiede in Signalintensitäten wurden während der Detektion am Mikroskop (manuelle Modulation der Detektionsempfindlichkeit) und später bei der 3D-Rekonstruktion und Bildbearbeitung (Kontrast- und Helligkeitsregelung) teilweise angeglichen. Ansonsten wurden keine Manipulationen an den Bild-Rohdaten vorgenommen. Die Resultate sind in Abb. 16-1 bis -4 ([1] bis [33]) zusammengestellt:

[1] ***arx***: Transkripte dieses TF finden sich im Bereich der ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalons sowie im ventralen Thalamus und Hypothalamus des Diencephalons – in diesen Regionen ist auch *dlx2a* exprimiert (siehe unten) –, und kaudal der cephalen Flexur findet sich Expression in der Bodenplatte (Miura et al., 1997). *arx*-positive Bereiche im ventralen und hypothalamischen Bereich sind komplementär zu den GFP-positiven Regionen und grenzen dort die GFP-Reporterdomänen voneinander ab: den ventralen Thalamus rostrolateral von der preoptischen Region und ventral vom Hypothalamus.

[2] **barhl1.2**: Dieser TF markiert den dorsal gelegenen Teil der *Zona limitans intrathalamica* (ZLI), die den ventralen vom dorsalen Thalamus trennt. Es finden sich keine mit dem GFP-Reporter kolokalisierten Bereiche.

[3] **dbx1a (hlx1)**: Die Domäne im ventralen Diencephalon markiert Prosomer d6, welcher die GFP-positiven Domänen des posterioren Tuberculum rostrale und kaudal der cephalen Flexur trennt. Kolokalisierte Bereiche finden sich im dorsalen Thalamus und Pretectum. In kaudaler Verlängerung des dorsalen Thalamus in den dorsalen Streifen des Tegmentums kolokolisieren beide Signale ebenfalls. Der *dbx1a*-positive Bereich dorsal davon markiert den Grenzverlauf zwischen Di- und Mesencephalon und ist GFP-negativ. Aufgrund der Kolokolisation mit *dbx1a* kann der dorsale Thalamus dem diencephalen Prosomer 7 (d7) zugeordnet werden.

[4] **shh**: siehe *nkx2.2a* [12].

[5] **dlx2a**: Ähnlich wie *arx* ist *dlx2a* in ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalons, im ventralen Thalamus und Hypothalamus exprimiert. Die vom ventralen Thalamus in den Hypothalamus ziehende Domäne markiert Prosomer 4: Hier befindet sich der einzige beide Signale aufweisende Bereich (d4). Außerdem markiert *dlx2a*-Expression im ventralen Thalamus die ventrale Grenze der Alarplatte. Somit kann die ventromedial liegende GFP-Domäne des posterioren Tuberculum im Hypothalamus als Abkömmling der Basalplatte betrachtet und Prosomer 5 (d5) zugeordnet werden (auch wegen der kaudalen Begrenzung durch Prosomer 6, welches durch *dbx1a* markiert ist). Darum müssen dorsal gelegene GFP-Signale alaren Ursprungs sein. Die dorsolateral und rostral von Prosomer 4 (d4) lokalisierte GFP-Domäne der preoptischen Region liegt dementsprechend in Prosomer 3 (d3), begrenzt in anteriorer Richtung durch Prosomer 2 (d2), welches durch *shh*-Expression (siehe [4]) gekennzeichnet ist.

[6] **eng2b**: Starke Expression ist im Mesencephalon zu sehen, die sich dorsalseits über das ganze Tectum erstreckt und sich im Isthmusbereich weiter ventral ausdehnt. Die *eng2b*-Domäne bildet hierbei die kaudale Begrenzung der GFP-positiven Domänen des Pretectums und Tegmentums. Ein sagittal verlaufender optischer Schnitt im Bereich der Mittellinie verdeutlicht die *eng2b*-Expression in der MHB (*midbrain hindbrain boundary* = Isthmusorganisator) und im Cerebellum (siehe eingefügtes Bild). Man beachte, dass die

Expression sich nicht in die Tiefe erstreckt, sondern superfiziell ausgeprägt und höchstens drei Zellschichten dick ist.

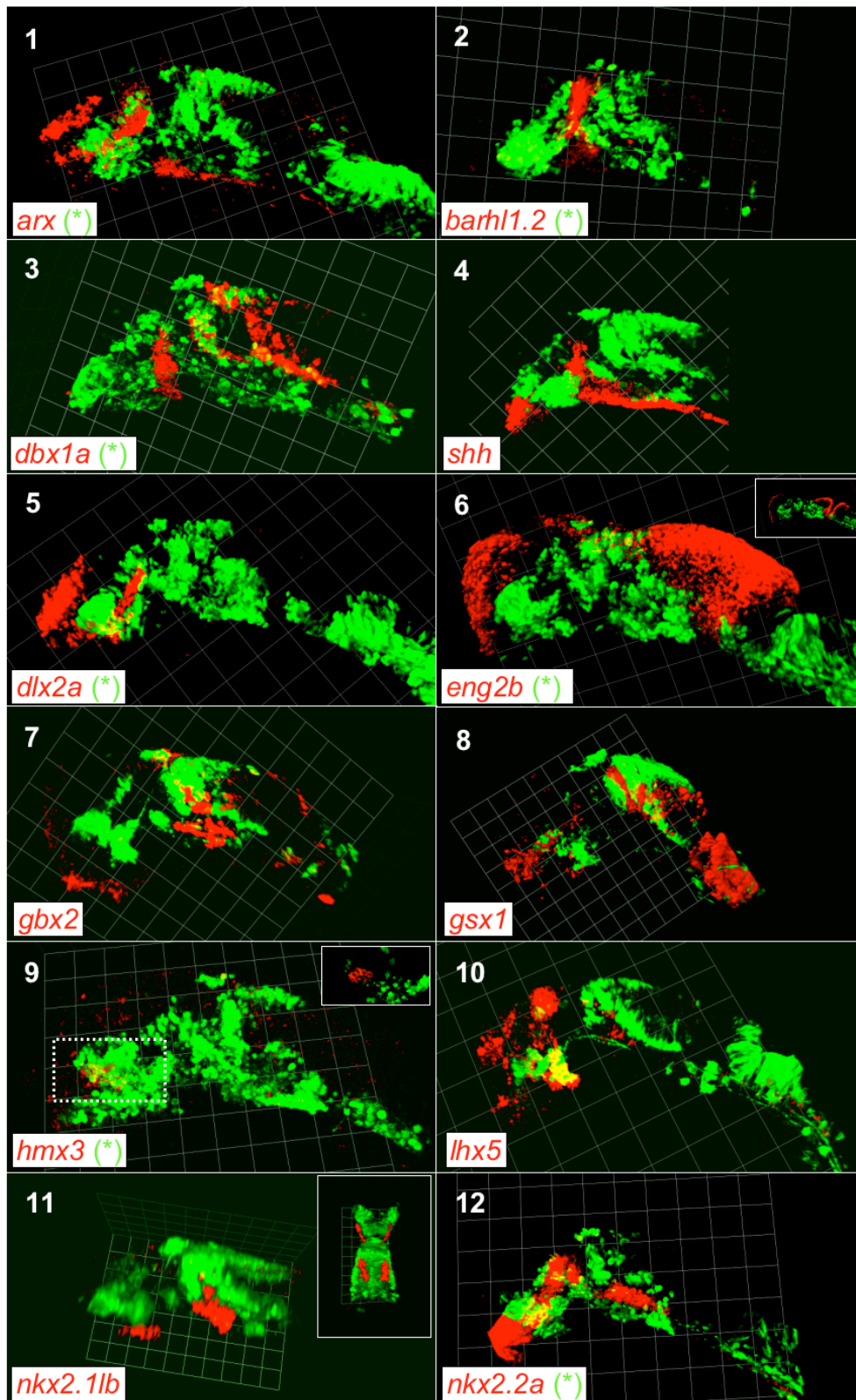


Abb. 16-1: Koexpression ausgewählter TF-Kandidaten (mRNA-Signale in rot) mit dem 3.1-Reporter (GFP-Protein-Signal in grün), Kolokalisierte Signale in gelb. Lateralansichten von Embryonen etwa 24 hpf (anterior = links). Erklärung teilweise eingefügter Bilder siehe Text. Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit.

[7] ***gbx2***: Die hier verwendete Ribosonde detektierte nicht das erwartete Expressionsmuster im Telencephalon und MHB, sondern tegmentale Domänen. Daher wurde auf eine weitere Beschreibung verzichtet.

[8] ***gsx1*** (*gsh1*): Die Expressionsdomäne von *gsx1* im ventralen Diencephalon kolokalisiert mit der GFP-Domäne der preoptischen Region. Hier überlappen beide Signale jedoch nicht, sondern erscheinen eher komplementär angeordnet. Im dorsalen Diencephalon füllt *gsx1* genau den GFP-negativen Raum aus zwischen den Domänen des dorsalen Thalamus und des Pretectums, sowie deren Verbindung zum dorsalen Tegmentum. Dieser Zwischenraum ist höchstens zwei Zellschichten dick.

[9] ***hmx3*** (*nkx5.1*): Ein etwa 20 Zellen umfassender Cluster im anteroventralen Thalamus medial der GFP-positiven preoptischen Region zeigt das *hmx3*-Signal. Dieser Zellverband zeigt jedoch nur im Übergangsbereich zur preoptischen Region wenige Zellen mit beiden Signalen; die meisten Zellen des Clusters sind GFP-frei (siehe Sagittalschnitt im eingefügten Bild).

[10] ***lhx5*** (*lim5*): Der GFP-Reporter ist im ventralen Teil des posterioren Tuberculum (Prosomer d5) mit *lhx5* koexprimiert. Dessen andere Expressionsdomänen im dorsalen Telencephalon, Hypothalamus, ventralen Thalamus und Tegmentum zeigen keine Kolokalisation. *lhx5* ist abhängig von *shh* und wurde daher eine Rolle bei Musterbildungsprozessen im Zebrafisch zugewiesen (Toyama et al., 1995). Außerdem wurden orthologe Lhx-Proteine mit Funktionen bei der prosomeren Organisation von Vertebratenhirnen und bei der terminalen Differenzierung von Neuronen in Verbindung gebracht (Bachy et al., 2001; Hobert et Westphal, 2000).

[11] ***nkx2.11b*** (*sax2*): Die paarigen *sax2*-Expressionsdomänen rostral der cephalen Flexur begrenzen ventrolateralseits die GFP-Domänen des posterioren Tuberculum (siehe Ventralansicht im eingefügten Bild, anterior = oben), kaudal sind sie in GFP-Signal-freie Bereiche des ventralen Tegmentums sowie dorsal davon zwischen dorsalem Thalamus und Pretectum in die Grenzregion zwischen Di- und Mesencephalon eingebettet. Mitglieder der Sax-Proteinfamilie besitzen neben der Homeobox- eine mit Engrailed verwandte Repressordomäne und spielen möglicherweise eine Rolle während der frühen Neurogenese (Bae et al., 2004).

[12] ***nkx2.2a***: Das Expressionsdomänen von *nkx2.2a* liegen dorsal direkt benachbart der *shh*-Domänen (Barth et Wilson 1995). *shh*-Expression (Abb. 16-4) markiert die Basalplatte und das Expressionsmuster von *nkx2.2a* die Grenzregion zwischen Basal- und Alarplatte (Hauptmann et al., 2002). Rostral der cephalen Flexur trennt das *nkx2.2a*-Signal die dorsal gelegene GFP-Domäne des ventralen Thalamus (inkl. preoptischer Region) vom posterioren Tuberculum, wobei nur im Übergangsbereich zwischen preoptischer Region und posteriorem Tuberculum eine Kolokalisation beider Signale erkennbar ist. Das *shh*-Expressionsmuster weist zwischen Hypothalamus und ZLI eine Lücke auf, die gerade vom GFP-Signal dieses Übergangsbereichs ausgefüllt wird. Die ZLI zeigt weder ein *nkx2.2a*- noch ein GFP-Signal (siehe auch *barhl1.2*). Kaudal davon verläuft das *nkx2.2a*-Signal zwischen posteriorem Tuberculum und dorsalem Thalamus und, nach Unterbrechung durch den dorsalen Thalamus, weiter zwischen den dorsalen und ventralen Streifen des Tegmentums. Somit können die ventral des *nkx2.2a*-Signal gelegenen GFP-positiven Bereiche als Abkömmlinge der Basalplatte betrachtet werden, also das gesamte posteriore Tuberculum und der ventrale Streifen des Tegmentums. Alle GFP-Domänen des 3.1-Reporters dorsal des *nkx2.2a*-Signals haben damit alaren Charakter.

[13] ***onecut1*** (*hnf6*): Alle GFP-Domänen kolokalisieren mit *onecut1*-Expressionsdomänen, diese werden jedoch eher von jenen eingeschlossen, d.h. die *onecut1*-Domänen zeigen eine begrenztere Ausdehnung als die GFP-Domänen, was gegen eine „Vormusterung“ (*pre-pattern*) von *neurog1*- resp. GFP-Bezirken durch diesen Faktor spricht. In einer Kaskade aufeinanderfolgender TF-Aktivierungen zur Zelltypspezifizierung steht *onecut1* daher wahrscheinlich hinter *neurog1*.

[14] ***otpa***: Die größte Expressionsdomäne in der preoptischen Region schließt sich anterolateral an die GFP-Domäne in diesem Bereich. Die Signale im posterioren Tuberculum werden hingegen ganz von den GFP-Signalen eingeschlossen. Ähnlich wie *onecut1* scheinen sich *otpa*- aus *neurog1*-Domänen heraus zu entwickeln als umgekehrt.

[15] ***otx2***: Das *otx2*-Signal ventromedial des Hypothalamus (Pfeilspitze) markiert die Bodenplatte (Hauptmann et al., 2002). Die rostrale der beiden posterior gelegenen Expressionsdomänen von *otx2* beginnt dorsal der Epiphyse und verläuft nach kurzer Unterbrechung in ventraler Richtung zwischen den GFP-positiven Domänen des ventralen und dorsalen Thalamus im Bereich der ZLI, wobei die Domäne anders als bei *shh* oder *barhl1.2*

direkt an beide Thalamushälften grenzt, also sowohl nach anterior und posterior als auch lateral ausgedehnter ist. Ventral wird die Domäne vom kaudal der cephalen Flexur liegenden Teil des posterioren Tuberculum begrenzt. Von da ab zieht ein schmaler Streifen relativ schwachen *otx2*-Signals zwischen GFP-positiven Domänen des posterioren Tuberculum

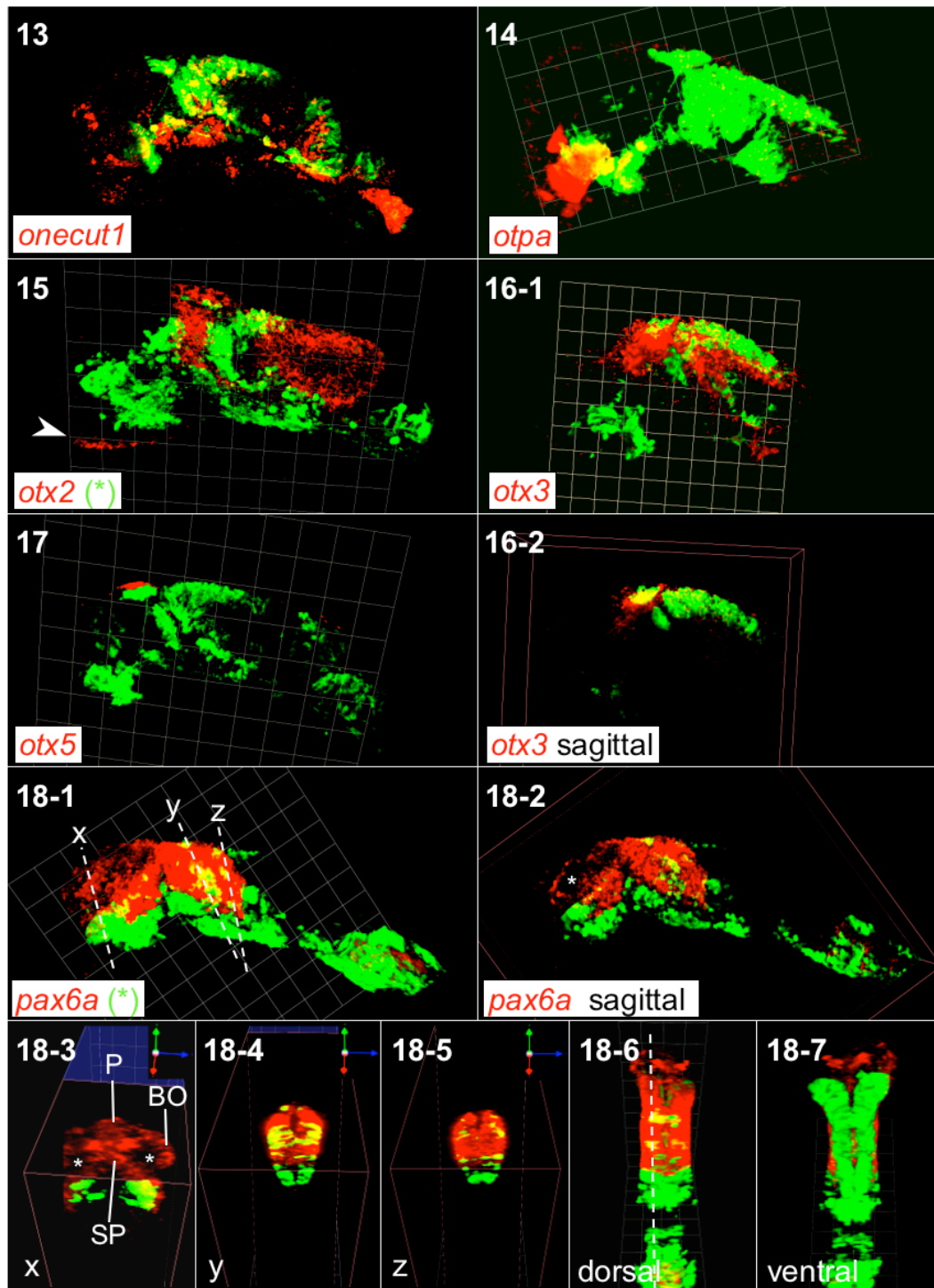


Abb. 16-2: Koexpression ausgewählter TF-Kandidaten (mRNA-Signale in rot) mit dem 3.1-Reporter (GFP-Protein-Signal in grün), Kolokalisierte Signale in gelb. Lateralansichten von Embryonen etwa 24 hpf (anterior = links). Ebenen der Transversalschnitte 18-3 bis 5 markiert in 18-1. P (Pallium), SP (Subpallium), BO (Bulbus olfactorius), Erklärung siehe Text. Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit.

und des dorsalen Thalamus sowie den ventro- und dorsolateralen Abschnitten des Tegmentums kaudalwärts bis zur zweiten Expressionsdomäne, welche das gesamte Tectum ausfüllt. Insgesamt können die Signale von *otx2* und GFP kaudal der cephalen Flexur bis inkl. Tectum als zueinander komplementär betrachtet werden, da keine signifikante Überlappung erkennbar ist. Nach Hauptmann et al. (2002) markiert *otx2* zusammen mit *pax6a* (siehe unten) und *dlx2a* den alaren Teil der Neuralröhre. Dies unterstützt die bereits mit der *nkx2.2a*-Analyse getroffene longitudinale Zuordnung der GFP-Domänen des 3.1-Reporters zu basalen und alaren Bereichen.

[16-1/-2] ***otx3***: Die durch *otx3*-Signale markierten Bereiche unterscheiden sich von denjenigen von *otx2* einerseits durch eine rostralwärts gerichtete Verschiebung beider Hauptdomänen, wobei die rostrale Expressionsdomäne weiter in den ventralen Thalamus reicht und die Verbindung zur kaudalen Domäne nicht ventral des dorsalen Thalamus verläuft, sondern dorsalseits durch das Pretectum. Die kaudale Expressionsdomäne von *otx3* markiert im Gegensatz zu *otx2* nicht das Tectum (ausgenommen einem Streifen ventral des GFP-positiven Pretectums), sondern die meisten Signale können weiter rostral im Grenzbereich zwischen Di- und Mesencephalon (vgl. *dbx1a*) detektiert werden. Kolokalisierte Signale von *otx3* und GFP finden sich nur in der Epiphyse, wie der Sagittalschnitt [16-2] zeigt.

[17] ***otx5***: Im Diencephalon ist *otx5* in Photorezeptoren der Retina – wenn die Augen als Abkömmlinge des Diencephalons betrachtet werden – und in der Epiphyse exprimiert. Allerdings kolokalisiert sein Signal nicht mit dem des Reporters, sondern liegt gerade dorsal darüber. Die Epiphyse besteht aus zwei Zelltypen: Photorezeptoren und nach ventral absteigende Axone projizierende Neurone, wobei die Photorezeptoren dorsal liegen und nur die projizierenden Neurone *pax6a* exprimieren (Masai et al., 1997). Das GFP-Signal in der Epiphyse (kolokalisiert mit *pax6a*-Signal, siehe nächster Abschnitt) repräsentiert daher projizierende Neurone, und das *otx5*-Signal Photorezeptoren.

[18-1 bis -7] ***pax6a***: *pax6a* markiert alare Abschnitte der Neuralröhre. Telencephalische Domänen mit starker Expression finden sich am Übergang von Pallium und Subpallium, schwächer ausgeprägt im Pallium, Subpallium und Bulbus olfactorius (siehe Schnittebene x, P, SP und BO in [18-1]). Eine Region ohne *pax6a*-Signal findet sich im Zwischenraum dieser Domänen, im lateralen Telencephalon (Stern in Sagittalschnitt [18-2] bzw.

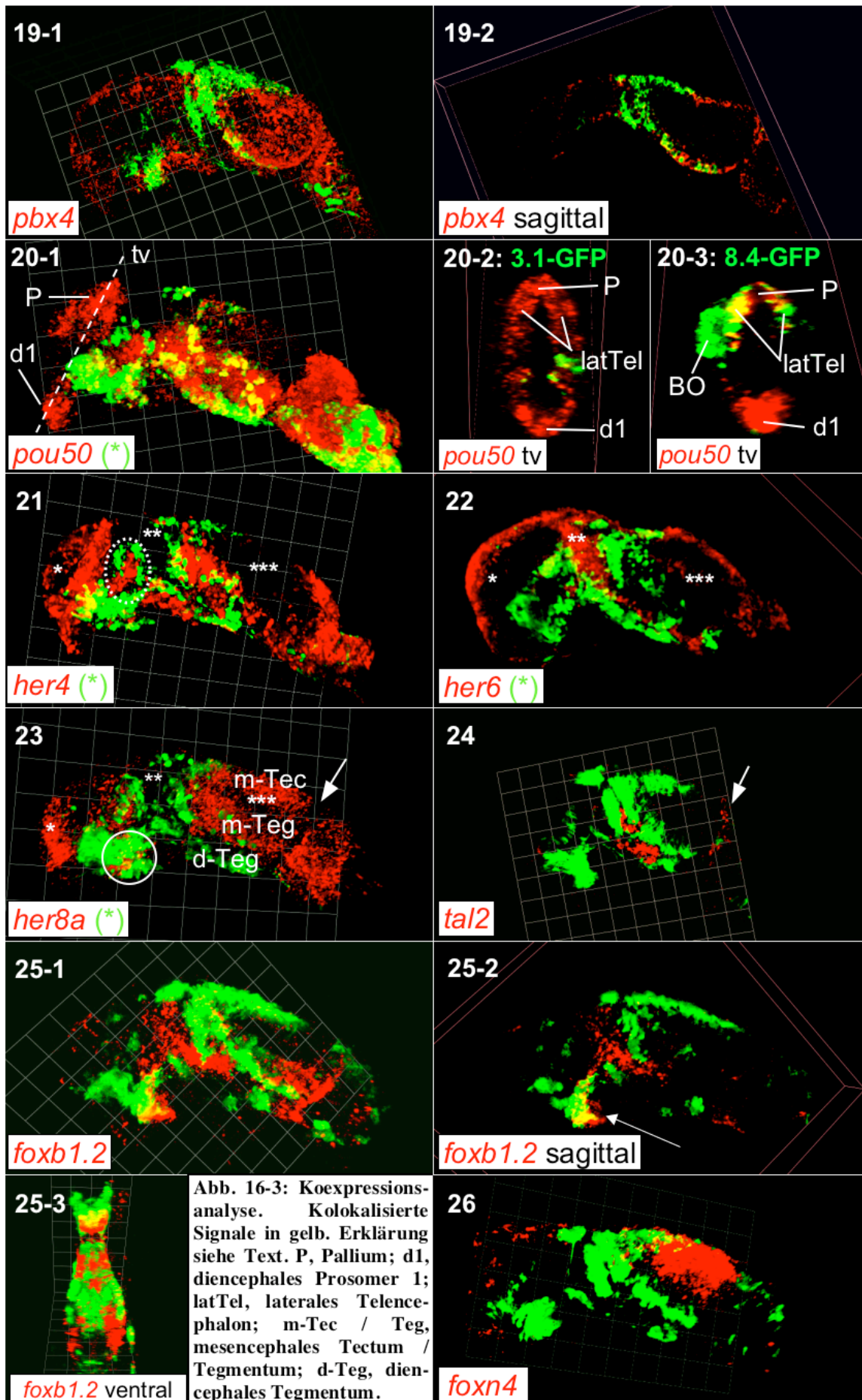
Transversalschnitt [18-3]). Mit GFP kolokalisierte Signale finden sich im ventralen Thalamus (exkl. preoptischer Region), dorsalen Thalamus inkl. Epiphyse (siehe Schnittebene y [18-4] und Dorsalansicht [18-6]) und Pretectum (siehe Schnittebene z [18-5]), wobei diese Regionen von starkem *pax6a*-Signal eingehüllt und durchdrungen werden, was für eine Rolle von *pax6a* als Vormusterungs-Faktor spricht und bisher veröffentlichte Ergebnisse unterstützt (Blader et al., 2004).

pax6a-Expression als Marker alarer Bereiche erlaubt die Zuordnung des GFP-positiven ventralen Thalamus exklusive der preoptischen Region zu Prosomer 5 (d5). Außerdem lässt sich die pretectale Domäne des GFP-Reporters durch Vergleich der Signale von *pax6a* und *dbx1a* in dieser Region Prosomer 8 (d8) zuordnen (Schnittebene z). *pax6a* markiert auch d6 (GFP-negativ) und d7 (dorsaler Thalamus, GFP-positiv, siehe Schnittebene y).

[19-1/-2] ***pbx4***: *pbx4*-Signale sind in allen embryonalen Vorderhirnabschnitten zu finden, wobei sie eher lateral superfizielle Bereiche der Neuralröhre markieren. Besonders stark ist das Signal im Mesencephalon ausgeprägt, wo es das Tectum und Tegmentum kennzeichnet. Der Sagittalschnitt zeigt den einzigen mit dem GFP-Signal kolokalisierten Bereich im Tegmentum (weiß eingekreist). Dorsal markiert *pbx4* den Grenzverlauf zwischen Pretectum und Tectum, verdeutlicht am scharfen Übergang zum GFP-Signal (Pfeil im Sagittalschnitt).

[20-1 bis -3] ***pou50***: Die Signale in den durch *pou50* markierten Prosomeren d3 und d5 (Hauptmann et Gerster, 2002) kolokalisieren mit den GFP-Signalen der preoptischen Region bzw. dem rostral der cephalen Flexur gelegenen Region des posterioren Tuberculum. Der Übergangsbereich beider Regionen zeigt kein *pou50*-Signal, daher erfolgt die Zuordnung zu Prosomer d4. Dies bestätigt die schon mit Hilfe von *dlx2a* getroffene Zuordnung.

Im Telencephalon markiert *pou50* sowohl das Pallium als auch eine Domäne, die vom Pallium ausgehend rostrolateral in Richtung der mit Prosomer d1 bezeichneten Domäne im ventralen Thalamus zieht und das laterale Telencephalon markiert: Dieser telencephalische Bezirk wird durch den 8.4-GFP-Reporter repräsentiert, dessen Signal mit dem *pou50*-Signal dort überlappt (latTel; vergleiche Transversalschnitte [tv] durch Embryo mit 3.1- bzw. 8.4-GFP-Transgen). Die telencephalische *pou50*-Domäne ist somit nicht im Bulbus olfactorius (BO) lokalisiert, wie von Hauptmann und Gerster (2002) behauptet, da in diesem vom 8.4-Reporter markierte Bereich keine *pou50*-Transkripte detektiert werden. Kaudal der cephalen Flexur kolokalisieren die Signale im dorsalen Thalamus, der Epiphyse, Pretectum, posterioren Tuberculum und Tegmentum.



[21] **her4**: Im Telencephalon finden sich *her4*-Transkripte im Pallium, lateralen Telencephalon und Bulbus olfactorius; der subpalliale Bereich dagegen zeigt wenig bis kein Signal (Stern in [21]). Im Diencephalon im Bereich von Prosomer d2 (posterior von d1, vgl. *pou50* [20]), mit GFP kolokalisiert nur in der posterior angrenzenden preoptischen Region (d3). Weiterhin im ventralen Thalamus medial der dortigen GFP-Signale und diesen so in eine anteriore und posteriore Hälfte teilend (siehe punktierter Kreis in [21]), sowie im posterioren Tuberculum, dieses rostral der cephalen Flexur in eine größere dorsale und kleinere ventrale Domäne aufteilend (siehe auch *her8a* [23]).

Kaudal der cephalen Flexur liegen *her4*-positive Domänen ventromedial des posterioren Tuberculums sowie in der Epiphyse, zwischen dem GFP-positiven dorsalen Thalamus und Pretectum an der Grenze zwischen Di- und Mesencephalon und ventral zwischen alarem bzw. basalem Tegmentum. Schwache *her4*-Signale sind auch im Pretectum selbst zu erkennen. Insgesamt sind alle diencephalen Signale mit Ausnahme in der preoptischen Region komplementär zu den GFP-Domänen arrangiert.

her4 agiert als Effektor des Notch-Signalwegs und unterdrückt die Expression von *neurogl1* (Takke et al., 1999). Die zueinander komplementären Expressionsmuster unterstützen diese Aussage. Determinierte, also *neurogl1*- bzw. GFP- positive Bereiche scheinen sich von noch nicht determinierten, *her4*-positiven Bereichen im Verlauf der Entwicklung abzusondern. Im Gegensatz zu einem „Salz-und-Pfeffer-Muster“ sich abwechselnder einzelner *her4*- oder *neurogl1*-positiver Zellen im späten Neuralplattenstadium (Stigloher et al., 2008), grenzen in der frühen Neuralröhre beide Signale in Zellverbänden domänenartig aneinander.

[22] **her6** und [23] **her8a**: Die Signale dieser beiden bHLH-Familienmitglieder komplettieren die GFP-freien Bezirke, die nicht von *her4* ausgefüllt sind: *her6* vor allem im Bereich der ZLI (Doppelsterne in [22/23]), *her8a* im Subpallium und im Mesencephalon (Sterne bzw. Dreifachsterne).

her8a markiert im Mesencephalon das dorsal des Ventrikels gelegene Tectum (m-Tec) und das ventral gelegene Tegmentum (m-Teg). Somit ist das Tegmentum in einen alar-mesencephalen und in einen basal-diencephalen Bereich (kein *her8a*-Signal, d-Teg) unterteilt. Der Bereich der MHB (Pfeil) zeigt weder GFP- noch *her8a*-Signal. Wie schon *her4* unterteilt auch *her8a* das posteriore Tuberculum in einen dorsalen und ventralen Bezirk (weiß eingekreist in [23]).

[24] ***tal2***: Auch dieser bHLH-TF zeigt zu GFP komplementäre Signale: zwischen di- und mesencephalem Tegmentum und dorsalwärts benachbart den dorsalen Thalamus vom Pretectum und mesencephalen Tegmentum trennend. Schwache *tal2*-Expression konnte darüberhinaus (und im Gegensatz zu Pinheiro et al., 2004) in der MHB detektiert werden (Pfeil).

[25-1 bis -3] ***foxb1.2*** (*mariposa*): Im Diencephalon kolokalisieren *foxb1.2*- und GFP-Signale nur in der rostral der cephalen Flexur liegenden Domäne des posterioren Tuberculums (siehe Pfeil in Sagittalschnitt [25-2]). Von dieser Domäne ausgehend ziehen drei Streifen schwacher *foxb1.2*-Expression, einer medial und zwei lateral gelegene, im ventralen Thalamus dorsalwärts bis unterhalb die Epiphyse und füllen den Bereich zwischen ventralem und dorsalem Thalamus. Die Streifen ziehen zwischen posteriorem Tuberculum und dorsalem Thalamus sowie Pretectum kaudalwärts bis zum anterioren Ende des mesencephalen Tegmentums, wobei der medial verlaufende Streifen am weitesten vordringt. Im mesencephalen Abschnitt werden *foxb1.2*-Signale am posterioren Ende des Tegmentums sowie im Bereich der MHB detektiert, wobei die Signale lateral angeordnet sind (siehe Ventralansicht [25-3]).

[26] ***foxn4***: Die für *foxn4* beschriebene telencephale Expressionsdomäne im Bulbus olfactorius ist kaum zu erkennen, dafür können Transkripte im Tectum eindeutig nachgewiesen und eine signifikante Kolokalisation mit GFP-Signalen des 3.1-Reporterns ausgeschlossen werden.

[27] ***gata2b***: Transkripte dieses TFs werden sowohl im Telencephalon, im ventralen Rhombencephalon, als auch im Mesencephalon detektiert, wo die Signale mit der GFP-positiven Domäne des mesencephalen Tegmentums überlappen.

[28] ***sp9***: Im Tel- und Diencephalon ähneln die *sp9*-Expressionsdomänen sehr stark denen von *arx* und *dlx2a*. Transkripte werden im ventralen Telencephalon sowie zwischen ventralem Thalamus und posteriorem Tuberculum gefunden. Darüberhinaus und im Gegensatz zu *arx* und *dlx2a* finden sich schwache Signale im Tectum sowie etwas stärker im dorsalen Bereich des Cerebellums (Stern) und nicht in der MHB (Pfeil), wie von Kawakami et al. (2004) beschrieben; dieser direkt anterior gelegene Bereich ist *sp9*-negativ.

[29-1/-2] *lef1*: Dieser TF gilt als Effektor des *wnt*-Signalwegs (Eastman et Grosschedl, 1999). *lef1*-Transkripte werden ähnlich wie *wnt1* (Hauptmann et Gerster, 2002) in der dorsalen Firstplatte detektiert. Diese Aussage stützt sich darauf, dass die GFP-positive Epiphyse als Ausstülpung der Alarplatte im Verlauf der Entwicklung dorsal der Firstplatte

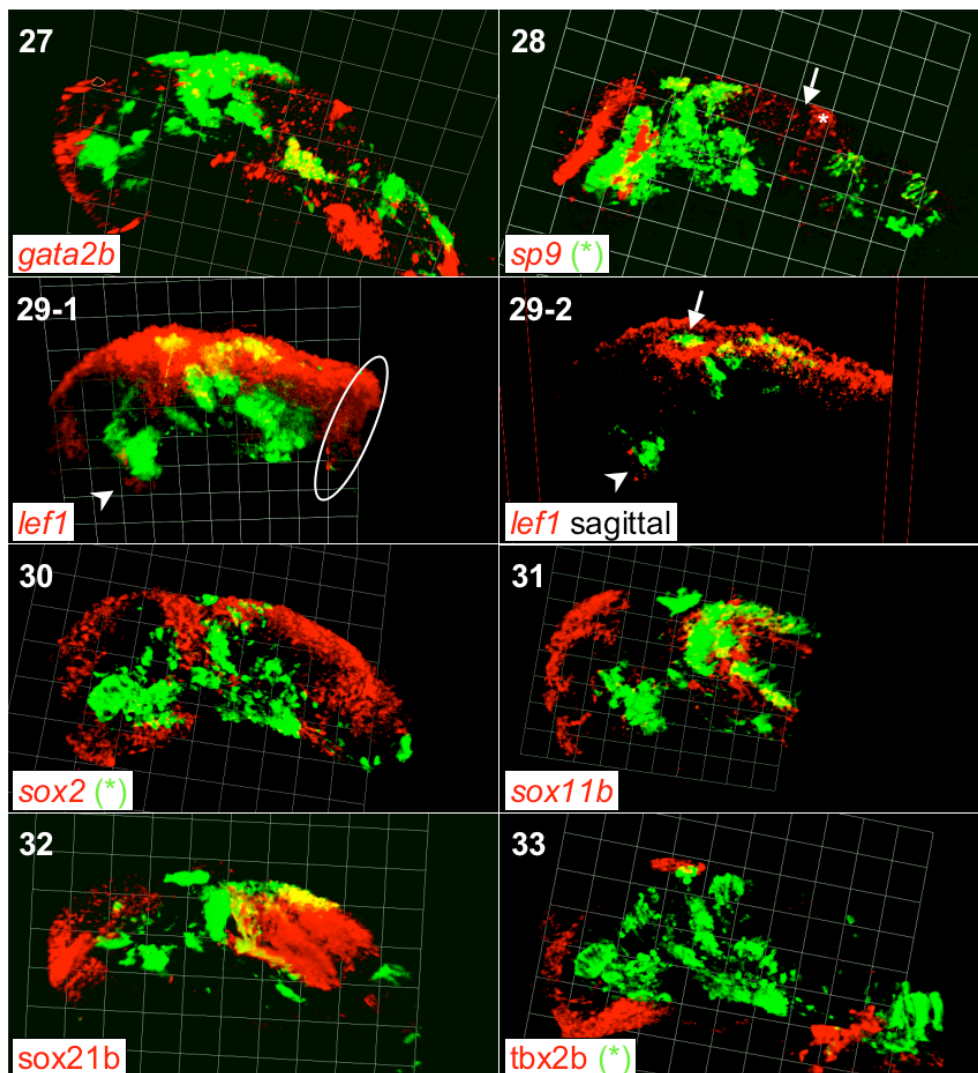


Abb. 16-4: Koexpressionsanalyse. Kolokalisierte Signale in gelb. Erklärung siehe Text. Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit. Pfeil in [28]: MHB; Stern in [28]: Cerebellum; Kreis in [29-1]: MHB; Pfeil in [29-2]: Epiphyse; Pfeilspitze in [29-1/2] markiert Hypothalamusregion.

zu liegen kommt und nicht mit *lef1*-Signalen kolokalisiert (siehe Pfeil im Sagittalschnitt [29-2]). Benachbarte Regionen des alaren Epithalamus (z.B. das Pretectum) werden dagegen vom *lef1*-Signal bedeckt. Ventral davon gelegene *lef1*-Signale kolokollieren mit dem GFP-Signal des alaren Pretectums und dringen auch aus tieferen Schichten der Alarplatte in der Region zwischen ventralem und dorsalem Thalamus sowie der MHB (weiß eingekreist in [29-1]). Daher markiert *lef1* sowohl die Firstplatte als auch angrenzende alare Aspekte der Neuralröhre. Im Hypothalamus ist *lef1* außerdem gerade anterior des GFP-positiven

posterioren Tuberculum exprimiert und markiert hiermit einen sehr begrenzten Bezirk der Basalplatte (Pfeilspitzen in [29-1/-2]).

[30] *sox2*, [31] *sox11b* und [32] *sox21b*: Sox-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei Prozessen zur Zelltypspezifizierung und neuralen Induktion (Mizuseki et al., 1998a+b), und aufgrund ihrer komplexen Expressionsmuster kommen sie als erste Antwortgeber in Signaltransduktionskaskaden in Betracht (Pevny und Lovell-Badge, 1997). *sox2*-Transkripte sind in ähnlich eng benachbarten Bereichen wie *lef1*-Transkripte anzutreffen, vergleichbar mit der Nachbarschaft der Expressionsdomänen von *shh* und *nkx2.2a*, dessen Expression vom SHH-Signal abhängig ist. Diese Beobachtung rückt TFs der Sox-Familie in die Nähe des WNT-Signalwegs. Desweiteren fällt auf, dass sich die Expressionsmuster der verschiedenen Sox-Familienmitglieder komplementär zueinander darstellen, wie das schon für Mitglieder der Her-Familie gezeigt worden ist [21-23]. Beispielsweise ist *sox2* in dorsalen Teilen des Telencephalons und des Mesencephalons inklusive MHB exprimiert, *sox21b* gerade in den ventralen Teilen dieser Hirnregionen exklusive der MHB; und *sox11b* füllt noch die anterior des dorsalen Thalamus sowie posterior und ventral des Pretectums angrenzenden Lücken, die durch *sox2*- bzw. *sox21b*-Expression nicht abgedeckt sind. Dasselbe Bild ergibt sich auch bei Betrachtung paraloger Mitglieder: *sox21a* ist ähnlich wie *sox2* im dorsalen Telencephalon und der MHB exprimiert (nicht gezeigt, siehe Rimini et al., 1999) und ergänzt *sox21b*.

Keines der hier untersuchten *sox*-Mitglieder weist eine signifikante Koexpression mit dem GFP-Reporter auf, die Muster erscheinen vielmehr zueinander komplementär.

[33] *tbx2b*: Im Diencephalon ist *tbx2b* in der Epiphyse exprimiert, und *tbx2b*-Transkripte finden sich dort auch in GFP-positiven Zellen. Andere *tbx2b*-Expressionsdomänen sind vor allem ventromedial des Hypothalamus sowie ventrokaudal des Tegmentums in wahrscheinlich mesodermalen Bereichen lokalisiert. Daneben finden sich schwache Signale im ventromedialen Telencephalon.

3.2.5 Zusammenfassung der Koexpressionsanalyse

Die vom 3.1-GFP-Reporter rekapitulierten *neurogl*-Expressionsdomänen im Diencephalon des einen Tag alten Zebrafischembryos können durch Vergleich mit Expressionsdomänen bekannter TFs eindeutig sowohl longitudinalen (Alar- und Basalplatte) als auch transversalen Unterteilungen (Prosomere) des Neuralrohrs zugeordnet werden, entsprechend dem Schema nach Hauptmann und Gerster (2002) wie in Abb. 17 dargestellt.

Die Zuordnung GFP-positiver Bezirke ausschließlich zu Basal- und Alarplatte beruht einerseits auf der Tatsache, dass keine Kolokalisation von GFP-Signalen mit Signalen der die Bodenplatte markierenden TFs (*otx2* rostral bzw. *arx* kaudal der cephalen Flexur) beobachtet werden konnte. Andererseits ist keine klare Kolokalisation von GFP-Signal und dem die Firstplatte markierenden TF *lef1* zu erkennen; besonders im Bereich der Epiphysenanlage, welche alaren Ursprungs ist und im Verlauf der Entwicklung dorsal der Firstplatte zu liegen kommt, sind *lef1*-Transkripte nicht nachweisbar.

Alle dorsal des *nkx2.2a*-Signals gelegenen GFP-Domänen sind alaren, alle ventral davon gelegenen basalen Ursprungs. Von anterior nach posterior gehören demnach die preoptische Region, der ventrale und dorsale Thalamus mit Epiphysenanlage, das Pretectum sowie das mesencephale Tegmentum zur Alarplatte; diese Domänen liegen außerdem innerhalb der Expressionsdomänen der die Alarplatte markierenden TFs *dlx2a*, *pax6a* und *otx2*. Zur Basalplatte gehören alle ventral gelegenen GFP-Domänen des posterioren Tuberculums und des diencephalen Tegmentums.

Die prosomere Organisation der GFP-Domänen stellt sich wie folgt dar (Abb. 17-C):

Die preoptische Region liegt in Prosomer d3 (siehe *dlx2a* und *pou50*), der ventrale Thalamus und das rostral der cephalen Flexur gelegene posteriore Tuberculum in d5 (siehe *pax6a* und *pou50*). Der Übergangsbereich zwischen preoptischer Region und posteriorem Tuberculum und damit zwischen Alar- und Bodenplatte liegt in d4 (siehe *dlx2a*, *nkx2.2a*). Prosomer d6 ist GFP-frei (siehe *dbx1a*), der Bereich der ZLI ebenfalls (siehe *barhl1.2*). Der kaudal angrenzende dorsale Thalamus inkl. Epiphysenanlage (Alarplatte) sowie der kaudal der cephalen Flexur gelegene Teil des posterioren Tuberculums (Basalplatte) konnte Prosomer d7 zugeordnet werden, und das Pretectum liegt in Prosomer d8 (siehe *dbx1a* und *pax6a*), beide klar getrennt durch einen *gsx1*-positiven Bereich. Der am weitesten kaudal gelegene Abschnitt des Diencephalons, das ventrale Tegmentum, welches im Verlauf der Neurulation

unter dem Mesencephalon zu liegen kommt (Staudt und Houart, 2007), bildet die Verlängerung des basalen d7 und gehört damit zu d8. Der dorsal von diesem gelegene tegmentale Bereich (ventral des mesencephalen Ventrikels) ist Teil des Mesencephalons, sein GFP-Signal kolokalisiert mit Mesencephalonmarkern (z.B. *her8a* und *pou50*).

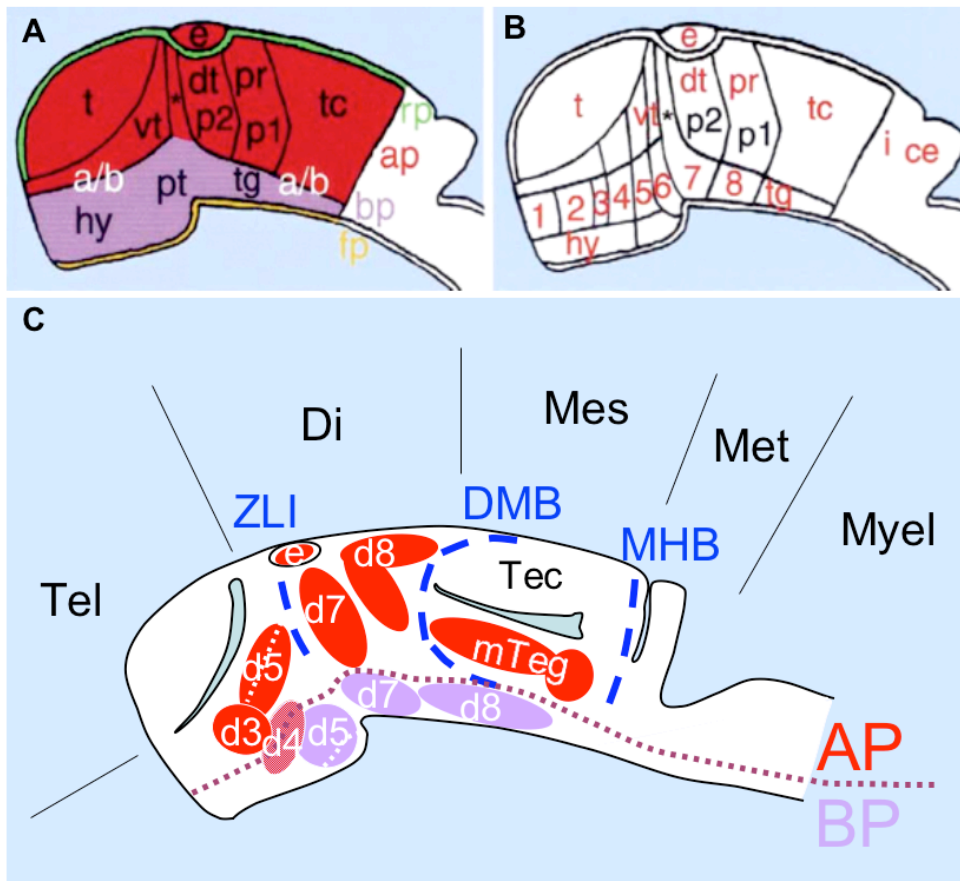


Abb. 17: Schemata zur longitudinalen (A) und transversalen Unterteilung (B) des Zebrafisch-Vorderhirns 24 hpf (nach Hauptmann und Gerster, 2002; verändert; Ziffern 1-8 bezeichnen diencephale Prosomere d1-d8). Zuordnung von GFP-Expressionsdomänen des 3.1-Reporters zu diesem Modell (C). d1-8 = diencephale Prosomere 1-8 entsprechend Schema in (B); AP, Alarplatte; BP, Basalplatte; violett punktiert markiert Grenzverlauf; ZLI, Zona limitans intrathalamica; DMB, Grenze Di-/Mesencephalon (diencephalon midbrain boundary); MHB, Grenze Mes-/Metencephalon (midbrain hindbrain boundary); Tec, Tectum; mTeg, mesencephalisches Tegmentum; diencephalisches Tegmentum = d8. Lateralansichten (anterior = links), Lücken zwischen Tel- und Diencephalon sowie zwischen Tectum und Tegmentum deuten Ventrikel an.

Alle GFP-Domänen sind klar voneinander durch Domänen verschiedener TFs abgrenzbar (*gsx1*-Domäne beispielsweise trennt den dorsalen Thalamus vom Pretectum, Abb. 16-[8]) oder werden sogar noch von diesen in Subdomänen unterteilt, so der ventrale Thalamus (d5) durch *her4* und das posteriore Tuberculum (d4) durch *her4* und *her8a* (Abb. 16-[21] und -[23]).

3.3 Mutationsanalyse der LATE-Sequenz (*In-vivo*-Analyse)

Ein Vergleich der Expressionsmuster von GFP-Reportern mit unveränderter bzw. gezielt mutierter LATE-Sequenz sollte aufdecken, welche Sequenzabschnitte für die regionspezifische Reporteraktivität im Diencephalon essentiell sind. Hierfür wurden Reporterkonstrukte mit seriellen, nicht-überlappenden Deletionen von jeweils 40 bp in LATE hergestellt (Abb. 18-D) und damit stabil transgene Zebrafischlinien erzeugt, welche die resultierenden GFP-Muster vollständig exprimieren. Aufgrund der Komplexität des GFP-Musters erschien eine auf transienter und damit nur mosaikartiger GFP-Expression beruhende Analyse nicht hinreichend aussagekräftig. Es wurde erwartet, dass die Abwesenheit *cis*-regulatorischer Sequenzabschnitte die regionsspezifische Expression des GFP-Transgens verändert und somit Hinweise für die Beteiligung von TFs liefert, welche an die fehlenden Sequenzen normalerweise binden. Die Mutationsanalyse erfolgte wie die Koexpressionsanalyse an fixierten Zebrafischembryonen im Prim-5-Stadium (24 ± 1 hpf) durch GFP-Antikörperfärbung. Die hohe Immunreaktivität des verwendeten Antikörpers ermöglichte einerseits eine maximale Signaldetektion und andererseits die detaillierte Untersuchung der Expressionsmuster mittels 3D-Rekonstruktion (siehe auch Videodateien auf DVD).

3.3.1 Mutationsanalyse im 3.1-Kontext

Für die Deletionsserie wurde der 3.1-Reporter verwendet, der die 3,1 kbp stromaufwärts des *neurog1*-Startkodons gelegene genregulatorische Sequenz mit endogenem Promotor und LATE-Enhancer enthält. Die Erzeugung transgener Linien erfolgte nach der Meganuklease-Methode (Thermes et al., 2002).

3.3.1.1 Vergleich der Expressionsmuster zwischen Ausgangskonstrukt pBL3.1 und modifiziertem Referenz-LATE-Reporter

Zunächst musste das Ausgangskonstrukt pBL3.1*ngn1(mouseLATE)* durch Austausch der Maus-LATE- mit der Zebrafisch-LATE-Sequenz zum Referenz-LATE-Reporter modifiziert werden (siehe 2.2.1.17). Dessen Expressionsmuster sollte mit dem Muster des nicht-modifizierten Reporters pBL3.1 (Blader et al., 2004) hinreichend konsistent sein, falls die LATE flankierenden Sequenzen auf die Reporteraktivität keinen Einfluss haben.

Wie aus Abb. 18-A bis -B3 ersichtlich, zeigen zwei der drei Muster aus unabhängigen Linien hinsichtlich Lokalisation und Anordnung der einzelnen Domänen ausreichende Ähnlichkeit, wobei die Referenz-Linie 1 am besten mit pBL3.1 übereinstimmt (vergleiche A und B1): Linie 1 weist einerseits zwar in der räumlichen Ausdehnung des Pretectum-Signals Defizite auf, dennoch ist die Domäne vorhanden; andererseits erscheint der ventrale Thalamus und das posteriore Tuberculum überrepräsentiert. Nicht so die Linien 2 und 3: Beiden fehlt GFP-Expression in der Epiphyse, auch erscheinen der ventrale Thalamus und das Pretectum stark reduziert, wobei einzelne Zellen dennoch GFP-positiv sind (B2, B3).

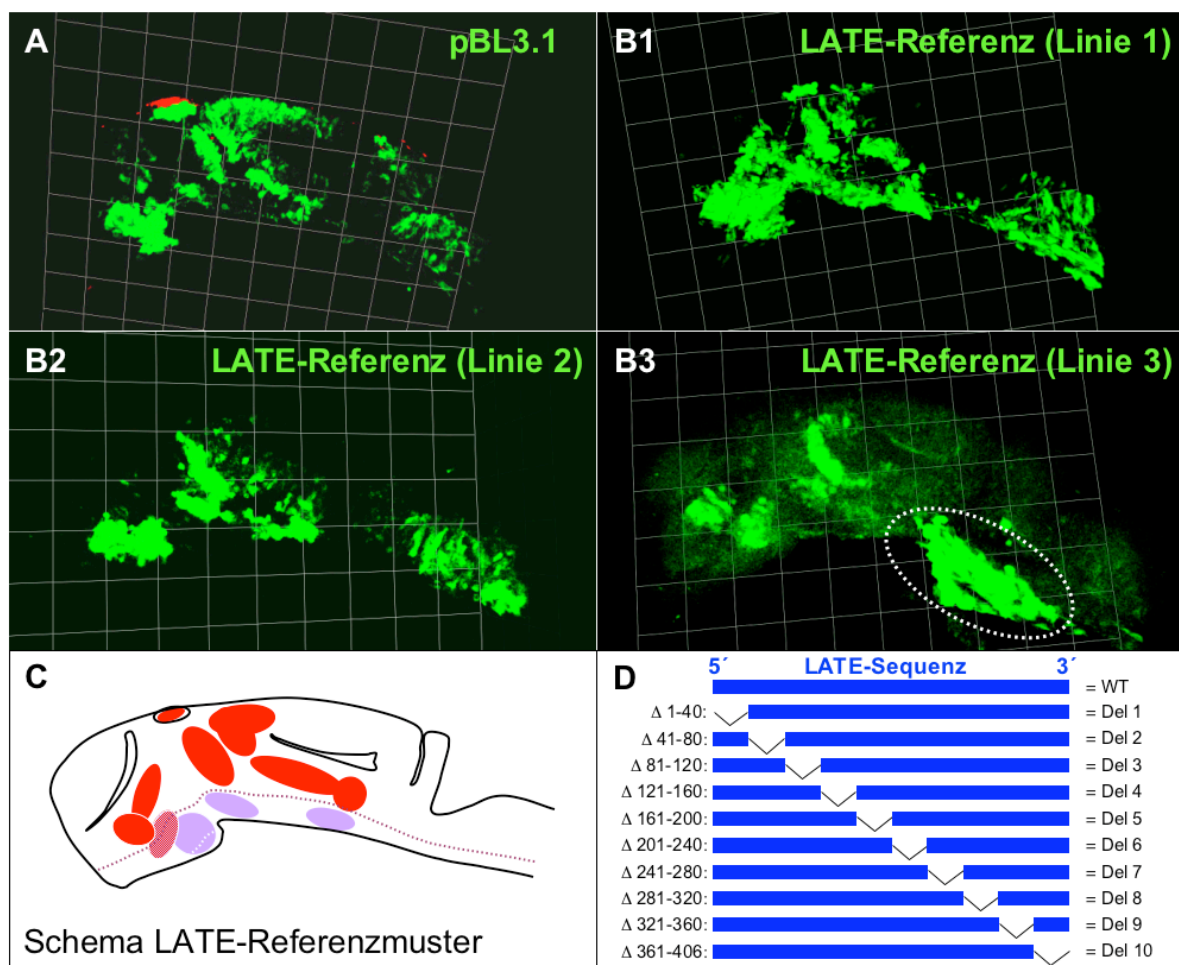


Abb. 18: Mutationsanalyse. Vergleich der Expressionsmuster zwischen Ausgangskonstrukt pBL3.1 (A) und modifiziertem Referenz-LATE-Reporter (B1-3): Darstellung dreier unabhängiger Linien (ektopisches GFP-Signal außerhalb der Neuralröhre punktiert eingekreist in (B3)), Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit). (C): Schemazeichnung des Referenzmusters entsprechend Abb. XX-C. (D): Schematische Darstellung der LATE-Deletionsserie im Reporterkonstrukt: undeletiert = Wildtyp (WT), darin vom 5'- zum 3'-Ende jeweils 40 bp lange Fragmente nicht überlappend entfernt (Del 1-10).

Linie 3 zeigt darüberhinaus ektopische GFP-Expression: Ein relativ starkes Hintergrundsignal, außerdem ist ein Zellverband am Übergang von Neuralröhre und Dottersack stark

GFP-positiv (Pfeil in B3). Es wurden noch zwei weitere Linien isoliert, diese weisen jedoch sehr starke ektopische GFP-Signale auf und die spezifischen Expressionsdomänen sind kaum erkennbar (nicht gezeigt).

Insgesamt zeigt Linie 1 weder neue noch fehlende diencephale Domänen und erfüllt daher das Kriterium hinreichender Konsistenz, Linien 2 und 3 nur eingeschränkt. Linie 1 wurde ebenfalls für die Koexpressionsanalyse verwendet (siehe 3.2.4). Da das Expressionsmuster des modifizierten Referenzreporters zumindest einer Linie nur geringfügig vom Muster des Ausgangskonstrukts abweicht, kann davon ausgegangen werden, dass die den LATE-Enhancer flankierenden Sequenzen keinen Einfluss auf die Reporteraktivität ausüben.

3.3.1.2 Vergleich der Expressionsmuster von Referenz- und mutierten LATE-Reportern

Die eigentliche Untersuchung hinsichtlich einer Beteiligung von Unterabschnitten der LATE-Sequenz an der Regulation diencephaler Reporteraktivität erfolgte anhand einer Gegenüberstellung des Referenzmusters (undeletierte LATE-Sequenz = Wildtyp, Schema in Abb. 18-C) mit den jeweiligen Mustern der LATE-Deletionsserie, dargestellt in Abb. 19-1 bis -4 (bzw. [1/1'] bis [19/19']). Im Folgenden werden die Muster der erhaltenen transgenen Linien nacheinander abgehandelt. Zur besseren Übersicht sind daneben Schemazeichnungen beigefügt, worin ektopische Domänen in grün und stark reduzierte kariert repräsentiert sind. Die Beschreibung der Muster beschränkt sich auf tel- und diencephale Domänen, kaudal gelegene bleiben unberücksichtigt.

Del 1 (Δ 1-40, [1/1'] und [2/2']): Es wurden zwei unabhängige Linien erhalten, die in der Expression des GFP-Transgens weitgehende Inkonsistenz aufweisen. Linie A zeigt bis auf die Domäne des dorsalen Thalamus eine starke Reduktion des GFP-Signals (preoptische Region und Prethalamus, kariert dargestellt in [1']), sowie ektopische GFP-Expression im dorsalen Telencephalon (grün in [1']). Signale in anderen Domänen, besonders diejenigen der Basalplatte, fehlen. Dagegen zeigt Linie B das vertraute Muster des nicht mutierten Referenzkonstrukts: Alle mit GFP markierten proneuralen Domänen sind vorhanden. Wie schon beim Vergleich der Muster zwischen Ausgangs- und Referenzkonstrukt (siehe vorheriger Abschnitt) scheint mit der Erzeugung wenigstens einer Linie ohne bedeutende Veränderung betreffend Lokalisation oder Anordnung der Domänen eine Beteiligung der ersten 40 bp von LATE an der Regulation des 3.1-Reporters unwahrscheinlich.

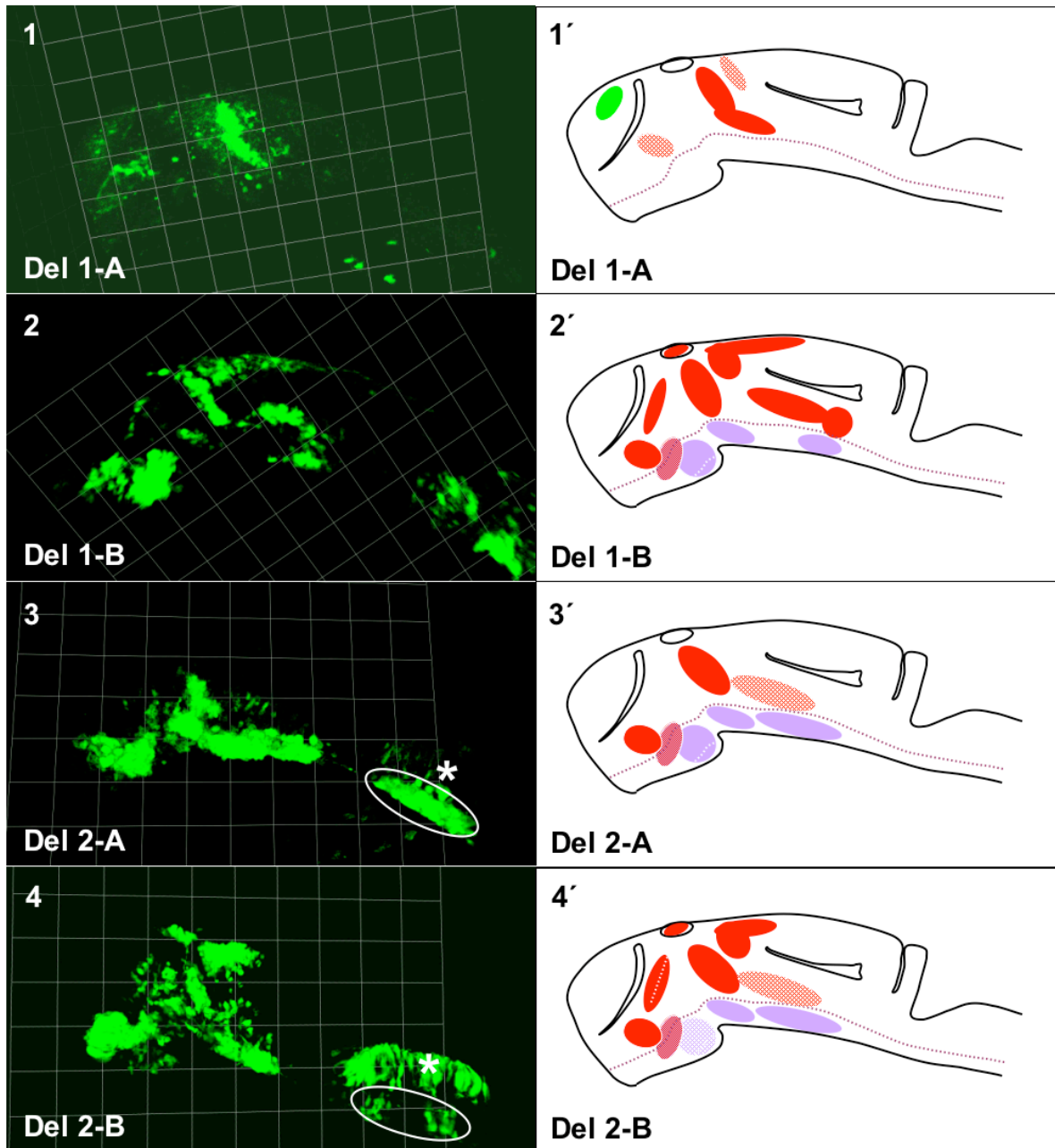


Abb. 19-1: LATE-Mutationsanalyse im 3.1-Kontext. Transgene Linien der Deletionen 1 und 2. [1-4]: Darstellung von Lateralansichten der Expressionsmuster aus 3D-Rekonstruktionen, anterior = links, Signale aus GFP-Antikörperfärbung in grün, Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit. [1'-4']: Schemazeichnungen: alare Domänen in rot, basale in blau-violett, reduzierte schraffiert, ektopische in grün dargestellt. Stern bzw. eingekreist in [3] und [4]: dorsales bzw. ventrales Rhombencephalon (Erklärung siehe Text).

Del 2 (Δ 41-80, [3/3'] und [4/4']): Zwei Linien wurden erzeugt. Beide zeigen übereinstimmend eine verminderte GFP-Expression im alaren Tegmentum (kariert in [3'] und 4'). Diese Reduktion erscheint jedoch nicht hinreichend signifikant, weil auch die Referenzlinien 2 und 3 in diesem Bereich relativ schwache Expression zeigen (siehe Abb. 18-B2/3).

Inkonsistenzen sind ebenfalls erkennbar: Linie A fehlt sowohl Expression im ventralen Thalamus als auch in epithalamischen Domänen (Epiphyse und Pretectum), und in basalen Regionen (posteriores Tuberculum und Tegmentum) kann mehr GFP-Signal detektiert werden als bei Linie B. Dort ist das Signal im posterioren Tuberculum rostrale der cephalen Flexur bedeutend schwächer. Nicht unerwähnt bleiben soll die Verlagerung des GFP-Signals im Rhombencephalon aus dem alaren Bereich (Stern in [3] und [4]) bei Linie B in den basalen Bereich (eingekreist in [3] und [4]) bei Linie A. Die festgestellten Variationen der beiden Linien untereinander einerseits und die Übereinstimmung von Linie B mit den Referenzlinien andererseits lassen daher nicht den Schluss zu, dass diese deletierte LATE-Teilsequenz für die Reporteraktivität essentiell ist.

Del 3 (Δ 81-120, [5/5'] und [6/6']): Die Situation ist ähnlich wie bei Del 1. Linie A zeigt ein stark reduziertes Muster, und Linie B hinreichende Konsistenz mit dem Referenzmuster. Darum ist auch hier nicht davon auszugehen, dass der fehlende LATE-Abschnitt bedeutsam ist.

Del 4 (Δ 121-160): Mit der zuerst angewendeten Meganuklease-Methode konnte nur eine transgene Linie erzeugt werden. Es war allerdings nicht möglich, die Linie zu etablieren, da die wenigen GFP-positiven Nachkommen des einen Gründerweibchens nie das Adultstadium erreichten, und der Gründer schließlich keine Nachkommen mehr produzierte.

Del 5 (Δ 161-200, [7-9] bzw. [7'-9']): Von drei erhaltenen Linien weist zwar eine wieder starke Reduktion und Hintergrundsignale auf (Del 5-A), aber zwei stimmen in ihren Abweichungen vom Referenzmuster fast völlig überein (Del 5-B und -C): Das Signal im ventralen Thalamus erstreckt sich weiter nach anterior und endet nicht schon auf Höhe der preoptischen Region, sondern reicht fast bis ans rostrale Ende der Neuralröhre; die GFP-Expression im dorsalen Thalamus ist stark reduziert und im Epithalamus (Epiphyse und Pretectum) kaum nachweisbar. Diese Beobachtung ist ein starker Hinweis darauf, dass die deletierten 40 bp für eine positive Regulation des 3.1-Reporters, d.h. dessen Aktivierung, im dorsalen Diencephalon wesentlich sind. LATE-Fragment 5 enthält die vorhergesagte Pax6-Bindestelle. Dieses Ergebnis bestätigt also die Befunde von Blader et al. (2004) und somit die Eignung des hier verfolgten methodischen Ansatzes zur *in-vivo*-Detektion funktionaler Enhancerabschnitte.

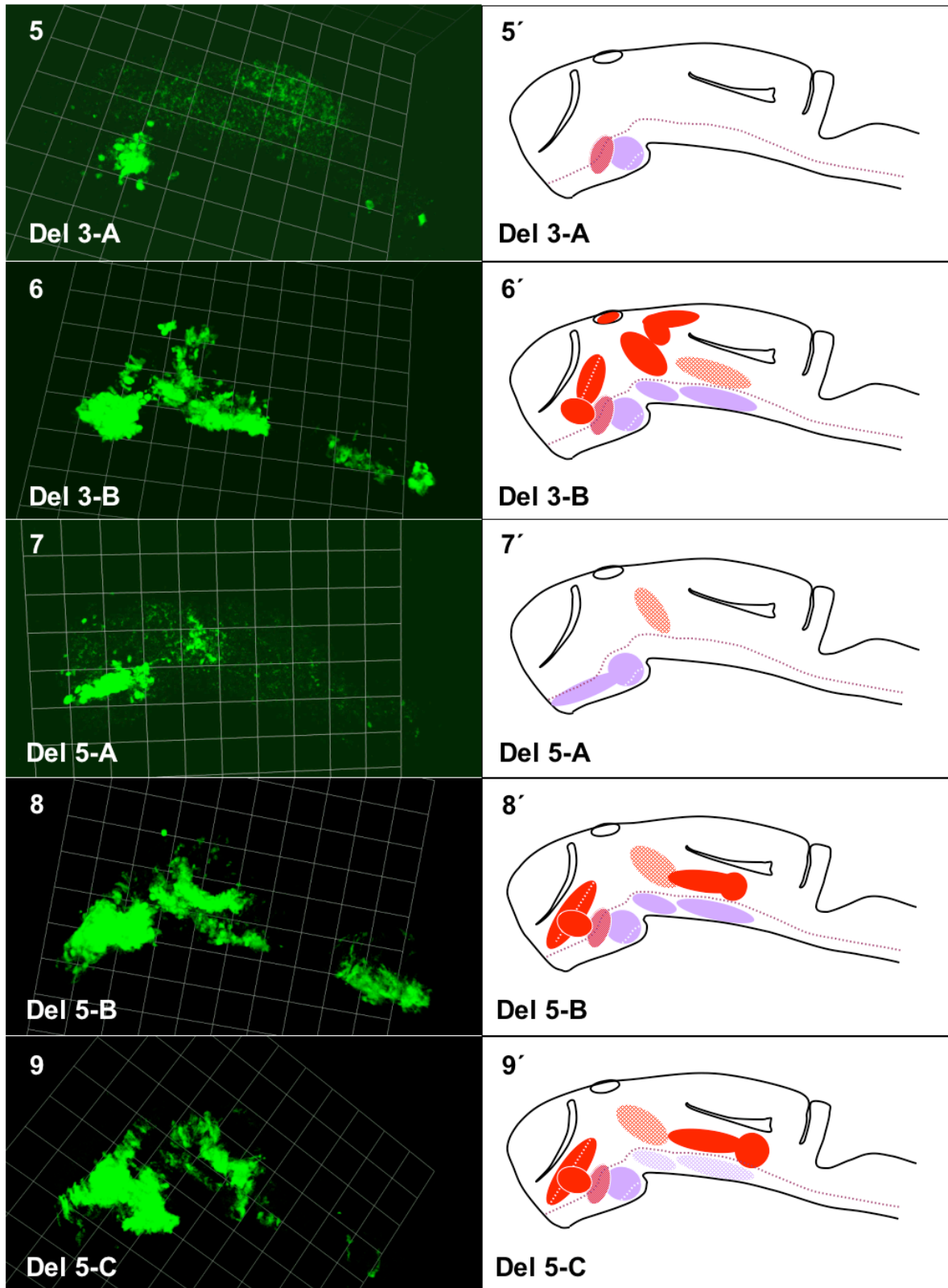


Abb. 19-2: LATE-Mutationsanalyse im 3.1-Kontext. Transgene Linien der Deletionen 3 bis 5. [5-9]: Darstellung von Lateralansichten der Expressionsmuster aus 3D-Rekonstruktionen, anterior = links, Signale aus GFP-Antikörperfärbung in grün, Skalierungsgitter: 37,6 μm pro Einheit. [5'-9']: Schemazeichnungen: alare Domänen in rot, basale in blaus-violett und reduzierte schraffiert dargestellt.

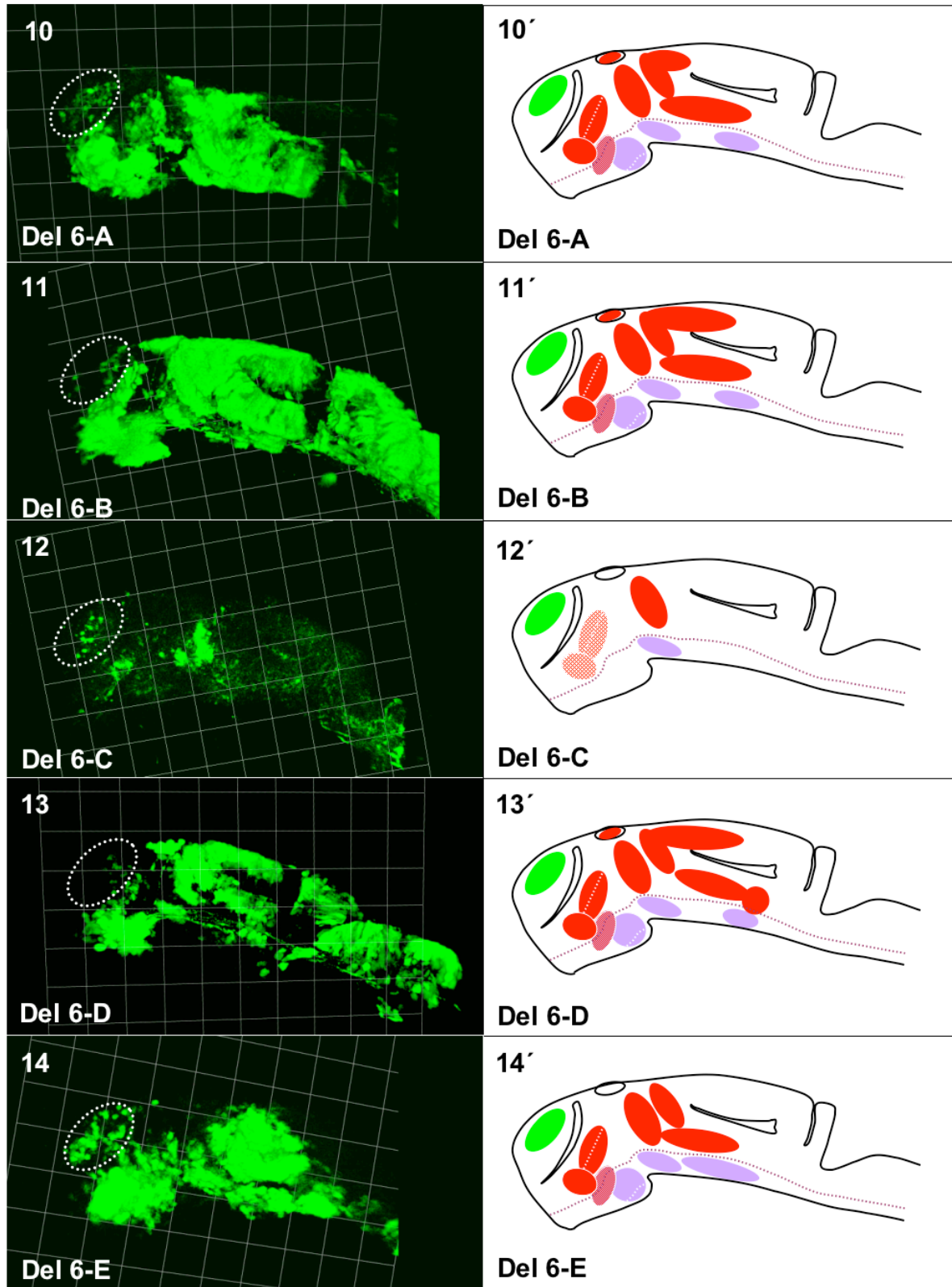


Abb. 19-3: LATE-Mutationsanalyse im 3.1-Kontext. Transgene Linien der Deletion 6.
 [10-14]: Darstellung von Lateralansichten der Expressionsmuster aus 3D-Rekonstruktionen, anterior = links, Signale aus GFP-Antikörperfärbung in grün, Skalierungsgitter: $37,6 \mu\text{m}$ pro Einheit, ektopische Expression im Telencephalon punktiert markiert. [10'-14']: Schemazeichnungen: alare Domänen in rot, basale in blaus-violett, reduzierte schraffiert, ektopische in grün.

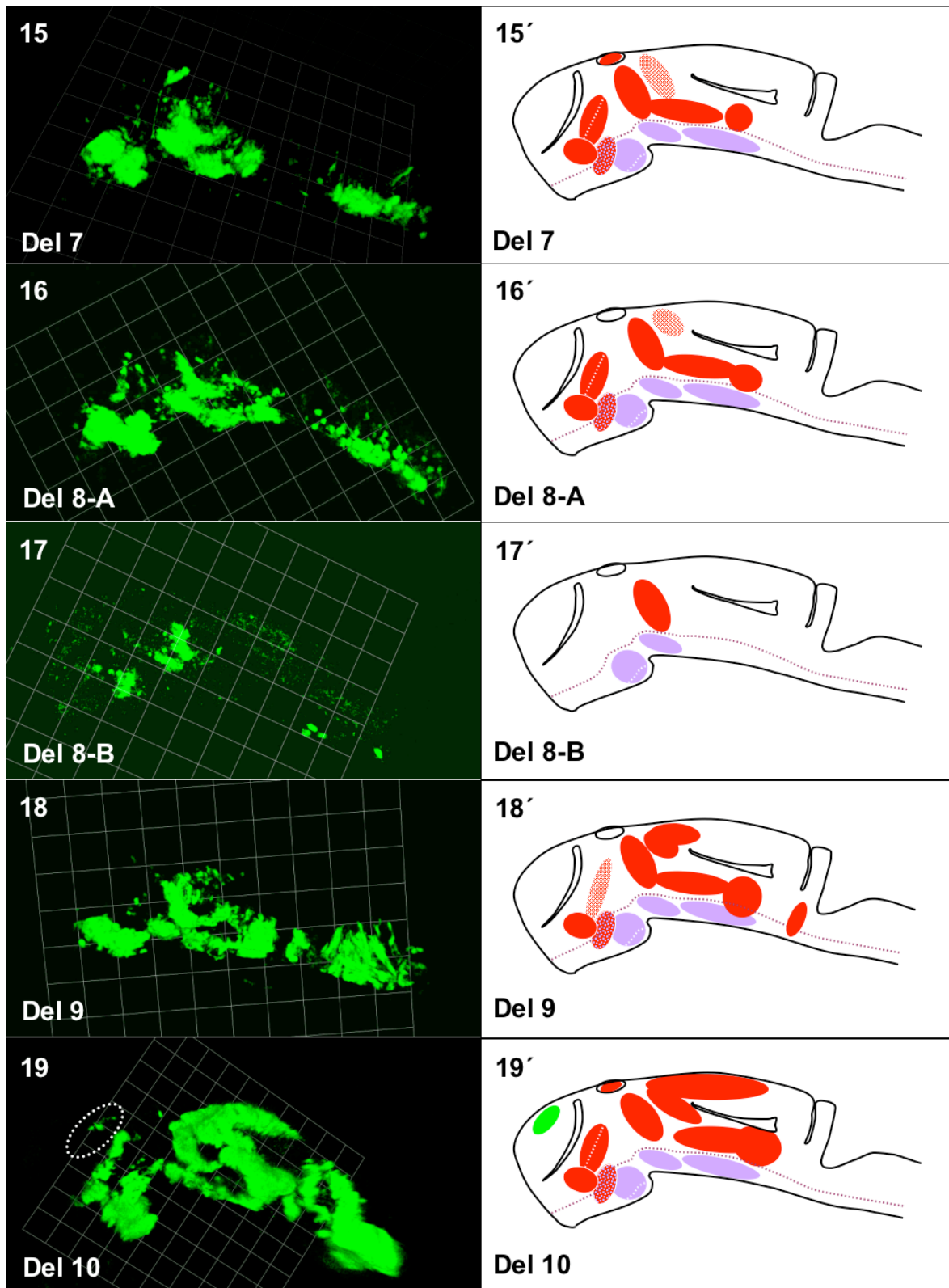


Abb. 19-4: LATE-Mutationsanalyse im 3.1-Kontext. Transgene Linien der Deletion 7-10. [15-19]: Darstellung von Lateralansichten der Expressionsmuster aus 3D-Rekonstruktionen, anterior = links, Signale aus GFP-Antikörperfärbung in grün, Skalierungsgitter: $37,6 \mu\text{m}$ pro Einheit, ektopische Expression im Telencephalon punktiert markiert. [15'-19']: Schemazeichnungen: alare Domänen in rot, basale in blass-violett, reduzierte schraffiert, ektopische in grün.

Del 6 (Δ 201-240, [10-14] bzw. [10'-14']): Fünf transgene Linien konnten isoliert werden, die wieder Inkonsistenzen in der Reporterexpression im Diencephalon zeigen. Überraschenderweise weisen allerdings alle mehr oder weniger ektopische Reporteraktivität im dorsalen Telencephalon auf (punktiert eingekreist in [10-14] bzw. grün in [10'-14']). Dieses Ergebnis animiert zu der Annahme, dass das deletierte LATE-Fragment eine Sequenz enthält, welche die Reporteraktivität negativ reguliert, d.h. ihr Fehlen die Derepression des Transgens im Telencephalon bewirkt. Diese ektopische Expression ist in lebenden Embryonen nicht vor etwa 24 hpf sichtbar.

Del 7 (Δ 241-280, [15/15']): Das GFP-Muster der einzigen erzeugten Linie stimmt weitgehend mit dem Referenzmuster überein.

Del 8 (Δ 281-320, [16/17] bzw. [16'/17']): Die Muster beider Linien sind inkonsistent, Linie A gleicht mit Ausnahme reduzierter Reporterexpression im Pretectum dem Referenzmuster.

Del 9 (Δ 321-360, [18/18']): Außer der hier gezeigten Linie wurden noch drei andere isoliert, deren GFP-Expression jedoch sehr schwach, wie Referenzlinie 3 starke ektopische Signale zwischen Körperachse und Dottersack aufwies und daher für einen Vergleich unbrauchbar waren. Mit Ausnahme verminderter Expression im ventralen Thalamus (und einer ektopischen Domäne rostroventral der Isthmusregion) stimmt das Muster mit dem Referenzmuster überein.

Del 10 (Δ 360-406, [19/19']): Auch hier konnte nur eine Linie zur Analyse herangezogen werden, da das GFP-Signal der anderen zu schwach ausgeprägt war. Wie bei Del 6 zeigt das Muster schwache ektopische Expression im dorsalen Telencephalon. Außerdem sind die Domänen von Pretectum und Tegmentum vergrößert.

Zusätzlich und zur Kontrolle wurde versucht, mit dem 3.1-Reporterkonstrukt ohne LATE-Sequenz, das vor der Klonierung der undeletierten bzw. deletierten Sequenzen nur das Adapteroligonukleotid enthält (siehe 2.2.1.17), transgene Linien zu isolieren. Es wurde erwartet, dass die diencephalen Domänen fast vollständig verloren gehen, entsprechend den Ergebnissen von Blader et al. (2004). Jedoch konnte keine Linie gefunden werden.

3.3.1.3 Umstellung auf das *Tol2*-Transgenesesystem

Die Erzeugung transgener Linien durch Meganuklease vermittelte Transgenintegration bzw. -transmission erwies sich als sehr arbeits- und zeitintensiv, weil für die Isolation einer für die Analyse brauchbaren Linie bei einer Transmissionswahrscheinlichkeit des Transgens von 1-5 % pro Reporterkonstrukt die Nachkommen von mindestens 50 Gründerfischen untersucht werden mussten. Für aussagekräftige Ergebnisse bei der Expressionsmusteranalyse sollten pro Konstrukt mindestens drei Linien generiert werden, von denen idealiter zwei ein hinreichend konsistentes Muster zeigen sollten. Nur für zwei Deletionen – Del 5 und Del 6 – wurde dieses Kriterium erfüllt.

Die Transposase-vermittelte Methode zur Erzeugung transgener Linien verspricht Transmissionsraten von 10-30 % (Kawakami et al., 2004) und darüber (T. Becker / S. Rastegar, pers. Mitteilung). Um die Deletionsserie zu vervollständigen wurde auf dieses System umgestellt. Besonders für die fehlende Deletion 4 galt es Linien zu isolieren sowie die Ergebnisse von Del 5 und 6 zu bestätigen.

Anfangs musste festgestellt werden, dass bei ungefähr der Hälfte der Nachkommen im Gelege eines Paares aus Wildtyp- und Gründerfisch ektopische GFP-Expression im ganzen Embryo auftritt. Teilweise überlagerte dieses unspezifische GFP-Signal ein gewebsspezifisches Signal. Abb. 20-A zeigt drei lebende Embryonen der F₁-Generation von Del 10 mit einem solchen Muster: Neben einem relativ schwachen GFP-Signal, das sich über die gesamte Oberfläche des Embryos (Epidermis) inklusive Dottersack erstreckt, finden sich Signale im Inneren der Körperachse, z.B. den Somiten, Augen, aber auch im Telencephalon und Hypothalamus (Pfeil bzw. Pfeilspitze in A).

Die andere Hälfte der Nachkommen zeigte dagegen nur das gewebsspezifische Signal (Abb. 20-B), hier wieder im Telencephalon und Hypothalamus (Pfeil bzw. Pfeilspitze in B), aber auch in nicht näher bestimmten kaudalen Abschnitten. Außerdem wurde beobachtet, dass die Stärke der GFP-Signale von Embryonen im selben Gelege unterschiedlich waren (nicht gezeigt). All die eben geschilderten Variationen und Inkonsistenzen der Muster machte es schwierig, geeignete F₁-Nachkommen zur weiteren Aufzucht auszuwählen und in der nächsten Generation für die Analyse heranzuziehen. Außerdem war die Ausbeute an transgenen Linien nicht so hoch wie prognostiziert: Maximal 10 % der P₀-Generation produzierte GFP-positive Nachkommen. Nicht zuletzt der hohe Arbeitsaufwand machte schließlich eine Fokussierung auf die Deletionen 4, 5 und 6 unumgänglich

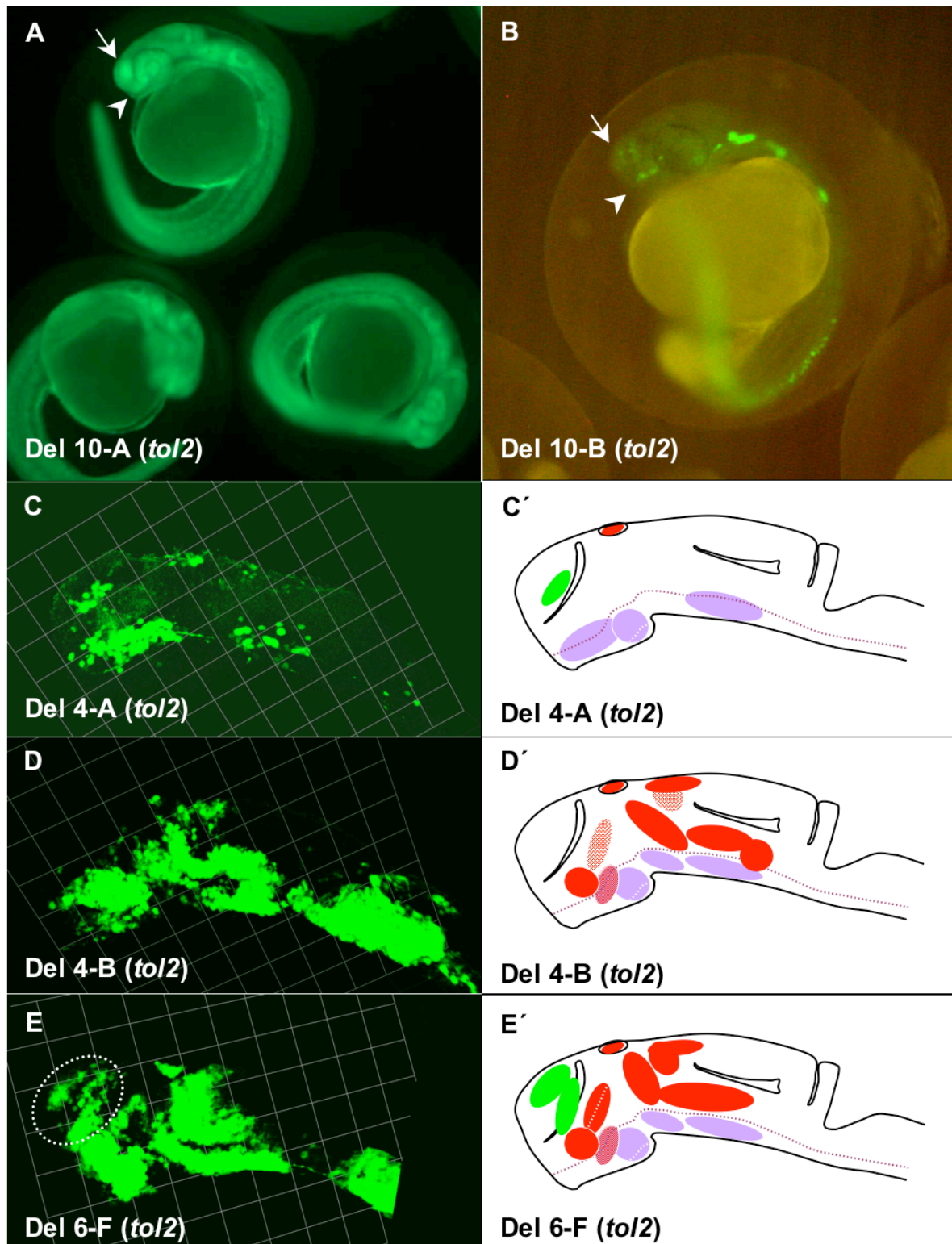


Abb. 20: LATE-Mutationsanalyse im 3.1-Kontext. Transgene Linien nach der *tol2*-Methode. (A): Ektopisches epidermales EGFP-Signal überdeckt spezifisches Signal aus Telencephalon (Pfeil) bzw. Hypothalamus (Pfeilspitze). (B): Konsistentes Muster ohne Epidermissignal. (C-E): Lateralansichten der Expressionsmuster von Deletion 4 und 6 aus 3D-Rekonstruktionen, anterior = links, Signale aus GFP-Antikörperfärbung in grün, Skalierungsgitter: $37,6 \mu\text{m}$ pro Einheit, ektopische Expression im Telencephalon von Del 6 in (E) punktiert markiert. (C'-E'): Schemazeichnungen: alare Domänen in rot, basale in blass-violett, reduzierte schraffiert, ektopische in grün dargestellt.

Für Del 4 konnten zwei Linien mit wiederum inkonsistenten Expressionsmustern erzeugt werden (Abb. 20-C/C' bzw. -D/D'). Das Muster von Linie A erinnert mit dem hypothalamischen GFP-Signal an jenes von Del 5-A (vgl. Abb. 19-2-[7]), darüberhinaus findet sich eine ektopische Domäne im Telencephalon. Bis auf das Epiphysensignal fehlen die restlichen alaren Domänen. Bei Linie B zeigen der ventrale Thalamus und das Pretectum zwar verminderte GFP-Signale, trotzdem sind die Domänen vorhanden. Das Muster ist daher fast übereinstimmend mit dem Referenzmuster der undeletierten LATE-Sequenz nach der Meganuklease-Methode. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass Reporterkonstrukte auf Basis des *tol2*-Vektors Muster produzieren, welche mit auf der Meganuklease-Methode basierenden Mustern prinzipiellvergleichbar sind. Diese Aussage wird noch unterstützt, da der *tol2*-Reporter mit Del 6 dieselbe ektopische Domäne im dorsalen Telencephalon und auch für die diencephalen Domänen ein hinreichend konsistentes Muster produziert (vergleiche Abb. 20-E/E' und Abb. 19-3-[10/11/13] bzw. -[10'/11'/13']). Die *tol2*-Linie zeigt übrigens den stärksten Effekt von Del 6, d.h. die ektopische Expressiondomäne im dorsalen Telencephalon erscheint lateral ausgedehnt und dadurch an die GFP-Domäne des ventralen Thalamus anzugrenzen.

Für Del 5 und das Konstrukt mit Adapteroligonukleotid statt LATE-Sequenz konnte keine neue Linie gefunden werden.

3.3.2 Mutationsanalyse im 8.4-Kontext

Die Deletionsserie des LATE-Enhancers im 3.1-Reporterkonstrukt sollte in reduktionistischer Strategie, d.h. unter Ausschluss eines etwaigen Einflusses der beiden anderen Enhancer LSE und ANPE, regulatorisch essentielle Sequenzabschnitte in LATE entdecken. Parallel dazu wurde ein sozusagen holistischer Ansatz verfolgt, bei dem die Deletionen 4, 5 und 6 im 8.4-Reporter, der zusätzlich LSE und ANPE in der endogenen Anordnung des *neurog1*-Locus enthält, konstruiert und mit dem nicht-deletierten Referenzreporter verglichen wurden. Wie bei der Analyse im 3.1-Kontext erfolgte zunächst auch hier die Gegenüberstellung der Expressionsmuster von nicht-modifiziertem 8.4-Konstrukt pBL8.4ngn1:*gfp* (Blader et al., 1997) und modifiziertem 8.4-Referenzkonstrukt. Außerdem wurde das 8.4-Konstrukt ohne LATE (nur mit Adapteroligonukleotid) eingesetzt. In Abb. 21 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt, worin zusätzlich die jeweiligen mRNA-Muster und Dorsalansichten wiedergegeben sind. Die Sicht von dorsal verdeutlicht

die Transgenexpression im Telencephalon, weil das Signal des Bulbus olfactorius die Domäne im dorsalen Telencephalon teilweise verdeckt. Man beachte, dass die maximale Signaldetektion nur bis zur sagittalen Mitte des Embryos möglich war, daher wurde in den Reihen A, C, D, E und F die rechte Seite, in B die linke Seite betrachtet. In den Schemata wurden die Ergebnisse auf die jeweils andere Seite übertragen.

Die Erzeugung transgener Linien mit den 8.4-*tol2*-Konstrukten war wesentlich effektiver als mit den 3.1-Konstrukten (sowohl auf Meganuklease- als auch auf *tol2*-Basis). Mindestens 30% aller untersuchten Gründer produzierte GFP-positive F₁-Nachkommen. Davon zeigten zwar durchschnittlich die Hälfte der Linien die schon im 3.1-Kontext beschriebene ektopische Expression in der Epidermis, die anderen Linien jedoch mit dem Reporterkonstrukt pBL8.4ngn1:*gfp* vergleichbare Muster. Ausgewählte Expressionsmuster der F₁-Generation sind in Abb. 21 dargestellt.

Der Vergleich zwischen Ausgangs- und modifiziertem Referenzkonstrukt zeigt eine nahezu völlige Übereinstimmung beider Muster (vgl. Reihe A und B). Beim Konstrukt, dessen LATE-Sequenz mit dem Adapternukleotid ersetzt wurde, sind vor allem GFP-Signale im alaren Diencephalon signifikant reduziert (8.4-ohne LATE, Reihe C). Diese Differenz ist mittels GFP-Antikörperfärbung ausgeprägter erkennbar als durch Signaldetektion mittels FISH. Telencephale Domänen sind im Vergleich zum Referenzmuster (Reihe B) nicht betroffen. Del 4 zeigt ebenfalls eine starke Reduktion im alaren Diencephalon (Epiphyse ausgenommen), nachweisbar durch beide Färbemethoden (Reihe D). Das diencephale Muster ist demjenigen der Del 4-A-Linie im 3.1-Kontext sehr ähnlich (vergleiche mit Abb. 20-C/C'). Del 5 ergibt auch eine Verminderung von Signal im dorsalen Thalamus und Pretectum, jedoch nicht so ausgeprägt wie im 3.1-Kontext. Überraschenderweise ist hier die telencephale Domäne sichtbar reduziert (GFP-mRNA-Signal punktiert eingekreist, Reihe E). Das Expressionsmuster von Del 6 (Reihe F) zeigt den umgekehrten Fall: Hier weisen alle anderen Domänen (einschließlich dorsales Telencephalon, ausschließlich B. olfactorius) nicht nur ein intensiveres GFP-Signal auf, sondern einige (dorsales Telencephalon, ventraler Thalamus und Pretectum) erscheinen auch räumlich ausgedehnter. Wie im 3.1-Kontext ist die Expression im dorsalen Telencephalon lateral erweitert (punktiert eingerahmt, Abb. 21-Reihe F) und grenzt somit an diejenige des ventralen Thalamus (Pfeilspitze in F).

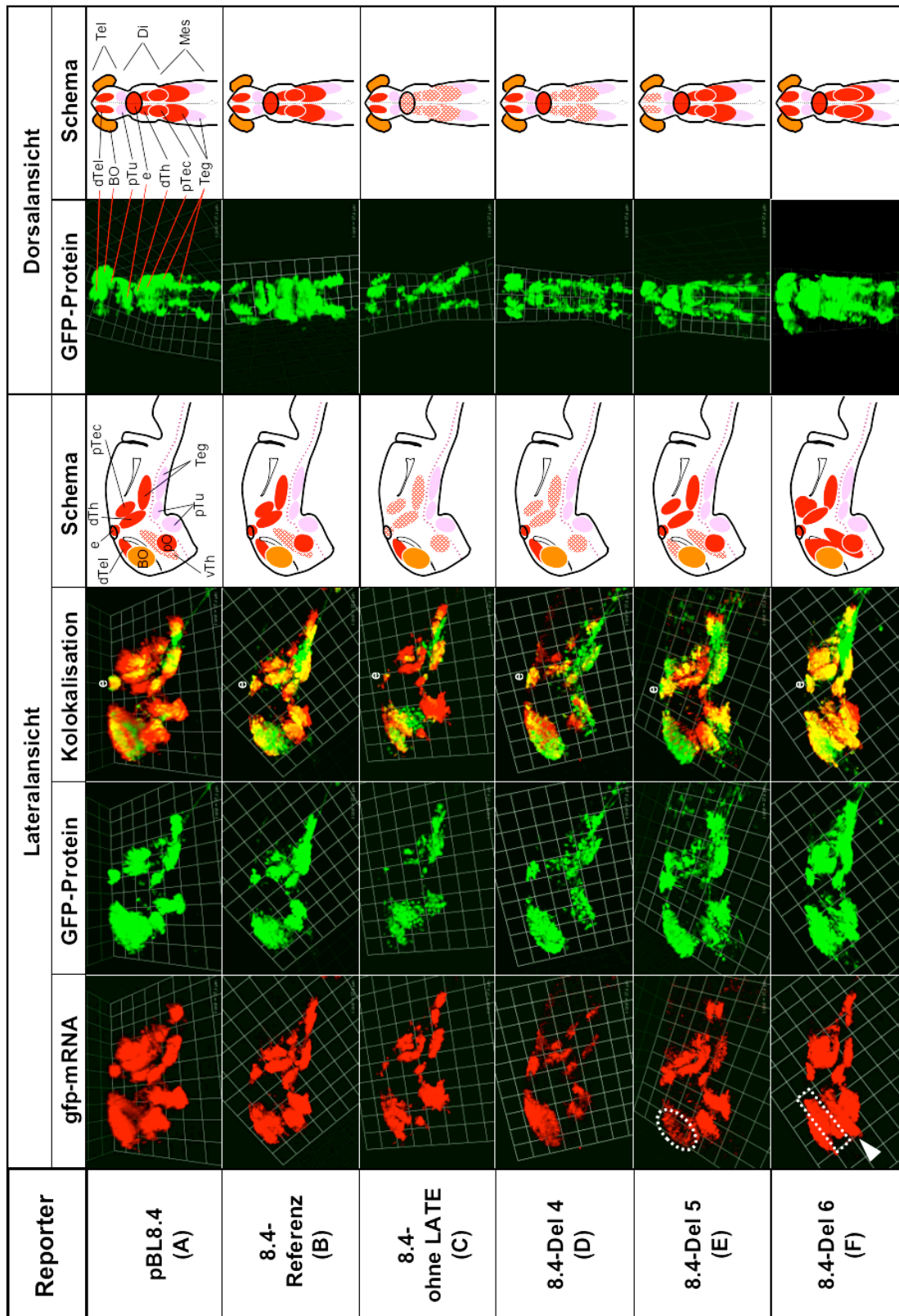


Abb. 21: LATE-Mutationsanalyse im 8.4-Kontext. Erklärung siehe Text. Abkürzungen: BO, Bulbus olfactorius; Di, Diencephalon; dTel, dorsales Telencephalon; dTh, dorsaler Thalamus; e, Epiphyse; Mes, Mesencephalon; pO, preoptische Region; pTec, Pretectum; pTu, posteriores Tuberculum; Teg, Tegmentum; Tel, Telencephalon; vTh, ventraler Thalamus.

3.3.3 Zusammenfassung der LATE-Mutationsanalyse

Die Untersuchung zur Aufdeckung essentieller Unterabschnitte der LATE-Region mittels vergleichender GFP-Transgenexpression liefert wichtige Informationen nicht nur über funktionelle Merkmale des Enhancers, sondern offenbart auch Möglichkeiten und Grenzen der eingesetzten Methoden. Sowohl die Meganuklease- als auch die *tol2*-Methode zur Erzeugung transgener Linien mit 3.1-Reporterkonstrukten erwiesen sich hinsichtlich Anzahl und Konsistenz der Expressionsmuster als relativ ineffektiv. Zumindest für das Referenzmuster und die Expression der Transgene Del 5 und 6 wurden die Analysekriterien ausreichend erfüllt. Danach besitzt der LATE-Enhancer einen Sequenzabschnitt mit aktivierenden Eigenschaften, der die Transgenexpression positiv reguliert und dessen Deletion (Del 5) die Reporteraktivität spezifisch im dorsalen Diencephalon (dorsaler Thalamus, Pretectum) herabsetzt. Gleichzeitig erstreckt sich die Domäne des ventralen Thalamus weiter nach anterior über Prosomer d3 (preoptische Region) hinaus. Somit scheint das in Del 5 deletierte LATE-Fragment auch reprimierenden Charakter zu besitzen. Eindeutig hemmenden Einfluß hat Deletion 6. Die ektopische Domäne im dorsalen Telencephalon wird in allen transgenen Linien im 3.1-Kontext rekapituliert, obwohl die Intensität des Effektes von Linie zu Linie unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Den stärksten Effekt zeigt Del 6 des *tol2*-Transgens. Die übereinstimmende Anordnung diencephaler Expressionsdomänen (auch jener von Del 4-B) lassen darauf schließen, dass *tol2*- und Meganuklease-Muster prinzipiell miteinander vergleichbar sind, insofern die ausschließlich mit dem *tol2*-Konstrukt erzeugten Linien mit epidermalen GFP-Signalen unberücksichtigt bleiben. Unter dieser Bedingung kann im 3.1-Kontext auch dem deletierten Abschnitt 10 reprimierenden Einfluss im dorsalen Telencephalon zugeschrieben werden.

Mit den 8.4-Konstrukten konnte eine wesentlich höhere Ausbeute an transgenen Linien für einen repräsentativen Vergleich erzielt werden. Nicht-modifiziertes 8.4-Meganuklease- und modifiziertes *tol2*-Referenzkonstrukt zeigen fast identische Muster, somit sind – wie schon im 3.1-Kontext – beide Transgenesemethoden für eine vergleichende Analyse verwendbar. Im Gegensatz zum 3.1-Kontext konnte hier das Expressionsmuster vom Konstrukt ohne LATE-Sequenz isoliert werden, das die erwartete signifikante Reduktion diencephaler GFP-Signale aufweist. Mit Ausnahme des Epiphysensignals wird dasselbe Ergebnis für Del 4 erhalten. Beide Ergebnisse verweisen damit auf eine diencephal aktivierende Eigenschaft der LATE-Sequenz allgemein bzw. das deletierte Fragment 4 im Besonderen, wenn die Enhancer LSE und ANPE beteiligt sind. Nicht nur die Beobachtung für Del 4 steht im

Widerspruch zum 3.1-Kontext, ebenfalls für Del 5 ergibt sich beim 8.4-Reporter ein unerwarteter Effekt: Nicht nur diencephale Expressionsdomänen sind reduziert, sondern das telencephalische GFP-Signal ist ebenfalls sichtbar geringer, sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene. Del 6 wiederum bestätigt die schon im 3.1-Kontext getroffene Vermutung, dass der deletierte LATE-Abschnitt reprimierenden Einfluss auf di- und telencephale Bereiche ausübt, da sein Signal dort intensiver und räumlich ausgedehnter ist.

Im folgenden Abschnitt wird die ektopische telencephalische Domäne eingehender untersucht.

3.3.4 Analyse des Effektes von Deletion 6

Koexpressions-Experimente sollten klären, wo genau das durch Deletion 6 im 3.1-Reporter hervorgerufene GFP-Signal im Telencephalon lokalisiert ist. Dazu wurde zuerst die mit dem *tol2*-Del 6-Konstrukt erzeugte Linie (Del 6-F, siehe Abb. 20-E/E'), die das LATE-abhängige ektopische GFP-Signal am deutlichsten zeigt, mit einer Linie gekreuzt, welche die LSE-abhängige Telencephalonexpression als nukleäres RFP-Signal wiedergibt (8.4-nRFP-Transgen). Doppelt transgene F1-Nachkommen wurden im Prim-5-Stadium fixiert, die Expressionsmuster digital dokumentiert und 3D-rekonstruiert.

In den dargestellten Dorsalansichten in Abb. 22 ist zu erkennen, dass die ektopische GFP-Expression innerhalb der LSE-abhängigen Telencephalondomäne liegt. Das cytoplasmatische GFP-Signal der ektopischen Domäne von (weiß punktiert in A, C und C'') kolokalisiert mit dem nukleären RFP-Signal des 8.4-Reporters (weiß eingerahmt in der Überlagerung beider Signale in B und in der Vergrößerung in B' und C'). Ein optischer Horizontalschnitt durch diesen Bereich (C-C'') zeigt exemplarisch drei Zellen, die gleichzeitig beide Reporter exprimieren (gelb in C''). Darüberhinaus kolokalisiert das GFP-Signal des 3.1-Transgens mit Deletion 6 nahezu perfekt mit dem Signal endogener *neurogl1*-Transkripte (D-D'', gelb markiert), auch im Telencephalon, wobei nicht alle *neurogl1*-positiven Zellen GFP exprimieren (siehe vergrößerten Ausschnitt in D'').

Als nächstes wurde die telencephale Domäne des 3.1-Reporters mit Deletion 6 auf Koexpression mit *pax6a*, *pou50* und *dlx2a* untersucht. Im Gegensatz zu *pax6a* (E-E''), dessen palliale Expression domäne vor allem mit dorsal davon gelegenen GFP-Signalen

kolokalisiert, ist die telencephale *pou50*-Domäne (F-F'') mit der ektopischen GFP-Domäne fast identisch (siehe jeweils Sagittalschnitte in E'/F' und entsprechende Vergrößerungen in E''/F'').

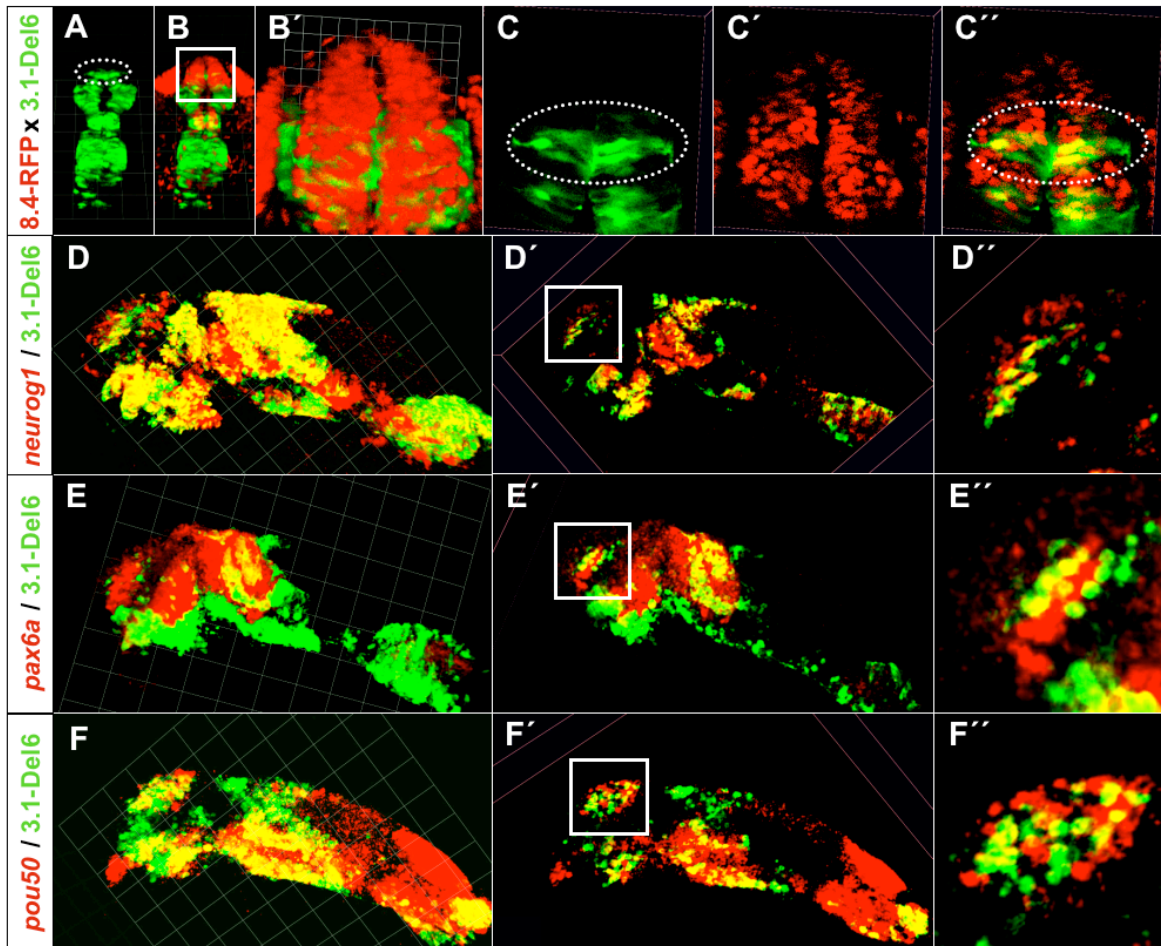


Abb. 22: Koexpression von 3.1-Transgen mit Deletion 6 (3.1-Del6, in grün) und 8.4-RFP-Transgen (A-C'') bzw. *neurog1* (D-D''), *pax6a* (E-E'') und *pou50* (F-F''), jeweils in rot). Dorsalansichten (anterior = oben) in A-C'', Lateralansichten (anterior = links) in D-F''. 3D-Rekonstruktionen in A, B, B', D, E, F; Horizontalschnitte in C-C''; Sagittalschnitte in D', E', F', telencephalischer Bereich (weiß eingerahmt) vergrößert in D'', E'' und F''. Kolokalisierte Signale in gelb.

Die Expressionsdomäne von *dlx2a* im ventralen Telencephalon grenzt direkt an die dorsal gelegene ektopische GFP-Domäne, Koexpression ist nicht nachweisbar (siehe Abb. 23-B nächste Seite). Dagegen zeigen sich kolokalisierte Signale im ventralen Thalamus und posterioren Tuberculum beim Muster des Deletionskonstrukts (vgl. Abb. 23-A' und -B'). Somit verursacht Deletion 6 nicht nur ektopische GFP-Expression im dorsalen Telencephalon, sondern auch im ventralen Diencephalon.

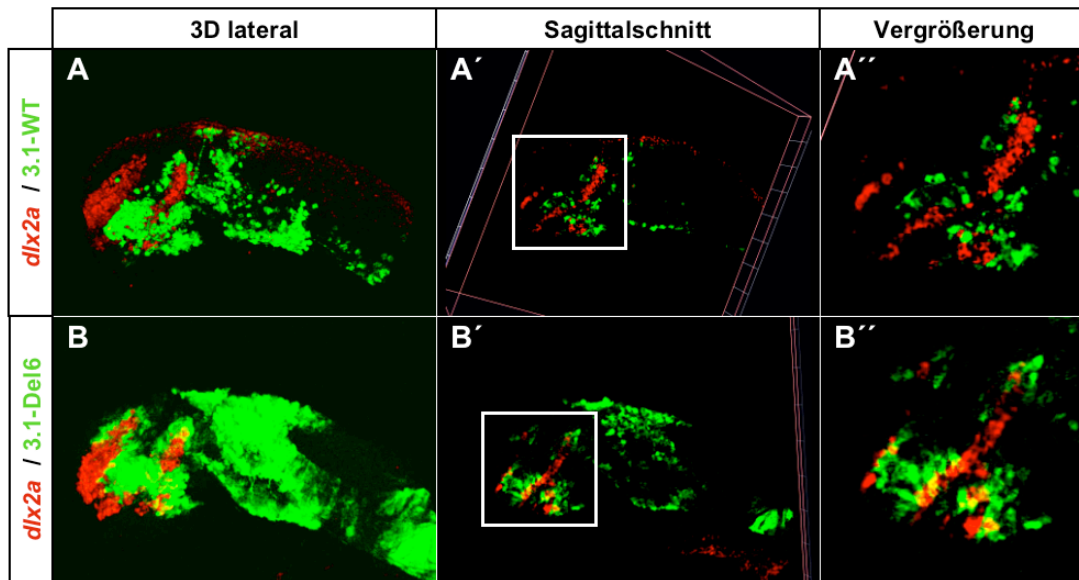


Abb. 23: Vergleich der Koexpression von undeletiertem 3.1-Transgen (3.1-WT, in A-A'') bzw. mit Deletion 6 (3.1-Del6, in B-B''), jeweils in grün und *dlx2a* (in rot). 3D-Rekonstruktionen (in A und B), Sagittalschnitte (in A' und B'), Vergrößerung von ventralem Thalamus und posterioem Tuberculum (weiß eingerahmt) in A''/B''. Lateralansichten (anterior = links). Kolokalisierte Signale in gelb.

Ebenso wurde die Koexpression der 8.4-Reporterkonstrukte (undeletiert bzw. Del 6) mit *pax6a* und *pou50* betrachtet (Abb. 24 nächste Seite). Während die Ausdehnung telencephaler Koexpressionsdomänen der jeweiligen Reporter mit *pou50* sehr ähnlich ist, d.h. nahezu alle *pou50*-exprimierenden Zellen sind GFP-positiv (aber nicht alle GFP-positiven Zellen exprimieren *pou50*) (vgl. jeweils Abb. 24-A-A'' und -B-B''), zeigt das GFP-Muster des 8.4-Reporters mit Wildtyp-LATE-Sequenz wesentlich weniger Kolokalisation mit *pax6a*-Signalen als jenes mit Deletion 6 (vgl. C-C'' und D-D''). Die koexprimierten Bereiche im Telencephalon, anterioren ventralen Thalamus und Bulbus olfactorius sind nicht nur räumlich ausgedehnter, sondern dort decken sich GFP- und *pax6a*-Domäne exakt (D'' und eingefügte Frontalansichten in D).

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild: Die ektopische telencephalische Domäne des 3.1-Reporters mit LATE-Deletion 6 ist Teil endogener *neurog1*-Expression, sowie der telencephalischen RFP-Domäne des 8.4-Konstrukts. *pou50*-Transkripte lassen sich in fast allen Zellen der ektopischen Domäne nachweisen, auch die telencephalischen GFP-Expressionsdomänen der 8.4-Konstrukte (sowohl undeletiert als auch mit Deletion 6) exprimieren *pou50* (Abb. 24). Diese Beobachtungen geben Anlass zur Annahme, dass die ektopische Domäne einen Teil endogener *neurog1*-Expression im Telencephalon repräsentiert. Die Tatsache, dass der durch das Fehlen von Fragment 6 dereprimierte GFP-Reporter im 8.4-Kontext vollständig (im 3.1-Kontext teilweise) die telencephalische Expressionsdomäne von *pax6a* reka-

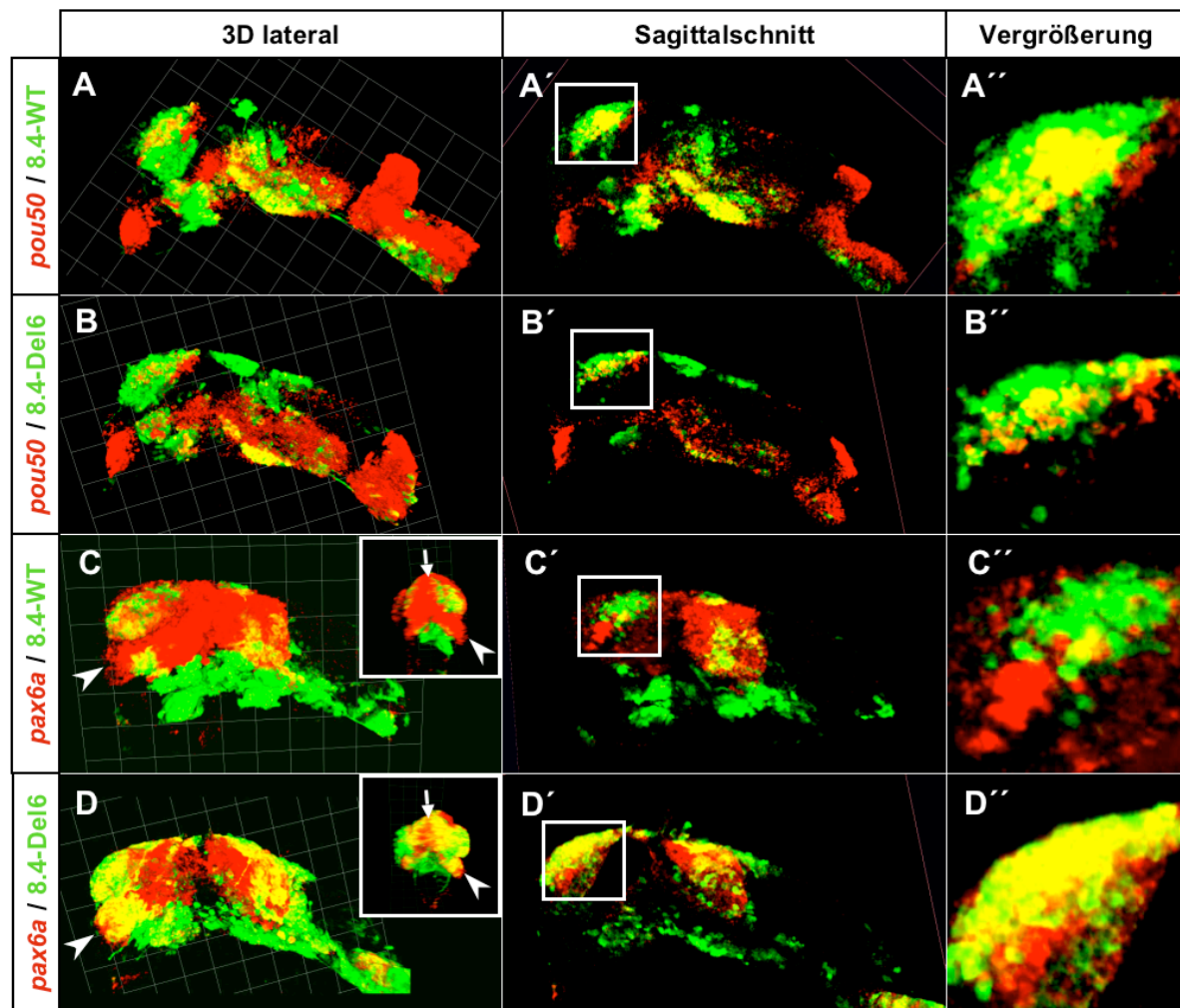


Abb. 24: Vergleich der Koexpression von undeletiertem 8.4-Transgen (8.4-WT, in A-A'' und C-C'') bzw. Deletion 6 (8.4-Del6, in B-B'' und D-D''), jeweils in grün) mit *pou50* (A-B'') bzw. *pax6a* (C-D''), jeweils in rot). 3D-Rekonstruktion in A, B, C, D; Sagittalschnitte in A', B', C', D'; Vergrößerung des weiß eingerahmten telencephalischen Bereichs in A'', B'', C'', D''. Lateralansichten (anterior = links). Kolokalisierte Signale in gelb. Eingelegte Frontalansichten in C und D: linksseitiger ventraler Thalamus markiert mit Pfeilspitze, palliale Expressionsdomäne markiert mit Pfeil.

pituliert, legt die Vermutung nahe, dass der LATE-Enhancer via direkter Interaktion mit *pax6a* nicht nur diencephale, sondern auch telencephale Aspekte der *neurogl1*-Regulation steuert. Diese Aussage wird auch dadurch unterstützt, dass die Deletion LATE-Fragments 5 (enthält Pax6-Bindestelle) im 8.4-Kontext neben diencephaler auch telencephale Reporteraktivität signifikant reduziert (siehe Abb. 21-Reihe E). Darum beinhaltet das stromabwärts der Pax6-Bindestelle benachbarte LATE-Fragment 6 wahrscheinlich Bindestellen für einen oder mehrere Repressoren, die die LATE/Pax6-abhängige GFP-respektive *neurogl1*-Expression im Telencephalon normalerweise inhibiert. Überdies scheint die hemmende Eigenschaft von Fragment 6 auch auf diencephale Abschnitte Einfluss zu haben, wie die Koexpression von GFP des dereprimierten Reporters mit *dlx2a* im ventralen Thalamus und posteriorem Tuberculum zeigt (Abb. 23). Diese beiden Regionen sind ebenfalls *pou50*-positiv. Auch die übereinstimmende Lokalisation von ektopischer GFP- und

pou50-Expression im Telencephalon macht diesen TF für weitere Untersuchungen interessant.

Im Folgenden wurden Protein-DNA-Bindungsstudien durchgeführt zur Überprüfung, ob Pou50 und verschiedene andere im Telencephalon und Diencephalon exprimierte TFs mit dem LATE-Fragment 6 physisch interagieren.

3.4 Analyse zur Protein-DNA-Interaktion (*In-vitro*-Analyse)

Die prinzipielle Fähigkeit zur Bindung eines TF an spezifische DNA-Motive kann durch Detektion eines Komplexes aus rekombinant hergestelltem Protein der Wahl und markiertem Oligonukleotid definierter Sequenz (Sonde) nach Inkubation *in vitro* und gelelektrophoretischer Auftrennung bestimmt werden. Die Produktion rekombinanter Proteine erfolgte in Retikulozytenlysat (TNT® Kit, Firma Promega), das die erzeugten Proteine, im Gegensatz zur *E. coli* vermittelten Proteinherstellung, mit eukaryotischen post-translationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierungen und Acetylierungen) ausstattet. Aussagen hinsichtlich der Sequenzspezifität einer beobachteten Interaktion erlaubt die Anwesenheit eines Überschusses an erstens zufälligen Sequenzen (hier: fragmentierte genomische Kalbsthymus-DNA) zum Abfangen unspezifischer Wechselwirkungen und zweitens spezifischen bzw. unspezifischen Kompetitoren (d.h. nicht-markierter Oligonukleotide gleicher bzw. gezielt mutierter Sequenz des untersuchten DNA-Motivs) im Reaktionsansatz. Die Zugabe spezifischen Kompetitors vermindert das detektierte Signal eines Komplexes signifikant, die Zugabe unspezifischen Kompetitors nicht. Die Inkubation des Proteins mit einem markierten Oligonukleotid mit mutiertem Bindungsmotiv (markierter unspezifischer Kompetitor = mutierte Sonde) darf ebenfalls kein entsprechendes Signal liefern.

Als Positivkontrolle der angewandten Methode diente die Reproduktion des Nachweises der sequenzspezifischen Bindung von Pax6a an denjenigen LATE-Abschnitt (Fragment 5), der das vorhergesagte DNA-Motiv enthält (LATE 174-206, nach Blader et al., 2004). Abb. 25-A zeigt das Ergebnis (Spuren 1-6). Inkubation der Sonde (PAX6a-Sonde, Abb. 25-B) mit rekombinantem Pax6a-Protein liefert im Gegensatz zum Einsatz des für die Proteinproduktion verwendeten Retikulozytenlysates ohne DNA-Vorlage – als Negativkontrolle

somit ohne Pax6a-Protein (Spur 1) – das mit dem Pfeil markierten Bandensignal eines höhermolekularen Komplexes (Spur 2). Verdopplung der Proteinmenge intensiviert das Signal (Spur 3), folglich ist die Menge dieses Komplexes gestiegen. Anwesenheit des spezifischen Kompetitors hebt das Signal auf (Spur 4), stattdessen beeinflusst unspezifischer Kompetitor (DNA-Bindungsmotiv durch Transversionen mutiert, schwarz/gelb markierte Sequenz in B) die Komplexbildung unwesentlich (Spur 5). Der Einsatz mutierter Sonde liefert wie die Negativkontrolle kein entsprechendes Signal (Spur 6). Somit zeigt das nur in Spur 2, 3 und 5 vorhandene Signal den sequenzspezifischen Pax6a-DNA-Komplex an. Alle Signale zwischen diesem und dem der ungebundenen Sonden sind demnach unspezifischer Natur.

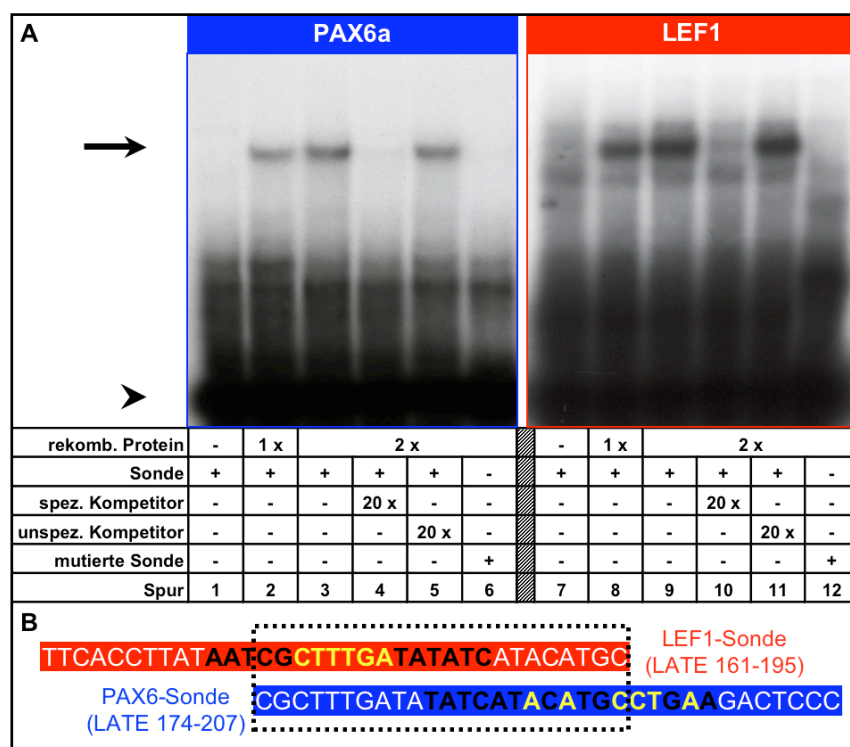


Abb. 25: Kompetitions-Assays zur Protein-DNA-Interaktion *in vitro*. (A): Pax6a-Positivkontrolle nach Blader et al. (2004) sowie spezifische Bindung von rekombinantem Lef1-Protein an vorhergesagte Bindestelle (nach *MatInspector*) in der LATE-Region. Bandensignal der spezifischen Protein-DNA-Komplexe markiert mit Pfeil, Pfeilspitze zeigt nicht gebundene Sonden, andere Signale sind unspezifische Komplexe. Spur 1 und 7: Negativkontrollen mit TNT-Lysat aus Proteinproduktion ohne Vorlagen-DNA. (B): Sequenzen der verwendeten DNA-Sonden. Vorhergesagte Bindungssequenzen in schwarz und deren Kernsequenzen in gelb, beide wurden für mutierte Sonde transvertiert. Lef1-Bindestelle liegt gerade stromaufwärts benachbart und gering überlappend mit Pax6-Bindestelle, daher besitzen beide Sonden teilweise die selbe Sequenz (punktirt markiert).

Analog wurde die spezifische Bindung von Lef1 an die mit dem Programm *MatInspector* vorhergesagte Lef1-Bindestelle untersucht, die stromaufwärts gerade benachbart der Pax6-Stelle liegt. Weitere Gründe sprechen für eine Untersuchung auf eine prinzipielle Möglichkeit zur physischen Interaktion von Lef1 mit dem LATE-Enhancer: Die Sequenz des

potentiellen Lef1-Motivs ist konserviert, außerdem ist *lef1* wie *pax6a* mit dem 3.1-LATE-Reporter im Pretectum koexprimiert, wo durch Deletion 5 in diesem Bereich der Neuralröhre die Reporteraktivität signifikant reduziert wird. Hier konnte die sequenzspezifische Bindung rekombinanten Lef1-Proteins an die vorhergesagte Bindestelle *in-vitro* verifiziert werden (Abb. 25-A, Spuren 7-12). Die Lef1-Sonde repräsentiert LATE-Sequenz 161-195 und schließt die Bindungs- bzw. Kernsequenz (schwarz bzw. gelb dargestellt in Abb. 25-B) ein.

Innerhalb von LATE-Fragment 6, dessen Deletion im 3.1-Reporter die ektopische GFP-Domäne im Telencephalon verursacht und in welcher *pou50* koexprimiert ist, werden Bindestellen für TFs mit POU-spezifischer Homeodomäne vorhergesagt (zwei auf dem Plus- und eine auf dem Minusstrang). Pou50 wurde daher auf seine Fähigkeit überprüft, gezielt dieses DNA-Motiv und zum Vergleich eine stromaufwärts gelegene potentielle Homeo-Erkennungssequenz zu binden (Abb. 26-A). Genauso wurde mit *dlx2a* verfahren, das auch in GFP-positiven Zellen des dereprimierten 3.1-Reporters koexprimiert ist (Abb. 26-C). Die Homeo-Sonde enthält die für TFs mit Homeodomäne vorhergesagte Bindestelle mit einfacher TAAT-Kernsequenz (Plusstrang), wobei die Ähnlichkeit zur Dlx-Matrize am größten ist; die POU-Homeo-Sonde mit enthält das TAAT-Motiv dagegen doppelt auf Plus- und Minusstrang (punktirt markiert in Abb. 26-B). Beide Sonden, sowie die entsprechend mutierten Versionen, bilden keinen spezifischen Komplex nach Inkubation mit Komponenten des TNT-Lysats ohne Pou50 bzw. Dlx2a (Negativkontrollen, Spuren 1, 2, 10 und 11 in Abb. 26-C). Dagegen zeigt sich das Signal des spezifischen Protein-DNA-Komplexes (markiert durch Pfeil in Abb. 27) für Pou50 mit der POU-Homeo-Sonde (blau in Abb. 26-A, Spuren 8-14): Erhöhung der Proteinkonzentration ergibt eine deutliche Steigerung des Signals (vgl. Spur 8 und 9); durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an spezifischem Kompetitor (relativ zur Sondenkonzentration) lässt sich das Signal kaum noch, mit 50-fachem Überschuss nicht mehr nachweisen (Spur 10 bzw. 11); die Anwesenheit unspezifischen Kompetitors hat keinen Einfluss auf die Komplexbildung (Spuren 12 und 13) und die Transversion des Bindungsmotivs in der Sonde verhindert die Komplexbildung (Spur 14). Pou50 zeigt eine wesentlich geringere Affinität zur Homeo-Sonde als zur POU-Homeo-Sonde: Das Komplexsignal ist bei gleicher Menge rekombinanten Proteins nur nachweisbar durch eine längere Expositionszeit während der Autoradiographie (vgl. rot und blau in Abb. 26-A), weswegen die Signale unspezifischer Komplexe und ungebundener Sonden (Pfeilspitzen in Abb. 26) hier stärker erscheinen.

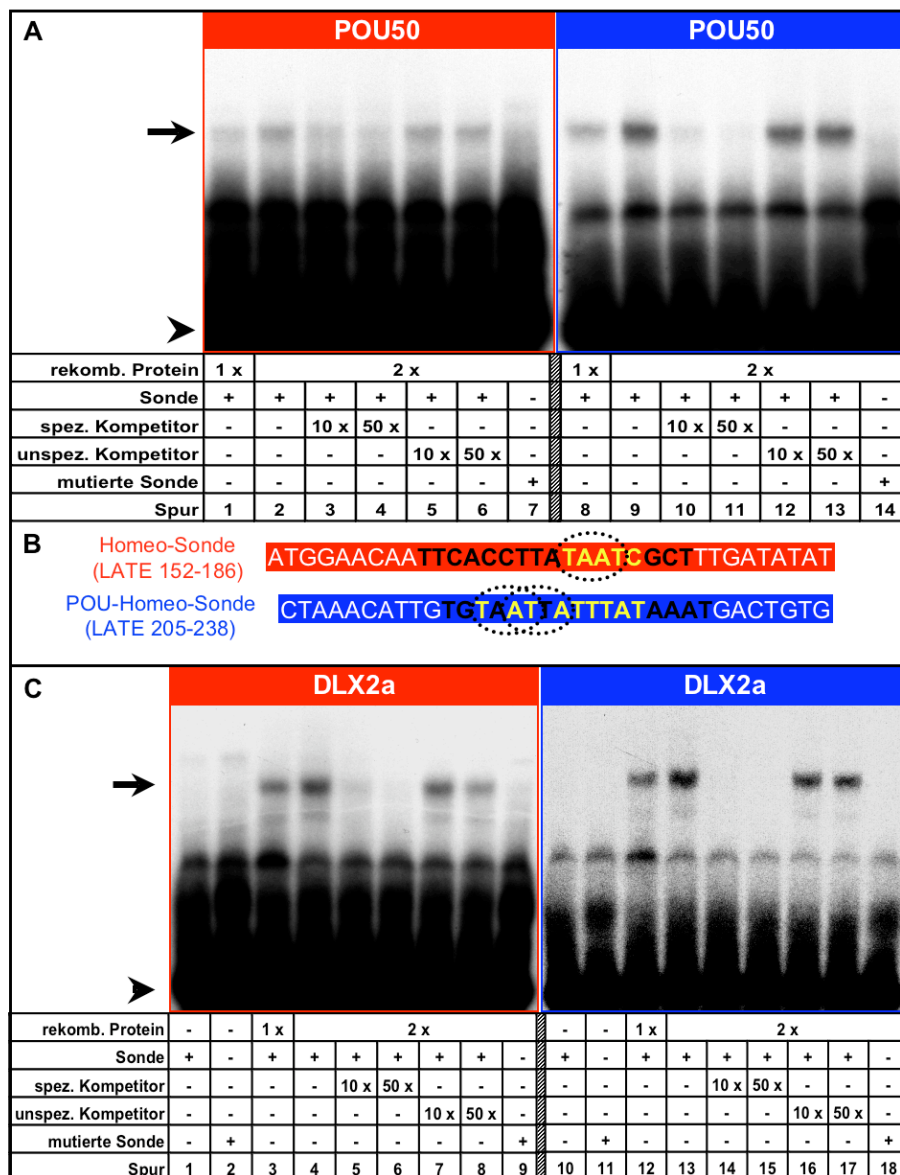


Abb. 26: Kompetitions-Assays zur Protein-DNA-Interaktion *in vitro* für Pou50 (A) und Dlx2a (C). Spezifische Bindung rekombinanter Proteine an die Homeo-Sonde (rot) bzw. POU-Homeo-Sonde (blau) (Erklärung siehe Text). Bandensignal der spezifischen Protein-DNA-Komplexe markiert mit Pfeil, Pfeilspitze zeigt nicht gebundene Sonden, andere Signale sind unspezifische Komplexe. Negativkontrollen mit TNT-Lysat aus Proteinproduktion ohne Vorlagen-DNA (Spuren 1, 2, 10 und 11 in C). Sequenzen der verwendeten DNA-Sonden (B) mit vorhergesagten Bindungsmotiven (nach *MatInspector*) in schwarz und deren Kernsequenzen in gelb, beide wurden für jeweilige mutierte Sonde transvertiert. Homeobox-Konsensus TAAT punktiert markiert.

Dlx2a bindet sowohl die Homeo- als auch die POU-Homeo-Sonde spezifisch, wobei die Affinität zu letztgenannter höher erscheint (vgl. rot und blau in Abb. 26-C).

Es wurden weitere im Tel- und Diencephalon exprimierte TFs mit Homeodomäne auf eine Bindung mit der POU-Homeo-Sonde untersucht (siehe Abb. 27). Jedoch konnte bis auf die Positivkontrolle Dlx2a für keinen der ausgewählten Faktoren (Emx2, Otx2, Isl1, Dbx1a, Arx) eine Interaktion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Bindungsselektivität von Pou50 und Dlx2a für das POU-spezifische Homeobox-Motiv.

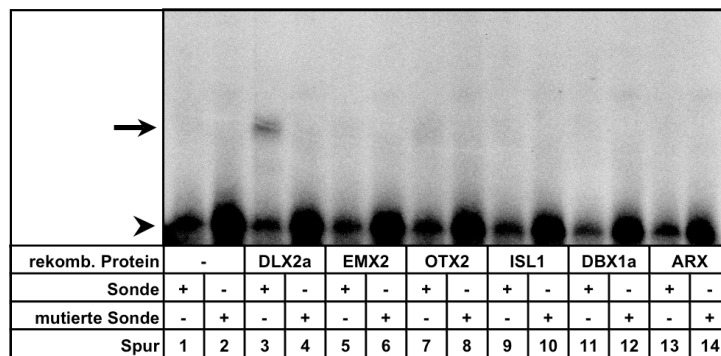


Abb. 27: Assays zur Protein-DNA-Interaktion *in vitro* weiterer tel- und diencephal exprimierter Homeodomänen-TFs mit der POU-Homeo-Sonde. Bandensignal des spezifischen Protein-DNA-Komplexes markiert mit Pfeil, Pfeilspitze zeigt nicht gebundene Sonden. Spur 1 und 2: Negativkontrollen mit TNT-Lysat aus Proteinproduktion ohne Vorlagen-DNA. Spur 3 und 4: Dlx2a-Positivkontrolle.

3.5 Knock down der *lef1*-, *dlx2a*- und *pou50*-Expression

Drei TF-Kandidaten wurden für *knock down*-Experimente ausgewählt: *lef1*, *dlx2a* und *pou50*, weil die Deletionsanalyse in deren Expressionsdomänen Änderungen im 3.1- sowie 8.4-Reportermuster ergab. Die Koinjektion verschiedener Konzentrationen von Morpholino-Oligonukleotiden (MOs) gegen das Startkodon der jeweiligen Kandidaten und der gleichen Menge an *p53*-MO (zur Unterdrückung unspezifischer Nebenwirkungen durch Apoptose) konnte jedoch keinen stichhaltigen Nachweis einer spezifischen Regulation weder der Transgen- noch der endogenen *neurog1*-Expression erbringen. Zwar waren Änderungen im Expressionsmuster von *neurog1* in Embryonen 24 h nach Injektion von 0,8 mM *pou50*- und *p53*-MOs im Vergleich zu nur mit *p53*-MO-injizierten Zygoten sichtbar (vermehrte Expression von *neurog1* im Telencephalon und Minderung im Di- und Rhombencephalon) jedoch blieb die Expression des 3.1-Reporters bis auf eine Minderung im diencephalen Bereich unverändert (nicht gezeigt). Die Injektion eines an mehreren Nukleotidpositionen mutierten MOs zur Kontrolle des *pou50*-spezifischen *knock down*-Effekts wurde bisher nicht durchgeführt, ebenso eine Quantifizierung der Ergebnisse. Die Kontrollinjektion von alleiniger *p53*-MO schließt einerseits eine Störung der Embryonalentwicklung durch die Injektionsprozedur aus, andererseits muss davon ausgegangen werden, dass der *pou50*-MO innerhalb von 24 h eine Vielzahl anderer unbekannter pleiotroper Effekte verursacht (*off-target effects*, siehe z. B. Jackson et al., 2003), welche die Entwicklung der Gehirnanlage beeinflussen. Außerdem konnte in diesem Experiment keine ektopische 3.1-Reporteraktivität im Telencephalon induziert werden, was daher keine soliden Aussagen hinsichtlich einer direkten Kontrolle der *neurog1*-Regulation durch Pou50 erlaubt. Die Injektion von *lef1*- oder

dlx2a-MOs verursachte ebenfalls keine erkennbaren Veränderungen in der Transgenexpression.

3.6 Untersuchung mit Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) ist ein *Streptomyces*-Metabolit, der spezifisch Histondeazetylase (HDAC)-Aktivität sehr schnell, reversibel und kompetitiv inhibiert (HDAC-Klassen I und II) und so die Akkumulation hochacetylierter Histonmoleküle in Zellen verursacht. Aus diesem Grund ist TSA zur Untersuchung der Histonacetylierung *in-vivo* geeignet (Yoshida et al., 1990a+b; Arts et al, 1995).

Weil Repressoren die Transkription von Genen oftmals durch Interaktion mit HDACs stilllegen (Jepsen und Rosenfeld, 2002), wurde die *neurogl*-Expression hinsichtlich einer Abhängigkeit von HDAC-Aktivität untersucht. Besonders die durch LATE-Deletion 6 hervorgerufene ektopische telencephale Reporterexpression in 3.1-Kontext gab Anlass zur Frage, ob der beobachtete Effekt durch die Wegnahme einer spezifischen Repressorbindestelle entsteht, oder ein Artefakt darstellt einer künstlichen, durch die Deletion zufällig konstruierten Aktivatorbindestelle. Dazu wurden transgene Embryonen mit 8.4-Reporter, 3.1del6-Reporter und undeletiertem 3.1-Reporter ab dem 14- bis 16 S-Stadium mit 1 μ M TSA inkubiert und acht Stunden danach deren GFP- sowie endogene *neurogl*- und *pax6a*-Expression mit jener unbehandelter Embryonen mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) verglichen. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen das Ergebnis. Die TSA-Behandlung hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen, unbehandelte und behandelte zeigen auch keine erkennbaren morphologischen Abweichungen. Die Expression des 8.4-Reporters bleibt durch TSA-Inkubation unverändert, ebenso jene des 3.1del6-Reporters und von endogenem *pax6a* (vergleiche mit blauer Pfeilspitze repektive blau punktierte markierte telencephale Domäne der Lateralansichten in Abb. 28-A/A' bzw. B/B' sowie Dorsalansichten in Abb. 29-D/D bzw. -C/C'). Im Gegensatz dazu zeigt die Expression des undeletierten 3.1-Reporters nach TSA-Behandlung – in Übereinstimmung mit der Annahme einer negativen Regulation des LATE-Enhancers durch einen HDAC-abhängigen Repressor – das spezifische Signal einer ektopischen GFP-Domäne im dorsalen Telencephalon (vergleiche Abb. 28-C und -C' bzw. Abb. 29-A und -A'). Dieses GFP-Signal konnte auch in lebenden Tieren vor deren Fixierung beobachtet werden, wobei wegen der

langen Dauer bis zur Bildung des Chromophors kein klares Telencephalonsignal vor sechs Stunden Inkubationszeit erkennbar war (nicht gezeigt).

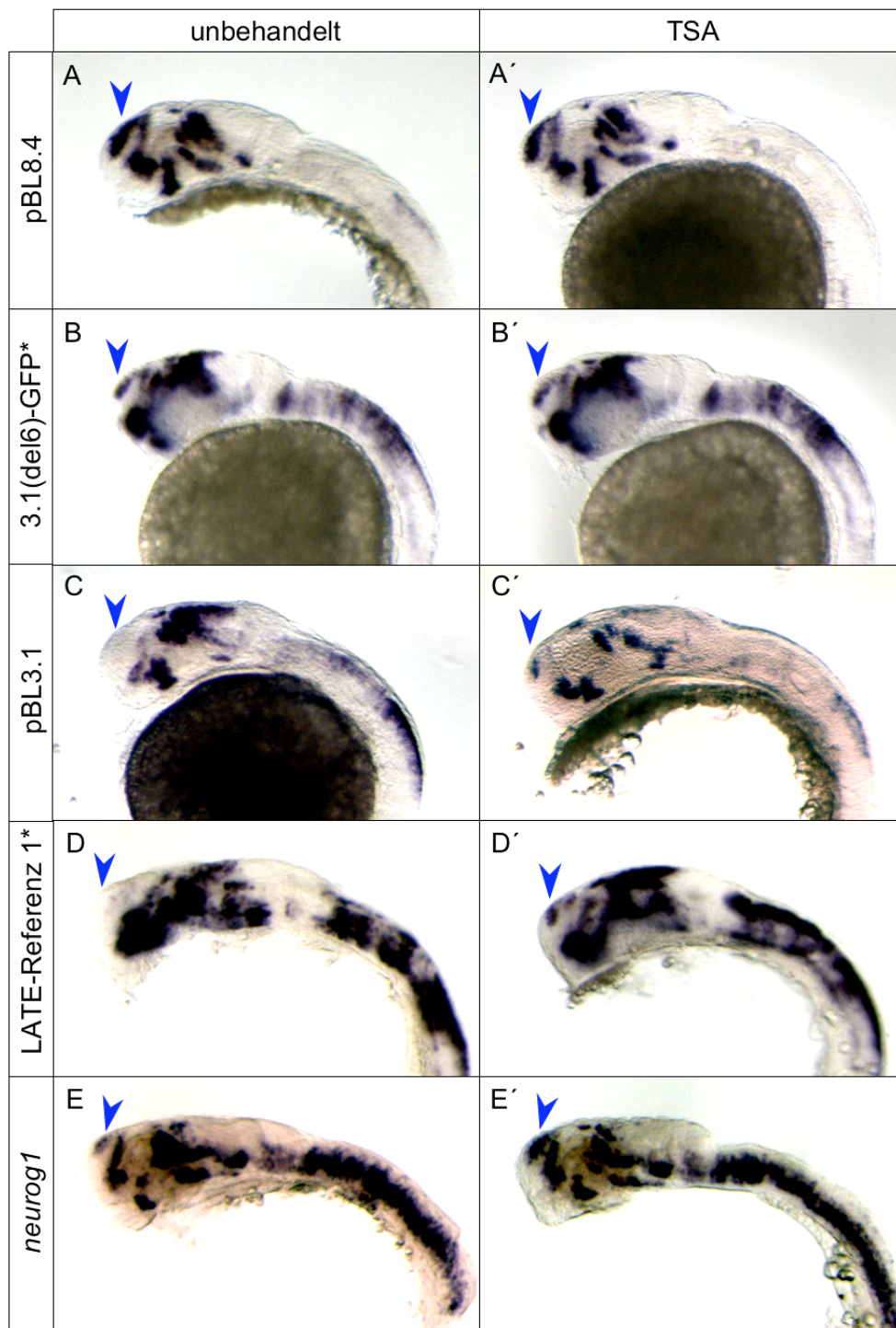


Abb. 28: Untersuchung mit Trichostatin A (TSA). Vergleich transgener Embryonen mit 8.4-Reporter (A/A'), modifiziertem (*) LATE-Deletion 6-Reporter (B/B'), unmodifiziertem LATE-Reporter (C/C') oder modifiziertem (*) LATE-Referenz-Reporter der Deletionsanalyse (D/D') ohne bzw. nach 8 h TSA-Inkubation ab dem 16S-Stadium mit anschließender ISH zur Detektion der Reporteraktivität. Parallel wurde die endogene *neurog1*-Expression überprüft (E/E'). Lateralansichten (anterior = links), telencephaler Gehirnbereich mit blauer Pfeilspitze gekennzeichnet.

Der TSA-Effekt ist ebenfalls in anderen unabhängigen 3.1-Reporterlinien sichtbar, z.B. in der für die Deletionsanalyse modifizierte (undeletierte) LATE-Referenzlinie 1 (siehe Abb. 28-D/D', vergl. Abb. 18-B1, Seite 88), womit ausgeschlossen werden kann, dass der TSA-Effekt durch unbekannte regulatorische Elemente am genomischen Integrationsort des Transgens hervorgerufen wird. Die Ausdehnung der ektopischen telencephalen Domäne ist zwar je nach verwendeter transgener 3.1-Reporterlinie verschieden, was wahrscheinlich auf die ursprüngliche Anzahl der ins Genom integrierten Transgensequenzen je Linie zurückzu-

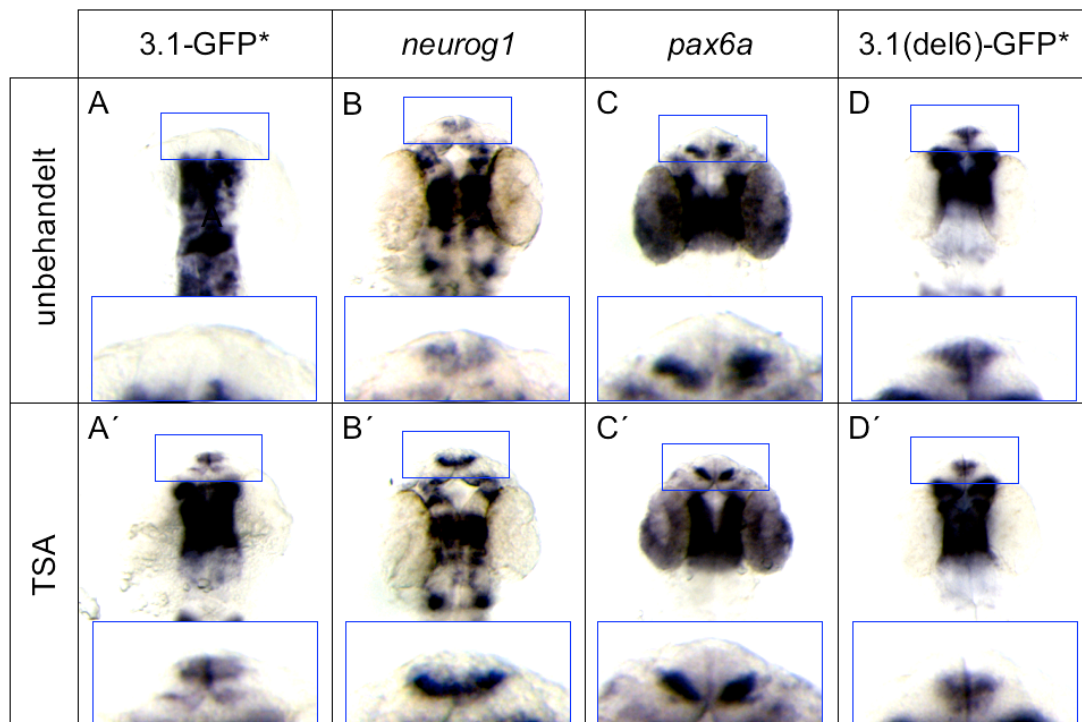


Abb. 29: Untersuchung mit Trichostatin A. Darstellung endogener Gen- und Reporteraktivitäten nach 8 h Inhibitorinkubation ab dem 16S-Stadium. Dorsalansichten der entsprechenden Embryonen aus Abb. 28. Hier zusätzlich der Nachweis endogener *pax6a*-Expression (C/C'). Jeweilige telencephale Expressionsdomäne blau eingerahmt und in Vergrößerung am unteren Bildrand gezeigt.

führen ist und somit lediglich die Expressionsstärke des Transgens reflektiert. Die Domäne ist jedoch im selben dorsalen Telencephalonbereich wie die endogene *neurog1*-Expression und die durch LATE-Deletion 6 hervorgerufene ektopische Domäne lokalisiert (vergleiche Dorsalansichten in Abb. 29-A', -B und -D).

HDAC-Inhibition hat auch Auswirkung auf die endogene *neurog1*-Expression im Telencephalon. Durch TSA-Behandlung zeigt sich dort ein stärkeres *neurog1*-mRNA-Signal als in unbehandelten Embryonen nach gleich langer Chromogenreaktion während der ISH (Abb. 28-E/E' und Abb. 29-A/A'). Die gezeigten Ergebnisse sind bisher nur insofern stichhaltig, als die ektopische telencephalische GFP-Domäne beim 3.1-Reporter durch TSA induziert wurde und bei unbehandelten Embryonen nie beobachtet wurde. Außerdem ist der

Effekt in ab dem 20 S-Stadium behandelten Embryonen nicht mehr sichtbar, und frühere Stadien wurden nicht untersucht. Ein Einfluss der HDAC-Inhibition auf die endogene *neurog1*- und *pax6a*-Expression muss darüberhinaus noch quantifiziert werden, weshalb diese Ergebnisse trotz konstanter experimenteller Bedingungen als vorläufig zu betrachten sind. Dennoch, die hier beobachtete relative Unempfindlichkeit des 8.4- und 3.1(del6)-Reporters sowie der endogenen *pax6a*-Expression gegenüber TSA unterstreicht die Spezifität der HDAC-vermittelten Regulation der LATE-Aktivität und zeigt, dass LATE-Fragment 6, welches eine zwischen weit entfernten Vertebratenspezies vollständig konservierte Bindestelle für POU-Homeodomänen-Faktoren enthält, essentiell ist für die Induktion der ektopischen telencephalen Domäne durch TSA. Umgekehrt bekräftigt dieses Ergebnis die Spezifität des Effekts von LATE-Deletion 6 in der Transgenanalyse und unterstützt die Vermutung, dass wahrscheinlich nur ein einzelner im Telencephalon exprimierter HDAC-abhängiger transkriptioneller Repressor die LATE-Expression direkt durch sequenzspezifische Bindung an LATE-Fragment 6 inhibiert, und aufgrund keiner zusätzlichen ektopischen Aktivitäten durch TSA wahrscheinlich keine anderen HDAC-abhängigen Repressoren in diesen Prozess involviert sind.

4. Diskussion

Während der Embryonalentwicklung von Vertebraten kontrollieren drei hoch konservierte Enhancerelemente die raumzeitliche Expression orthologer *neurog1*-Gene. In niederen Vertebraten (Anamniota) wie dem Zebrafisch wird die Transkription des proneuralen Gens nach Bildung der Neuralplatte durch zwei dieser *cis*-regulatorischen Module gesteuert. Transgenanalysen mit GFP-Reportern konnten zeigen, dass der distal gelegene LSE-Enhancer die *neurog1*-Expression im dorsalen Telencephalon und der mehr proximal lokalisierte LATE-Enhancer im Diencephalon der Gehirnanlage aktiviert (Blader et al., 2003). Pax6, ein an vielen Entwicklungsprozessen beteiligter Transkriptionsfaktor (TF), reguliert hierbei die diencephale *neurog1*-Expression durch direkte Interaktion mit LATE. Es wird vermutet, dass diese Interaktion in höher entwickelten Vertebraten (Amniota) wie der Maus zur Kooption von *neurog1* im lateralen Telencephalon – einem phylogenetisch abgeleiteten Gehirnkompartment, aus welchem der Neocortex hervorgeht und das in Anamniota nicht angelegt ist – entscheidend beigetragen hat. Jedoch müssen andere mit Pax6 kooperierende Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein, einerseits, weil Pax6 allein zur LATE-vermittelten *neurog1*-Aktivierung nicht ausreicht (beispielsweise im Zebrafisch-Telencephalon), andererseits, weil *neurog1* auch unabhängig von Pax6 exprimiert wird (beispielsweise im Zebrafisch-Diencephalon) (Blader et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob und wie weitere TFs in die Regulation der regionsspezifischen *neurog1*-Expression im Diencephalon des Zebrafischs durch Interaktion mit dem LATE-Enhancer involviert sind. Der kombinierte experimentelle Ansatz mittels computergestützter Sequenzanalyse, Mutationsanalyse mit Reportertransgenen und Koexpressionsanalyse potentieller TF-Kandidaten weist auf eine Beteiligung von Homeodomänen-TFs der POU-Klasse an der LATE-vermittelten Regulation von *neurog1* hin. Es wurde erkannt, dass LATE nicht nur diencephale, sondern auch telencephale Aspekte der *neurog1*-Expression beeinflusst. Die präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass LATE ein direktes Ziel nicht nur positiv, sondern auch negativ regulierender Signale darstellt.

***In-silico*-Vorhersage von TF-Bindestellen in LATE**

Eine computergestützte Analyse der LATE-Region erlaubte zunächst die Eingrenzung mutmaßlich wichtiger TF-Bindestellen, die hauptsächlich in den am höchsten konservierten Abschnitten lokalisiert sind. Dabei wurden verschiedene Algorithmen angewandt, um

möglichst verschiedene Parameter bei der Detektion potentieller Motive abzudecken. Von diesen sollte *MatInspector* allein durch Analyse der Primärsequenz, unter Verwendung von in der *TRANSFAC*-Datenbank gespeicherten positionsspezifisch gewichteten Matrizen, potentielle TF-Bindestellen auffinden. Schon dieser Algorithmus lokalisierte die meisten Bindestellen in konservierten LATE-Abschnitten, was am einfachsten damit erklärt werden kann, dass der überwiegende Teil der Matrizen aus Mensch- und Maus-Daten abgeleitet ist. Die beobachtete Häufung an potentiellen Bindestellen in diesen Abschnitten lässt daher keinen Schluss zu betreffend einer funktionellen Relevanz konservierter Sequenzen. Einzig die positive Identifikation der funktionell annotierten Pax6-Bindestelle, gerade deren Sequenz nicht in dem am höchsten konservierten Bereich liegt, macht *MatInspector* gegenüber anderen vergleichbaren Suchprogrammen (*Patch*, *Alibaba* usw.) überlegen. Die beiden zusätzlich verwendeten Algorithmen basieren bei der Bewertung potentiell regulatorischer Signifikanz von Motiven nun eindeutig auf dem Konservationskriterium, jedoch betrachtet *WeederH* die relative Position von Motiven in homologen Genloci und *Footprinter* außerdem deren evolutionäre Distanz, was die weitere Eingrenzung mutmaßlich regulatorischer Bereiche in LATE erlaubte. Auffallend bei der *Footprinter*-Analyse war die Beobachtung, dass einzelne Motive bzw. Motivblöcke in *Xenopus* und Zebrafisch im Vergleich zu Mensch, Maus und Huhn rearrangiert sind und beim Zebrafisch drei Kopien eines Extramotivs angezeigt werden (blau und rot umrahmt dargestellt bzw. Sterne in Abb. 10-A). Dies reflektiert wahrscheinlich die evolutionäre Distanz der homologen LATE-Sequenzen. Daneben kann dies als Hinweis gewertet werden, dass der der Enhancer einen gewissen Grad an funktioneller Flexibilität und/oder Redundanz besitzt, wodurch Verlust und Rearrangements einzelner Sequenzmotive während der Evolution keinen wesentlichen Einfluss auf prinzipielle Enhancerfunktion ausüben, und bestätigt somit Reporterexperimente von Blader et al. (2004), wo die homologe LATE-Sequenz aus der Maus im Zebrafischembryo ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie Zebrafisch-LATE im Diencephalon erzeugt. Jedoch bleibt die Frage offen, ob die verlorenen und rearrangierten Motive neutral oder funktional sind und inwiefern Sequenzkonservierung Funktionalität impliziert.

Interessanterweise gibt der *EvoFold*-Algorithmus in LATE einen Abschnitt an, der ein kurzes RNA-Molekül mit typischer Stamm-Schleifen-Struktur codieren könnte (Abb. 8-A). Demnach bildeten die beiden längsten hoch konservierten Abschnitte den Stamm aus gepaarten Nukleotiden und der dazwischen liegende, weniger konservierte den Schleifen-Abschnitt der RNA. Die biologische Bedeutung solcher nicht für Proteine codierende RNAs

(sog. ncRNAs) ist seit einigen Jahren ein intensiv diskutiertes Thema (siehe z.B. Hüttenhofer et al., 2005). Hier durchgeführte (aber bisher unerwähnte) Experimente zum Nachweis eines die vorhergesagte Sequenz enthaltenden Transkripts in Präparationen von Zebrafisch-Gesamt-RNA mittels reverser-Transkriptase-PCR blieben jedoch erfolglos. Außerdem stört eine T/C-Einzelsubstitution in Zebrafisch-LATE die Bildung einer solchen RNA-Struktur (Abb. 8-B). Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit einer Regulation von *neurog1* durch ncRNAs nicht weitergehend untersucht.

Computerprogramme zur Vorhersage von TF-Bindestellen und regulatorischer Motive liefern je nach zuvor definierter Stringenz der Analyseparameter entweder eine Vielzahl falsch-positiver Ergebnisse oder unterschätzen das regulatorische Potential von DNA-Sequenzen. Die Resultate einer *in-silico*-Analyse erlauben daher niemals Rückschlüsse auf funktionelle Relevanz *in-vivo*. In der hier durchgeführten Analyse wurde lediglich versucht, die LATE-Region auf eine Anzahl mutmaßlich wichtiger Unterabschnitte und damit einhergehend die Anzahl potentiell interagierender TFs zu reduzieren.

***In-vivo*-Mutationsanalyse von LATE**

Parallel dazu erfolgte die *in-vivo*-Untersuchung auf relevante Unterabschnitte der LATE-Region mittels Mutationsanalyse durch serielle Deletion von LATE-Fragmenten in GFP-Reportertransgenen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass LATE nicht nur aktivierende, sondern auch reprimierende Funktion besitzt. Der Ausfall diencephaler GFP-Expression durch Deletion desjenigen LATE-Abschnitts im 3.1-Reporter, welcher die experimentell annotierte Pax6-Bindestelle enthält (Deletion 5), bestätigt die Ergebnisse von Blader et al. (2004). Überraschenderweise zeigt das GFP-Muster nach Deletion dieses Fragments im 8.4-Reporter eine signifikante Reduktion im Telencephalon, was die Frage aufwirft, ob LATE ausschließlich an der Regulation diencephaler Gehirnregionen beteiligt ist. Überdies verursacht Deletion des benachbarten Fragments (Deletion 6) im 3.1-Kontext genau den gegenteiligen Effekt, nämlich ektopische Reporteraktivität im dorsalen Telencephalon, in der selben Domäne, deren Expression vom LSE-Enhancer aktiviert wird. Auch im 8.4-Kontext wird mit der Abwesenheit des gerade stromabwärts der Pax6-Bindestelle gelegenen LATE-Abschnitts die telencephalische Expression des Reportertransgens verstärkt. Beide Beobachtungen lassen vermuten, dass dieser 40 bp lange LATE-Abschnitt eine Sequenz beinhaltet, welche die telencephale Reporterexpression unterdrückt. Es kann eingewendet werden, dass die Effekte durch Artefakte entstehen, wenn die die Deletionsstelle

flankierenden Nukleotide eine neue regulatorisch aktive Sequenz bilden. Eine Überprüfung der jeweiligen modifizierten Sequenzen mit *MatInspector* lieferte jedoch keinen Hinweis auf die künstliche Schaffung neuer potentieller Bindestellen für gehirnspezifische TFs (nicht gezeigt). Absolute Gewissheit könnte die Analyse von Reportertransgenen liefern, bei denen die jeweiligen Fragmente nicht einfach deletiert, sondern funktionell relevante Nukleotide durch Punktmutationen ermittelt würden.

Aufgrund der hohen Komplexität des aus vielen Domänen zusammengesetzten Expressionsmusters wurde, anstatt der Analyse transienter und mosaiker Expressionsmuster in mit Reportern injizierten Embryonen, der experimentelle Ansatz zur Erzeugung stabil transgener Linien gewählt. Den Ergebnissen von Blader et al. (2004) zufolge variiere die Reporterexpression in unabhängigen Linien zwar hinsichtlich ihrer Intensität, signifikante Abweichungen im Expressionsmuster aufgrund von Positionseffekten am genomischen Integrationsort von Transgenen seien aber nicht beobachtet worden. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Transgenanalyse im Rahmen dieser Arbeit durch den unerwartet hohen Grad an Inkonsistenz von Expressionsmustern sehr erschwert wurde, besonders bei den 3.1-Reportern. Hier stimmen nicht nur die Intensitäten, sondern auch die räumliche Anordnung der GFP-Expressionsdomänen in vielen Fällen nicht überein, und die Ausbeute an transgenen Linien war in vielen Fällen zu gering, um vergleichende Analysen zuzulassen. Dieses Problem konnte auch durch Umstellung vom Meganuklease- auf das *tol2*-Transgenesesystem nicht befriedigend gelöst werden. Anders hingegen bei den größeren 8.4-Konstrukten: Dort war nicht nur die Transmissionsrate injizierter *tol2*-Konstrukte und damit die Ausbeute an transgenen Linien bedeutend höher, auch die jeweils erhaltenen GFP-Muster wiesen einheitlichere Intensität und Komposition ihrer Expressionsdomänen auf. Es scheint daher, dass die Konsistenz der Transgenexpression vom Umfang der getesteten regulatorischen Sequenz abhängt. Längere 8.4-Transgene unterliegen wahrscheinlich geringeren regulatorischen Einflüssen in der Umgebung ihrer zufälligen genomischen Integrationsposition, weil sie zusätzliche *cis*-Elemente (z.B. Insulatoren) enthalten, die sie gegen Regulationsmechanismen am Integrationsort, wie etwa dort aktive Enhancer oder Silencer oder Mechanismen zur Modifikation des lokalen Chromatinstatus, abschirmen (Goetze et al., 2005; West et al., 2002; Wilson et al., 1990). Allein die Anzahl der ins Genom integrierten Transgene kann die Stärke des GFP-Signals schon beeinflussen, und eine Bestimmung der Zahl an Transgeninsertionen in den erzeugten Linien mittels Southernblot-Analyse wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hinzu kommt, dass vom Zeitpunkt der Transkriptionsinitiation bis zur Bildung sichtbaren GFP-Chromophors etwa zwei bis vier

Stunden vergehen und GFP-Protein eine relativ lange Halbwertszeit (ebenfalls mehrere Stunden) besitzt (Zimmer, 2002). Spezifische und wahrscheinlich nur subtile Änderungen in der Reporterexpression durch Mutation einzelner TF-Bindestellen können deshalb im lebenden Embryo nicht wahrgenommen werden. Angewandte Techniken zum GFP-Nachweis durch Antikörperfärbung bzw. *In-situ*-Hybridisierung mit anschließender digitaler Bildbearbeitung ermöglichen zwar eine maximale Signalausbeute und Darstellung der momentanen Reporteraktivität im Embryo, jedoch erst nach dessen Fixierung.

Die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen zur Bewertung von Deletionseffekten beruhen daher auf dem hinreichend stringenten Konsistenzkriterium, wonach pro Reporterkonstrukt von drei unabhängigen Linien mindestens zwei hinsichtlich einer Änderung im Expressionsmuster übereinstimmen müssen. Für die Mutationsanalyse im 3.1-Kontext erfüllen das Referenzkonstrukt sowie die Deletionen 5 und 6 dieses Kriterium. Die entsprechende Analyse im 8.4-Kontext lieferte zwar viele transgene Linien, aber gerade deren große Anzahl machte die Entscheidung schwierig, welche davon für die Analyse ausgewählt und weitergezüchtet werden sollten, auch wiederum aufgrund der Tatsache, dass schon Stunden zuvor gebildete GFP-Signale Änderungen der Reporteraktivität im sich vergleichsweise schnell entwickelnden Embryo zum Zeitpunkt der Beobachtung verdecken.

Bemerkenswert erscheint die Beobachtung, dass die Deletion der ganzen LATE-Region (hier durch Austausch mit einem 36 bp langen Adapternukleotid) im 8.4-Transgen kaum zur Reduktion der Reporterexpression im Diencephalon führt (Abb. 21). Besonders basale Domänen bleiben erhalten, und auch in alaren Domänen sind GFP-mRNA-Transkripte nahezu unvermindert detektierbar, was mit den Daten von Blader et al. (2004) nicht im Einklang steht. Wieder können Positionseffekte dafür verantwortlich sein, wobei unklar bleibt, ob diese die Reporteraktivität eher vermindern als verstärken. Interessanterweise zeigen alle 8.4-Reporter im Bulbus olfactorius, wo keine *neurogl1*-Transkripte nachweisbar sind, ektopische Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass 8.4 kbp stromaufwärts (5') des Startkodons gelegene DNA-Sequenz für eine exakte Repräsentation endogener *neurogl1*-Aktivität nicht ausreichen und weitere *cis*-regulatorische Elemente identifiziert werden müssen. Möglicherweise sind diese stromabwärts (3') der proteinkodierenden Sequenz lokalisiert, z.B. in der hoch konservierten 3'-untranslatierten Region (Blader et al., 2003), oder jenseits davon in weit entfernten Regionen. Auf der BAC (*bacterial artificial chromosomes*)-Technologie basierende Transgenanalysen könnten zur Klärung dieser Frage beitragen (Jessen et al., 1998; Yang et al., 2006).

Desweiteren ist fraglich, welche der beiden hier angewandten Methoden zum Nachweis der Transgenaktivität geeigneter ist. Wegen der hohen Immunreaktivität des GFP-Antikörpers, und weil die Färbung im Gegensatz zur Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH) nicht von einer Enzym-vermittelten Signalamplifikationsreaktion abhängt, wurde entschieden, alle verschiedenen GFP-Muster nach GFP-Antikörperfärbung miteinander zu vergleichen. Das brachte den Vorteil mit sich, nicht alle verschiedenen Linien gleichzeitig färben zu müssen. Hingegen ist das Zeitfenster für die Erfassung der Transgenaktivität mit Antikörperfärbung aufgrund der erwähnten biochemischen Eigenschaften von GFP wesentlich größer als mit FISH. Deshalb wurde erwartet, dass der GFP-Antikörper auch Domänen färbt, in denen schon keine GFP-Transkription mehr stattfindet. Ein Vergleich von GFP-Signalen bei der 8.4-Mutationsanalyse nach beiden Färbemethoden ergab allerdings teilweise widersprüchliche Ergebnisse, mal war das GFP-Protein-Signal stärker als das entsprechende mRNA-Signal, mal umgekehrt. Es kann nur spekuliert werden, ob hier prä-/post-translationelle Modifikationen von GFP, methodische Fehler oder doch eher wieder Position und Anzahl der Transgenintegration ursächlich sind. Trotzdem kann das räumlich fast unveränderte Expressionsmuster des 8.4-Reporters nach Deletion von LATE im Diencephalon als Indiz gewertet werden, dass andere noch nicht bekannte Sequenzen den LATE-Verlust (teilweise) kompensieren können. Zumindest erscheint unwahrscheinlich, dass die 36 bp des Adapternukleotids (siehe 2.1.9.1) dazu in der Lage sind.

In zukünftigen Mutationsanalysen sollten Reporterkonstrukte folgendermaßen modifiziert werden, um subtile Effekte der stabilen Transgenexpression in lebenden Embryonen verlässlicher und schneller detektierbar zu machen: Erstens sollte das Transgen, neben *tol2*-Stellen zur Steigerung der Transmissionsrate, von Insulatorsequenzen (z.B. β -Globin 5'HS4-Insulator aus dem Huhn) flankiert werden, um Positionseffekte am genomischen Integrationsort und damit Variabilitäten in Expressionsmustern zu reduzieren (Potts et al., 2000). Zweitens muss die für die störende Epidermisexpression verantwortliche Sequenz im *tol2*-Vektor lokalisiert und entfernt werden. Das zu stabile bzw. zu langsam gebildete Reporterprotein sollte drittens durch eine destabilisierte oder photokonvertierbare GFP-Variante ausgetauscht werden, um kurzfristige und geringe Expressionsänderungen bereits *in vivo* feststellen zu können (Ando et al., 2002; Li et al., 1998; Vogt et al., 2008).

Viertens würde eine Quantifizierung der Reporteraktivität durch Kombination des *tol2*-Transgenesesystems mit dem *Cre/lox*-Rekombinationssystem ermöglicht. Hierbei könnte zunächst *tol2*-vermittelt eine transgene Linie erzeugt werden, die eine Einzelkopie des nicht-

mutierten Referenztransgens stabil exprimiert und die zu mutierende Sequenz von *lox*-Stellen flankiert („gefloxt“) ist. Im nächsten Schritt würden Zygoten dieser Linie mit Cre-mRNA sowie gefloxter mutierter Sequenz (enthalten in einem Donorvektor) koinjiziert. Die aktivierte Cre-Rekombinase katalysierte hierbei den Austausch gefloxter Transgen-DNA, und die genomische Integrationsposition des Reporters bliebe unverändert. In der nächsten Generation könnten dann schließlich Embryonen mit abweichendem Reportermuster detektiert, relative GFP-Intensitäten quantifiziert und Ergebnisse unabhängig von Positionseffekten interpretiert werden. Die Methode zum Cre/*lox*-vermittelten Austausch von Transgenen wurde bereits in *Drosophila* etabliert und kürzlich im Zebrafisch ansatzweise erfolgreich angewandt (Oberstein et al., 2005; Hans et al., 2009).

Trotz aller technischen Schwierigkeiten weisen die Ergebnisse der Mutationsanalyse klar auf eine Funktion von LATE bei der Telencephalonexpression hin. Es kann der Verdacht geäußert werden, dass LATE und LSE kooperativ an diesem Prozess beteiligt sind, weil im 8.4-Kontext die Deletion von LATE-Fragment 5, das die funktionelle Pax6-Bindestelle enthält, zur Reduktion der GFP-Aktivität in der LSE-abhängigen Telencephalondomäne führt; umgekehrt verursacht Deletion des benachbarten Fragments 6 im 3.1-Kontext ektopische und im 8.4-Kontext eine Expansion der Reporteraktivität im Telencephalon. Demnach besitzt Fragment 6 reprimierenden Charakter und seine Abwesenheit führt sozusagen zur „Derepression“ telencephaler Transgenaktivität. Es ist jedoch ungewiss, ob Fragment 6 allein ausreichend ist für die Repression telencephaler Transgenaktivität. Zur Klärung dieser Frage könnte Fragment 6 mit anderen Telencephalon-Enhancern gekoppelt werden (z.B. LSE).

Wie Ergebnisse der Koexpressionsanalyse zeigen (Abb. 22-24), rekapituliert der dereprimierte 3.1-Reporter endogene *neurog1*-Expression im Telencephalon und scheint überdies diencephale Domänen noch besser zu repräsentieren als der unveränderte 3.1-Reporter. Pax6 ist möglicherweise auch an diesem Effekt beteiligt, weil seine mittels FISH lokalisierte telencephalische Expressionsdomäne sehr genau mit derjenigen des dereprimierten 8.4-Reporters übereinstimmt, und zwar noch mehr als beim dereprimierten 3.1-Transgen, wo nur wenig endogene Pax6-Signale mit GFP im Telencephalon kolokalisieren. Denkbar ist, dass ein mit LATE-Fragment 6 interagierender TF die Fähigkeit von Pax6 zur Aktivierung telencephaler *neurog1*- bzw. Reporterexpression inhibiert.

In-situ-Analyse

Die für die Koexpressionsanalyse entwickelte FISH-Methode hat sich als sehr geeignet erwiesen, gleichzeitig die Aktivitäten eines Transgens und eines beliebigen endogenen TFs als Fluoreszenzsignale darzustellen, was die Untersuchung beider Expressionsmuster im virtuellen dreidimensionalen Raum erlaubt. Die computergestützte Zerlegung digitalisierter Expressionsdomänen mittels frei wählbarer Schnittebenen bietet den Vorteil, kolokalisierte Signale schnell zu erfassen und zu dokumentieren. Diese Technik ist jedoch herkömmlichen chromogenbasierten Methoden insofern unterlegen, als dass mehr Aufwand erforderlich ist, die Signale spezifischen Geweben zuzuordnen, was bei der lichtmikroskopischen Betrachtung BCIP/NBT-gefärbter Embryonen leichter möglich ist.

Gleichwohl sind die Expressionsdomänen der meisten hier überprüften TFs bereits sehr genau bekannt und viele dienen als Marker bestimmter Zell- und Gewebetypen (Diez del Corral und Storey, 2001). Damit gelang zumindest die Zuordnung diencephaler Expressionsdomänen des LATE-Reporters auf Basis des Prosomermodells nach Rubenstein et al. (2003). Ein anderer Nachteil der FISH-Methode liegt in der Chemie zur Erzeugung des CY3-Signals begründet, weil hochmolekulare fluorochromgekoppelte Tyramidpräzipitate kovalent an Tyrosinreste benachbarter Proteine binden, transgenes GFP eingeschlossen, was zur Maskierung des GFP-Signals führen und so die Darstellung der Reporteraktivität verhindern kann, jedoch lässt die Kontrolle der gleichzeitigen Entwicklung der Signale von GFP-mRNA und -Protein wesentliche Übereinstimmung in beiden Mustern erkennen (Abb. 15). Das endogene *neurog1*-Muster zeigt eine sehr starke Ähnlichkeit zur Domänenkomposition seiner GFP-Reporter, deckt sich mit diesen allerdings nicht exakt, weil *neurog1*-mRNA sehr wahrscheinlich eine andere Halbwertszeit als GFP-mRNA besitzt. Gleichwohl ist davon auszugehen, dass die *neurog1*-Aktivität durch die Reportertransgene akkurat repräsentiert wird. Überraschenderweise passt das Expressionsmuster des dereprimierten 3.1-Reporters bis auf Abweichungen im Telencephalon besser zum endogenen *neurog1*-Muster als jenes sowohl des undeletierten 3.1- wie auch 8.4-Reporters (vergl. Abb. 22-D und Abb. 14-A3 bzw. -B3). Am einfachsten lässt sich diese Beobachtung wieder mit Positionseffekten bei der Transgenexpression begründen. Methodisch noch besser wäre daher der Abgleich beider Aktivitäten auf Transkriptebene, d.h. der gleichzeitige Nachweis der mRNA von sowohl *neurog1* als auch Reportertransgen mittels Fluorochromen, aber Versuche hinsichtlich einer Erweiterung des FISH-Protokolls zur simultanen Darstellung beider mRNA-Signale blieben hier bisher erfolglos, weil das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei der Entwicklung des

zweiten Fluorochroms (CY5-Tyramid) minimal und daher ein spezifisches Signal kaum detektierbar war. Die Entwicklung einer robusten Methode erfordert wahrscheinlich die Optimierung im Design von RNA-Sonden (z.B. Biotin-Markierung anstatt Digoxigenin oder Fluorescein), damit einhergehend der Einsatz anderer Antikörper mit eventuell von Peroxidase verschiedenen Enzymkonjugaten zur Umsetzung anderer Fluorochromsubstrate.

Am besten wäre jedoch ein Nachweis der TF-Expression auf Proteinebene durch den Einsatz spezifischer Antikörper verbunden mit der simultanen Darstellung der Reporter- bzw. *neurog1*-Expression auf Transkriptebeine, wodurch der zeitlich reale Aktivierungsablauf reflektiert und dargestellt würde. Die Auswahl an TF-spezifischen Antikörpern für den Zebrafisch ist allerdings äußerst limitiert.

Bei der hier durchgeführten Koexpressionsanalyse ausgewählter TFs mit dem 3.1-Reporter wurden oftmals weitestgehend komplementäre Expressionsmuster festgestellt, beispielsweise bei den *her*- und *sox*-Genen. Wie in Abschnitt 1.3 erläutert gelten *her*-Gene beim Prozess der lateralen Inhibition als antineurale Gegenspieler proneuraler Gene, welche beide ihre Expression gegenseitig unterdrücken, was mit der Komplementarität ihrer Aktivitätsmuster im Einklang steht und außerdem die Tauglichkeit der FISH-Methode unterstützt. Ähnliches kann über die *sox*-Gene gesagt werden: *SoxB1*-Gene (*Sox1-3*) hemmen proneurale Genaktivität, damit die Neurogenese und werden darum für die Erhaltung neuronaler Stammzeleigenschaften benötigt (Bylund et al., 2003). *Sox21* (ein *SoxB2*-Gen) dagegen wird durch proneurale Faktoren aktiviert, reprimiert sodann *Sox3* und fördert damit neuronale Differenzierung (Sandberg et al., 2005). Unabhängig von Differenzierungsmechanismen ist *Sox11* (*SoxC*-Gruppe) nötig für die Ausbildung pan-neuronaler Merkmale und aktiviert z.B. *Tuj1* und *MAP2* (Bergsland et al., 2006). Diese Befunde erklären nicht nur die komplementären Expressionsmuster zum proneurale Aktivität repräsentierenden 3.1-Reporter, sie machen ebenfalls die komplementären Muster der hier untersuchten *Sox*-Orthologe untereinander verständlich (Abb. 16). Mehrere Bindestellen werden für *Sox*-Proteine vorhergesagt, aber bezüglich Bindestellen für bHLH-Faktoren macht das Programm *MatInspector* keine Angaben, wobei eine manuelle Durchsicht dennoch zwei E-Box-Konsensussequenzen identifizieren konnte. Trotzdem zeigen Deletionen von LATE-Fragmenten im 3.1-Reporter, welche die jeweiligen Stellen enthalten, keine konsistenten Effekte, weshalb hier bis auf weiteres davon ausgegangen werden muss, dass diese beiden Klassen wichtiger DNA-bindender Entwicklungsregulatoren nicht an der Regulation von *neurog1* via LATE beteiligt sind. An dieser Stelle sollte mit Hinweis auf die angewandte

Mutationsstrategie einer einfachen Deletionsserie entlang der Enhancersequenz die Möglichkeit einer funktionellen Redundanz von Bindestellen als Grund für den Mangel an beobachteten Mutationseffekten nicht unerwähnt bleiben. Es liegt nahe, bezüglich der restlichen in dieser Arbeit untersuchten und überwiegend nicht mit dem 3.1-Reporter koexprimierten TFs in die gleiche Richtung zu argumentieren, dahingehend, dass diese vermutlich größtenteils nicht an Determinations-, sondern an Differenzierungsprozessen beteiligt sind (z.B. *gsx1*, *onecut1* oder *lhx5*) und darum in der transkriptionellen Aktivierungskaskade hinter *neurog1* liegen, oder dass sie die Expression von *neurog1* zwar regulieren, aber auf indirektem Weg etwa durch Aktivierung antineuraler Faktoren oder Beeinflussung autoregulatorischer Rückkopplungsschleifen zur Aufrechterhaltung proneuraler Genaktivität.

Es gibt neben dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz über koexprimierte TF-Kandidaten andere experimentelle Strategien zur Identifikation potentiell mit spezifischen DNA-Sequenzen interagierender TFs. Eine vielversprechende Methode beruht auf einem modifizierten *yeast two-hybrid*-Screeningsystem, bei dem eine Bibliothek genomischer DNA-Fragmente im Hochdurchsatzverfahren auf Interaktionen mit ausgewählten TFs getestet werden kann, um deren Bindestellen und Zielgene aufzuspüren (Zeng et al., 2008). Im Prinzip besteht die Möglichkeit, dieses Verfahren umzukehren und eine TF-Bibliothek auf Interaktion mit definierten DNA-Sequenzen zu überprüfen. Dieser experimentelle Ansatz wird momentan im Strähle-Labor untersucht. Bisher konnten in der dort vorhandenen Bibliothek von 1939 im Zebrafischgenom bioinformatisch vorhergesagten transkriptionellen Regulatoren 668 verschiedene TF identifiziert werden, von denen rund 200 gewebspezifische Expressionsmuster im einen Tag alten Embryo aufweisen, wobei viele TFs in der Gehirn-anlage exprimiert und teilweise noch nicht beschrieben sind (O. Armant, pers. Mitteilung). Es wäre daher sinnvoll, diese TFs ebenso einer Koexpressionsanalyse mit *neurog1*-Reportern zu unterziehen, um deren Expressionsdomänen genau zu bestimmen und untereinander vergleichen zu können, wobei die synchrone Visualisierung der Aktivitäten von mindestens zwei TFs, wie oben erläutert, sehr hilfreich wäre. Auf diese Weise könnte ein virtueller „3D-Atlas“ zur Veranschaulichung multipler TF-Aktivitäten zu einem (oder mehreren) definierten Zeitpunkt(en) während der Embryonalentwicklung erstellt werden. Solch eine synthetisch-integrative Betrachtungsweise würde einen großen Beitrag zum Verständnis von Struktur und Logik genregulatorischer Netzwerke leisten.

Indizien für eine Beteiligung von POU-HD-Faktoren

Gestützt auf Ergebnisse der LATE-Mutationsanalyse kann gesagt werden, dass mindestens zwei der hier ausgewählten TFs an der LATE-vermittelten, regionsspezifischen Expression von *neurog1* direkt beteiligt sind: zum einen das bereits bekannte Paired-Homeodomänen-Protein Pax6 als diencephaler Aktivator sowie zum anderen ein POU-Homeodomänen (POU-HD)-TF, möglicherweise Pou50 oder ein paraloger Faktor, als telencephaler Repressor. Einige Befunde sprechen für die Beteiligung eines POU-HD-Faktors:

Erstens stimmt die telencephale Expressionsdomäne von *pou50* mit derjenigen des dereprimierten 3.1-Reporters fast genau überein (Abb. 22-F-F''). Zweitens tritt die ektopische Reporteraktivität etwa zum selben Zeitpunkt auf wie die *pou50*-Expression in diesem Bereich (Hauptmann und Gerster, 1996).

Drittens bindet rekombinantes Pou50-Protein spezifisch die in LATE-Fragment 6 vorhergesagte POU-HD-Bindestelle *in-vitro* (Abb. 26). Dieses Ergebnis erscheint besonders signifikant, weil außer *dlx2a*, welches aber nicht im besagten Telencephalonbereich exprimiert ist, kein weiteres hier getestetes Homeodomänen-Protein die prinzipielle Fähigkeit zur Bindung dieses Motivs besitzt. Deshalb kann angenommen werden, dass vor allem strukturell konservierte POU-HD-Proteine mit diesem DNA-Motiv interagieren. ZFIN gibt 18 verschiedene Faktoren mit POU-Domäne an, von denen mindestens vier (*pou12*, *pou23*, *pou47* und *pou50*) im Telencephalon exprimiert sind und überhaupt sehr ähnliche Expressionsmuster aufweisen, was einen hohen Grad an funktioneller Redundanz vermuten lässt. Ein kombinierter *knock down* könnte zeigen, welcher der Faktoren funktionelle Relevanz besitzt. Jedoch haben MO-Injektionen in Zygoten wie die Analyse von Mutanten u.a. den Nachteil, dass der Verlust einer oder mehrerer Genfunktionen zeitlich und räumlich nicht kontrollierbar (konditional) ist, was eine Analyse der Funktion von Entwicklungsregulatoren, welche oftmals zu verschiedenen Zeiten in unterschiedlichen Geweben andere Aufgaben übernehmen, sehr erschwert. Konditionale *knock-out*-Techniken zur induzierbaren Inaktivierung der Genaktivität auf Basis des bereits erwähnten Cre/*lox*-Rekombinationssystems sind in der Maus seit geraumer Zeit etabliert (Kühn et al., 1995), und erst kürzlich gelang dessen modifizierte Anwendung auch in *Drosophila* (Choi et al., 2009). Diese Technik wird im Zebrafisch in sehr naher Zukunft ebenfalls verfügbar sein, weil die beiden Hauptprobleme, nämlich die gezielte Einführung von *lox*-Stellen ins Genom mittels *zinc-finger*-Nukleasen und die raumzeitlich steuerbare Cre-Expression, prinzipiell gelöst sind (Doyon et al., 2008; Meng et al., 2008; Hans et al., 2009).

Viertens zeigt eine Studie in der Maus, dass ein mit Pou50 eng verwandter TF (Brn3a = Pou4f1) die Expression proneuraler Gene (Math3 und NeuroD1) durch direkte Bindung in deren Promotoren reprimiert, dass die differentielle Regulation zahlreicher weiterer Zielgenpromotoren durch Brn3a von deren Histonazetylierungsgrad abhängt, wobei azetylierte offenbar bevorzugt von Brn3a besetzt werden, und darüberhinaus wohl eine Korrelation zum Grad an Sequenzkonservierung von Brn3a-Bindestellen besteht (Lanier et al., 2007). Dieser Zusammenhang passt genau in das sich abzeichnende Bild einer direkten negativen Regulation von *neurog1* durch Interaktion eines POU-HD-TFs mit der völlig konservierten Bindestelle in LATE-Fragment 6. Inwiefern epigenetische Regulationsmechanismen an der *neurog1*-Expression beteiligt sind, wurde durch Behandlung von Zebrafischembryonen mit Trichostatin A (TSA), einem potenten Histondeazetylase (HDAC)-Inhibitor, untersucht.

Einfluss des Chromatinstatus auf die LATE-abhängige *neurog1*-Expression

Frühere Studien im Zebrafisch belegen den maßgeblichen und übergeordneten Einfluss der Chromatinarchitektur auf die Exprimierbarkeit von Genen und damit auf die Identität und das Schicksal von Zellen sowie deren Prädisposition für externe Signale: Beispielsweise fördert HDAC1 die Neurogenese in der Retina durch Hemmung des Notch-Signalwegs und der Expression dessen Zielgene, u.a. des antineuralen Gens *her4*, sowie durch Hemmung des WNT-Signalwegs, wodurch die Transkription von WNT-Zielgenen (*cyclin D1* und *cmyc*) inhibiert, die Beendigung des Zellzyklus gefördert und die Anzahl differenzierender retinaler Neurone gesteigert wird (Yamaguchi et al., 2005). HDAC1 kontrolliert auch die SHH-abhängige Differenzierung von Motorneuronen und Oligodendrozyten im Rhombencephalon nicht nur des Zebrafischs (Cunliffe, 2004; Cunliffe und Casaccia-Bonnel, 2006), sondern auch der Ratte (Shen et al., 2005). Die erwähnten HDAC1-Funktionen wurden durch Analyse von *hdac1*-Mutanten ermittelt, wobei HDAC1 der HDAC-Klasse I angehört (de Ruijter et al., 2003). TSA verursacht zwar die relativ unspezifische Inhibition von Enzymen der HDAC-Klassen I und II, dafür erlaubt TSA-Behandlung die zeitlich flexible Analyse transkriptioneller Regulationsprozesse an Zebrafischembryonen zu späteren Entwicklungsstadien, was einen Einfluss pleiotroper Effekte in früheren Stadien, z.B. bei *knock down*-Experimenten durch MO-Injektion in die Zygote, minimiert. TSA-Behandlung etwa ab dem Blastulastadium verhindert die (FGF8-abhängige) *pax2.1*-Transkription, die Bildung der MHB und verändert die Expressionsdomänen von *emx1* und *dlx2a* im

Telencephalon, was eine Beteiligung von HDACs an Musterungsprozessen belegt (Plaster et al., 2006). In neuronalen Vorläuferzellen des embryonalen Telencephalons der Maus scheinen HDACs gleichzeitig sowohl Neurogenese-fördernde, als auch -hemmende Funktionen zu besitzen. Im ventralen Telencephalon führt HDAC-Inhibition durch TSA zu einer Abnahme, im dorsalen Telencephalon hingegen zu einer Zunahme der Anzahl proliferierender neuronaler Vorläuferzellen. Die TSA-Behandlung verstärkt zwar in beiden Fällen allgemein Neurogenese inhibierende BMP-Signale, diese werden aber von den Zellen in beiden Gehirndomänen aufgrund ihrer verschiedenen Entwicklungsstadien und genetischen Kontexte unterschiedlich interpretiert. Diese Studie konnte zeigen, dass HDAC-Inhibition durch TSA-Behandlung im dorsalen Telencephalon das zu diesem Zeitpunkt noch vorherrschende neurogene Determinationsprogramm (angezeigt durch *neurog1*), hingegen im ventralen Telencephalon das bereits angelaufene astrogliogene Differenzierungsprogramm verstärkt. Außerdem scheinen nur Klasse-II-HDACs in diesen Prozess involviert zu sein (Shakèd et al., 2008).

Das Ergebnis der TSA-vermittelten HDAC-Inhibition in der vorliegenden Arbeit zeigt zum einen, dass TSA spezifisch im dorsalen Telencephalon die LATE-getriebene Reporterexpression induzieren kann, und zum anderen, dass diese ektopische Domäne sehr wahrscheinlich mit der endogenen Expressionsdomäne von *neurog1*, *pax6a* sowie mit der durch Deletion von LATE-Fragment 6 im 3.1-Reporter erzeugten ektopischen Domäne im Telencephalon übereinstimmt (Abb. 28 und 29). Eine Koexpressionsanalyse würde diese Frage schnell klären. Auch sollten transgene Linien mit anderen LATE-Deletionen einer TSA-Behandlung unterzogen werden, um die Spezifität des beobachteten Effekts zu untermauern. Nicht zuletzt muss der spezifisch in LATE-Fragment 6 bindende TF identifiziert und dessen physische Interaktion mit HDAC zweifelsfrei nachgewiesen werden.

LATE als Ziel eines HDAC-abhängigen POU-HD-Faktors

Die hier präsentierten Ergebnisse deuten dennoch stark darauf hin, dass HDAC-Aktivität selektiv an der zwischen entfernt verwandten Vertebratenklassen vollständig konservierten 40 bp langen LATE-Sequenz vermittelten transkriptionellen *neurog1*-Repression im Zebrafisch-Telencephalon beteiligt ist, dieses LATE-Fragment für den TSA-Effekt essentiell ist und höchstwahrscheinlich das Ziel eines POU-spezifischen HD-TFs darstellt. Offenbar existiert nicht nur eine räumliche Übereinstimmung zwischen der sowohl durch Deletion von

LATE-Fragment 6, als auch durch HDAC-Inhibition erzeugten telencephalischen Reporterexpression und der dort lokalisierten endogenen *pou50*-Aktivität, sondern auch eine zeitliche Korrelation insofern, als dass alle drei Aktivitäten im Zeitfenster zwischen 22 und 26 hpf liegen, in dem die telencephale *pou50*-Aktivität nach Hauptmann und Gerster (1996) am stärksten ist. Aber, wie oben schon angesprochen, ist wahrscheinlich ein paraloger POU-HD-Faktor mit vergleichbarem Expressionsmuster involviert.

POU-HD-Faktoren wurden bereits in mehreren Studien als HDAC-abhängige transkriptionelle Repressoren identifiziert, so wird z.B. Oct-1 bei der Inhibition sowohl des *p15^{INK4b}*- als auch des *Gadd45 γ* -Gens zur Aufrechterhaltung des Zellzyklus benötigt (Hitomi et al., 2007; Campanero et al., 2008). Desweiteren ist Oct-1 nötig zur Spezifikation neuraler Vorläuferzellen (Kiyota et al., 2008).

Basierend auf den vorliegenden Daten und auf veröffentlichten Befunden anderer wage ich also folgenden Vorschlag einer Erweiterung des molekularen Mechanismus zur LATE-vermittelten Regulation der *neurog1*-Expression in der Gehirnanlage des Zebrafischembryos:

Der LATE-Enhancer ist ein komplexes und relativ flexibles *cis*-regulatorisches Element mit zwei prinzipiellen Inputbereichen zur Verarbeitung von Positionsinformation und Steuerung der Zelltypspezifikation. Einerseits stellt LATE das Ziel eines aktivierenden, die *neurog1*-Expression im alaren Diencephalon positiv regulierenden TFs (Pax6) dar, sowie andererseits eines HDAC-abhängigen transkriptionellen Repressors mit POU-spezifischer Homeodomäne, welcher die *neurog1*-Expression im dorsalen Telencephalon negativ reguliert. Dieser dort exprimierte Repressor rekrutiert HDAC (oder ist Teil eines HDAC-enthaltenden Proteinkomplexes), bindet spezifisch im konservierten LATE-Fragment 6 und etabliert oder unterstützt so die Bildung einer kondensierten Chromatinstruktur im Bereich der LATE-Region, was die Bindung aktivierender TFs (etwa Pax6) inhibiert. Die Anwesenheit des Repressors blockiert auf diese Weise die LATE-vermittelte *neurog1*-Transkription zur Determination neuraler Vorläuferzellen und beeinflusst somit das raumzeitliche Entwicklungsprogramm von Zellen in diesem Gehirnkompartment.

Das ancestrale Funktionsspektrum von LATE ist also nicht nur auf diencephale Areale beschränkt, wie von Blader et al. (2004) vermutet wurde, sondern erstreckt sich auch auf telencephale Aspekte der *neurog1*-Expression. Dieser Befund wirft ein neues Licht auf die Entwicklung des Telencephalons in höheren Vertebraten: Unbestritten liegt die Evolution der Neocortexanlage in Amniota nicht nur allein in der Kooption der *neurog1*-Aktivität durch

eine Ausweitung der Pax6-Expression begründet, und sehr wahrscheinlich haben noch weitere transkriptionelle Aktivatoren zur Rekrutierung proneuraler Genaktivität beigetragen. Parallel dazu sollte jedoch ebenso die Frage nach dem Einfluss der Abwesenheit von transkriptionellen Repressoren auf die Entwicklung neuer Merkmale gestellt werden. In dieser Hinsicht kann die zwischen Maus und Zebrafisch völlige Sequenzübereinstimmung von LATE im Bereich der Repressorbindestelle dahingehend interpretiert werden, dass Änderungen der *cis*-Regulation von *in trans* agierenden Repressoren im Vergleich zu Aktivatoren noch bedeutsamer für evolutionären Wandel sind.

5. Literatur

- **Adamska et al.**, 2000: Inner ear and lateral line expression of a zebrafish Nkx5-1 gene and its downregulation in the ears of FGF8 mutant, ace. *Mech. Dev.* **97**, 161-165.
- **Akimenko et al.**, 1994: Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J. Neurosci.* **14**, 3475-3486.
- **Altschul et al.**, 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- **Amacher**, 1999: Transcriptional regulation during zebrafish embryogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 548-552.
- **Amsterdam et al.**, 1995: The Aequorea victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **171**, 123-129.
- **Ando et al.**, 2002: An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **99**, 12651-12656.
- **Andrioli et al.**, 2002: Anterior repression of a Drosophila stripe enhancer requires three position-specific mechanisms. *Development* **129**, 4931-4940.
- **Aparicio et al.**, 2002: Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of Fugu rubripes. *Science* **297**, 1301-1310.
- **Appel und Eisen**, 1998: Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* **125**, 371-380.
- **Arnosti et al.**, 1996a: The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy. *Development* **122**, 205-214.
- **Arnosti et al.**, 1996b: The gap protein knirps mediates both quenching and direct repression in the Drosophila embryo. *EMBO J.* **15**, 3659-3666.
- **Arnosti**, 2003: Analysis an function of transcriptional regulatory elements: Insights from Drosophila. *Annu. Rev. Entomol.* **48**, 579-602.
- **Artavanis-Tsakonas et al.**, 1990: Notch and the molecular genetics of neuroblast segregation in Drosophila. *Mol. Reprod. Dev.* **27**, 23-27.
- **Artavanis-Tsakonas et al.**, 1999: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- **Arts et al.**, 1995: Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation. *Biochem. J.* **310**, 171-176.
- **Axelrod et al.**, 1996: Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Genes Dev.* **9**, 2609-2622.
- **Bae et al.**, 2004: Expression of sax1/nkx1.2 and sax2/nkx1.1 in zebrafish. *Gene Expr. Patt.* **4**, 481-486.
- **Bae et al.**, 2005: Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* **132**, 1375-1385.
- **Bagheri-Fam et al.**, 2001: Comparative genomics of the SOX9 region in human and Fugu rubripes: conservation of short regulatory sequence elements within large intergenic regions. *Genomics* **78**, 73-82.
- **Bainter et al.**, 2001: Neural induction takes a transcriptional twist. *Dev. Dyn.* **222**, 315-327.
- **Bakkers et al.**, 2002: Zebrafish Δ Np63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell* **2**, 617-627.
- **Balciunas et al.**, 2004: Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *BMC Genomics* **5**, 62.

- **Bally-Cuif und Hammerschmidt**, 2003: Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 16-25.
- **Banerji et al.**, 1981: Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308.
- **Barth und Wilson**, 1995: Expression of zebrafish nk2.2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarkates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development* **121**, 1755-1768.
- **Bejerano et al.**, 2004: Ultraconserved elements in the human genome. *Science* **304**, 1321-1325.
- **Bejerano et al.**, 2006: A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. *Nature* **441**, 87-90.
- **Bell et al.**, 2001: Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science* **291**, 447-450
- **Bellefroid et al.**, 1998: Xiro3 encodes a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois genes and functions in neural specification. *EMBO J.* **17**, 191-203.
- **Bellen et al.**, 1989: P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in Drosophila. *Genes Dev.* **3**, 1288-1300.
- **Bennani-Baiti et al.**, 1998: Physical linkage of the human growth hormone gene cluster and the CD79B (Ig β /B29) gene. *Genomics* **48**, 258-264.
- **Berger**, 2002: Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 142-148.
- **Bergsland et al.**, 2006: The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev.* **20**, 3475-3486.
- **Bertrand et al.**, 2002: Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 517-530.
- **Bier et al.**, 1989: Searching for pattern and mutation in the Drosophila genome with a P-lacZ vektor. *Genes Dev.* **3**, 1273-1287.
- **Biggar und Crabtree**, 2001: Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J.* **20**, 3167-3176.
- **Blader et al.**, 1997: The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-4569.
- **Blader et al.**, 2003: Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* **120**, 211-218.
- **Blader et al.**, 2004: Conserved and acquired features of neurogenin1 regulation. *Development* **131**, 5627-5637.
- **Boffelli et al.**, 2004: Comparative genomics at the vertebrate extremes. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 456-465.
- **Brand et al.**, 1985: Characterization of a 'silencer' in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* **41**, 41-48.
- **Brand et al.**, 1996: Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* **123**, 129-142.
- **Brenner et al.**, 1994: Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* **366**, 265-268.
- **Brewster et al.**, 1998: Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* **393**, 579-583.
- **Briscoe et al.**, 2000: A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-445.
- **Broccoli et al.**, 1999: The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* **401**, 164-168.

- **Burgess-Beusse et al.**, 2002: The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16433-16437.
- **Butler und Kadonga**, 2002: The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* **16**, 2583-92.
- **Bylund et al.**, 2003: Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* **6**, 1162-1168.
- **Cajiao et al.**, 2004: Bystander gene activation by a locus control region. *EMBO J.* **23**, 3854-3863.
- **Calhoun et al.**, 2002: Promoter-proximal tethering elements regulate enhancer-promoter specificity in the *Drosophila Antennapedia* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9243-9247.
- **Campanero et al.**, 2008: The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces GADD45 gamma expression via Oct and NF-Y binding sites. *Oncogene* **27**, 1263-1272.
- **Campuzano und Modolell**, 1992: Patterning of the *Drosophila* nervous system: the acheate-scute gene complex. *Trends Genet.* **8**, 202-208.
- **Carroll et al.**, 2001: From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design. *Blackwell, Malden, MA*.
- **Carroll et al.**, 2005: Evolution at two levels: On genes and form. *PLoS Biol.* **3**, 1159-1166.
- **Carter und Wagner**, 2002: Evolution of functionally conserved enhancers can be accelerated in large populations: a population-genetic model. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* **269**, 953-960.
- **Carvajal und Rigby**, 2008: Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes *Mrf4* and *Myf5*. *Genes Dev.* **22**, 265-276.
- **Cau et al.**, 2000: Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development* **127**, 2323-2332.
- **Cau und Wilson**, 2003: *Ash1a* and *Neurogenin1* function downstream of *Floating head* to regulate epiphyseal neurogenesis. *Development* **130**, 2455-2466.
- **Chalmers et al.**, 2002: Intrinsic differences between the superficial and deep layers of the *Xenopus* ectoderm control primary neuronal differentiation. *Dev. Cell* **2**, 171-182.
- **Chapman et al.**, 2004: Analysis of multiple genomic sequence alignments. A web resource, online tools, and lessons learned from analysis of mammalian SCL loci. *Genome Res.* **14**, 313-318.
- **Cheesman und Eisen**, 2004: *Gsh1* demarcates hypothalamus and intermediate spinal cord in zebrafish. *Gene Expr. Patt.* **5**, 107-112.
- **Cheng et al.**, 2001: Identification and expression of zebrafish Iroquois homeobox gene *irx1*. *Dev. Genes Evol.* **211**, 442-444.
- **Chien et al.**, 1996: Neuronal type information encoded in the basic helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13239-13244.
- **Chitnis und Kintner**, 1996: Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* **122**, 2295-2301.
- **Chitnis**, 1999: Control of neurogenesis – lessons from frogs, fish and flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 18-25.
- **Chizhikov und Millen**, 2004: Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 808-812.
- **Cho et al.**, 2004: Advances in chromatin remodeling and human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 308-315.
- **Choi et al.**, 2009: Conditional mutagenesis in *Drosophila*. *Science* **324**, 54.
- **Chuzhanova et al.**, 2000: Promoter shuffling has occurred during the evolution of vertebrate growth hormone gene. *Gene* **254**, 9-18.

- **Collins und Weismann**, 1984: The molecular genetics of human hemoglobin. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **31**, 315-462.
- **Colombo et al.**, 2006: Zebrafish BarH-like genes define discrete neural domains in the early embryo. *Gene Expr. Patt.* **6**, 347-352.
- **Danilova et al.**, 2004: Expression of the winged helix/forkhead gene, foxn4, during zebrafish development. *Dev. Brain Res.* **153**, 115-119.
- **Davidson et al.**, 2001: Genomic regulatory systems: Development and evolution. San Diego CA: *Academic Press*.
- **Davidson et al.**, 2002: A genomic regulatory network for development. *Science* **295**, 1669-1678.
- **Del Giacco et al.**, 2006: Differential regulation of the zebrafish orthopedia1 gene during fate termination of diencephalic neurons. *BMC Dev. Biol.* **6**, 50.
- **Dermitzakis et al.**, 2002: Numerous potentially functional but non-genic conserved sequences on human chromosome 21. *Nature* **420**, 578-582.
- **Dermitzakis et al.**, 2003: Evolutionary discrimination of mammalian conserved non-genic sequences (CNGs). *Science* **302**, 1033-1035.
- **de Ruijter et al.**, 2003: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737-749.
- **Dheen et al.**, 1999: Zebrafish tbx-c functions during formation of midline structures. *Development* **126**, 2703-2713.
- **DiLeone et al.**, 1998: An extensive 3' regulatory region controls expression of Bmp5 in specific anatomical structures of the mouse embryo. *Genetics* **148**, 401-408.
- **Dillon und Sabbattini**, 2000: Functional gene expression domains: defining the functional unit of eukaryotic gene regulation. *Bioassays* **22**, 657-656.
- **Dillon**, 2003: Gene autonomy: positions, please. *Nature* **425**, 457.
- **Dooley und Zon**, 2000: Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 252-256.
- **Dorsky et al.**, 1999: Maternal and embryonic expression of zebrafish lef1. *Mech. Dev.* **86**, 147-150.
- **Druker und Whitelaw**, 2004: Retrotransposon-derived elements in the mammalian genome: a potential source of disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 319-330.
- **Duboule und Wilkins**, 1998: The evolution of 'bricolage'. *Trends Genet.* **14**, 54-59.
- **Echelard et al.**, 1993: Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **227**, 648-660.
- **Echevarría et al.**, 2003: Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **43**, 179-191.
- **Egger et al.**, 2004: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-463.
- **Ekker et al.**, 1992: Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development* **120**, 1001-1010.
- **Ekker und Larson**, 2001: Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* **30**, 89-93.
- **Ellingsen et al.**, 2005: Large-scale enhancer detection in the zebrafish genome. *Development* **132**, 3799-3811.
- **Feng et al.**, 2006: The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev.* **20**, 1470-1484.
- **Figdor und Stern**, 1993: Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* **363**, 630-634.
- **Fjose**, 1994: Expression of the zebrafish gene hlx-1 in the prechordal plate and during CNS development. *Development* **120**, 71-81.

- **Fode et al.**, 2000: A role for neuronal determination in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* **14**, 67-80.
- **Force et al.**, 1999: Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-1545.
- **Frazer et al.**, 2001: Evolutionary conserved sequences on chromosome 21. *Genome Res.* **11**, 1651-1659.
- **Frazer et al.**, 2004: Noncoding sequences conserved in a limited number of mammals in the SIM2 interval are frequently functional. *Genome Res.* **14**, 367-372.
- **Fujioka et al.**, 1999: Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. *Development* **126**, 2527-2538.
- **Gajewski und Voolstra**, 2002: Comparative analysis of somitogenesis related genes of the hairy/Enhancer of split class in Fugu and zebrafish. *BMC Genomics* **3**, 21.
- **Gamse et al.**, 2002: Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat. Genet.* **20**, 117-121.
- **Geling et al.**, 2003: bHLH transcription factor Her5 links patterning to regional inhibition of neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **130**, 1591-1604.
- **Geling et al.**, 2004: Her5 acts as a prepattern factor that blocks neurogenin1 and coe2 expression upstream of notch to inhibit neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **131**, 1993-2006.
- **Ghazi und VijayRaghavan**, 2000: Developmental biology. Control by combinatorial codes. *Nature* **408**, 419-420.
- **Gibbs et al.**, 2004: Genome sequence of the brown norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521.
- **Gillemans et al.**, 2003: Functional and comparative analysis of globin loci in pufferfish and humans. *Blood* **101**, 2842-2849.
- **Glazko et al.**, 2003: A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and mouse consists of predicted matrix attachment regions. *Trends Genet.* **19**, 119-124.
- **Glazov et al.**, 2006: Evidence for control of splicing by alternative RNA secondary structures in dipteran homothorax pre-mRNA. *RNA Biol.* **3**.
- **Goetze et al.**, 2005: Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2260-2272.
- **Gómez-Skarmeta et al.**, 1998: Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* **17**, 181-190.
- **Gómez-Skarmeta et al.**, 2006: New technologies, new findings, and new concepts in the study of vertebrate cis-regulatory sequences. *Dev. Dyn.* **235**, 870-885.
- **Gottgens et al.**, 2000: Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nature Biotechnol.* **18**, 181-186.
- **Gowan et al.**, 2001: Crossinhibitory activities of ngn1 and math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**, 219-232.
- **Griffin et al.**, 2002: New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech. Dev.* **112**, 89-100.
- **Gurdon und Bourillot**, 2001: Morphogen gradient interpretation. *Nature* **413**, 797-803.
- **Haddon et al.**, 1998: Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359-370.
- **Han et al.**, 2004: Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* **429**, 268-274.
- **Hans et al.**, 2004: Her3, a zebrafish member of the hairy-E(spl) family, is repressed by Notch signalling. *Development* **131**, 359-370.

- **Hardison et al.**, 1997: Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: Reasons to sequence the mouse genome. *Genome Res.* **7**, 959-966.
- **Hardison**, 2000: Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet.* **16**, 369-372.
- **Hassan und Bellen**, 2000: Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* **14**, 1852-1865.
- **Hatakeyama et al.**, 2001: Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-1322.
- **Hauptmann und Gerster**, 1994: Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and Drosophila embryos. *Trends Genet.* **10**, 266.
- **Hauptmann und Gerster**, 1996: Complex expression of the zp-50 pou gene in the embryonic zebrafish brain is altered by overexpression of sonic hedgehog. *Development* **122**, 1769-1780.
- **Heitzler et al.**, 1996: Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signaling in Drosophila. *Development* **122**, 161-171.
- **Hemmati-Brivanlou und Melton**, 1997: Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* **88**, 13-17.
- **Hitomi et al.**, 2007: Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the p15(INK4b) gene. *FEBS Lett.* **581**, 1087-1092.
- **Hüttenhofer et al.**, 2005: Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet.* **21**, 289-297.
- **Hurles**, 2004: Gene duplication: the genomic trade in spare parts. *PLoS Biol.* **2**, E206.
- **Hurley et al.**, 2005: Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evol. Dev.* **7**, 556-567.
- **Ilgan und Kopan**, 2007: SnapShot: Notch signaling pathway. *Cell* **128**, 1246.
- **Ingham**, 1997: Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1755-1760.
- **Inoue et al.**, 2002: Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* **129**, 831-842.
- **Istrail und Davidson**, 2005: Logic functions of the genomic cis-regulatory code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4954-4959.
- **Ito et al.**, 1991: A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* **102**, 67-70.
- **Itoh et al.**, 2002: A role for iro1 and iro7 in the establishment of anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **129**, 2317-2327.
- **Itoh et al.**, 2000: Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6954-6967.
- **Jarman et al.**, 1993: Atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell* **73**, 1307-1321.
- **Jenuwein und Allis**, 2001: Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- **Jepsen und Rosenfeld**, 2002: Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J. Cell Sci.* **115**, 689-698.
- **Jessell und Sanes**, 2000: The decade of the developing brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 599-611.
- **Jessen et al.**, 1998: Modification of bacterial artificial chromosomes through chi-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5121-5126.
- **Joyner et al.**, 2000: Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 736-741.

- **Jurata et al.**, 1998: The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerisation of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 3152-3157.
- **Kammandel et al.**, 1999: Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev. Biol.* **205**, 79-97.
- **Katahira et al.**, 2000: Interaction between Otx2 and Gbx2 defines the organizing center for the optic tectum. *Mech. Dev.* **91**, 43-52.
- **Kawakami et al.**, 2004a: A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev. Cell* **7**, 133-144.
- **Kawakami et al.**, 2004b: Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* **131**, 4763-4774.
- **Kawakami et al.**, 2005: Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev. Dyn.* **234**, 244-254.
- **Kellum et al.**, 1991: A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* **64**, 941-950.
- **Kermekchiev et al.**, 1991: Every enhancer works with every promoter for all the combinations tested: could new regulatory pathways evolve by enhancer shuffling? *Gene Expr.* **1**, 71-81.
- **Kida et al.**, 2004: Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development* **131**, 4179-4187.
- **Kiefer**, 2005: Proneural factors and neurogenesis. *Dev. Dyn.* **234**, 808-813.
- **Kim und Maniatis**, 1997: The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell.* **1**, 119-129.
- **Kimura und Ohta**, 1974: On some principles governing molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2848-2852.
- **Kimura**, 1985: The role of compensatory neutral mutations in molecular evolution. *J. Genet.* **64**, 7-19.
- **Kimura-Yoshida et al.**, 2004: Characterization of the pufferfish Otx2 cis-regulators reveals evolutionary conserved genetic mechanisms for vertebrate head specification. *Development* **131**, 57-71.
- **Kiyota et al.**, 2008: The POU homeobox protein Oct-1 regulates radial glia formation downstream of Notch signaling. *Dev. Biol.* **315**, 579-592.
- **Kleinjan et al.**, 2001: Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2049-2059.
- **Kleinjan et al.**, 2002: Characterization of a novel gene adjacent to Pax6, revealing synteny conservation with functional significance. *Mamm. Genome* **13**, 102-107
- **Kleinjan et al.**, 2004: Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev. Biol.* **265**, 462-477.
- **Kleinjan et al.**, 2008: Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet.* **4**, e29.
- **Kleinjan und van Heyningen**, 2005: Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 8-32.
- **Kobayashi et al.**, 2002: Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* **129**, 83-93.
- **Krauss et al.**, 1991: Zebrafish pax[zf-a]: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J.* **10**, 3609-3619.
- **Krauss et al.**, 1993: A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hedgehog is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* **75**, 1431-1444.

- **Kroll et al.**, 1998: Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* **125**, 3247-3258.
- **Kuhlenbeck**, 1937: The ontogenetic development of diencephalic centres in the bird's brain (chick) and comparison with the reptilian and mammalian diencephalon. *J. Comp. Neurol.* **66**, 23-75.
- **Kuhlenbeck**, 1973: *The Central Nervous System of Vertebrates*. Vol.3, Part II. Berlin: S. Karger A.G.
- **Kühn et al.**, 1995: Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429.
- **Kulkarni und Arnosti**, 2003: Information display by transcriptional enhancers. *Development* **130**, 6569-6575.
- **Kumar und Hedges**, 1998: A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**, 917-920.
- **Kwon et al.**, 2004: Opposing inputs by Hedgehog and Brinker define a stripe of hairy expression in the Drosophila leg imaginal disc. *Development* **131**, 2681-2692.
- **Laemmli**, 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- **Lanier et al.**, 2007: Brn3a target gene recognition in embryonic sensory neurons. *Dev. Biol.* **302**, 703-716.
- **Lee et al.**, 1995: Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic-helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-844.
- **Lee et al.**, 2006: Canonical Wnt signaling through *lefl* is required for hypothalamic neurogenesis. *Development* **133**, 4451-4461.
- **Lee und Jessel**, 1999: The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 261-294.
- **Lee und Pfaff**, 2001: Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nature Neurosci.* **4**, 1183-1191.
- **Lee und Pfaff**, 2003: Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* **38**, 731-745.
- **Lettice et al.**, 2002: Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7548-7553.
- **Levine und Davidson**, 2005: gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4936-4942.
- **Levine und Tijan**, 2003: Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147-151.
- **Li et al.**, 1998: Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970-34975.
- **Lin**, 2000: Transgenic zebrafish. *Methods Mol. Biol.* **136**, 375-383.
- **Linker und Stern**, 2004: Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* **131**, 5671-5681.
- **Lowery und Shive**, 2004: Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech. Dev.* **121**, 1189-1197.
- **Ludwig et al.**, 1998: Functional analysis of *eve* stripe 2 enhancer evolution in Drosophila: rules governing conservation and change. *Development* **125**, 949-958.
- **Ludwig et al.**, 2000: Evidence for stabilizing selection in a eucaryotic enhancer element. *Nature* **403**, 564-567.
- **Ludwig**, 2002: Functional evolution of noncoding DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 634-639.
- **Luther**, 1935: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen am Forellenkeim: die Rolle des Organisationszentrums bei der Entstehung der Embryonalanlage. *Biol Zentralbl* **55**, 114-137.

- **Ma et al.**, 1996: Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**, 43-52.
- **Ma et al.**, 1998: Neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* **20**, 469-482.
- **Maniatis et al.**, 1987: Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237-1245.
- **Mann und Carroll**, 2002. Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 592-600.
- **Mannervik et al.**, 1999: Transcriptional coregulators in development. *Science* **284**, 606-609.
- **Mantovani et al.**, 1987: A protein factor binding to an octamer motif in the gamma-globin promoter disappears upon induction of differentiation and hemoglobin synthesis in K562 cells. *Nucleic Acids Res.* **15**, 9349-9364.
- **Marshall et al.**, 1994: A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* **370**, 567-571.
- **Masai et al.**, 1997: Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.
- **Matsunaga et al.**, 2000: Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* **127**, 2357-65.
- **Matsuo-Takasaki et al.**, 1999: The POU domain gene, XIPOU2 is an essential downstream determinant of neural induction. *Mech. Dev.* **89**, 75-85.
- **Mattar et al.**, 2004: A screen of downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev. Biol.* **273**, 373-389.
- **McEwen et al.**, 2006: Ancient duplicated conserved noncoding elements in vertebrates: a genomic and functional analysis. *Genome Res.* **16**, 451-465.
- **McGaughey et al.**, 2008: Metrics of sequence constraint overlook regulatory sequences in an exhaustive analysis at phox2b. *Genome Res.* **18**, 252-260.
- **Mercier et al.**, 1995: Expression pattern of two otx genes suggests a role in specifying anterior body structures in zebrafish. *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 559-573
- **Millet et al.**, 1999: A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161-164.
- **Miura et al.**, 1997: Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. *Mech. Dev.* **65**, 99-109.
- **Mizuseki et al.**, 1998a: SoxD: an essential mediator of anterior neural tissues in Xenopus embryos. *Neuron* **21**, 77-85.
- **Mizuseki et al.**, 1998b: Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* **125**, 579-587.
- **Molnar und Butler**, 2002: The corticostriatal junction: a crucial region for forebrain development and evolution. *Bioassays* **24**, 530-541.
- **Mori et al.**, 1994: Different spatio-temporal expressions of three otx homeoprotein transcripts during zebrafish embryogenesis. *Mol. Brain Res.* **27**, 221-231.
- **Mullis and Faloona**, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Emzymol.* **155**, 335-350.
- **Muraoka et al.**, 2000: Kheper, a novel ZFH/deltaEF1 family member, regulates the development of the neuroectoderm of zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Biol.* **228**, 29-40.
- **Nakada et al.**, 2004: Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* **131**, 1319-1330.
- **Nobrega et al.**, 2003: Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* **302**, 413.

- **O’Cane et al.**, 1987: Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9123-9127.
- **Ochoa-Espinosa et al.**, 2005: The role of binding site cluster strength in Bicoid-dependent patterning in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4960-4965.
- **Oda-Ishii et al.**, 2005: Making very similar embryos with divergent genomes: conservation of regulatory mechanisms of Otx between ascidians *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. *Development* **132**, 1663-1674.
- **Odenthal und Nüsslein-Volhard**, 1998: Fork head domain genes in zebrafish. *Dev. Genes Evol.* **208**, 245-258.
- **Ogryzko et al.**, 1996: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959.
- **Okuda et al.**, 2006: Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Dev. Dyn.* **235**, 811-825.
- **Oliveri et al.**, 2004: Gene regulatory network analysis in sea urchin embryos. *Methods Cell Biol.* **74**, 775-794.
- **Orenic et al.**, 1993: The spatial organization of epidermal structures: hairy establishes the geometrical pattern of *Drosophila* leg bristles by delimiting the domains of achaete expression. *Development* **118**, 9-20.
- **Parinov et al.**, 2004: Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* **231**, 449-459.
- **Parras et al.**, 2002: The proneural proteins atonal and scute regulate neural target genes though different E-box binding sites. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9517-9526.
- **Pennacchio und Rubin**, 2001: Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 100-109.
- **Pera et al.**, 2001: Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev. Cell* **1**, 655-665.
- **Pfeifer et al.**, 1999: Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 111-124.
- **Piano et al.**, 1999: Evidence for redundancy but not trans factor – cis element coevolution in the regulation of *Drosophila* Yp genes. *Genetics* **152**, 605-616.
- **Pinheiro et al.**, 2004: The basis helix-loop-helix transcription factor, Tal2, marks the lateral floor plate of the spinal cord in zebrafish. *Gene Expr. Patt.* **4**, 85-92.
- **Plaster et al.**, 2007: REREa/Atrophin-2 interacts with histone deacetylase and Fgf8 signaling to regulate multiple processes of zebrafish development. *Dev. Dyn.* **236**, 1891-1904.
- **Pollard et al.**, 2004: Benchmarking tools for the alignment of functional noncoding DNA. *BMC Bioinformatics* **5**, 6.
- **Postlethwait et al.**, 2004: Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* **20**, 481-490.
- **Potts et al.**, 2000: Chicken beta-globin 5’HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 1015-1018.
- **Puelles und Rubenstein**, 1993: Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggests a neuromeric organisation. *Trends Neurosci.* **16**, 472-479.
- **Puelles und Rubenstein**, 2003: Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* **26**, 469-476.
- **Ramain et al.**, 2001: Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr. Biol.* **11**, 1729-1738.

- **Reeves und Posakony**, 2005: Genetic programs activated by proneural proteins in the developing Drosophila PNS. *Dev. Cell* **8**, 413-425.
- **Rimini et al.**, 1999: Expression patterns of zebrafish sox11A, sox11B and sox21. *Mech. Dev.* **89**, 167-171.
- **Robinson-Rechavi et al.**, 2001: Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Res.* **11**, 781-788.
- **Robu et al.**, 2007: p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* **3**, e78.
- **Roelink et al.**, 1995: Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino terminal cleavage product of Sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-455.
- **Rossi et al.**, 2000: Transcriptional control: rheostat converted to on/off switch. *Mol. Cell* **6**, 723-728.
- **Rowitch et al.**, 1998: Identification of an evolutionary conserved 110 base-pair cis-acting regulatory sequence that governs Wnt-1 expression in the murine neural plate. *Development* **125**, 1735-1746.
- **Rubenstein et al.**, 1994: The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* **266**, 578-580.
- **Rubenstein et al.**, 1998: Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 445-477.
- **Sambrook und Russell**, 2001: Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 3rd edition.
- **Sandberg et al.**, 2005: Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **8**, 995-1001.
- **Sanges et al.**, 2006: Shuffling of cis-regulatory elements is a pervasive feature of the vertebrate lineage. *Genome Biol.* **7**, R56.
- **Santagati et al.**, 2003: Identification of cis-regulatory elements in the mouse Pax9/Nkx2-9 genomic region: Implication for evolutionary conserved synteny. *Genetics* **165**, 235-242.
- **Sasai**, 1996: Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in Xenopus animal caps. *EMBO J.* **15**, 4547-4555.
- **Sasai**, 1998: Identifying the missing links: genes that connect neural induction and primary neurogenesis in vertebrate embryos. *Neuron* **21**: 455-458.
- **Scardigli et al.**, 2001: Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron* **31**, 203-217.
- **Seipel et al.**, 1992: Different activation domains stimulate transcription from remote (‘enhancer’) and proximal (‘promoter’) positions. *EMBO J.* **11**, 4961-4968.
- **Semon und Wolfe**, 2007: Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends Genet.* **23**, 108-112.
- **Seo et al.**, 1999: Three structurally and functionally conserved Hlx genes in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 323-335.
- **Shanmugalingam et al.**, 2000: Ace/Fgf8 is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* **127**, 2549-2561.
- **Shimamura et al.**, 1995: Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* **121**, 3923-3933.
- **Shimamura und Rubenstein**, 1997: Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.
- **Small et al.**, 1992: Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo. *EMBO J.* **11**, 4047-4057.
- **Small et al.**, 1993: Spacing ensures autonomous expression of different stripe enhancers in the even-skipped promoter. *Development* **119**, 762-772.

- **Small et al.**, 1996: Regulation of two pair-rule stripes by a single enhancer in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **175**, 314-324.
- **Spemann und Mangold**, 1924: Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch. EntwMech. Org.* **100**, 599-638.
- **Spitz et al.**, 2001: Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. *Genes Dev.* **15**, 2209-2214.
- **Stern et al.**, 2002: Induction and patterning of the nervous system – the chick embryo enters the scene. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 447-451.
- **Stern**, 2000: Perspective: Evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution* **54**, 1079-1091.
- **Stern**, 2001: Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nature Rev. Neurosci.* **2**, 92-98.
- **Stern**, 2005: Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* **131**, 2007-2021.
- **Stöckert et al.**, 1987: Expression of the affected A gamma globin gene associated with Greek nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2999-3003.
- **Stoykova et al.**, 2000: Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J. Neurosci.* **20**, 8042-8050
- **Strähle et al.**, 2004: Vertebrate floor plate specification: variations on common themes. *Trends Genet.* **20**, 155-162.
- **Strähle und Rastegar**, 2008: Conserved non-coding sequences and transcriptional regulation. *Brain Res. Bull.* **75**, 225-230.
- **Streisinger et al.**, 1981: Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachidanio rerio*). *Nature* **291**, 293-296.
- **Streit et al.**, 2000: Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* **406**, 74-78.
- **Struhl**, 2001: Gene regulation. A paradigm for precision. *Science* **293**, 1054-1055.
- **Su und Meng**, 2002: The expression of *gbx-2* during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* **113**, 107-110.
- **Summerton**, 1990: Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 141-158.
- **Surguchov**, 1991: Migration of promoter elements between genes: a role in transcriptional regulation and evolution. *Biomed. Sci.* **2**, 22-28.
- **Tagle et al.**, 1988: Embryonic epsilon and gamma globin genes of a prosimian primate (*Galago crassicaudatus*). *J. Mol. Biol.* **203**, 439-455.
- **Takebayashi et al.**, 1997: Conversion of ectoderm into a neural fate by *ATH-3*, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene *atonal*. *EMBO J* **16**, 384-395.
- **Takke et al.**, 1999: *Her4*, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *e(spl)*, is a target of Notch signalling. *Development* **126**, 1811-1821.
- **Tanabe und Jessel**, 1996: Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115-1123.
- **Tautz**, 2000: Evolution of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 575-579.
- **Tessmar et al.**, 2002: A screen for co-factors of *Six3*. *Mech. Dev.* **17**, 103-113.
- **Thanos und Maniatis**, 1995: Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**, 1091-1100.
- **Thermes et al.**, 2002: I-Sce I meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **118**, 91-98.

- **Thisse et al.**, 2001: Expression of the zebrafish genome during embryogenesis. *ZFIN direct data submission*.
- **Thisse et al.**, 2004: Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. The zebrafish: genetics, genomics and informatics, 2nd ed. *Methods Cell Biol.* **77**, 505-519.
- **Thomas et al.**, 2003: Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* **424**, 788-793.
- **Tomita et al.**, 2000: Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J.* **19**, 5460-5472.
- **Toyama et al.**, 1995: The LIM class homeobox gene *lim5*: implied role in CNS patterning in *Xenopus* and zebrafish. *Dev. Biol.* **170**, 583-593.
- **Tropepe et al.**, 2001: Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**, 65-78
- **True und Haag**, 2001: Developmental system drift and flexibility in evolutionary trajectories. *Evol. Dev.* **3**, 109-119.
- **Turner**, 2002: Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285-291.
- **Uchikawa et al.**, 2003: Functional analysis of chicken *Sox2* enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev. Cell* **4**, 509-519.
- **Venkatesh et al.**, 2006: Ancient noncoding elements conserved in the human genome. *Science* **314**, 1892.
- **Venter et al.**, 2001: The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- **Vlachakis et al.**, 2000: A novel *Pbx* family member expressed during early zebrafish embryogenesis forms trimeric complexes with *Meis3* and *Hoxb1b*. *Dev. Dyn.* **217**, 109-119.
- **Vogt et al.**, 2008: A green fluorescent protein with photoswitchable emission from the deep sea. *PLoS ONE* **3**, e3766.
- **Volff**, 2005: Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* **94**, 280-294.
- **Waddington**, 1932: Experiments on the development of chick and duck embryos cultivated in vitro. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **221**, 179-230.
- **Waddington**, 1933: Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. *J. Exp. Biol.* **10**, 38-48.
- **Waddington**, 1934: Experiments on embryonic induction. *J. Exp. Biol.* **11**, 211-227.
- **Wang et al.**, 2001: Expression of two novel zebrafish *iroquois* homologues (*ziro1* and *ziro5*) during early development of axial structures and central nervous system. *Mech. Dev.* **105**, 385-400.
- **Wasserman et al.**, 2000: Human-mouse sequence comparisons to locate regulatory sites. *Nat. Genet.* **26**, 225-228.
- **Wasserman und Sandelin**, 2004: Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 276-287.
- **Waterston et al.**, 2002: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.
- **West et al.**, 2002: Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* **16**, 271-288.
- **Williams et al.**, 1998: A highly conserved lens transcriptional control element from the *Pax-6* gene. *Mech. Dev.* **73**, 225-229.
- **Wilson et al.**, 1989: P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 1301-1313.

- **Wilson et al.**, 1990: Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 679-714.
- **Wilson und Edlund**, 2001: Neural inductin: toward a unifying mechanism. *Nat. Neurosci. Suppl.* **4**, 1161-1168.
- **Wittkopp**, 2006: Evolution of cis-regulatory sequence and function in Diptera. *Heredity* **97**, 139-147.
- **Woolfe et al.**, 2005: Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol.* **3**, e7.
- **Woolfe und Elgar**, 2007: Comparative genomics using Fugu reveals insights into regulatory subfunctionalization. *Genome Biol.* **8**, R53.
- **Wullmann und Rink**, 2002: The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity, and catecholaminergic organization. *Brain Res. Bull.* **57**, 363-370.
- **Wurst und Bally-Cuif**, 2001: Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.
- **Xie et al.**, 2005: Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**, 338-345.
- **Yang et al.**, 2006: Modified bacterial artificial chromosomes for zebrafish transgenesis. *Methods* **39**, 183-188.
- **Yoshida et al.**, 1990a: Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in Friend leukemia cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **43**, 1101-1106.
- **Yoshida et al.**, 1990b: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179.
- **Yuh et al.**, 1998: Genomic cis-regulatory logic: experimental and computational analysis of a sea urchin gene. *Science* **279**, 1896-1902.
- **Zeng et al.**, 2008: Genome wide screens in yeast to identify potential binding sites and target genes of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **36**, e8.
- **Zhou und Levine**, 1999: A novel cis-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the Drosophila embryo. *Cell* **99**, 567-575.
- **Zimmer**, 2002: Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behaviour. *Chem. Rev.* **102**, 759-781.
- **zur Lage et al.**, 2004: EGF receptor signaling triggers recruitment of Drosophila sense organ precursors by stimulating proneural gene autoregulation. *Dev. Cell* **7**, 687-696.

Abkürzungen und Bezeichnungen

μ	mikro
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare (singular und plural)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CY3	Cyanine3 (Fluoreszenzfarbstoff)
<i>de novo</i>	von Neuem
Del = Δ	Deletion
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
HD	Homeodomäne
hpf	Stunden nach der Befruchtung
i.A.	im Allgemeinen
<i>in silico</i>	computergestützt
<i>in situ</i>	am ursprünglichen Ort
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
k	kilo
m	milli bzw. Meter
M	molar
mRNA	messenger RNA
resp.	respektive
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
sog.	sogenannt
u.a.	unter anderem (singular und plural)
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Die Namen von Genen sind *kursiv* (z.B. *pax6*), von Proteinen regulär oder in Großbuchstaben (z.B. Pax6 oder PAX6) dargestellt.

Danksagungen

An erster Stelle fühle ich mich Prof. Dr. Uwe Strähle verbunden. Ohne die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine positive Ausstrahlung, seine unermüdliche Geduld und Ermutigungen sowie in jeder Angelegenheit hilfreichen Ratschläge wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen – Danke Uwe.

Frau Prof. Dr. Gabriele Petersen danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Durch Christine Blattner bin ich überhaupt erst nach Karlsruhe gekommen. Dafür und die Einweisung in biochemische Methoden großen Dank.

Ein herzliches Dankeschön ergeht an alle jetzigen und ehemaligen Mitglieder der Strähle-Gruppe sowohl für ihre fachlich und technisch kompetente Unterstützung als auch für *soft and english skills* und die angenehme Arbeitsatmosphäre:

Olivier Armant, Isabelle Baader, Raymond Ertzer, Marco Ferg, Nadine Gretz, Yavor Hadzhiev, Nga Yu Ho (Catherine), David Hutcheson, Jules Richard Kemadjou Njiwa, Chiu Wai Kwok (Babs), Chen Sok Lam (Eric), Martin März, Sandeep Paul, Maryam Rastegar, Sepand Rastegar, Urmas Roostalu, Simone Schindler, Rebecca Schmidt, Masanari Takamiya, Saradavey Rathnam und Lixin Yang.

Daneben auch an die anderen Arbeitsgruppen, die das 4. OG im Tox-Bau 439 mit uns teilten: die Gruppe um Rüdiger Rudolf mit Ira Röder und Kyeong Rok Choi sowie die Gruppe um Thomas Dickmeis mit Meltem Sahinbas und Benjamin Weger.

Für die optimale Versorgung der Fische danke ich Nadine Borel, Christina Villani, Mandy Thomauske und den studentischen Hilfskräften.

Nicht zu vergessen die Jungs und Mädels der Tox-Gruppe aus dem 5. OG um Carsten Weiss mit Marco Al-Rawi, Silvia Andraschko, Jessica Budde, Silvia Diabaté, Julia Donauer, Nina Grico, Clarissa Marquardt, Dorit Mattern, Alicja Panas, Ilona Schreck und Siegfried Strack: Großes Merci für Glühwein, Zigaretten, Schokolade und andere Köstlichkeiten während meiner Tipperei im Seminarraum. Es war sehr nett bei euch.

René Günther und Wolf-Gerolf Thies danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen.

Für Ablenkungen außerhalb des akademischen Elfenbeinturms haben gesorgt: Heiko und Silvi, Patrick und Helga, Ferenc, Markus, Dany, Stefan, Jörg, Danny, Chrissi, Sammy, Tobi, Benny und die ganze Karlsruher Minimal-Community. Ich glaube, ohne euch wäre ich wirklich verrückt geworden ;)

Danke auch an alle, die ich vergessen habe.

Oma Gerda für zahllose Spenden und lecker Essen.

Und natürlich an meine Eltern: Für euer Vertrauen, für die uneingeschränkte Freiheit und Unterstützung, die Ihr mir immer geschenkt habt, für die Erziehung, die ich genießen durfte, dafür und alles überhaupt – Danke.

