

# **Funktionsanalyse des *Irx1*-Gens**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Armin Uwe Zülch**

aus Homberg/Efze

Göttingen 2001

Diese Arbeit wurde am  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
Karl-Friedrich-Bonhoefer-Institut  
Abteilung: Molekulare Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Peter Gruss  
durchgeführt.

D7

Referentin: Professorin Dr. M. Schäfer

Korreferent: Professor Dr. P. Gruss

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2001

*Irx1-*

ein Vormustergen,  
essentiell für die murine Gastrulation

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>II. Ergebnisse</b>	<b>13</b>
II.1. Strukturanalyse des <i>Irx1</i> -Gens	13
II.1.1. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek zur Komplettierung der <i>Irx1</i> -Sequenz	14
II.1.2 Sequenzanalyse der <i>Irx1</i> -cDNA	15
II.1.3. Das <i>Irx1</i> -Antiserum	21
II.2. Analyse des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters des <i>Irx1</i> -Gens	24
II.2.1. Analyse des <i>Irx1</i> -Transkripts während der Mausentwicklung	24
II.2.2. <i>Irx1</i> -Expression während der frühen Gastrulation (E6,0 bis E7,5)	25
II.2.3. <i>Irx1</i> -Expression während der Neurulation (E8,5 bis E9,0)	27
II.2.4. <i>Irx1</i> -Expression während der Organogenese (E9,5 bis E14,5)	29
II.2.5. Spezielle Beispiele der Expression von <i>Irx</i> -Genen während der Organogenese	29
II.3. Die Funktion des <i>Irx1</i> -Gens	38
II.3.1. Die <i>Zn-Finger</i> -Gene <i>Gli1</i> und <i>Gli2</i> kontrollieren die <i>Irx1</i> -Expression	38
II.3.2. Das <i>Irx1</i> -Gen aktiviert nicht den <i>Mash1</i> -Promotor	40
II.4. Analyse der <i>Irx1</i> -Mausmutante	42
II.4.1. Analyse der chromosomalen Lokalisation des <i>Irx1</i> -Gens	43
II.4.2. Kartierung und genomische Organisation des <i>Irx1</i> -Gens	45
II.4.3. Herstellen eines <i>Irx1</i> -Rekombinationskonstruktes für die homologe Rekombination in ES-Zellen	46
II.4.4. Gentransfer in ES-Zellen	50

II.4.5. Morula-Aggregation von ES-Zellen	55
II.5. Analyse der <i>Irx1</i> -defizienten Mäuse	59
II.5.1 <i>Irx1</i> -defiziente Mäuse sterben während der embryonalen Entwicklung	59
II.5.2 <i>Irx1</i> -defiziente Mäuse zeigen einen starken embryonalen Phänotyp	60
II.5.3. <i>Irx1</i> ist wesentlich für die Gastrulation der Maus	63
<b>III. Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>IV. Material und Methoden</b>	<b>89</b>
<i>IV.1. Organismen</i>	<i>89</i>
IV.1.1 Mäuse und Embryonen	89
IV.1.2 Bakterien	89
IV.1.3 ES-Zellen	89
<i>IV.2 Materialien</i>	<i>90</i>
IV.2.1 Chemikalien	90
IV.2.2 Radiochemikalien	90
IV.2.3 Verbrauchsmaterial	90
IV.2.4 Enzyme	90
IV.2.5 Reaktionssets (“Kits”)	90
IV.2.6 Membranen	91
IV.2.7 DNA-Bibliotheken	91
IV.2.8 Vektoren	91
IV.2.9 Größenmarker	91
IV.2.10 Oligonukleotide	92
IV.2.11 Filme	92
IV.2.12 Photoarbeiten und Sequenzbearbeitung	92
IV.2.13 Zelllinien	93
IV.2.14 <i>in-situ</i> -Hybridisierungssonden	93
IV.2.15 Medien, Nährböden, Standard-Lösungen	93
<i>IV.3 Methoden</i>	<i>95</i>
IV.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	95
IV.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	97

IV.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	97
IV.3.4 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIA-quick Gel Extraction Kit	97
IV.3.5 Restriktionsspaltung von DNA	98
IV.3.6 Aufreinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion	98
IV.3.7 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen	99
IV.3.8 Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen	99
IV.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten	100
IV.3.10. "blunt end"-Klonierung	100
IV.3.11 Transformation von Bakterien	100
IV.3.12 Sequenzierung ("Cycle sequencing")	102
IV.3.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	103
IV.3.14 Southern-Blot-Analyse	104
IV.3.15 Radioaktive Markierung von DNA- und RNA-Blots	105
IV.3.16 Durchmustern einer cDNA- oder genomischen Maus-DNA-Bibliothek nach rekombinanten Bakteriophagen und deren Isolierung	107
IV.3.17 Präparation genomischer Maus-DNA	110
IV.3.18 Arbeiten mit RNA	111
IV.3.19 Northern Blot	113
IV.3.20 Radioaktive mRNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an Schnitten	115
IV.3.21 mRNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an ganzen Embryonen (" <i>whole-mount</i> "-Hybridisierungstechnik)	120
IV.3.22 Nachweis von <i>β-Galaktosidase</i> ( <i>X-Gal</i> -Färbung)	126
IV.3.23 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	127
IV.3.24 Maus- <i>FISH</i> -Analyse der transgenen ES-Zellen	131
IV.3.25 Herstellung von Maus-Chimären aus ES-Zellen durch Morulaaggregation	132
IV.3.26 Zellbiologische Methoden	135
IV.3.27 Herstellung von Antisera ( <i>Irx1</i> -Antikörper)	136
IV.3.28 Western-Blot	139
IV.3.29 Immunhistochemie	142

IV.3.30 Histologische Methoden	143
IV.3.31 Arbeiten mit <i>Gli1</i> - und <i>Gli2</i> -Mausmutanten	144
<b>V. Glossar, Abkürzungen und Symbole</b>	<b>145</b>
<b>VI. Zusammenfassung</b>	<b>152</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis</b>	<b>154</b>
<b>VIII. Danksagung</b>	<b>173</b>
<b>IX. Publikationen</b>	<b>175</b>
<b>X. Lebenslauf</b>	<b>176</b>

# I. EINLEITUNG

*"IT IS NOT BIRTH, MARRIAGE, OR DEATH, BUT  
GASTRULATION, WHICH IS TRULY THE MOST  
IMPORTANT TIME IN YOUR LIFE."*

*LEWIS WOLPERT (1986)*

Zu den faszinierensten Vorgängen der Biologie zählt die Entwicklung eines multizellulären Organismus aus einer einzelnen Zelle, der Zygote. Neben der Bildung von neuen Zellen vollzieht sich während dieses Prozesses auch deren Organisation und Differenzierung. Durch die graduelle Differenzierung der Zellen, die die verschiedenen Zelltypen eines Organismus bilden, werden zelluläre Unterschiede definiert.

In den letzten Jahren hat die Entwicklungsbiologie, durch die Kombination der Genetik, der Zell- und Molekularbiologie zu einem bemerkenswerten Verständnis der molekularen Basis der Embryonalentwicklung geführt. Heute wissen wir, daß die Entwicklung eines hochkomplexen Organismus unter der präzisen Kontrolle eines genetischen Programmes steht. Die anfänglich totipotente Zygote entwickelt sich mittels eines zeitlich und räumlich koordinierten Abrufens von genetischer Information zu differenzierten und determinierten Tochterzellen. Diese Zellen nehmen, entsprechend ihrer späteren Position und Funktion, definierte Aufgaben im Organismus wahr.

Bezüglich zellulärer Interaktionen und genetischer Regulationen sind dabei so unterschiedliche Prozesse wie die Entwicklung der Sinnesborstenzellen in *Drosophila melanogaster* und der Mausgastrulation auf molekularer Ebene vergleichbar.



Das in dieser Arbeit vorgestellte *Irx1*-Gen spielt in der embryonalen Entwicklung der Maus eine entscheidende Rolle. Zum besseren Verständnis der molekularen Prozesse der *Iroquois*-Regulation wird zunächst die genetische Regulation der Mechanorezeptorenbildung bei *Drosophila melanogaster* vorgestellt, um dann analoge Prozesse, die evolutiv konserviert sind, im Modellsystem Maus zu erläutern.

## ***DIE SPEZIFIZIERUNG VON ZELLIDENTITÄTEN IM NERVENSYSTEM VON DROSOPHILA M.***

### *DIFFERENZIERUNG DER MECHANOSENSORISCHEN SINNESORGANE WÄHREND DER ENTWICKLUNG VON DROSOPHILA MELANOGASTER.*

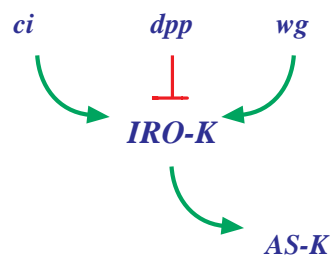
**A**uf der Körperoberfläche der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* befinden sich Haare und Borsten, welche mechanosensorische Sinnesorgane darstellen und Berührung sowie Luftwiderstände wahrnehmen. Interessanterweise ist die Zahl und auch die genaue Position der großen Borsten exakt festgelegt und so bilden diese definierte Reihen mit gleichbleibender Dichte. Diese Sinnesorgane werden während des Larven- und Puppenstadiums schrittweise angelegt. Die Entstehung der sensorischen Vorläuferzelle (SOM; sensomotoric mother cell) wird über die Aktivität der Vormustergene (prepattern genes), der proneuralen Gene und des *Notch-Delta*-Signalweges gesteuert. Aus der SOM entwickelt sich nach mehreren Zellteilungen das sensorische Organ. (Posakony, 1994; Simpson, 1997; Heitzler et al., 1996; Leyns et al., 1996; Gómez-Skarmeta et al., 1995; Gómez-Skarmeta et al., 1996).

### *IN DROSOPHILA M. GEHEN AUS PRONEURALEN ZELLGRUPPEN NEURONEN HERVOR*

**B**evor ein Mechanorezeptor gebildet werden kann, muß der Ort der Entstehung definiert sein. In der Imaginalscheibe sind Proteine durch Diffusion verteilt und bilden einen Konzentrationsgradienten aus. Dies entspricht einem „Vormuster“ (prepattern), welches bereits von Stern 1954 aufgrund seiner *achaete-scute*-Mosaik-Analyse postuliert wurde (Stern, 1954). Bisher konnten nur wenige potentielle Vormustergene identifiziert werden. Die Genprodukte von *hairy* und *panier* sowie die Gene des *Iroquois*-Komplex (*IRO-K*) stellen solche

Vormustergene dar (Romain et al., 1993; Leyns et al., 1996). Der *IRO*-Komplex umfaßt die Gene *araucan*, *caupolitan* und *mirror* (Leyns, 1991; Gómez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997). Während *Hairy* einen Repressor der proneuralen Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes darstellt, handelt es sich bei den Genen des *Iroquois*-Komplexes um Aktivatoren (Skeath and Carroll, 1991; Rushlow et al., 1989; Ohsako et al., 1994; Gómez-Skarmeta et al., 1996; Gómez-Skarmeta et al., 1995).

*Iro* wurde genetisch als die *Tp(3,3)iro<sup>1</sup>*-Mutante beschrieben und die rezessive Mutation führt zum Fehlen der lateralen sensorischen Borsten auf dem Notum (Dambly-Chaudière und Leynes, 1992). Dieser Phänotyp korreliert mit der Abwesenheit der dazugehörigen *achaete-scute-* (*as-sc-*) exprimierenden proneuralen Zellgruppen. Bei den Genprodukte des *IRO*-Komplexes handelt es sich um Homeobox-Transkriptionsfaktoren, die die bisher einzigen bekannten positiven und direkten Regulatoren des *Achaete-Scute*-Komplex (*AS-K*) sind. So aktivieren *araucan* und *caupolitan* den *AS*-Komplex in bestimmten proneuralen Zellgruppen (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Da ihre Expression räumlich größer ist, als die des aktivierten *AS-K*, muß es noch weitere Kofaktoren geben, die an der räumlichen Begrenzung beteiligt sind. Als ein Regulator des *Iroquois*-Komplexes wird das Genprodukt des Segmentpolaritätsgen *cubitus interruptus* (*ci*) (Orenic et al., 1987) beschrieben (Gómez-Skarmeta und Modolell, 1996). Weiterhin wird das Expressionsmuster durch Gene wie *decapentaplegic* (*dpp*) und *wingless* (*wg*) reguliert, die den Imaginalscheiben Positionsinformationen liefern (Vervoort, 2000).



**Abb. I.1:** Regulation des Iroquois-Komplexes in *D. melanogaster* (modifiziert nach (Vervoort, 2000; Gómez-Skarmeta und Modolell, 1996)).

## LATERALINHIBITION ZUR BESTIMMUNG VON NEURONALEN VORLÄUFERN

Nachdem das Vormuster definiert wurde, entsteht in den Vorläuferzellen die neuronale Kompetenz. Dies erfolgt durch die Aktivität der proneuralen Gene, wie *achaete* und *scute* (Simpson, 1997; Heitzler et al., 1996).

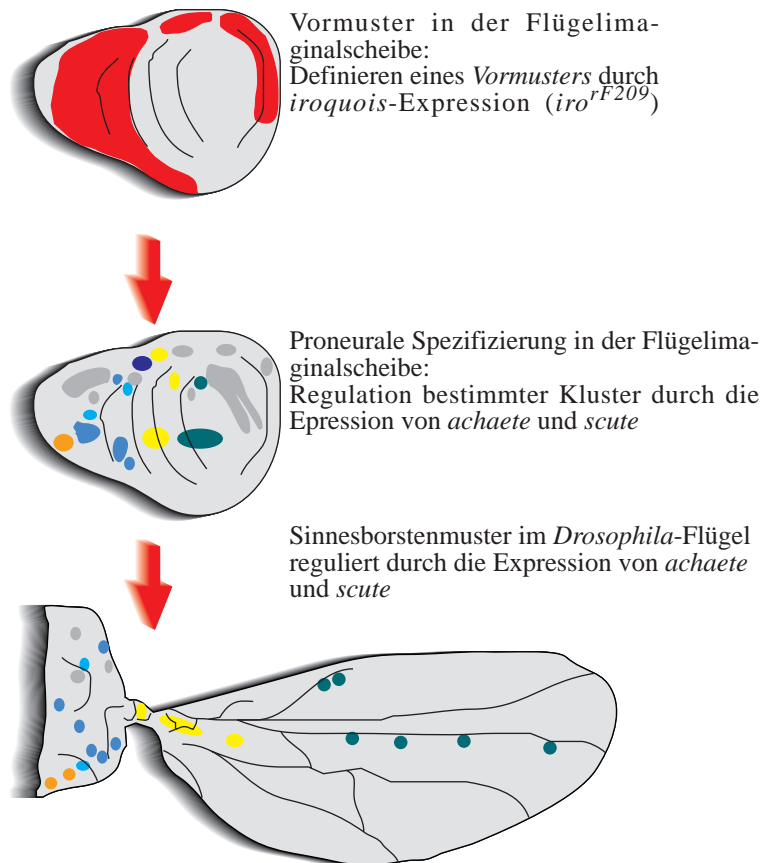


Abb. 1.2: Festlegung des Sinnesborstenmusters auf dem *Drosophila*-Flügel.

Bei der Bildung der sensomotorischen Organe spielt die bereits erwähnte Regulation des *Iroquois*-Komplexes eine ganz wesentliche Funktion. Die essentielle Rolle der *Iroquois*-Gene in der Kontrolle der neuronalen Entwicklung wird durch die Tatsache unterstrichen, daß Teile dieser Regulation hochkonserviert sind und bei allen höheren Eumetazoen, von Nematoden, über die Maus bis hin zum Menschen vorhanden sind (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

## ***DIE SPEZIFIZIERUNG VON ZELLIDENTITÄTEN IN WIRBELTIEREN***

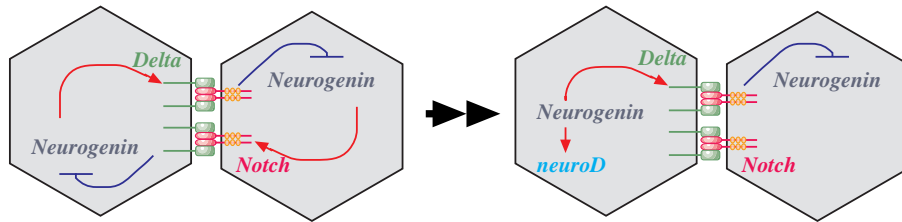
### *IN WIRBELTIEREN ENTSTAMMT DAS NERVENSYSTEM DER NEURALPLATTE*

Alle Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) entstammen in Wirbeltieren entweder der Neuralplatte oder den sensorischen Plakoden der Kopffregion. Bei der Neuralplatte handelt es sich um eine zylindrische Epithelregion, die im dorsalen Ektoderm während der Gastrulation induziert wird. Gegen Ende der Gastrulation faltet sich die Neuralplatte einwärts und bildet das Neuralrohr. In der dorsalen Hälfte des Neuralrohres verlassen Neuralleistenzellen die Struktur und bilden nach der Umwandlung ihres epithelialen in einen mesenchymalen Charakters die sensorischen Neuronen des peripheren (PNS) und des vegetativen Nervensystems. Das aus Gehirn und Rückenmark bestehende ZNS wird aus dem verbleibenden Neuralrohr gebildet.

### *IN WIRBELTIEREN WERDEN NEURONALE VORLÄUFER DURCH LATERALE INHIBITION BESTIMMT*

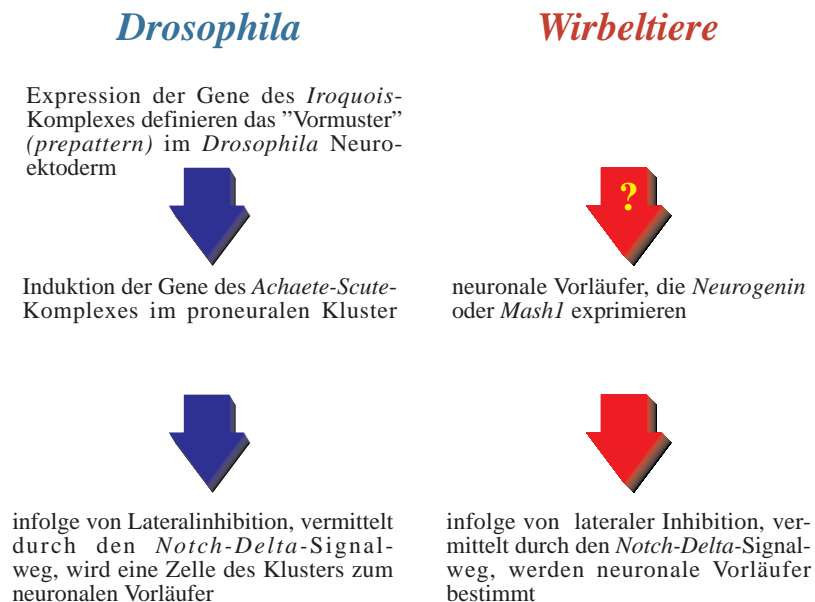
In Wirbeltieren erfolgt die Spezifizierung neuronaler Vorläuferzellen in einer ganz ähnlichen Weise wie in der Fruchtfliege. Betrachtet man die frühen Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, so ist zu erkennen, daß dort die künftigen Neuronen nicht aus der gesamten Neuralplatte entstehen, sondern aus drei exakt definierten Längsstreifen auf beiden Seiten der Mittellinie. So gehen aus den flankierenden Streifen die sensorischen Neuronen und Interneuronen hervor. Dagegen bildet der mittlere Streifen, der später zur Ventralregion des Neuralrohres wird, die Motoneuronen. Ein ganz wesentliches Gen für diese neuronale Differenzierung ist *Neurogenin* (Ma et al., 1996). Dieses Gen gehört zur Familie der basischen *Helix-Loop-Helix*-Transkriptionsfaktoren und ist mit den Genen *achaete* und *scute* aus *Drosophila* verwandt. Die Selektion der neuronalen Zellen erfolgt durch die Lateralinhibition, u.a. vermittelt durch die Gene *Notch* und *Delta* (Chitins et al., 1995; Ma et al., 1996). Dabei dient *Delta* als Ligand, welcher an das Rezeptorprotein *Notch* bindet und dadurch eine intrazelluläre Reaktion in der empfangenden Zelle auslöst. In dieser Empfängerzelle wird die neuronale Differenzierung durch Hemmung der

*Neurogenin*-Synthese gestoppt. Produziert eine Zelle mehr *Delta*-Protein als ihre Nachbarzelle, unterdrückt sie deren *Delta*-Expression. Dies bedeutet wiederum, daß ihre eigene *Neurogenin*-Expression nicht mehr unterdrückt wird und somit entwickelt sich diese Zelle im weiteren Verlauf zu einem Neuron (Chitins et al., 1995; Ma et al., 1996).



**Abb. 1.3:** Durch laterale Inhibition werden im Nervensystem der Wirbeltiere einzelne Zellen zu neuronalen Vorläufern determiniert.

Es stellt sich die Frage, ob Entwicklungsprozesse von Insekten und Säugern identisch sind. Die Analyse in verschiedenen Organismen zeigt, daß viele Prozesse in ihren wesentlichen Zügen vergleichbar sind.



**Abb. 1.4:** Die Festlegung der neuronalen Identitäten in *D. melanogaster* und in Wirbeltieren.

Die Lateralinhibition ist ein gutes Beispiel dafür, wie stark Musterbildungsprozesse und die daran beteiligten Gene in der Evolution konserviert sein können (Tanabe und Jessel, 1996; Jessell und Sanes, 2000; McMahon, 2000). Es darf aber darüber weder die Varianz, die Vielfältigkeit noch die Einzigartigkeit einzelner Entwicklungsschritte vergessen werden.

### ***DIE FRÜHE ENTWICKLUNG DER MAUS***

Nach erfolgter Befruchtung benötigt der Mausembryo 19 Tage bis zur Geburt. Dabei weicht die frühe Phase der Entwicklung der Amnioten stark von der anderer Wirbeltiere ab. Denn die Entwicklung im Mutterleib stellt neue Erfordernisse an das Überleben des Embryos.

Die Eier sind sekundär dotterarm und vollziehen eine totale Furchung. So bezieht der Embryo Nahrung von der Mutter, das heißt, daß die Eier keinen Dottervorrat mitzubringen brauchen, da sie von der Mutter über die Plazenta versorgt werden. Dies bedeutet, daß die Embryonen sehr früh mit der Mutter Kontakt aufnehmen müssen, um ihre Versorgung sicherzustellen (Tam und Behringer, 1997; Hogan et al., 1994). Es ist zu erwarten, daß an diesem Punkt der Entwicklung neue Mechanismen entstanden sind, auf der genetischen Grundlage des vorhandenen Repertoires an Genen. Es könnten bekannte Gene und bekannte Geninteraktionen mit zusätzlicher Funktion auftreten.

Die Befruchtung des Eies und die Furchung erfolgen im Eileiter und benötigen mehrere Tage. Bis zum 8-Zellstadium sind die Blastomeren noch totipotent. Beim Übergang zum 16-Zellstadium kommt es zur Kompaktion, die zur Morula führt. Dabei werden die Blastomere mittels bestimmter Zelladhäsionsmolekülen eng miteinander verknüpft. In diesem Morula-Stadium kommt es zu einer ersten Differenzierung. Die inneren Zellen der Morula bilden die innere Zellmasse (Embryoblast), die äußeren Zellen das Trophoektoderm. Dabei werden die Zellen des Trophoektoderms polyploid, d.h. sie amplifizieren ihr Genom, wohingegen die Zellen der inneren Zellmasse diploid bleiben. Während sich aus dem Trophoektoderm extraembryonale Strukturen wie die Plazenta bilden, entwickelt sich der eigentliche Embryo aus dem Embryoblasten. Die entstandene Blastozyste stellt einen flüssigkeitsgefüllten

Hohlkörper dar, der im weiteren Verlauf aus seiner schützenden *Zona pellucida* "schlüpft". Nun kann sich die Blastozyste, nach viereinhalb Tagen (E4,5), in die Gebärmutterwand einnisten (implantieren). Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt unterteilt sich die innere Zellmasse (IZM): zum einen entsteht das primitive Endoderm, und zwar aus Zellen, die der flüssigkeitsgefüllten Blastozystenhöhle zugewandt sind, und zum anderen bildet sich aus den übrigen Zellen der inneren Zellmasse das primitive Ektoderm (Epiblast). Das primitive Endoderm ist an der Bildung extraembryonaler Membranen beteiligt, wohingegen der Epiblast sowohl den eigentlichen Embryo, wie auch extraembryonalen Membranen ausbildet (Tam und Behringer, 1997; Hogan et al., 1994).

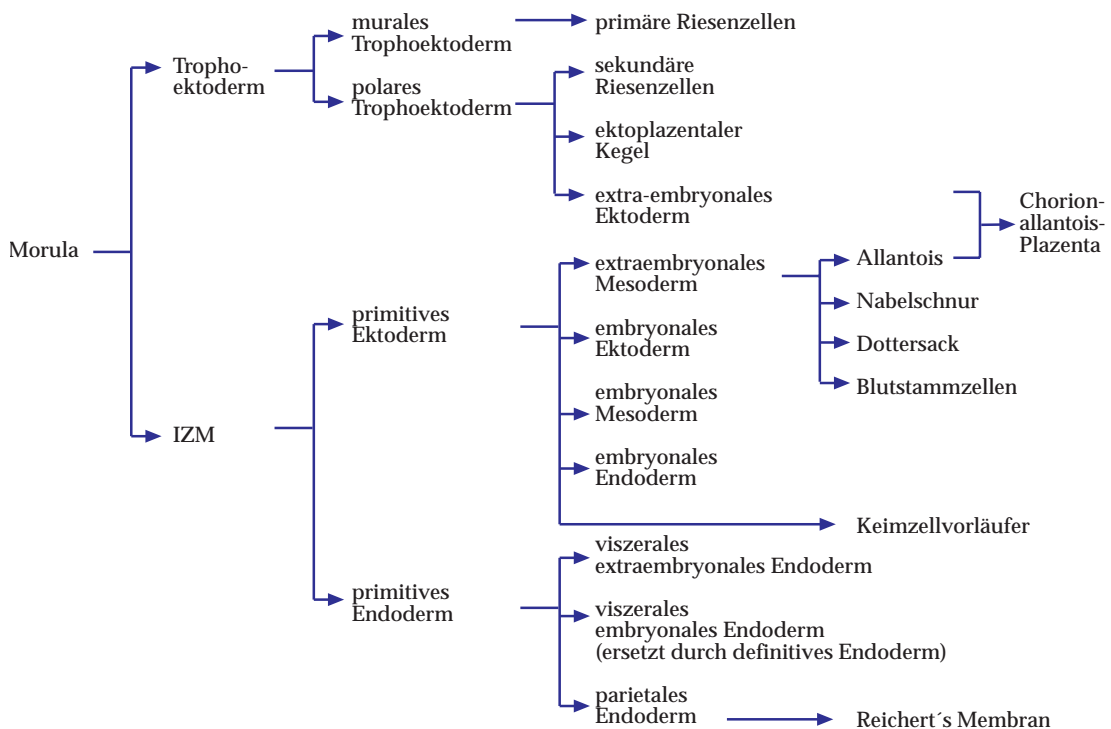


Abb. I.5: Zelllinien im frühen Mausembryo

(modifiziert nach (Bard und Kaufmann, 1994))

### DIE GASTRULATION IM MAUSEMBRYO

Sechs Tage nach der Befruchtung (E6,0) besteht die Blastula aus Trophoblast, Blastocoel und Epiblast. Nach sechseinhalb Tagen setzt die Gastrulation mit der Bildung des Primitivstreifens ein und zum ersten Mal ist damit auch eine

zukünftige Körperachse (anterior-posterior) morphologisch zu erkennen. Der Primitivstreifen beginnt als eine lokale Verdickung am proximo-posterioren Ende des eigentlichen Embryos. Die Innenseite des Embryos wird zur Dorsalseite. Während der Gastrulation wandern proliferierende Epiblastenzellen durch den Primitivstreifen hindurch, und zwar zwischen Ektoderm und viszeralem Endoderm nach rostral und lateral: es bildet sich die mesodermale Zellschicht (Hogan et al., 1994).

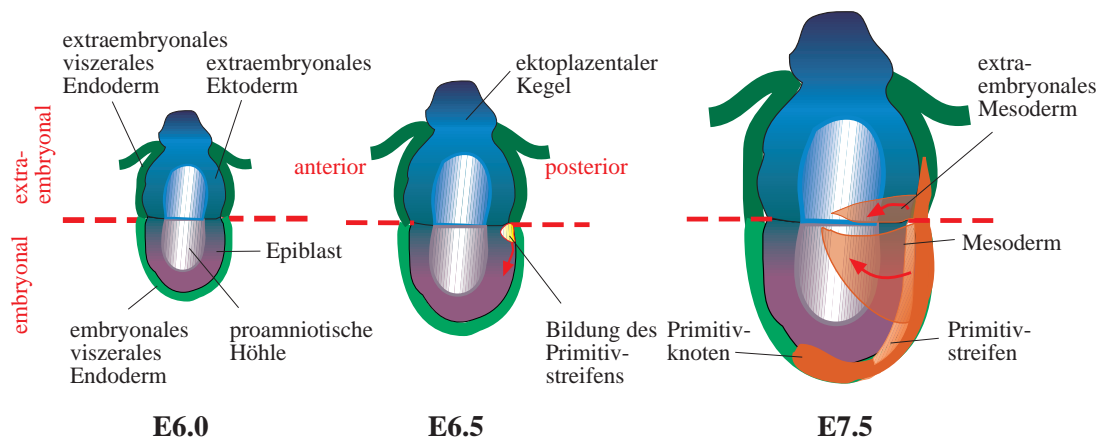


Abb. I.6: Die Mausembrionalentwicklung

Der Primitivstreifen verlängert sich in die Richtung des späteren Vorderendes des Embryos. Am anterioren Punkt der Zellwanderung bildet sich der Primitivknoten, der aus einer Ansammlung dicht gepackter Zellen besteht und funktionell dem Hensenschen Knoten im Hühnerembryo entspricht (Patten, 1971; Hamburger und Hamilton, 1951). Einige Zellen wandern durch den Primitivknoten nach vorne und bilden die Chorda dorsalis. Die Chorda und auch die Somiten entwickeln sich Schritt für Schritt anterior des Primitivknotens. Einige Epiblastenzellen dringen in das viszerale Endoderm ein, ersetzen dieses und bilden so das endgültige Endoderm, aus dem z.B. der Darm gebildet wird (Gardner und Rossant, 1979; Hogan et al., 1994; Bürki, 1986; Tam und Behringer, 1997; Theiler, 1989; Rugh, 1990).

Im Alter E8,5 geht die Gastrulation zu Ende und die Neurulation beginnt mit der Bildung der Neuralwülste im vorderen Bereich auf der dorsalen Seite des Embryos. Im neuralen Gewebe beginnt durch laterale Inhibition die spezifische



Zellentwicklung. In diesem Stadium kommt es zu umfangreichen Faltungen im Embryo, in dessen Verlauf sich das Endoderm, welches bisher den ventralen Bereich des Embryos darstellte, nach innen verlagert und den Darm bildet. Nun beginnt sich auch der Kopf abzuzeichnen. Im Zeitraum zwischen E8,5 bis E9,5 vollzieht der Mausembryo eine komplexe Drehung um seine eigene Achse und nach Abschluß dieser Drehung ist er völlig vom schützenden Amnion und der Amnionflüssigkeit umgeben. Nach neun Tagen beginnt die Organogenese (Hogan et al., 1994; Bürki, 1986; Tam und Behringer, 1997; Theiler, 1989; Rugh, 1990).

*NOCH VOR DER GASTRULATION LIEGT EINE SYMMETRISCHE MORPHOLOGY UND GENEXPRESSION VOR*

Die molekulare Grundlage der embryonalen Achsen und die Ausbildung des Primitivstreifens sind noch umstritten. Klassische Überlegungen gehen davon aus, daß die Interaktion zwischen dem Epiblast und dem axialen Mesoderm für die Achsenbildung verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu postulieren neuere Arbeiten ein anterior-posteriore Muster noch vor der Gastrulation (Beddington und Robertson, 1998). Es konnte sogar gezeigt werden, daß die Spermieneintrittsstelle von Bedeutung ist (Piotrowska und Zernicka-Goetz, 2001).

Die Expression des *Irx1* Gens beginnt noch vor der Gastrulation im extraembryonalen Gewebe. Aufgrund des interessanten Expressionsmusters während der Gastrulation ist eine Funktion dieses Gens in diesem entwicklungsbiologisch so bedeutsamen Prozeß der Regionalisierung gut denkbar.

***VORMUSTERGENE DER MAUS: DIE IROQUOIS-HOMEBOX-GENE***

Die *Iroquois*-Gene sind Mitglieder einer konservierten Genfamilie von Homeodomänen-kodierenden Transkriptionsfaktoren (Burglin, 1997), die in der embryonalen Musterbildung und Regionalisierung sowohl bei Invertebraten wie auch Vertebraten eine wesentliche Rolle spielen (Gómez-Skarmeta et al., 1996; Gómez-Skarmeta et al., 1998). Von den *Iroquois homeobox*- (*Irx*-) Genen

konnten bisher sechs Familienmitglieder in der Maus beschrieben werden - *Irx1*, *Irx2*, *Irx3*, *Irx4*, *Irx5* und *Irx6* (Bosse et al., 1997; Bosse et al., 2000; Peters et al., 2000; Cohen et al., 2000; Bruneau et al., 2000). Es erfolgten noch keine funktionellen Beschreibungen dieser Mausgene und die vorliegende Arbeit stellt somit die erste funktionelle Analyse dar. Es gibt ebenfalls humane *Irx*-Homologe und zwar *hIRX1*, *hIRX2* (Lewis et al., 1999), *hIRX3*, *hIRX4* (Bruneau et al., 2000), *hIRX5* und *hIRX6*. Auch hier gibt es noch keine funktionelle Beschreibung. Für das *hIRX2* liegen es erste funktionelle Hinweise aus der Analyse von humanem Brustkrebs (Lewis et al., 1999) vor. Weitere Analysen in Vertebraten wurden in *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* und in *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Im *Xenopus laevis* konnte den *Iroquois*-Genen *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3* eine Rolle während der Neurogenese zugeschrieben werden (Bellefroid et al., 1998; Gómez-Skarmeta et al., 1998). Im Huhn wurden bisher *clrx2* (Goriely et al., 1999), *clrx3* (Funayama et al., 1999), *clrx4* (Bao et al., 1999) identifiziert und in *C. elegans* *Ziro3* (Tan et al., 1999). Dabei zeigen erste Hinweise, daß *clrx4* eine wichtige Rolle während der Herzentwicklung spielt und *clrx3* während der Coelombildung von Bedeutung ist (Bao et al., 1999; Funayama et al., 1999).

Eine Reihe von homologen Genen, die während der Entwicklung der sensomotorischen Organe der Fruchtfliege eine Rolle spielen, haben auch eine wesentliche Funktion während der Embryogenese der Maus (Tanabe und Jessell, 1996; Jessell und Sanes, 2000; McMahon, 2000). Daher ist es von größtem Interesse, mögliche konservierte und auch nicht konservierte genetische Interaktionen der *Iroquois*-Gene zu charakterisieren.

### **ZIEL DIESER ARBEIT**

**Z**iel dieser Arbeit ist es, das *Iroquois homeobox* Gen *Irx1* (*Iroquois homeobox 1*; (Zülch, 1997; Bosse et al., 1997)) strukturell und funktionell zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst das zeitliche und räumliche Expressionsmuster bestimmt. Desweiteren nutzte ich die Möglichkeit, die Funktion des Gens in Mausmutanten der potentiellen Regulatorgene zu analysieren und so auch ein mögliches Netzwerk mit regulierenden und kontrollierten Genen ("upstream" und "downstream") zu erstellen. Die funktionelle Analyse wurde mit Hilfe der

ES-Zell-Technologie durchgeführt, wobei ich durch gezielte Mutagenese die Rolle des *Irx1*-Gens während der Entwicklung der Maus untersuchte.

## II. ERGEBNISSE

Grundlage dieser Arbeit war meine vorangegangene Analyse des *Irx1*-Gens, vormals *Irx2* genannt, die das Thema meiner Diplomarbeit ausmachte. Zu Beginn meiner Doktorarbeit lag ein in Ansätzen charakterisierter genomischer und cDNA-Klon des *Irx1*-Gens vor. Durch RNA *in-situ*-Analyse war die Expression von *Irx1* während der ZNS-Entwicklung von E9,5 bis E11,5 beschrieben worden (Zülch, 1997).

Ziel der Doktorarbeit ist die detaillierte Expressions- und Funktionsanalyse des *Irx1*-Gens in der Maus. Meine Arbeit beinhaltet die Untersuchung der *Irx1*-Genstruktur sowie des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters durch RNA *in-situ*-Analyse. Ferner wird die Funktion des *Irx1*-Gens in Mausmutanten und *in-vitro*-Experimenten mit potentiellen regulativen Partnern untersucht. Die gezielte Mutagenese des *Irx1*-Gens durch homologe Rekombination bildet die Grundlage der Phänotypanalyse. Die *Irx1*-defizienten Mäusen wurden im Anschluß detailliert analysiert und charakterisiert.

### II.1. STRUKTURANALYSE DES *IRX1*-GENS

Die vollständige Kenntnis der kodierenden Sequenz ist die Voraussetzung für weitere Analysen, ins besondere für Funktionsanalysen. Von der Nukleotidsequenz kann man auf die Aminosäuresequenz schließen und dies ist die Grundlage, um konservierte Bereiche in der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz zu finden.

### **II.1.1. DURCHMUSTERUNG EINER cDNA-BIBLIOTHEK ZUR KOMPLETTIERUNG DER IRX1-SEQUENZ**

Um die vorhandene *Irx1*-cDNA-Sequenz zu vervollständigen (Zülch, 1997), wurde eine Maus-cDNA-Bibliothek (Stratagene) mit einer *Irx1*-spezifischen Sonde durchgemustert. Die gewonnene *Irx1*-cDNA wurde aus dem Phagenvektor in einen Plasmidvektor umkloniert und die weiteren Analysen mittels Restriktions- und Sequenzuntersuchungen durchgeführt.

#### *HERSTELLEN DER IRX1-SONDE*

Da der bis dahin vorhandene *Irx1*-Klon nicht vollständig im 5'-Bereich war, mußte die zu verwendende Sonde möglichst weit 5' gelegen sein. Ferner sollte die Sonde keine Homeobox enthalten, um ein möglichst spezifisches Durchmustern zu ermöglichen. Der vorhandene Klon wurde mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten, so daß ein BS300-Fragment, den Vorgaben entsprechend, entstand.

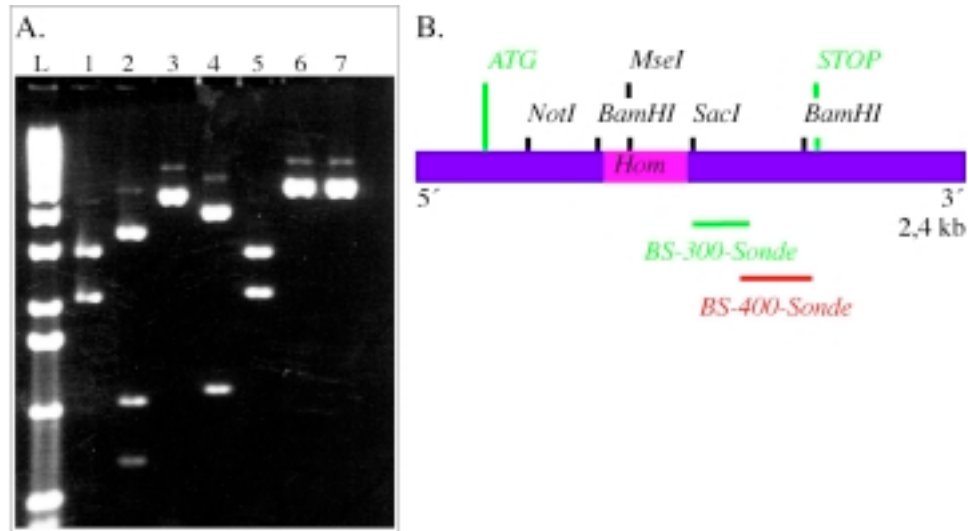
#### *ISOLIERUNG DES 5'-BEREICHS DER IRX1-CDNA*

Für die Identifizierung der *Irx1*-cDNA Klone wurde eine E10,5-Maus-cDNA-Bibliothek mit der *Irx1*-BS300-Sonde durchgemustert. Dabei wurden 200.000 Phagen ausplattiert, deren inserierte DNA das 4 - 8-fache des Mausgenoms abdeckte. Durch Hybridisierung mit der Sonde bei hoher Stringenz und anschließender Subklonierung der hybridisierenden Fragmente konnten 12 Klone isoliert werden, die unterschiedliche Restriktionsmuster aufwiesen. Die Analyse der 12 Klone ergab drei unterschiedliche *Irx1*-cDNA Fragmente, genannt *Irx1*-a, *Irx1*-b, *Irx1*-c und *Irx1*-d. *Irx1*-a stellt das ursprüngliche Fragment dar. Das *Irx1*-d-Fragment beinhaltet die größte neue Sequenzinformation im 5'-Bereich.

#### *KLONIERUNG DER KOMPLETTEN IRX1-CDNA*

Um die ganze *Irx1*-cDNA in einem Klon zur Verfügung zu haben, wurden die Fragmente *Irx1*-a und *Irx1*-d mittels einer *MseI*-Restriktionsschnittstelle

zusammenkloniert und ergaben den Klon *Irx1*-500. Dieser Klon beinhaltet die komplette kodierende *Irx1*-Sequenz (2.390 bp).



**Abb. II.1:** Die *Irx1*-cDNA

**A.** Die Abbildung zeigt Kontrollanalysen der Klonierung *Irx1*-500. Dieser Klon wurde aus den *Irx1*-Einzelklonen hergestellt.

**B.** Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der 2.390 bp großen *Irx1*-cDNA. Dieser Klon umfaßt auf der 5'-Seite den Transkriptionsstart (ATG) gefolgt von der Homeobox (Hom). Im 3'-Bereich befindet sich der Transkriptionsstop (STOP; TGA). Ferner sind die beiden Hybridisierungssonden BS-300 und BS-400 angegeben.

Abkürzungen: Restriktionsanalysen #1-#7: EcoRI, BamHI, NotI, SacI, ClaI+SpeI, ClaI, SpeI; L: 1kb-DNA-Marker

### II.1.2 SEQUENZANALYSE DER *IRX1*-CDNA

Die Northern-Blot-Analyse ergab ein ca. 2.500 bp Fragment, was darauf hindeutet, daß in dem *Irx1*-Klon die gesamte kodierende Nukleotidinformation vorhanden ist. Der 2.390 bp große *Irx1*-Klon ist vollständig sequenziert. Der Translationsstart (ATG) des *Irx1* Gens liegt bei der Position 308 bp und das Ende (TGA) bei Position 1.691 bp. Dieses *Iroquois*-Gen weist eine Homeobox (Gehring, 1994) auf, die sich von 629 bp bis 816 bp erstreckt. Ferner beinhaltet die kodierende *Irx1*-Sequenz im 3'-Bereich eine sog. *Iro*-Box (Burglin, 1997; 1178 bp bis 1217 bp).

Die Nukleotid- wie auch Aminosäuresequenz von *Irx1* ist im folgenden abgedruckt.

*IRX1*-NUKLEOTIDSEQUENZ:

```

      10              30              50
ATTTCGGCCCGCTGAGCGGAGGGCGGCCGCCGAGTCGGCGCGGATCTCGGATACGGGC
      70              90              110
GCAGCCGGGAGCCGGGCGCCGACGCGAGCACTGGGCCGAGGAACAGCGAGCGGCCCGC
      130             150             170
CCCCCGGGCCGGAGCGGCCCGGCCCGCGCCGCGCCGAGCCCCGAGTCGCGCTCCT
      190             210             230
CGGATCGCCAGCCGCTCTCTTGCCCGCGCAGTTAGTGTGCGCCTCCGCCACCACCGAAG
      250             270             290
CCCGCGACATGTCCTTCCCGCAGCTGGGCTACCCGCAATACCTAAGCGCCGCGGGCCCG
      310             330             350
GGCGCCTATGGTGGAGAAGCGCCCTGGGGTGTGGCTGCGGCCGCGGCTGTCGACCCGC
      370             390             410
      M V E K R P G V L A A A A A A A A A A
CGCCTCGTCGGGCCGTCCCGGACTGCGGAGCTGGGAGCGGGCGCGGAGCGGCCGCGGT
      430             450             470
      A S S G R P G T A E L G A G A G A A A V
CACCTCGGTGCTAGGCATGTATGCCGCGCGGGACCGTACGCGGGCGCACCCAACCTACAG
      490             510             530
      T S V L G M Y A A A G P Y A G A P N Y S
CGCCTTCTTGCCCTATGCCGCGGACCTCAGCCTCTTCTCGCAGATGGGCTCTCAGTATGA
      550             570             590
      A F L P Y A A D L S L F S Q M G S Q Y E
ACTGAAGACAACCCCGGGGTGCACCCAGCGACCTTCGCAGCCACACAACGCGCTGCTTA
      610             630             650
      L K D N P G V H P A T F A A H T T P A Y
TTATCCCTATGGTCAGTTTCAATACGGGATCCCGGACGGCCCAAGAACGCCACGCGGGA
      670             690             710
      Y P Y G Q F Q Y G D P G R P K N A T R E
GAGCACCAGCACGCTGAAAGCCTGGCTCAACGAACACCGCAAGAACCCGTACCCACCAA
      730             750             770
      S T S T L K A W L N E H R K N P Y P T K
AGGAGAGAAGATTATGCTGGCCATTATCACCAAGATGACCCTCACACAGGTCTCCACCTG
      790             810             830
      G E K I M L A I I T K M T L T Q V S T W
GTTCCCAATGCGCGCCGGCGCCTCAAGAAGGAGACAAGGTGACTTGGGGGGCGCGCAG
      850             870             890
      F A N A R R R L K K E N K V T W G A R S
CAAGGACCAGGAAGACGGCGCCCTCTTTGGCAGCGACACCGAGGGCGACCCCGAGAAGGC
      910             930             950
      K D Q E D G A L F G S D T E G D P E K A
CGAGGACGACGAGGAGATCGACCTGGAGAGCATTGACATCGATCAGATCGACGAGCGTGA
      970             990             1010
      E D D E E I D L E S I D I D Q I D E R D
TGGCACCAGAGCAACGAAGACGAAGAGGACAAGGGCGGAGGCTCCTAGGGCGCGCTACC
      1030             1050             1070
      G D Q S N E D E E D K A E A P R A R V P
CCCTCCGCTCAGCTCGGGACCAGAGCTCCCCATTGTGCGCTGCTGAGACTCAAGTC
      1090             1110             1130
      P P A S A R D Q S S P L S A A E T L K S
TCAAGATTCGCCCTTGGGCTGGTTAAGGAGTCTCAGAGCCCGGCGACACCGCTGCT
      1150             1170             1190
      Q D S P L G L V K E V S E P G S T R L L
GAGTCCTGGCGCCGCGGCTCGGCCTGCAGGGCGCGCCGACAGCAAGCCCAAGATCTG
      1210             1230             1250
      S P G A A A V G L Q G A P H S K P K I W

```

## II. ERGEBNISSE

```

GTCTCTGGCTGAGACAGCCACTAGCCCCGACGGTGGCCCTAAGGCGTCTCCACCGCCACC
  S L A E T A T S P D G A P K A S P P P P
    1270                1290                1310

CTCAAGCCACGCCAGCGCACACGGGCCGCCAGCGGCTCACCCCTGCAACACCCGGCCCTT
  S S H A S A H G P P S G S P L Q H P A F
    1330                1350                1370

TCTACCCAGCCACGGACTGTACACCTGTACATAGGCAAGTTTCCAACTGGACCAACGG
  L P S H G L Y T C H I G K F S N W T N G
    1390                1410                1430

CGCGTTCCTAGCACAGGGCTCGCTGCTGAACATGCGATCTTTCCTGGGCGTCAGCGCGCC
  A F L A Q G S L L N M R S F L G V S A P
    1450                1470                1490

GCATGCAGCACCTCAGGCCACACCTGACAGCACCACCACCTCCACAGCCGCCAGTCCA
  H A A P H G P H L T A P P P P Q P P V Q
    1510                1530                1550

GGTTGCCACCGGGGTGCTCCATGGTGAGAAGGCCTCCGCACGCAGCAGTCCTCGACTTCC
  V A T G V L H G E K A S A R S S P A L P
    1570                1590                1610

AGAGAGAGACCTAGTCACCAGACCGGATTCGCCCCACAACAGTTAAAGTCGCCCTTCCA
  E R D L V T R P D S P P Q Q L K S P F Q
    1630                1650                1670

GCCGGTGCAGCACAACCTCGCTGGCCCCGAGGAGGAAACGCCTCGGATCCTCGAGCCCT
  P V R D N S L A P Q E G T P R I L A A L
    1690                1710                1730

CCCGTCTGCCTGATTAAGGGGGTTCATCTTTTACTTTTTCGGGGGGAGGGGAGGGGGAGG
    1750                P S A * L R                1770                1790

GGTTGGGGGGAGGAGACGAGGAAGAATTAAGACAAATATTGAGACTTGTGTAAGGA
    1810                1830                1850

CAAACGTGACGCAGCGTCAGTGATTCTCACACATCGCTCTCTGCAGAAAGGGGCTCATC
    1870                1890                1910

CTGCCTAAGCGCTTGGGAAGGGGGAGTAAGGCTCAGCCTCGCCGCTCGGATTGATTATC
    1930                1950                1970

CGATTGCGTAAATGCCCCCTCCCACTTCTGTGTTGTGTCTTCTTTGTTTCTTTTTC
    1990                2010                2030

CCTTTCTGTATATAGCGTGATTTTCAGATTGTAATAGCGCGTCAGCGAACTTGTTTAAAT
    2050                2070                2090

CATATATTTTGTCTAATAAACTAAATGAAACGATGTCCACGCGGTACAGCTGTTTGTGTC
    2110                2130                2150

CCTGTCCTCCTGCGTTTGGGGAGGCCATGATGTTTGCATCTTGAAATCCTGGGCACA
    2170                2190                2210

GTTCAGGGCTATGTTTTCGCCAGACTCTTTTGGGAGAAGGGTCTTGAACAGTGTTC
    2230                2250                2270

ACCGAGTGTGAGGCGCACAGTCCGTGATGGTAGTGGTTGAATTTGTTGTTTTGCTCCTA
    2290                2310                2330

GCCAGCTTCTTGTGGCAGTGAATCTTTGCCAGCTTAGACAAGCGTTTATCTGGAG
    2350                2370                2390

CAGCCTTTTAAAGTACATAAATGCGTTCAATTTAGACAGTTTACAAAAA

```

**Abb. II.2:** *Irx1*-cDNA Sequenz

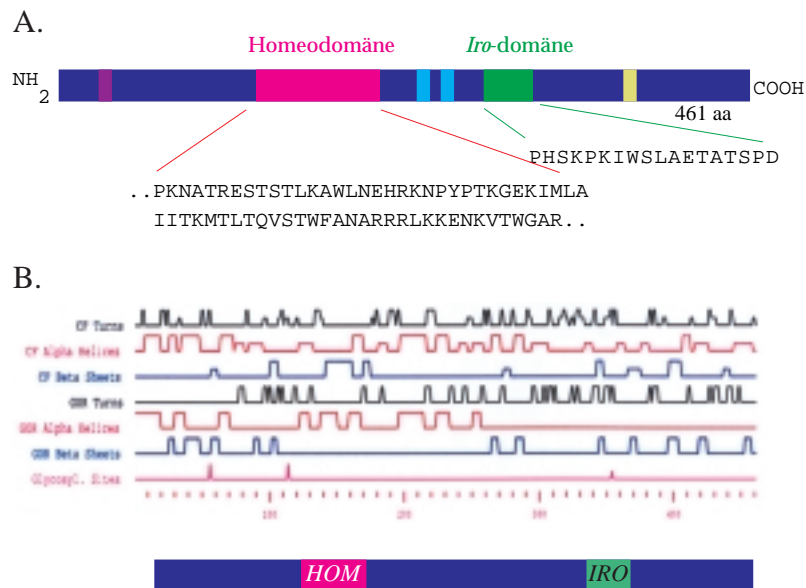
Die Abbildung zeigt die *Irx1*-Nukleotidsequenz der cDNA und die kodierte Aminosäuresequenz. Der Transkriptionsstart (ATG; 308 bp) und der Transkriptionsstop (TGA; 1691 bp) sind eingezeichnet und farblich markiert. Ebenso ist die Homeobox (629 bp bis 816 bp) und die *Iro*-Box (178bp bis 1217bp) eingezeichnet.

Abkürzungen: **ATG:** START; **TGA:** STOP; **DPG ... KEN:** Homeodomäne; **PHS ... ETA:** *Iro*-Domäne



*IRX1*-PROTEINSEQUENZANALYSE

Mittels zweier algorithmischer Berechnungen konnte eine potentielle Sekundärstrukturvorhersage des *Irx1*-Proteins getroffen werden. Dazu wurden Berechnungen mit dem Chou-Fassmann-(CF) und dem Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR)-Algorithmus angestellt (Chou und Fasman, 1978; Garnier et al., 1978). Diese dienen dazu,  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblattstrukturen und Drehungen in der sekundären Aminosäuresequenz vorherzusagen. Aus diesen Berechnungen ergibt sich im Bereich der Homeodomäne eine zu erwartende Helix-Schleife-Helix-Struktur. Ferner sind im Bereich der *Iro*-Domäne potentielle  $\beta$ -Faltblattstrukturen erkennbar, die durch ein vermehrtes Auftreten von Prolin begründbar sind. Das *Irx1*-Protein weist einen Alanin-reichen Bereich (10 - 19 aa), eine potentielle Phosphorylierungsstelle für eine *MAP-Kinase* (mitogen-activated protein kinase; 416 - 449 aa) und einige saure Aminosäurebereiche im mittleren Teil (180 - 230 aa) auf. Dieser sauren Region wird eine Rolle in der Aktivierung der Transkription zugesprochen (Burglin, 1997).



**Abb. II.3:** Struktur *Irx1*-Proteins

**A.** Die Struktur des 461 aa großen *Irx1*-Proteins mit der Homeodomäne (rosa) und *Iro*-Domäne (grün). Ferner ist der Alaninstreich (lila), die sauren Bereiche (türkis) und die potentielle MAPK-Stelle (gelb) markiert.

B. Die Abbildung stellt die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage mittels algorithmischer Berechnungen dar. Es wurden Chou-Fassmann-(CF) und Ganier-Osguthorpe-Robson (GOR) Berechnungen zu Grunde gelegt. Erkennbar ist die Helix-Schleife-Helix-Struktur im Bereich der Homeodomäne (Hom) und die  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Bereich der *Iro*-Domäne (*IRO*).

Das *Irx1*-Gen kodiert für ein theoretisches Protein aus 461 aa mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Davon bilden 63 aa die Homeodomäne, die aus vier  $\alpha$ -Helices besteht, und 14 aa die *Iro*-Domäne.

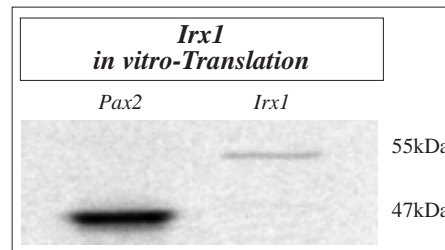


Abb. II.4: Die Abbildung zeigt eine *Irx1*-in-vitro-Translation.

Die in-vitro Translation wurde mit der *Irx1*-cDNA (*Irx1*-500) durchgeführt (T7-RNA-Polymerase; pBSKS+). Das *Irx1*-Gen kodiert für ein 55 kDa großes Protein. Als positive Kontrolle diente die Pax2 -cDNA, die für ein 47 kDa großes Protein kodiert.

Alle *Iroquois*-Gene zeigen einen hohen Grad an evolutiver Konservierung der Sequenz in der Homeodomäne. Innerhalb der Maus *Irx*-Gene (*Irx1*, *Irx2*, *Irx3*, *Irx4*, *Irx5* und *Irx6*) liegen Übereinstimmungen von 90 - 100% auf Aminosäureebene vor. Typischerweise zeigen alle Mitglieder der *Iroquois*-Proteinfamilie ein Alanin an der Aminosäureposition 50 der Homeodomäne. Keine andere bekannte Homeodomäne zeigt an dieser Stelle ein Alanin, die von besonderer Bedeutung ist, da dies die Aminosäureposition 9 der Erkennungshelix ist. Diese Position ist entscheidend an der DNA-Bindung beteiligt (Treisman et al., 1989).

*Aminosäurevergleich der murinen Iroquois-Genfamilie:*

	1					50
<i>Irx1</i>	M.....	.....	.....	.....	.....	.....VEK RPGVLA.....
<i>Irx3</i>	MSFPQLGY..	.....	.....	.....	.....	.....QYIRPLYPPE RPGAAGGGGG GSSAGGRSGP
<i>Irx2</i>	MSYPQ.GYLY	.....	.....	.....	.....	.....QAPG SLALYSC..P
<i>Irx5</i>	MSYPQ.GYLY	.....	.....	.....	.....	.....QPSA SLALYSC..P
<i>Irx4</i>	MSYPQFGYPY	SSAPQFLMTT	NSLSTCCESG	GRTLADSGPA	ASAQAPVYCP	
<i>Irx6</i>	MAFSPFGHPY	GSTSQFLVSA	SSSATCCETA	PRSVSDVASA	STSASTLCCT	
	51					100
<i>Irx1</i>	..GTAELGA..	..GAGAAAVT	SVLGM.Y.AA	AG.PYAGAPN	YSAFLPYAAD	
<i>Irx3</i>	GAGASELAA..	..SGSLSNVLS	SVYGAPYAAA	AA.AAAAAQG	YGAFALPYATE	

## II. ERGEBNISSE

<i>Irx2</i>	AYGASALAAP	RSEELARSAS	GSAFSPYPGS	AAFTAQAATG	FGSPLQYSAD
<i>Irx5</i>	AYSTSVLSGP	RTDELGRSSS	GSAFSPYAGS	TAFTA.PSPG	YNHSLQYGD
<i>Irx4</i>	VYESRLLATA	RHELNSAAAL	GVYGSYPYGS.	.....SQG	YGNVVTYVYGE
<i>Irx6</i>	PYDSRLLGSA	RPEL..GAAL	GIYGAPYAA.	.....AQS	YPGYLTYVGE
	101				150
<i>Irx1</i>	LSLF.SQMGS	QYELKDNPGV	.HPA.TFAA.	.HTTPAYYPY	GQFYQ.....
<i>Irx3</i>	LPIF.PQLGA	QYELKDSPGV	QHPA.TAAAF	PHPHAFYPY	GQYQF.....
<i>Irx2</i>	AAAA.AAAGF	P.SYVGSPPYD	THTT.GMTGA	ISYHPYGSAA	YPYQL.....
<i>Irx5</i>	AAAA.AAAAF	..SYVGSPPYD	.HTP.GMAGS	LGYPHYAAPL	GSYPY.....
<i>Irx4</i>	ASAFY.SLN.	SFESKDGTS	SHAGLPPTAA	AAYYPYEPAL	SQYVDRYGT
<i>Irx6</i>	PPTLCGALNP	QYEFKDAAGS	FAPSL..TQP	GAYYPYETTL	GQYQYDRYGG
	151				200
<i>Irx1</i>	...GDPGRPK	NATRESTSTL	KAWLNEHRKN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
<i>Irx3</i>	...GDPSPRK	NATRESTSTL	KAWLNEHRKN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
<i>Irx2</i>	...NDPAYRK	NATRDATATL	KAWLNEHRKN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
<i>Irx5</i>	...GDPAYRK	NATRDATATL	KAWLNEHRKN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
<i>Irx4</i>	VD..SGTRRK	NATRETTSTL	KAWLQEHKRN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
<i>Irx6</i>	VELSSAGRRK	NATRETSAL	KAWLHEHRKN	PYPTKGEKIM	LAIITKMTLT
	201				250
<i>Irx1</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKVT	WGARSKDQED	GALFGSDTEG	DPEKAEDDEE
<i>Irx3</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKMT	WAPRSRTDEE	GNAYGSEREE	EDEE.EDEEE
<i>Irx2</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKMT	WAPRNKSEDE	DEDEG.DASR	SKESSDKAQE
<i>Irx5</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKMT	WTPRNRSEDE	EEENIDLEK	NDEDEPQKPE
<i>Irx4</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKMT	WPPRNKCADE	KRPYGEGEEE	EAGEEESREE
<i>Irx6</i>	QVSTWFANAR	RRLKKNKMT	WAPKNK....	.....GGEER	KADSGEDSLG
	251				300
<i>Irx1</i>	I.DLE.SIDI	DQIDERDG..	.....DQSNE	DEE.....	..DKAEAPRA
<i>Irx3</i>	S.KRELEMEME	EELAGRGGGH	GGRGAGRERR	DEEIDL...E	NLDSAAAGSE
<i>Irx2</i>	D.GTETSAED	EGISLHVDSL	TDHSCSAESD	GEKLPFRAGD	ALCESGSECK
<i>Irx5</i>	D.KGDLEGEPE	SG..GAEQK	ATAGCE.RLQ	GPLSP..AGK	ETEGSLSDSD
<i>Irx4</i>	PLKSAKSEGH	AGKDDKELEL	SDLEDFDPLD	AETSECELKT	PFQSLDSSPE
<i>Irx6</i>	CLNGDTKDAT	ASQEARGRLR	SDLED...LE	EEEEEEEAEE	..EAAVSAAR
	301				350
<i>Irx1</i>	RVPPASARD	QS...S.PLS	AAETLKSQDS	.....PLG	LVK.....
<i>Irx3</i>	LTLAGAAHRN	GDFGLG.PIS	DCKTSDSDSDS	SEGLEDRLPS	VLSLAPPPPP
<i>Irx2</i>	DKFEDLEDEE	DEDEEC.ER.	.DLAPPKPVY	S..SPLTGEV	APLLSPAAGE
<i>Irx5</i>	FKESSSEGRH	DELPRP.PRA	GESSPAGPAT	ARLAEDAGPH	YPASVPAPGP
<i>Irx4</i>	RIPASSDGP	TGKEASTTLR	MPLGTAGGAV	MDGLERARN	CLRSTVVVVD
<i>Irx6</i>	RL.....	ADFQKST...	QPLPAPCAAA	QEGCLE.SRE	C...GLGLPR
	351				400
<i>Irx1</i>	...EVSEPG	S..TRLLSPG	AAAVGLQGAP	HSKPKIWSLA	ETATSPDGAP
<i>Irx3</i>	VARAPASPPS	P..PSSLDPC	APAPAPSSA.	LQKPKIWSLA	ETATSPDN.P
<i>Irx2</i>	APRG.....G	SGGKTPGLSR	TSPGAPP..P	ASKPKLWSLA	EIATSDLLKQV
<i>Irx5</i>	HPSAGELPPG	SGGSSVIHSP	PPPPPPPPAV	LAKPKLWSLA	EIATSDKPKK
<i>Irx4</i>	SGAEGGPPAC	EAKLTFAQAG	APPNL.....	ETKPRIWSLA	HTATAAAATA
<i>Irx6</i>	FSFTEAPQSG	EADFITAEPG	GPTMILHYPS	GHKPRIWSLA	HTAASAIVES
	401				450
<i>Irx1</i>	KASPPPP..S	SHASA...HG	PPS..GSPLQ	HPAFLP SHGL	YTCHIGKFSN
<i>Irx3</i>	RRSPPGAGGS	PPGAA...VA	PPTLQLSPAA	AAAAAAAAHRL	VSAPLGKFPA
<i>Irx2</i>	SLG.....	..PGC...G	P.....PGL	PAAAAAPASTG	APPGGSPYSA
<i>Irx5</i>	DGG.GGSEGS	PCPPC...PG	PMGGQTLGGS	RASPAPAPAR	SPSAQCFFPG
<i>Irx4</i>	LSQT...EF	PSC.MLKRQG	PTGVSATTPA	SSPAVTAPSG	ALDRHQDSPV
<i>Irx6</i>	APSTPPRAQS	PECHMIPRQ.	PSSIRLLVLP	RDSEGEEDSP	AAKAFGNSTF
	451				500
<i>Irx1</i>	WT..NGA..F	LA..QGSLLN	MRSFLGVSAP	HAAPHGPHLT	APPPPQPPVQ
<i>Irx3</i>	WT..NRP..F	PGPPAGPRPH	PLSMLG.SAP	Q.....HLL	GLPG.....
<i>Irx2</i>	SPLLGRHLYY	TSPFYGNYTN	YGNLNAALQG	QGLLRyntAA	SSPGETLHAM
<i>Irx5</i>	GTVLSRPLY	TAPFYPGYTN	YGSFGHLHG	PGPGPSPTA.	.GPGSHFNGL
<i>Irx4</i>	TSLRNWVDGV	FHDPILRHST	LN.QAWATAK	GALLDPGPLG	RNLGAGTNVL
<i>Irx6</i>	T.LQGLPLNC	APYPRRREPE	VRFQYPSGAE	G~~~~~~	~~~~~
	501				550
<i>Irx1</i>	VATGVLH.GE	KASARSSPAL	PE..RDLVTR	PDSPPQLKS	PFQVPRDNSL
<i>Irx3</i>	.AAG..HPAA	AAAAYARPAE	PESGTRDRCSA	LEVEKKLLKT	AFQPV...PR
<i>Irx2</i>	PKA.A...SD	TKAGSHSLE	SHYR...PPG	GGYEPKDKTS	EGCAVVGAGV
<i>Irx5</i>	NQT.VLNRAD	VLAADPKMLR	SQSQDLCKD	SPYELKKGMS	DI~~~~~
<i>Irx4</i>	TTPLACSFPP	TVPQDVPPAG	ASRELLATPK	AGGKPFCT~	~~~~~
<i>Irx6</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	551	568			
<i>Irx1</i>	APQE..GTPR	ILAALPSA			
<i>Irx3</i>	RPQNRLDAAL	VLSALSSS			
<i>Irx2</i>	QTYL~~~~~	~~~~~			
<i>Irx5</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>Irx4</i>	~~~~~	~~~~~			
<i>Irx6</i>	~~~~~	~~~~~			

Abb. II.5: Aminosäurevergleich der *Iroquois*-Proteine der Maus.

Innerhalb der Homeodomäne weisen die *Irx*-Gene eine nahezu 100%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf (rosa markiert). Bemerkenswert ist dabei auch das Alanin an Position 50 der Homeodomäne (türkis markiert). Das Protein weist weiterhin Bereiche auf mit überdurchschnittlicher Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (blau markiert). Die flankierenden Regionen weisen hingegen keine große Konservierung der Aminosäuresequenzen auf. Eine Ausnahme bildet die hoch konservierte *Iro*-Domäne (hellgrün markiert).

Die *Iro*-Domäne zeigt ebenfalls eine sehr hohe Konservierung innerhalb der Maus-*Irx*-Gene, auch im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der *Iroquois*-Familie (Daten nicht gezeigt (Burglin, 1997)). Bisher kann diesem kurzen Motiv keine Funktion zugeordnet werden, theoretisch kann es als Proteininteraktionsdomäne fungieren: Mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Screens wurde ein neues *Zn-Finger*-Protein identifiziert, welches an dieses *Iro*-Motif bindet. Allerdings ist die Funktion dieses Proteins noch unklar (Zusammenarbeit mit J.L. Gómez-Skarmeta, Madrid).

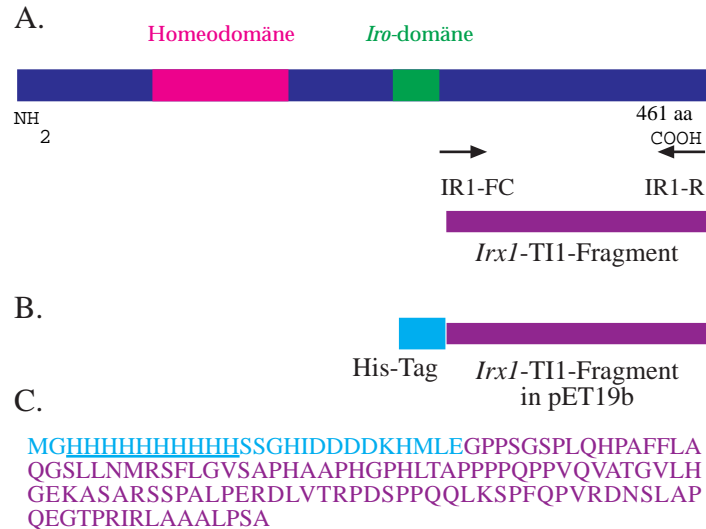
### **II.1.3. DAS *IRX1*-ANTISERUM**

Zur Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen das *Irx1*-Protein wurden Proteinfragmente in *E. coli* überexprimiert, welche dann zur Immunisierung von Kaninchen benutzt wurden. Im Gegensatz zur Herstellung synthetischer Peptide hat dies den Vorteil, daß die Proteine länger und damit spezifischer sind, und entsprechend mehr Antikörper gebunden werden können.

Voraussetzung dafür war eine erfolgreiche Überexpression und Aufreinigung der *Irx1*-Fragmente. Dazu wurden verschiedene *Irx1*-cDNA-Fragmente, die über PCR-Amplifikation hergestellt worden waren, in einen Vektor kloniert, der eine starke Expression ermöglichte und die Möglichkeit bot, die exprimierten Proteine über eine kurze, fusionierte Sequenz mit Hilfe der sehr effizienten Affinitätsreinigung zu isolieren. Ein solches System stellt das Bakteriophage-*T7*-Promotor/Histidinhexamer-System dar (Stüber et al., 1990; Studier et al., 1990).

Alle Fragmente befinden sich im carboxyterminalen Bereich des *Irx1*-Proteins und beinhalten weder die Homeodomäne noch die *Iro*-Domäne. Es wurde dieser Bereich gewählt, um aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu anderen

*Irx*-Proteinen eine Kreuzreaktion auszuschließen. Es zeigte sich, daß das *Irx1*-TI1-Fragment von Aminosäure 345-461 gut exprimiert wurde, und so wurde es zur Herstellung des *Irx1*-Antiserums benutzt.



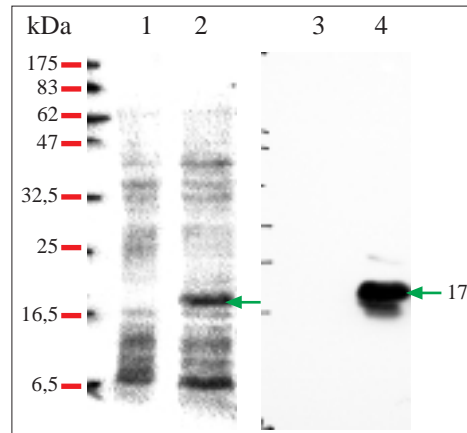
**Abb. II.6:** Herstellung der *Irx1*-Fragmente

A. Die Abbildung zeigt den amplifizierte *Irx1*-Bereich (345-461aa), welcher als *Irx1*-TI1-Fragment subkloniert, überexprimiert und zur Herstellung des *Irx1*-Antiserums benutzt wurde (Benutzte PCR-Primer: IR1-FC, IR1-R).

B. Die Abbildung zeigt das *Irx1*-TI1-Fragment mit His-Tag in pET19b kloniert.

C. Die Abbildung zeigt die Aminosäuresequenz des His-*Irx1*-TI1-Fragments. (Der His-Tag ist in türkis markiert und der Histidinbereich unterstrichen, während die *Irx1*-Sequenz in lila markiert ist).

Dieses Fragment wurde exprimiert, gereinigt und in Kaninchen injiziert. Um Proteine hoher Reinheit zu erhalten, wurden die Bakterienextrakte zur Affinitätsreinigung zweimal über eine Nickelchelatsäule gegeben. Die Immunisierung führte zu einem funktionellen Antiserum mit guten Ergebnissen bei der Analyse von Western-Blots.



**Abb. II.7:** *Irx1*-Antiserumreaktion

Die Abbildung zeigt Western-Blots, die mit *Irx1*-Antiserum inkubiert wurden. Dafür wurde ein Western-Blot aus Bakterienextrakt hergestellt. Die Bakterien wurden zuvor mit dem His-*Irx1*-T11-pET19b transformiert (2, 4), während die Kontrolle mit pET19b transformiert worden war (1,3). Beide Extrakte wurden in einem Proteingel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (1,2) und mit den *Irx1*-Antiserum inkubiert (3,4). Deutlich ist die His-*Irx1*-T11-Fragmentbande erkennbar (Pfeil). Exakt diese *Irx1*-T11-Bande wird durch das *Irx1*-Antiserum markiert (4), wohingegen kein Signal bei dem pET19b-Bakterienextrakt vorhanden ist. Da die Bakterien mit pET19b ebenfalls einen His-Tag exprimieren und kein Signal erkennbar ist, ist das *Irx1*-Antiserum spezifisch gegen *Irx1*.

(Antiserum aus Kaninchen #9111; 10% Gel, 1% Milchpulver)

Bei der Verwendung des Serums in der Histologie, vorrangig während der Analyse von Cyrostatschnitten, erwies sich der Antikörper jedoch nur als bedingt geeignet, da Hintergrundreaktionen auftraten.

## II.2. ANALYSE DES RÄUMLICHEN UND ZEITLICHEN EXPRESSIONSMUSTERS DES *IRX1*-GENS

Das Wissen über einen räumlichen und zeitlichen Expressionsverlauf eines Gens gibt erste Anhaltspunkte über dessen Funktion. Folgende methodische Ansätze wurden benutzt, um verschiedene Entwicklungsstadien der Maus zu untersuchen:

- 1) RNA-Analyse mittels Northern-Blot-Hybridisierung
- 2) nicht radioaktive Gesamtkörper (whole-mount-) in-situ-Hybridisierungen
- 3) radioaktive in-situ-Hybridisierungen auf Mausparaffinschnitten.

### II.2.1. ANALYSE DES *IRX1*-TRANSKRIPTS WÄHREND DER MAUSENTWICKLUNG

Zur Analyse des Transkriptes wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Diese ermöglicht zwei wesentliche Aussagen. Zum einen ermittelt man die Größe des untersuchten Transkriptes und zum anderen wird der zeitliche und räumliche Verlauf einer Expression gezeigt.

Für die Northern-Blot-Analyse wurde Gesamt- bzw. PolyA-RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen der Maus präpariert.

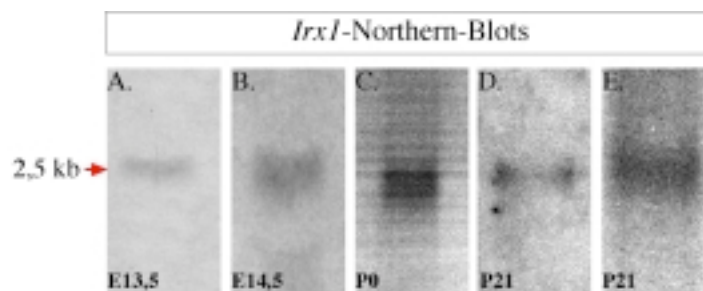


Abb. II.8: *Irx1*-Northern-Blot-Analyse

Die Abbildung zeigt fünf verschiedene Maus-Northern-Blots, die alle mit einer 0,4 kb-*Irx1*-Sonde (B/S400) hybridisiert wurden. Diese 3'-Sonde beinhaltet nicht die Homeobox. In allen Northern-Blots ist ein 2,5 kb Transkript markiert.

**A.:** Die Abbildung zeigt einen Gesamt-RNA Northern-Blot von E13,5 alten Embryonen.

**B.:** Die Abbildung zeigt einen PolyA-RNA Northern-Blot von E14,5 alten Embryonen.

**C.:** Die Abbildung zeigt einen PolyA-RNA Northern-Blot von neugeborenen Mäusen (Gehirn).

**D.:** Die Abbildung zeigt einen PolyA-RNA Northern-Blot von 21d alten Mäusen (Gehirn).

**E.:** Die Abbildung zeigt einen Gesamt-RNA Northern-Blot von 21d alten Mäusen (Lunge).

In den untersuchten Stadien und Organen konnte ein *Irx1*-Transkript von einer Länge von 2,5 kb nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß *Irx1* embryonal (E13,5 und E14,5), im Stadium der Geburt (P0) und auch 21 Tage nach der Geburt (P21) aktiv ist. Die klonierte *Irx1*-cDNA ist 2,5 kb groß (s.o.), was im Vergleich mit dem nachgewiesenen Transkript darauf schließen läßt, daß die komplette kodierende Sequenz vorliegt.

### ***II.2.2. IRX1-EXPRESSION WÄHREND DER FRÜHEN GASTRULATION (E6,0 BIS E7,5)***

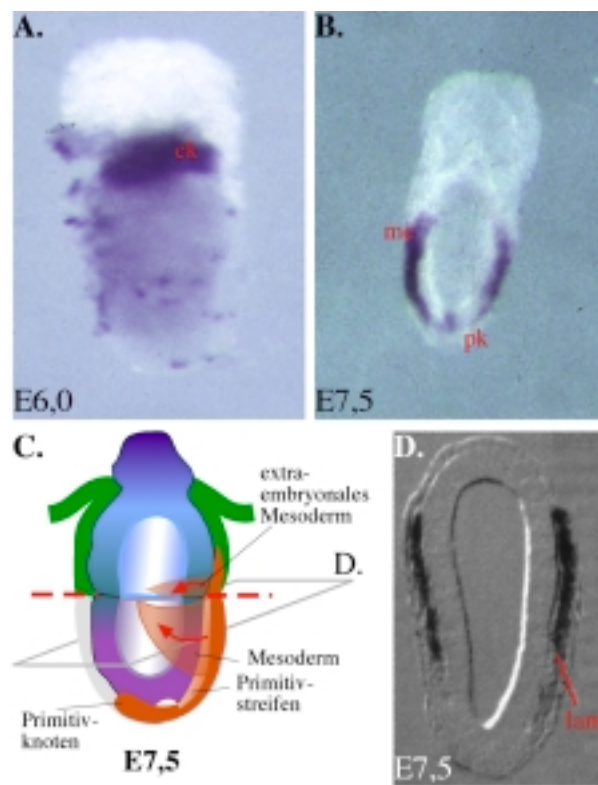
**D**as Gen *Irx1* zeigt ein räumlich und zeitlich spezifisch definiertes Expressionsmuster.

In RNA-*in-situ*-Hybridisierung von Embryonalstadien zeigte sich *Irx1*-Expression im frühesten untersuchten Stadium am Tag 6,0 (E6,0). Das ist das Eizylinderstadium (E5,5-E6,0), an dem sich der eingenistete Embryo zu differenzieren beginnt. In diesem frühen Stadium ist *Irx1* im extraembryonalen Ektoderm exprimiert. Der Übergang zwischen extraembryonalem und embryonalem Gewebe entspricht exakt der distalen Grenze der *Irx1*-Expression. Einen halben Tag später (E6,5) beginnt die Gastrulation des Mausembryos, in deren Verlauf der frühe Primitivstreifen erkennbar wird und erste Mesodermzellen erscheinen (Hogan et al., 1994). Auch in diesem Stadium (E6,5)



ist *Irx1* noch immer im extraembryonalen Ektoderm an der extraembryonal-embryonalen Grenze exprimiert.

Diese *Irx1*-Expression verändert sich einen Tag später (E7,0 - 7,5) ganz wesentlich. Nun ist *Irx1* in den lateral auswandernden Mesodermzellen aktiv. Im Stadium der Gastrulation dehnt sich der Primitivstreifen weiter aus und auch die Bildung der Kopfanlagen beginnt. Mesodermale Zellen wandern vom Primitivstreifen lateral und posterior zwischen den anderen Keimblättern aus, aber niemals nach anterior.



**Abb. II.9:** *Irx1*-Expression während der Gastrulation der Maus.

Die Abbildungen zeigen *whole mount-in-situ*-Analysen von Embryonen der Stadien E6,5 und E7,5 (A, B). Der E7,5 alte Embryo (B) wurde transvers geschnitten (D). Die Schnittebene ist in der Schemazeichnung (C) dargestellt.

**A.:** Die Expression von *Irx1* ist gut im extraembryonalen Ektoderm erkennbar.

**B.:** Die *Irx1*-Expression wechselt in das laterale Mesoderm und den Primitivknoten.  
Abbildung B aus A. Zülch (Zülch, 1997)

**C.:** Die Schemazeichnung zeigt die Zellwanderungen der mesodermalen Zellen im Stadium E7,5 und gibt die Schnittebene des transversen Schnittes (D) wieder.

D.: Die Abbildung zeigt einen transversen Schnitt durch den E7,5 Embryo im Bereich des embryonalen, lateralen Mesoderms.

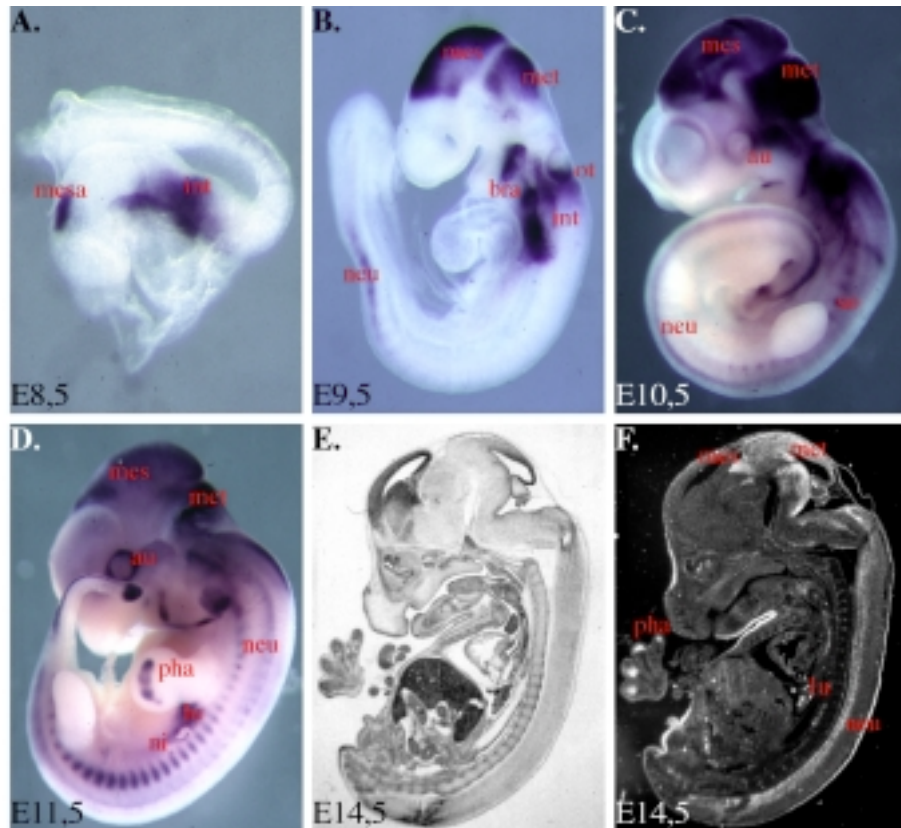
Abkürzungen: ek: extraembryonales Ektoderm, lam: lateral-embryonales Mesoderm, me: embryonales Mesoderm, pk: Primitivknoten

In dem Stadium E7,5 verdichten sich am anterioren Ende des Eizylinders die Zellen des extraembryonalen Ektoderms und bilden die Kopfanlage. *Irx1* ist auch im Primitivknoten exprimiert.

### ***II.2.3. IRX1-EXPRESSION WÄHREND DES NEURULATION (E8,5 BIS E9,0)***

Nach 8,0 bis 8,5 Tagen endet die Gastrulation, und die Neurulation beginnt mit der anterioren Bildung der Neuralwülste auf der dorsalen Seite des Embryos. Das Endoderm verlagert sich nach innen bildet und den Darm. Der Kopf wird erkennbar und Organe wie Leber und Herz nehmen ihre endgültige Position ein. Der Embryo dreht sich und wird nun vollständig von seinen extraembryonalen Membranen eingehüllt.

Im Stadium E8,5 ist *Irx1* in der Hirnanlage exprimiert und dabei am stärksten in den dorsolateralen Wänden der kranialen Neuralfalte erkennbar, welche die Mesenzephalonanlage darstellen. Ferner ist in Sagitalschnitten eine schwache Expression in der Rhombenzephalon-Anlage und in der posterioren Region des Neuralrohres erkennbar. Weiterhin ist *Irx1* im sich entwickelnden Vorderdarm aktiv.



**Abb. II.10:** *Irx1*-Expression während der embryonalen Entwicklung der Maus.

Expressionsmuster von *Irx1* während der Embryonalentwicklung zwischen E8,5 - E14,5 (A-F; (Zülch, 1997)). Die Analyse erfolgte mittels *whole-mount-in-situ*-Hybridisierung (A-D) und radioaktiv markierter *in-situ*-Analyse (E,F).

**A.:** Im Stadium E8,5 setzt sich die *Irx1*-Expression in der Mesenzephalon- und Intestinalanlage fort.

**B.:** Einen Tag später (E9,5) erweitert sich die Expression im Nervensystem, so daß Aktivität im Mesen- und auch Metenzephalon, sowie im Neuralrohr und den Branchialbögen erkennbar ist.

**C.:** Im Stadium E10,5 setzt sich die Expression im ZNS fort und weitere Bereiche, wie die Somiten und das Mesenchym um die Augenanlage, zeigen *Irx1*-Genaktivität.

**D.:** Im Stadium E11,5 beginnt die *Irx1*-Expression in den sich entwickelnden Fingern, der Lunge und der Niere. Die ZNS-Expression bleibt weiter bestehen und verstärkt sich weiter im Bereich des Rhombenzephalons.

**E. und F.:** Beide Abbildungen stellen dasselbe Objekt dar, wobei E eine Hellfeldaufnahme und F eine Dunkelfeldaufnahme gibt. Gut ist die Expression von *Irx1* im ZNS mit ventralen Neuralrohr, der Lunge und den Fingern erkennbar.

Abkürzungen: au: Augenanlage; bra: Branchialbögen; em: extraembryonales Mesoderm; int: Intestinalanlage, lu: Lunge, me: embryonales Mesoderm; mesa: Mesenzephalonanlage, Mes: Mesenzephalon, met: Metenzephalon, neu: Neuralrohr, ni: Nierenanlage, ot: Ohranlage, pk: Primitivknoten, pha: Phalangenanlage, so: Somitenanlage

### **II.2.4. IRX1-EXPRESSION WÄHREND DER ORGANOGENESE (E9,5 BIS E14,5)**

Nach 9,5 Tagen ist die Gastrulation beendet und sowohl die Neurogenese als auch die Organogenese setzten ein.

*Irx1* ist entlang der anterior-posterioren Achse des Neuralrohres exprimiert. Eine starke Expression ist im Tektum und Tegmentum des Mesenzephalons erkennbar. Im Rhombenzephalon ist *Irx1* exprimiert, wobei die Rhombomere 2, 3 und 4 keine Expression aufweisen. Die Grenze zwischen Mesenzephalon und Rhombenzephalon ist expressionsfrei. Im Neuralrohr weist *Irx1* eine Aktivität kaudal zum sich entwickelnden Hinterhirn auf.

Im Stadium E10,5 bleibt das charakteristische Expressionsmuster von *Irx1* erhalten. Es dehnt sich aber weiter in das dorsale Dienzephalon aus und die rostrale Expressionsgrenze bildet die zukünftige *Zona limitans intrathalamica*. Weiterhin bleibt die Genaktivität im ventralen Bereich des Neuralrohres bestehen, wobei die stärkste im kaudalsten Teil zu finden ist.

Die spezifische Expression im Gehirn mit Mesenzephalon, Pons, Cerebellum und Medulla bleibt bis zur Geburt erhalten. Im Alter von 14,5 Tagen nach der Befruchtung ist *Irx1*-Genaktivität im Dienzephalon im dorsalen Thalamus und in der *Zona limitans intralamica* vorhanden (Zülch, 1997).

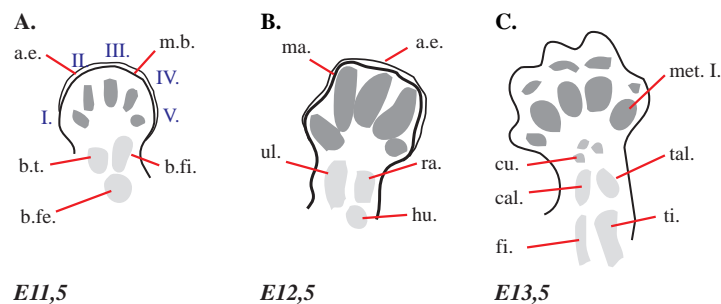
Im Neuralrohr dehnt sich die Expression zwischen E10,5 und E11,5 auf den medialen Teil und die distale Schwanzspitze aus. Dort ist sie ab E12,5 jedoch nicht mehr nachweisbar. Statt dessen tritt *Irx1*-Expression im ventralen Teil des Neuralrohres auf und die Aktivität ist dort bis zur Geburt nachweisbar.

### II.2.5. SPEZIELLE BEISPIELE DER EXPRESSION VON IRX-GENEN WÄHREND DER ORGANOGENESE

*Irx1* und auch, ein weiteres Mitglied der *Iroquois* Genfamilie der Maus *Irx2*, sind in spezifischen, nicht neuronalen Organen wie den Extremitäten und der Lunge exprimiert (Zülch et al., 2001; Becker et al., 2001).

#### *IRX1* UND *IRX2* EXPRESSION WÄHREND DER FINGERENTWICKLUNG DER EXTREMITÄTEN

Im Embryonalstadium E11,5 sind sowohl die Vorder-, als auch die Hinterextremitäten gut erkennbar, wobei die vordere weiter entwickelt ist. Die Extremitäten bilden flache Strukturen, die Hand- und Fußplatte. Einen Tag später, im Stadium E12,5, zeigen die Handplatten keine runde, sondern eher eine "wellige" Struktur an der distalen Oberfläche. Es zeichnen sich bereits die Strukturen der zukünftigen Finger (Phalangen) ab (Rugh, 1990). Die Fußplatte ist noch immer paddelförmig.



**Abb. II.11:** Schema der Phalangenentwicklung der Maus zwischen E11,5 bis E13,5 (A-C) (modifiziert nach: Rugh, 1990; Gruneberg, 1963).

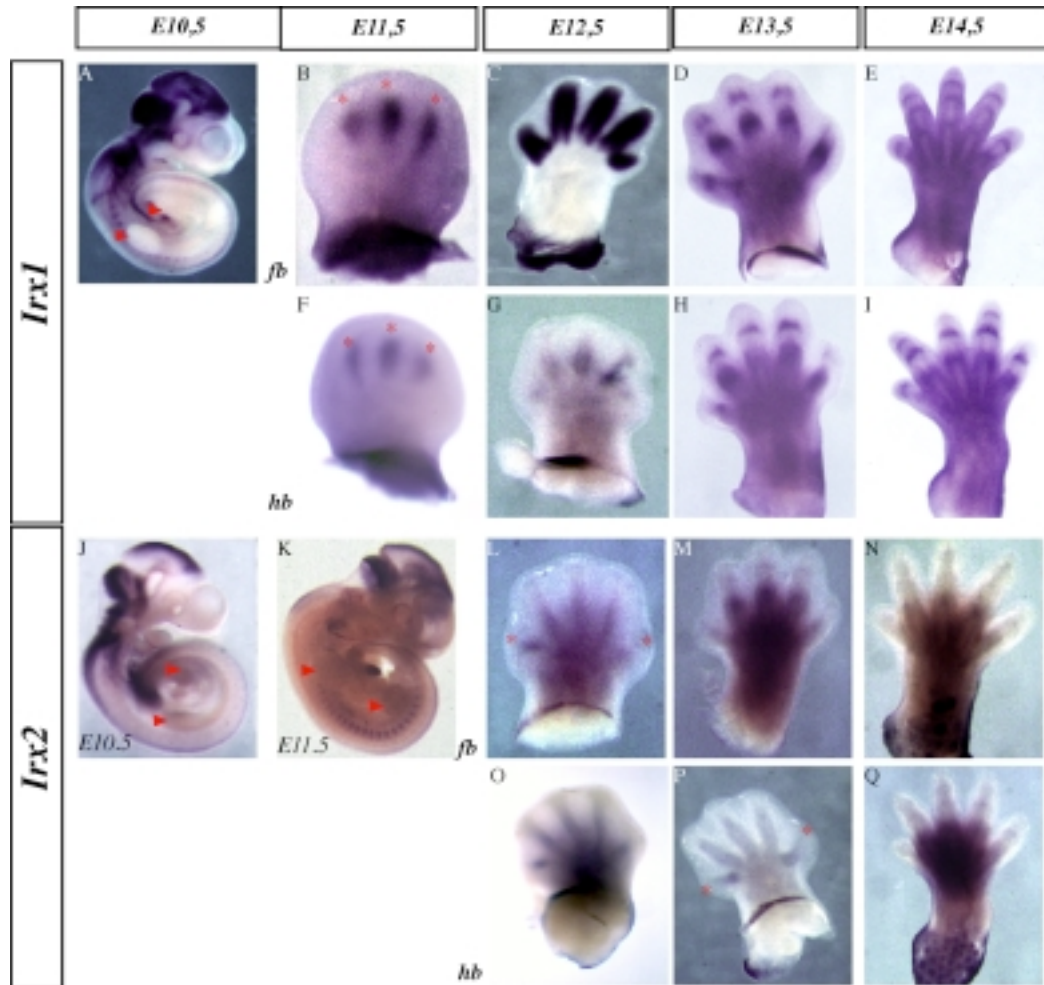
Abkürzungen: a.e: apicale Ektodermalleiste, b.fi: Fibulablastem, b.fe: Femurblastem, b.t: Tibiablastem, cal: Calcaneus, cu: Cuboideum, hu: Humerus, ma: Marginalsinus, m.b: Marginalblutsinus, met: Metatarsalia, ra: Radius, tal: Talus, ti: Tibia, ul: Ulna.

*Irx1*-Expression zeigt sich bereits vor der morphologischen Ausprägung exakt in den Bereichen, die später die Finger bilden. Daher bietet sich *Irx1* als Marker für die Entwicklung der Finger an.

Die Expression von *Irx1* beginnt im Stadium E11,5 in den Extremitätenknospen. Zunächst ist es in den sich entwickelnden Phalangen II bis IV aktiv und einen Tag später auch in den Fingern I und V.

Die karpale Region ist zum ersten Mal im Alter von E12,5 - 13,5 erkennbar. Zu dieser Zeit sind die Entwicklungsregionen der Finger der Handplatte sowie die Interphalangealregionen erkennbar. Dies ist eine kritische Phase in der Fingerentwicklung, da es sich um den Übergang vom Mesenchym hin zum Knorpelvorläufer handelt. Im Stadium E12,5 ist eine starke Expression in den gesamten Phalangen, mit einer scharfen proximalen Grenze zu beobachten. Einen Tag später sind die Extremitätenanlagen weiter gewachsen, und der distalste Teil hat sich in frühe (mesenchymale) Phalangen differenziert, welche aber noch nicht vollständig voneinander getrennt sind. Während des Stadiums E13,5 zeigt *Irx1* eine Aktivität im metatarsalen Knorpel und dem Knorpel der Phalangen. 14,5 Tage nach der Befruchtung sind die Finger der Vorder- und Hinterextremität gespreizt. Das *Irx1*-Gen ist weiterhin im metatarsalem Knorpel und dem Knorpel der Finger exprimiert .

Neben *Irx1* ist auch *Irx2* während der Extremitätenentwicklung aktiv. Dieses *Iroquois*-Gen weist ein mit *Irx1* überlappendes Expressionsmuster in den späteren Entwicklungsstadien auf. Die Aktivität startet jedoch erst später und zeigt ein anderes Muster in den ersten Stadien der Expression. *Irx2* startet im Stadium E12,5 wesentlich schwächer in der Intensität, und zwar im metatarsalen Knorpel. Weiterhin ist die erste Expression auf die Phalangen I und V beschränkt. Ähnlich wie *Irx1* zeigt auch *Irx2* eine Genaktivitätsgrenze in der proximalen Region der Finger. In E13,5 alten Embryonen ist *Irx2* im Knorpel der Phalangen nur schwach exprimiert.



**Abb. II.12:** *Irx1*- und *Irx2*-Expression während der Entwicklung der Phalangen

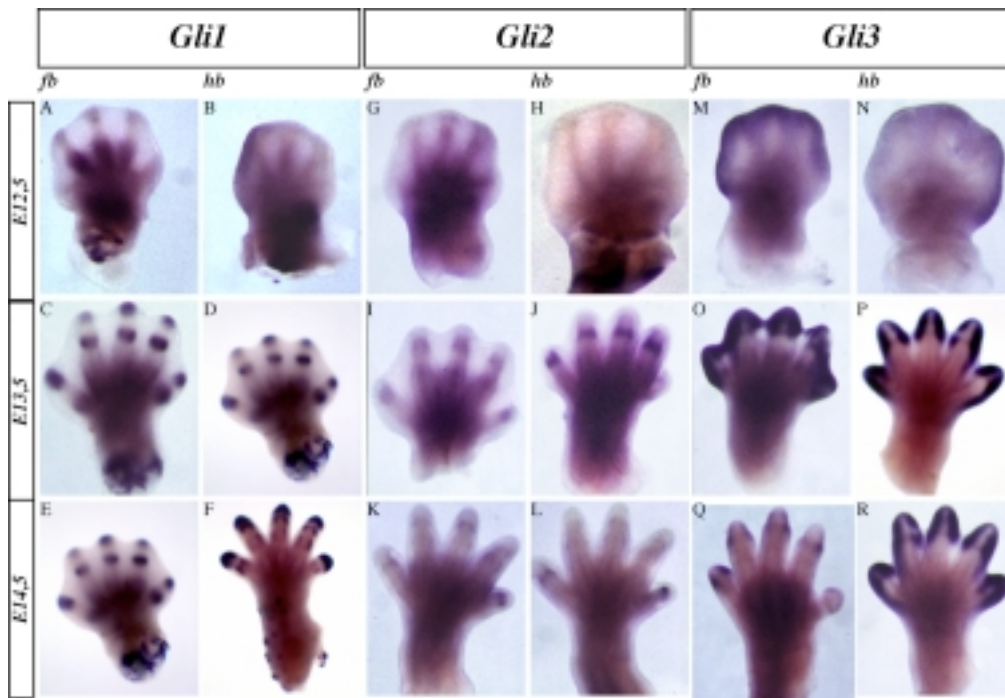
Expressionsmuster von *Irx1* in der Phalangenentwicklung im Vergleich zu *Irx2* während der Embryonalstadien E11,5 - E14,5 (A-Q). Die Analyse erfolgte mittels *whole-mount-in-situ*-Hybridisierung. Die Pfeile markieren die Region der Extremitätenknospen. Die Sterne markieren die Bereiche der *Irx*-Expression in den Fingeranlagen.

Abkürzungen: fb.: Vorderextremität; hb.: Hinterextremität

In *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, daß *cubitus interruptus* (*ci*) einen Regulator des *Iroquois*-Komplexes darstellt (Gómez-Skarmeta und Modolell, 1996). Die Maus-Homologe von *ci* (*Gli1*, -2, -3) sind spezifisch während der frühen Extremitätenentwicklung von E9,5 bis E12,5 exprimiert (Theil et al., 1999). Es wurde ein Vergleich der Expression mit den *Iroquois*-Genen während der Fingerentwicklung in den Stadien E12,5 bis E14,5 erstellt.

Die Expression von *Gli1* started in den Extremitätenknospen bei E9,5. In diesem Stadium sind *Gli2* und *Gli3* entlang der anterior-posterioren Achse der Extremitätenknospe exprimiert (Büscher und Rütter, 1998; Theil et al., 1999).

Im Stadium E12,5 zeigen *Irx1* und *Gli1* vergleichbare Expressionmuster. Beide Gene sind im Stadium E13,5 und E14,5 in dem metatarsalen Knorpel und dem Knorpel der Phalangen aktiv. Die Expression von *Gli2* ist ähnlich zu *Gli1*, aber wesentlich schwächer. Die Genaktivität von *Gli2* ist gut mit der von *Irx2* vergleichbar. Ein weiteres *ci*-Homolog, *Gli3*, zeigt keine Expression in den sich entwickelnden Knorpeln.



**Abb. II.13:** Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* während der Phalangenentwicklung

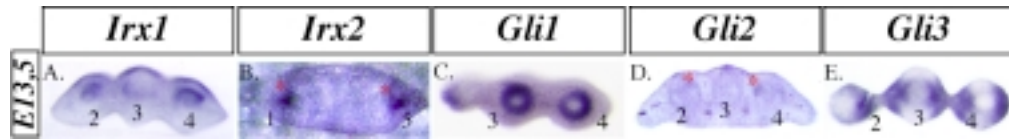
Expressionsmuster der Gli-Gene während der Phalangenentwicklung der Embryonalstadien E11,5 E - E14,5 (A-R) im Vergleich.

Im Stadium E12,5 beginnt eine zweite Phase der Gli-Genexpression während der Extremitätenentwicklung. Transkripte von *Gli1* (A, B) und *Gli2* (G, H) sind im Stadium E12,5 im kondensierenden Mesenchym zu finden, wohingegen *Gli3* (M, N) im umgebenden Mesenchym aktiv ist. *Gli1* ist im Stadium E13,5 im metatarsalen Knorpel und im Knorpel der Phalangen exprimiert (C, D). Diese Expression wird im Stadium E14,5 beibehalten (E, F). Die Expression von *Gli2*, obwohl sie schwächer ist, ist vergleichbar mit *Gli1*. So ist *Gli2* im Stadium E12,5 in der metatarsalen Knorpelanlage schwach aktiv (G, H). Zwischen E13,5 und E14,5 ist *Gli2*-mRNA im metatarsalen



Knorpel und im Knorpel der Phalangen nachweisbar (I - L). Dagegen zeigt *Gli3* ein ganz anderes Expressionsmuster. Es ist nicht in den Phalangen exprimiert (M - R).

Abkürzungen: fb: Vorderextremität; hb: Hinterextremität



**Abb. II.14:** Transverserschnitte von Vorderextremitäten von E13,5 alten Mausembryonen, die mittels einer *in-situ*-Hybridisierung analysiert wurden.

*Irx1* ist im Stadium E13,5 im Knorpel der Finger 2 bis 4 exprimiert (A). In ähnlicher Weise ist *Irx2* im kondensierenden Mesenchym der Phalangen 1 und 5 aktiv (B). *Gli1* und *Gli2* sind im metatarsalen Knorpel der Finger 1 bis 5 exprimiert (C, D). Im Gegensatz dazu ist *Gli3* im umgebenden Mesenchym aktiv (E).

Abkürzungen: 1, 2, 3, 4, 5: Nummern der Finger; \*: markieren besonders schwache Expression

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Expressionsdomänen von *Irx1-Gli1* und von *Irx2-Gli2* Übereinstimmungen zeigen, wohingegen kein überlappender Bereich zwischen *Gli3-Irx1* bzw. *Gli3-Irx2* zu beobachten ist.

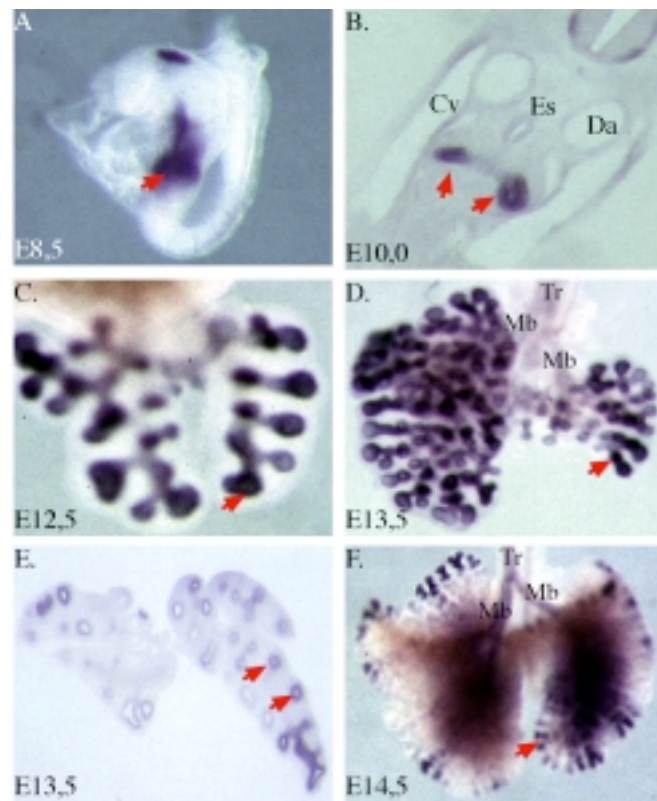
### *IRX1-EXPRESSION WÄHREND DER LUNGENENTWICKLUNG*

Während der frühen Säugerentwicklung bilden sich aus dem Endoderm eine Reihe von Organen wie Leber, Pancreas und Lunge. Die Lungenknospen entstehen aus dem Vorderdarm der kaudalen Pharynxregion und bestehen aus epithelialen Endodermschichten, die von Mesenchym umgeben sind (Hogan und Yingling, 1998). Zwischen dem Glandularstadium und dem Kanalikularstadium der Lungenentwicklung wachsen die Lungenknospen aus, bilden dabei zwei Bronchi und viele Bronchiolen und verzweigen in einem komplexen Muster (Ten Have-Oproek, 1991).

Die Expression von *Irx1* beginnt bereits im Stadium E8,5 im Vorderdarmbereich, u. a. in der Region, in der sich die laryngo-tracheale Falte und anschließend das tracheale Diverticulum bildet (Kaufmann und Bard, 1999). Der proximale Teil dieses Diverticulums bildet die Trachea und der distale die zwei primären Lungenknospen. *Irx1* ist im Stadium E10,5

ausschließlich in der Epithelschicht der Lungenknospen, nicht aber in der mesenchymalen Schicht exprimiert.

Während der nächsten Entwicklungsphase, dem Kanalikularstadium, bleibt *Irx1* weiterhin epithelial in den sich entwickelnden Bronchien exprimiert. Im Stadium E12,5 konzentrieren sich die *Irx1*-Transkripte vorrangig auf den distalen Bereich der sich formenden Lungen. Diese Expression in den epithelialen Bereichen bleibt auch noch im Stadium E13,5 erhalten, wenn die terminalen Bronchien und die 5 Lungenlappen gebildet werden. Ferner zeichnet die *Irx1*-Genaktivität die Verzweigung der Bronchiolen nach. Einen Tag später ist die Expression auf die Randbereiche der Lungen beschränkt. Die *Irx1* Aktivität stoppt mit dem Beginn der Alveolarphase (Becker et al., 2001).



**Abb. II.15:** *Irx1* während der Lungenentwicklung

Whole-mount-in-situ-Expression von *Irx1* während der Lungenentwicklung zwischen E8,5 und E14,5.

**A.:** Das Bild zeigt einen E8,5 jungen Embryo. Der Pfeil markiert den Bereich der Intestinalanlage.

**B.:** Diese Abbildung zeigt einen Vibratomschnitt (30 µm) durch einen E10,0 alten Mausembryo. Die spezifische *Irx1*-Expression ist in der epithelialen Zellschicht erkennbar.

**C.:** Die Abbildung zeigt eine E12,5-Lunge. Die distale Expression ist mit einem Pfeil markiert.

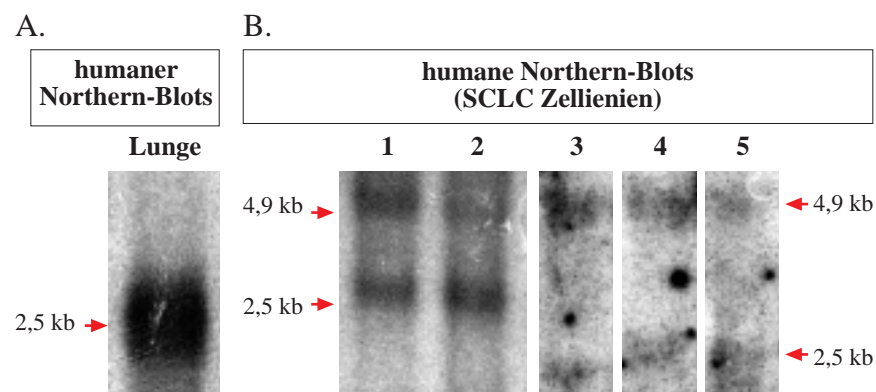
**D.:** Die Abbildung zeigt eine E13,5-Lunge. Die distale Expression ist mit einem Pfeil markiert.

**E.:** Die Abbildung zeigt einen transversen Schnitt durch eine E13,5-Lunge. *Irx1* ist klar in der epithelialen Schicht der Lunge exprimiert.

**F.:** Die Abbildung zeigt eine E14,5-Lunge. Die distale Expression ist mit einem Pfeil markiert.

Abkürzungen: Cv: Cardinalvene, Da: dorsale Aorta, Es: Ösophagus, Tr: Trachea, Mb: Hauptbronchie

*Mash1* spielt eine wesentliche Rolle während der Entstehung eines bestimmten Typus von humanem neuroendocrinem Lungenkrebs (Kleinzell-Lungenkrebs; SCLC: *small cell lung cancer*) (Ball et al., 1993). Da *Mash1* ein potentielles Zielgen von *Irx1* ist, wurde das *Irx1* Gen auf eine Beteiligung an der Krebsbildung analysiert. Dazu wurden Northern-Blot-Analysen verschiedener Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu normaler humaner Lungen-RNA durchgeführt.



**Abb. II.16:** humane *Irx1*-Northern-Blot-Analyse

Die Abbildung zeigt sechs verschiedene Northern-Blots, die alle mit einer 0,4 kb-*Irx1*-Sonde (B/S400) hybridisiert wurden. Im normalen, gesunden Lungengewebe (Pfeil in A) wurde ein 2,5 kb Fragment identifiziert. In allen untersuchten Lungenkrebszelllinien (SCLC: small cell lung cancer) wurden zwei Transkripte beobachtet, 4,9kb und 2,5kb (Pfeile in B).

**A.:** Die Abbildung zeigt einen Northern-Blot mit humaner Gesamt-RNA einer normalen adulten Lunge

**B.:** Die Abbildung zeigt Gesamt-RNA-Northern-Blots verschiedener SCLC-Zelllinien

Abkürzungen: 1: NCI-H82; 2: NCI-H592; 3: NCI-H69; 4: NCI-H345; 5: NCI-N417

Es konnte gezeigt werden, daß in der adulten humanen Lunge *Irx1* normalerweise aktiv ist. Ferner konnte gezeigt werden, daß dort, ähnlich wie in der Maus, ein 2,5 kb Transkript vorliegt. In den Zelllinien, die aus humanem Lungenkrebs (SCLC) hergestellt wurden, ist dagegen ein abweichendes Bild zu beobachten. Hier treten zwei Transkripte von 2,5 kb und 4,9 kb Länge auf. Dies läßt auf eine veränderte Expression des humanen *Irx1* Gens im Falle dieses Lungenkrebstypus schließen.

## II.3. DIE FUNKTION DES *IRX1*-GENS

Die durchgeführte funktionelle Analyse des *Irx1*-Gens gliedert sich in drei wesentliche Teile.

1. *Irx1* ist ein mögliches Zielgen der *Gli*-Gene. Daher wurde eine Analyse der *Gli*-Mutanten durchgeführt.

2. Analyse der Interaktion von *Irx1* mit *Mash1*, einem potentiellen Zielgen von *Irx1*.

3. Analyse der Funktion des *Irx1*-Gens durch Herstellung einer gezielten Verlustmutante und Untersuchung des daraus resultierenden Phänotyps.

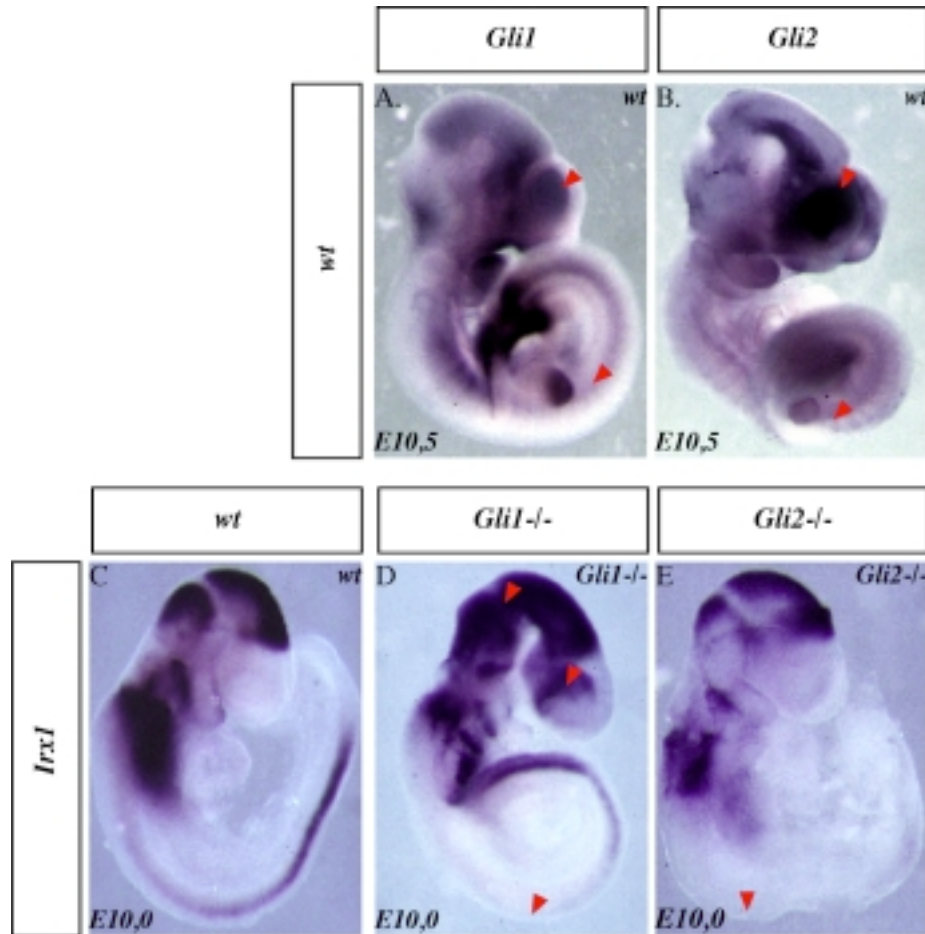
Dieser Ansatz ermöglichte es mir verschiedene Aspekte der Funktion von *Irx1* zu beschreiben.

### II.3.1. DIE ZN-FINGER-GENE *GLI1* UND *GLI2* KONTROLLIEREN DIE *IRX1*-EXPRESSION

Das *Drosophila*-Gen *cubitus interruptus* (*ci*) reguliert positiv den *Iroquois*-Komplex (Gómez-Skarmeta und Modolell, 1996). Dies war die Grundlage für den experimentellen Ansatz, eine mögliche Regulation der murinen *Irx*-Gene durch die *cubitus interruptus*-Homologe zu analysieren.

*Gli1*-defiziente Mäuse sehen äußerlich unauffällig aus und verhalten sich normal (Park et al., 2000). Dagegen zeigen *Gli2*-Mausmutanten eine Reihe von Skelettdefekten und abnormale Lungen (Mo et al., 1997; Motoyama et al., 1998).

Daher stellte sich die Frage, ob auch die Regulation von *ci* auf den *Iroquois*-Komplex in Vertebraten konserviert geblieben ist, d.h. ob eine Interaktion zwischen *Gli1* bzw. *Gli2* mit *Irx1* besteht. Die Mäuse wurden entsprechend der Angaben von Park et al. (2000) und Mo et al. (1997) verpaart und genotypisiert. Mit den homozygoten Embryos wurden *whole-mount*-Hybridisierungsanalysen durchgeführt, um eine mögliche Veränderung des *Irx1*-Expressionsmusters zu untersuchen.



**Abb. II.17:** *Gli1* und *Gli2* regulieren *Irx1*

Die Abbildungen zeigen *whole-mount*-in-situ-Hybridisierungsanalysen von *Gli1* und *Gli2* in E10,5 alten Embryonen (A, B). Ferner wird die veränderte Expression von *Irx1* in den Mutanten von *Gli1* bzw. *Gli2* in E10,0 alten Embryonen gezeigt (D, E). In der *Gli1*-Mutante zeigt *Irx1* eine breitere Expressionsdomäne (D; Expression in der Mesenzephalon-Metenzephalon-Grenze und im Telenzephalon). Im Neuralrohr ist ein teilweiser Verlust der Expression zu konstatieren (D). In der *Gli2*<sup>-/-</sup> Mutante liegt eine normale Expression von *Irx1* im Gehirn vor, aber die *Irx1*-Aktivität im Neuralrohr ist runterreguliert. *Irx1* wird durch die beiden Zn-Finger-Proteine *Gli1* und *Gli2* reguliert. Als Vergleich dient eine normale *Irx1*-Expression in einem E10,0 alten Embryo (C).

In den homozygoten *Gli1*-Mutanten ist ein deutlich verändertes *Irx1*-Expressionsmuster erkennbar. Dabei sind sowohl die Verstärkung von Signalen und ektopische Expressionen zu beobachten, wie auch ein Verschwinden von Expressionsdomänen. So ist *Irx1* in der *Gli1*-Mutante im Telenzephalon und auch in der Mesenzephalon-Metenzephalon-Grenze aktiv. Beides sind Bereiche,

die normalerweise kein *Irx1* exprimieren. Andererseits ist die Genaktivität von *Irx1* im medialen Teil des Neuralrohres in der *Gli*-Mutante verschwunden.

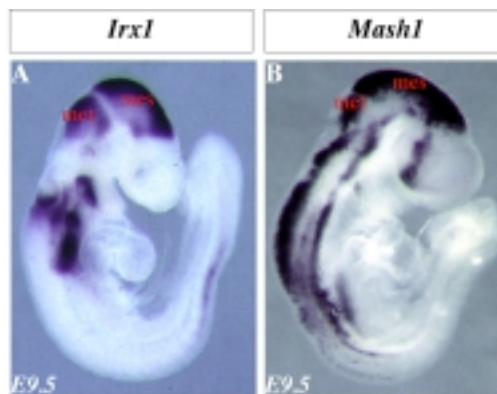
Auch in der *Gli2* Mutante ist die *Irx1*-Aktivität verändert. Während in den *Gli1*-defiziente Mäusen kein *Irx1*-Transkript im medialen Teil des Neuralrohres vorhanden ist, ist in den *Gli2*-defiziente Mäusen keine Expression im gesamten Neuralrohr erkennbar. Unverändert ist dagegen die Aktivität von *Irx1* im Mesenzephalon und Metenzephalon.

### **II.3.2. DAS IRX1-GEN AKTIVIERT NICHT DEN MASH1-PROMOTOR**

In *Drosophila melanogaster* ist der *Achaete-Scute*-Komplex (*AS-K*) ganz wesentlich an der Bildung der proneuralen Kluster (Zellgruppen) beteiligt. Positive und direkte Aktivatoren des *AS-K* stellen die Gene des *Iroquois*-Komplexes dar.

Homologe Gene des *AS-K* sind *Mash1* und *Mash2* (Guillemot et al., 1994; Guillemot et al., 1993). *Mash1* besitzt eine Funktion in der embryonalen Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems, des Riechepitheliums und der Retina (Guillemot et al., 1993).

Aufgrund der überlappenden Expressionsbereiche von *Irx1* und *Mash1* während der Entwicklung des Zentralnervensystems und der Regulation der homologen Gene in *Drosophila m.* wurde eine mögliche Interaktion zwischen *Irx1* und *Mash1* geprüft.

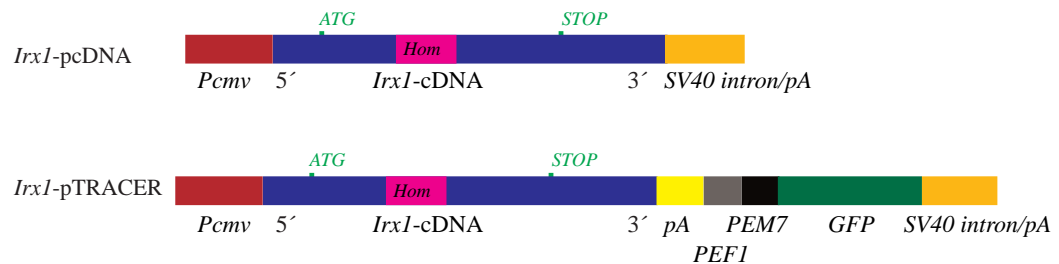


**Abb. II.18:** Überlappende Expressionsbereiche von *Irx1* und *Mash1*.

Die Abbildungen zeigen *whole-mount-in-situ*-Analysen von E9,5-alten Embryonen. *Irx1* (A) und *Mash1* (B) zeigen überlappende Expressionsbereiche während der Entwicklung des ZNS und insbesondere im Mesenzephalon und Metenzephalon.

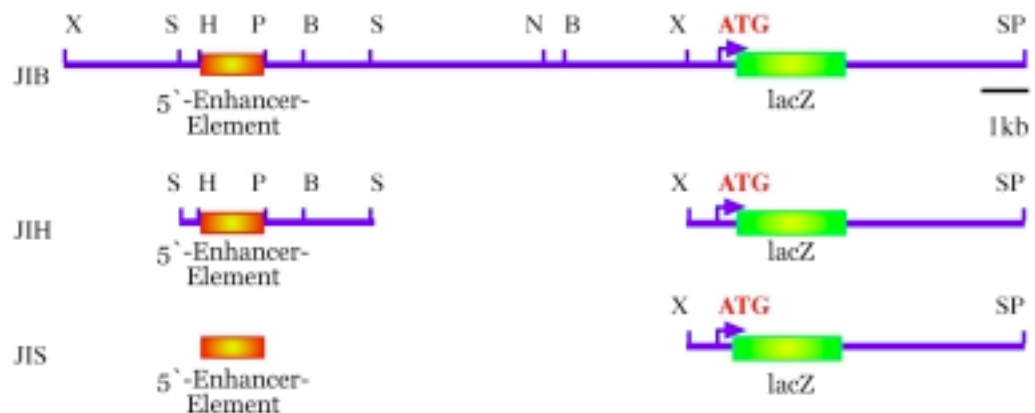
Abkürzungen: mes: Mesenzephalon; met: Metenzephalon

Die Analyse erfolgte durch Messung der Aktivität des *Mash1*-Promotors unter dem Einfluß von *Irx1*-Protein. Zu diesem Zweck wurde *PC12*-Zellen gleichzeitig mit einem vom *Mash1*-Promotor kontrollierten Rezeptorgen (*lacZ*-Gen) und einem *Irx1*-Expressionsvektor transformiert und die Reporteraktivität wurde analysiert. Drei unterschiedliche Reporter-Konstrukte kamen dabei zum Einsatz.



**Abb. II.19:** *Irx1*-Konstrukte zur Überexpression in Zellkultur

*Irx1*-pcDNA stellt ein Konstrukt dar, bei dem *Irx1* unter der Kontrolle des CMV-Promotor steht. Bei *Irx1*-pTracer liegt dies ebenfalls vor, aber weiterhin ist eine GFP-Sequenz nachgeschaltet (Grünes-Fluoreszenz-Protein), die es ermöglicht, die Aktivität des *Irx1*-Gens visuell zu verfolgen.



**Abb. II.20:** *Mash1*-Promotor Konstrukte



Die Abbildung zeigt die drei benutzten genomischen *Mash1*-Bereiche, die das 5'-Enhancer-Element beinhalten (Verma-Kurvari et al., 1998). Das 1158bp-Element liegt ca. 7 kb 5' der kodierenden *Mash1*-Sequenz und ist spezifisch für die *Mash1*-Expression während der Entwicklung des ZNS. Im JIB-Fragment liegt die gesamte 5'-Region upstream der kodierenden *Mash1*-Sequenz vor, während bei JIH und JIS die 5'-Bereiche verkürzt wurden. Diese Konstrukte wurde in einen  $\beta$ -Galactosidase-Vektor kloniert, wobei das lacZ durch das endogene ATG reguliert wird.

Keines der drei Konstrukte zeigte eine Aktivierung durch *Irx1*, obwohl jedes das bereits beschriebene für die *Mash1*-Expression essentielle Enhancerfragment enthält (Verma-Kurvari et al., 1998).

## II.4. ANALYSE DER *IRX1*-MAUSMUTANTE

Die Integration exogener genetischer Information in die Mauskeimbahn hat sich als nützliches Mittel für die Analyse der Funktion eines Gens bewährt. Der klassische Weg zur Herstellung transgener Mäuse mittels der DNA-Mikroinjektion weist jedoch den Nachteil auf, daß die Integration des DNA-Konstruktes in das Genom zufällig erfolgt. Erst die embryonale Stammzell-(ES-Zell-) Technologie in Verbindung mit der zelleigenen homologen Rekombination ermöglicht es, eine gezielte Veränderung eines bestimmten Genlokus durchzuführen und dieses stabil in der Keimbahn zu etablieren. Gezielt hergestellte Mausmutanten ermöglichen es, die Funktion eines Gens zu erklären.

Säugerzellen besitzen eine enzymatische Maschinerie, welche homologe Rekombination zwischen eingebrachten DNA-Molekülen und ihrem endogenen chromosomalen Locus ermöglichen (Doetschman et al., 1988; Bronson und Smithies, 1994; Capecchi, 1989). Diese Möglichkeit, gezielt Gene in ES-Zellen zu mutieren und daraus Verlustmutanten in der Maus herzustellen, wurde im Laufe der Jahre technisch verfeinert, um die Häufigkeit der homologen Rekombination zu optimieren. Um ein Gen gezielt auszuschalten, ist

ein Rekombinationskonstrukt notwendig, welches *in-vitro* hergestellt wird. Generell beinhaltet ein Rekombinationskonstrukt einen Selektionsmarker (in der Regel das *Neomycin*-Resistenzgen), welcher flankiert ist von homologen Regionen des genomischen Lokus. Während der homologen Rekombination wird dann die endogene Sequenz in den ES-Zellen, gegen die des Zielkonstruktes ausgetauscht.

#### **II.4.1. ANALYSE DER CHROMOSOMALEN LOKALISATION DES *IRX1*-Gens**

Zu Beginn der Arbeit waren drei *Iroquois*-Homeoboxgene in der Maus bekannt und beschrieben, ihre chromosomale Organisation war jedoch unbekannt (Zülch, 1997; Bosse et al., 1997).

Um eine funktionelle Analyse durchzuführen ist die Kenntnis über die chromosomale Organisation von entscheidender Bedeutung. Eine tandemartige Anordnung könnte zu Wechselwirkungen der Gene, z.B. in einer Verlustmutante, führen. Eine solche Tandemorganisation wurde bei den *Iroquois*-Genen in *D. melanogaster* gefunden. So ist es beispielsweise möglich, daß der Promotor des Selektionsgens eines Rekombinationskonstruktes andere Mitglieder einer tandemartigen Organisation mitreguliert und somit sekundäre Phänotypen verursacht (Meyers et al., 1998).

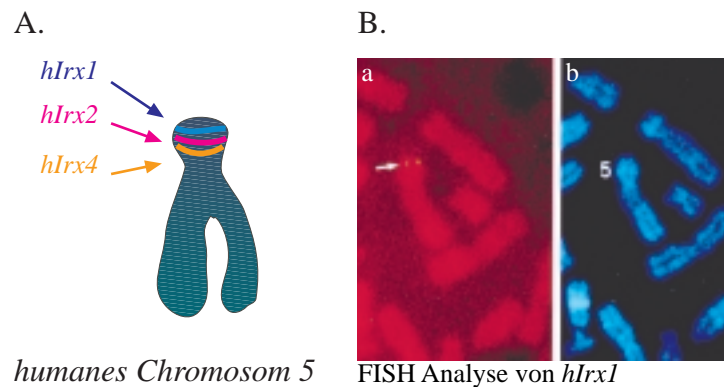
Aus diesem Grund wurde eine chromosomale Analyse des *Irx1*-Gens mittels *FISH in-situ* Analyse durchgeführt. Es wurden Maus-ES-Zellen benutzt, bei denen die Chromosomen in der Mitose arretiert wurden. Diese so vorbereiteten Chromosomen wurden auf Objektträgern gespreizt und mit einem genomischen *Irx1*-Klon (ga1.2) hybridisiert. Es stellte sich bei diesen Untersuchungen heraus, daß *Irx1* und *Irx2* sehr nah beieinander auf Chromosom 13 lokalisiert sind (M.B. Becker, pers. Mitteilung). Daher wurde zur Abstandsmessung zwischen *Irx1* und *Irx2* eine Fiber-*FISH*-Analyse durchgeführt (mit freundlicher Unterstützung von W. Engel, Göttingen). Diese Analyse ergab einen Abstand zwischen *Irx1* und *Irx2* von ca. 200 kb. Aus einer Datenbankanalyse konnte mittlerweile ein weiteres Mitglied der *Iroquois*-Genfamilie, *Irx4*, auf Chromosom 13 lokalisiert werden. Auch hier ist der Abstand zu den anderen Familienmitgliedern mit ca. 400 kb gering.



**Abb. II.21:** Chromosomale Organisation von *Irx1*

In der Maus sind die Gene *Irx1*, *Irx2* und *Irx4* auf Chromosom 13 tandemartig organisiert. Der Abstand zwischen ihnen beträgt 200 - 400 kb (A). Die Abbildung B zeigt ein Beispiel für die FISH-Analyse mit *Irx1* und *Irx2* (a). Die Fiber-FISH Analyse ergab einen Abstand von *Irx1* zu *Irx2* von ca. 200 kb (b). Die Fluoreszenzsignale sind (rot: *Irx1*, grün: *Irx2*) durch Pfeile markiert.

Diese tandemartige Organisation ist auch im Menschen konserviert. So sind die humanen Homologe (*hIrx1*, *hIrx2* und *hIrx4*) in vergleichbaren Abständen auf Chromosom 5 (5p15) organisiert. Dieses deutet darauf hin, daß neben den Genen an sich auch deren chromosomale Organisation konserviert ist.



**Abb. II.22:** Chromosomale Organisation der humanen *Iroquois*-Gene *hIrx1*, *hIrx2* und *hIrx4*

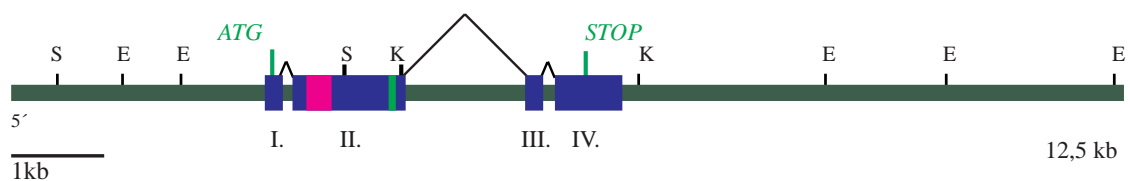
Die generelle Organisation von *hIrx1*, *hIrx2* und *hIrx4* ist zwischen Maus und Mensch konserviert. Auch im Menschen liegen diese drei Gene tandemartig vor und zwar auf Chromosom 5 (A). In Abbildung B ist ein Beispiel für die humane FISH-*in-situ*-Analyse mit *Irx1* dargestellt.

### II.4.2. KARTIERUNG UND GENOMISCHE ORGANISATION DES *IRX1*-GENS

Für die Herstellung eines Rekombinationskonstruktes wurde zunächst ein genomischer *Irx1*-Klon charakterisiert (Zülch, 1997). Dieser entstammt einer genomischen  $\lambda$ -Phagenbank, welche aus ES-Zellen des Mausstammes 129Sv hergestellt wurde (Kaestner et al., 1993). Das Durchmusterung der Phagenbank ergab insgesamt neun Klone und nach einer ersten Analyse der Klone wurden vier davon weiterbearbeitet. Der Klon ga1.2 (vormals: #1.1.3.1 (Zülch, 1997)) wurde schließlich kartiert und mit der partiellen *Irx1*-cDNA hybridisiert.

Mit den genomischen *Irx1*-Klone ga2.2, ga3.2 und ga4.2 erfolgte ebenfalls eine Charakterisierung mittels Kartierung und Sequenzierung. ga2.2 und ga4.2 befinden sich innerhalb, wohingegen sich ga3.2 sich 5'-Ende über den Klon ga1.2 hinaus erstreckt.

Eine detailliertere Kartierung und Sequenzanalyse des Klons *Irx1*-ga1.2 lieferte die genaue Struktur des *Irx1*-Locus. Es ist aus vier Exons aufgebaut, wobei sich das Start-ATG im ersten Exon befindet. Die Homeobox und die *Iro*-Box liegen auf dem zweiten Exon und das vierte Exon beinhaltet das STOP-Codon. Die kodierende Sequenz wird durch drei Introns unterschiedlicher Länge unterbrochen.



**Abb. II.23:** Die genomische Organisation des *Irx1*-Gens

Die genomische Organisation des Gens *Irx1* ist anhand des Klons ga1.2 schematisch dargestellt (B). *Irx1* ist in vier Exons organisiert (I. II. III. und IV.), wobei sich die Homeobox (lila) und die *IRO*-Box (hellgrün) auf dem zweiten Exon (II.) befinden. Das Start-ATG befindet sich auf dem ersten (I.) und das STOP-Signal auf dem letzten Exon (IV.).

Abkürzungen: E: EcoRI; K: KpnI; S: SacII

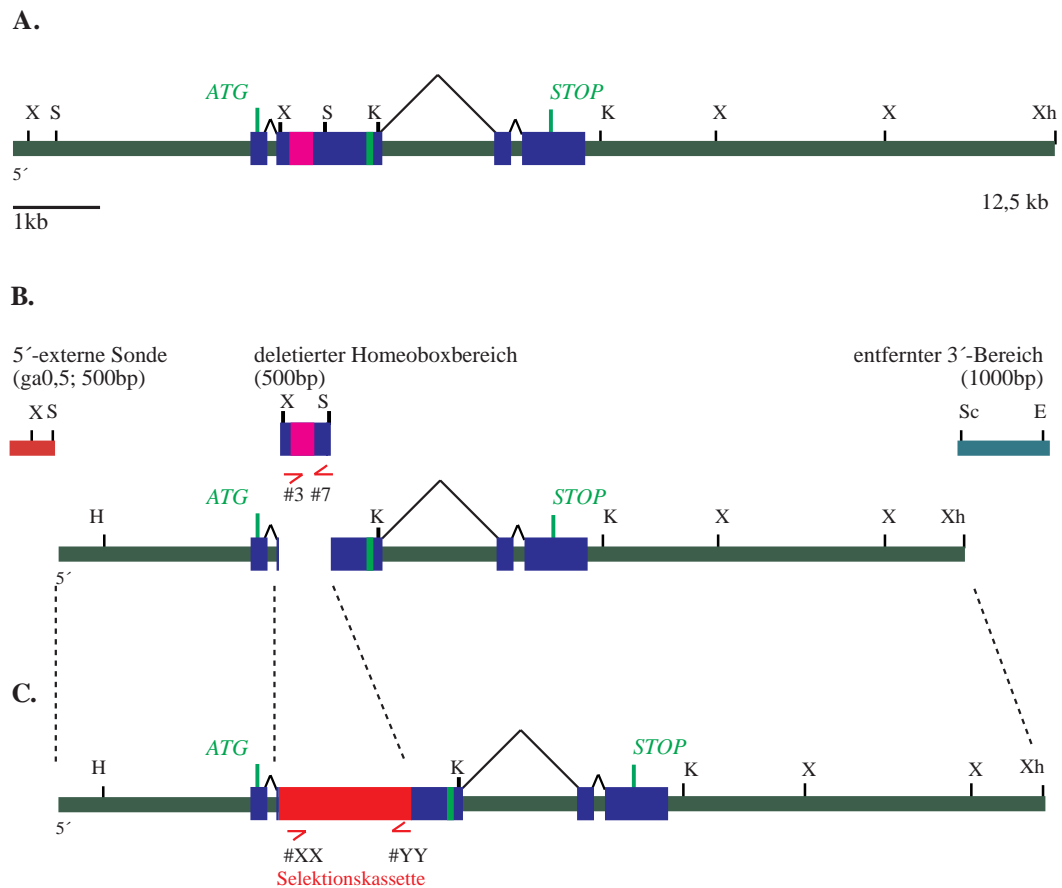
### **II.4.3. HERSTELLEN EINES *IRX1*-REKOMBINATIONSKONSTRUKTES FÜR DIE HOMOLOGE REKOMBINATION IN *ES*-ZELLEN**

Ziel eines Rekombinationskonstruktes ist es, die Funktion eines Zielgens zu zerstören. Im Falle von *Irx1* bedeutet dies, z.B. die funktionell wichtige Homeobox zu entfernen, um das Protein funktionsunfähig zu machen. Für das Entwerfen eines Rekombinationskonstruktes ist es von Vorteil, wenn sich die gesamte kodierende Information auf einem Klon befindet. Dann ist gewährleistet, daß keine regulativen Bereiche neben der Region, die entfernt werden soll, mitdeletiert werden und so zu möglicherweise verfälschenden Phänotypen führen. Es hat sich gezeigt, daß die Größe des Homologiebereiches für die Effizienz des Rekombinationsereignisses von großer Bedeutung ist (Thomas und Capecchi, 1987). Um eine hohe homologe Rekombinationsfrequenz zu erhalten, sollte diese nicht kleiner als 10kb gewählt werden (Mansouri, 2001). Die zu deletierende Region umfaßt die funktionelle Domäne, also in diesem Falle die Homeodomäne, da so die Funktion des *Irx*-Proteins zerstört wird, aber nicht dessen Regulation. So ist gewährleistet, daß nur das *Irx1*-Gen von der gezielten Mutation betroffen ist. In dem gewählten *Irx1-ga1.2*-Klon liegen diesen Überlegungen entsprechend optimale Bedingungen vor, da die Homeobox nahezu mittig liegt und von ausreichend Sequenz flankiert wird (5´der Homeobox befinden sich 3,5 kb und 3´der Homeobox 8,5 kb homologe Sequenz)

Zur Herstellung des *Irx1*-Rekombinationskonstruktes wurde der genomische *Irx1-ga1.2*-Klon wie folgt modifiziert. Zunächst wurde ein 0,5 kb großer Bereich auf der 5´-Seite des Klons als spätere sog. externe Sonde herauskloniert (*NotI*, *SacII*). Diese Sonde spielt eine entscheidende Rolle bei der späteren Genotypisierung der Mäuse. Sie ist nicht im fertigen Konstrukt enthalten und nimmt auch nicht an der homologen Rekombination teil, sondern sie dient als Hybridisierungssonde, um die korrekte Integration in den *Irx1*-Lokus zu überprüfen. Dieses Fragment wird im weiteren Verlauf als *ga0,5* bezeichnet. Aus dem verbleibenden genomischen Klon wird die Homeobox in Exon II entfernt (als *XbaI-SacII*-Fragment) und durch eine Selektionskassette ersetzt. Die Deletion umfaßt ein 500 bp-Fragment. Aufgrund von starken

---

Rekombinationsereignissen war es notwendig, die Klonierungen in einem speziellen Vektor ("very.low.copy"-DT-Plasmid; von D. Treichel (Göttingen) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt) und mit reparaturdefizienten Bakterien (XL-10Gold; Stratagene) durchzuführen. Ferner mußte ein 1 kb Bereich auf der 3'-Seite des *Irx1-ga1.2*-Klons (*ScaI-SacII*) entfernt werden, da dieser Bereich offensichtlich maßgeblich Rekombinationsereignisse provozierte.



**Abb. II.24:** Strategie zur Herstellung des *Irx1*-Rekombinationskonstruktes

Im Verlauf der Umklonierung des *Irx1-ga1.2*-Klons (A) wurde zunächst das ga0,5-Fragment auf der 5'-Seite entfernt und separat als externe Sonde kloniert (B). Ferner wurde die Homeobox als 500bp-Xba-SacII-Fragment deletiert und durch die Selektionskassette ersetzt. Aus Gründen der Rekombination in Bakterien wurde weiterhin ein 3'-Bereich entfernt (1kb). Das fertige Rekombinationskonstrukt besitzt mit 2,7 kb 5'-flankierender und 7,5 kb 3'-flankierender Sequenz ausreichende Bereiche für die homologe Rekombination.

Ferner sind die Positionen der Genotypisierungs-PCR-Primer (rote Pfeile) angegeben. Dabei variieren die Primerkombinationen mit dem Rekombinationskonstrukt.

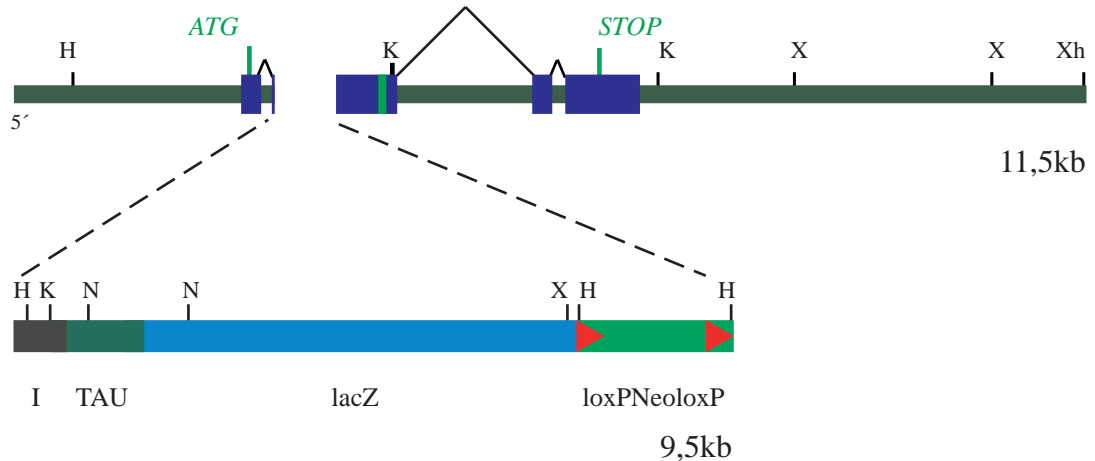
Abkürzungen: H: HindIII; I: IRES; K: KpnI; S: SacII; Sc: Scal; Tk: HSV-Thymidin-Kinase-Gen; X: XbaI; Xh: XhoI; #3; #4; #XX; #YY: verschiedene Genotypisierungs-PCR-Primer

Als Selektionskassetten wurden zwei Versionen benutzt und in die Mauskeimbahn eingebracht. Zum einen kam eine 9,5 kb große *IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-Kassette zum Einsatz (die *IRES-TAU-lacZ*-Kassette wurde freundlicherweise von P. Mombaerts (New York) und die *loxPNeoloxP*-Kassette von W. Wurst (Heidelberg) zur Verfügung gestellt). Das *IRES-TAU* vor dem *lacZ*-Gen ermöglicht die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in Nervenaxonen. Normalerweise ist die  $\beta$ -Galaktosidase kernlokalisiert. Mit dem Rinder-*tau*-Proteinsignal wird sie in die Axone transportiert. Das *IRES* (aus EMCV) dient dazu, die Elemente in der Kassette auch im Falle eines beschädigten endogenen Translationsstarts anzuschalten. Das *Neomycin*-Gen dient als positiver Selektionsmarker für die ES-Zellen nach der Elektroporation. Es wird von *loxP*-Sequenzen flankiert, damit man es nach der Selektion mittels *Cre*-Rekombinase entfernen kann. Dieses ist im Falle der Tandemanordnung der *Irx*-Gene vorzuziehen, da das *Neomycin*-Gen von einem *Pgk1*-Promotor angetrieben wird und dieser sehr starke rekombinierende Wirkungen aufweist und somit Einfluß auf die Expression der benachbarten Gene nehmen kann (Meyers et al., 1998). Aus diesem Grund wurde das *Pgk-Neomycin* nach dem Selektionsschritt mittels *Cre*-Rekombination in ES-Zellen entfernt. Es wurden anschließend sowohl ES-Zellen mit, als auch ohne *Neomycin* aggregiert und in die Keimbahn eingebracht.

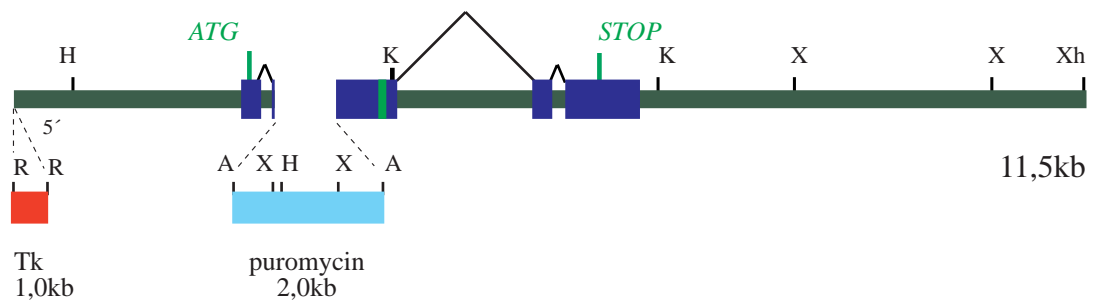
Mit der zweiten Deletionskassette wird der Bereich der Homeobox durch ein *Puromycin*-Gen ersetzt (*pKO-puro*; Stratagene). Das *Puromycin*-Gen ist wie *Neomycin* ein positiver Selektionsmarker nach der ES-Zell-Elektroporation. Der Vorteil von *Puromycin* ist, daß es effizienter als *Neomycin* wirkt und dadurch die Selektion schneller beendet werden kann. Weiterhin wurde bei dieser Kassette auf der 5'-Seite außerhalb des homologen Bereiches die *HSV-Thymidin-Kinase* als negativer Selektionsmarker eingebaut. Als Basis der Klonierung dient der

Vektor *pKO-#1908* (Stratagene), der sich ähnlich wie das "*very.low.copy*"-DT-Plasmid (s.o.) als rekombinationsarm erwiesen hat.

**A.:** *Irx1*- $\Delta$ hom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-Konstrukt (#4208)



**B.:** *Irx1*- $\Delta$ hom-puro-Konstrukt (#4703)



**Abb. II.25:** Die beiden *Irx1*-Rekombinationskonstrukt-Varianten

Das 500bp-Homeoboxfragment wird durch ein 9,5 kb großes IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-Rekombinationskonstrukt ersetzt (A). Dieses Konstrukt ermöglicht es  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ; hellblau) an den Orten der *Irx1*-Aktivität zu exprimieren und zusätzlich die Expression in den Axonen zu verfolgen (TAU; dunkelgrün). Ferner ermöglicht es, das *Neomycin*-Gen (hellgrün), welches von loxP-Sequenzen flankiert wird (rote Dreiecke), mittels einer Cre-Rekombinase zu entfernen.

In der zweiten Variante wird die Homeobox-Region durch das Selektionsgen *Puromycin* (pKO-puro) ersetzt (B). Desweiteren wurde am 5'-Ende des homologen Bereiches das HSV-Thymidin-Kinase-Gen als ein negativer Selektionsmarker eingeführt. Dieses Konstrukt ermöglicht eine doppelte Selektion und dient ferner als Kontrolle dafür, daß das große IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-Konstrukt (A).

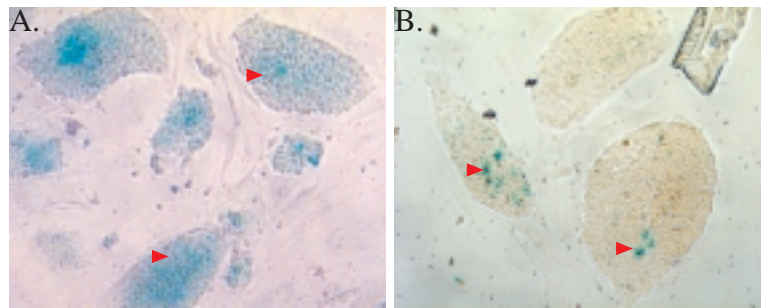
Abkürzungen:  $\Delta$ hom: deletierte Homeobox; H: HindIII; I: IRES; K: KpnI; lacZ:  $\beta$ -Galaktosidasegen; S: SacII; Tk: HSV-Thymidin-Kinase-Gen; X: XbaI; Xh: XhoI



#### II.4.4. GENTRANSFER IN ES-ZELLEN

**E**mbryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Mausblastozyste gewonnen und können in Kultur gehalten werden. Wenn sie auf embryonalen Fibroblasten oder in Anwesenheit von LIF (leukaemia inhibitory factor) kultiviert werden, behalten sie ihre Pluripotenz (Mansouri, 2000; Mansouri, 2001).

Die Rekombinationskonstrukte wurden in die *MPI-II-ES*-Zelllinie elektroporiert. Je Konstrukt wurden dabei insgesamt ca.  $1 \times 10^7$  ES-Zellen verwendet und auf das homologe Rekombinationsereignis selektiert.



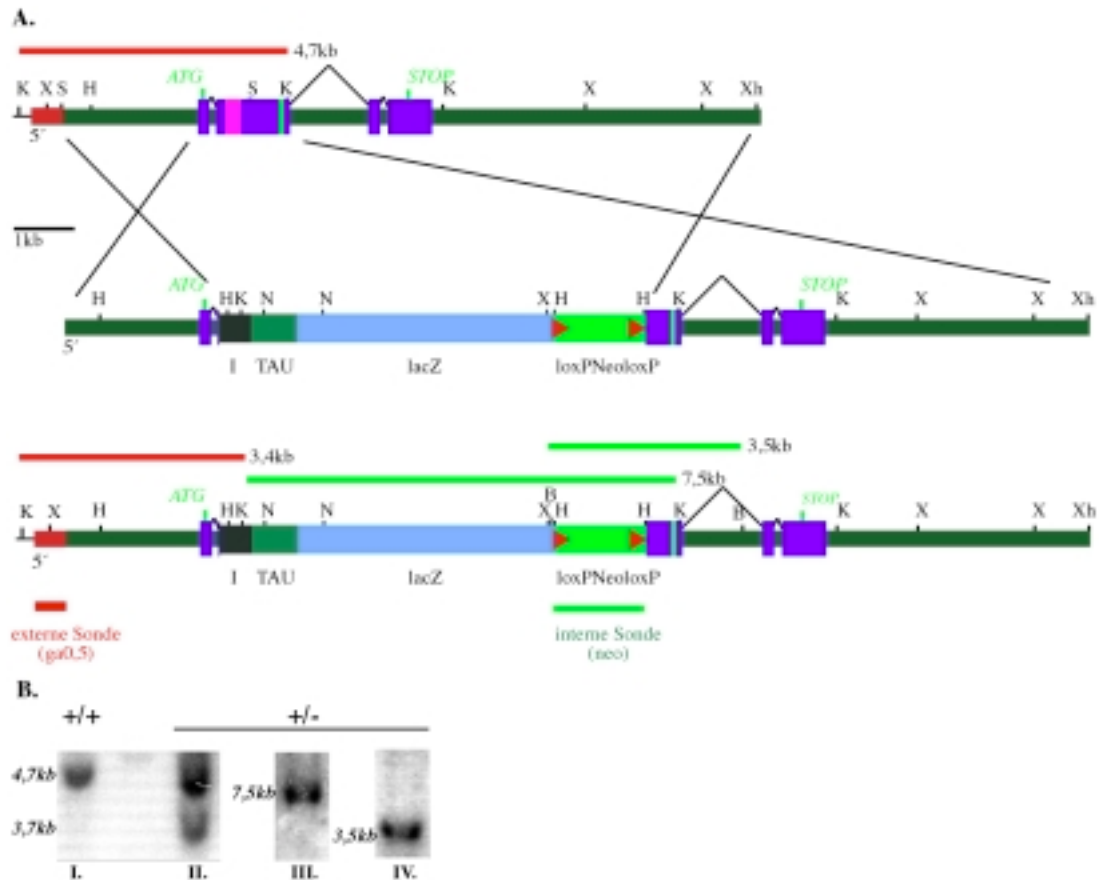
**Abb. II.26:** Embryonale Stammzellen

Die Abbildung zeigt Beispiele (A,B) von embryonalen Stammzellen. Die einzelnen ES-Zellen entwickeln sich klonal, so daß "Kolonien" aus klonalen embryonalen Stammzellen entstehen. Die transgenen ES-Zellen (hier mit *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*) wurden auf ihre β-Galaktosidaseaktivität hin, mittels X-Gal-Färbung, getestet. Die Aktivität ist an der blauen Färbung (rote Dreiecke) zu sehen.

#### *IRX1-ΔHOM-IRES-TAU-LACZ-loxPNeoloxP*

Die mit dem *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-Konstrukt transformierten Zellen wurden mit *Geneticin* (G418) selektiert. Nach der Selektion konnten insgesamt 135 ES-Zell-Klone isoliert werden. Zur Identifizierung des homologen Rekombinationsereignisses wurde genomische DNA aus den ES-Zellen gewonnen. Für die Southern-Blot-Analyse wurde eine externe (*ga0,5*; 500 bp) und eine interne Sonde (*neo*; 2 kb) benutzt. Der Verdau der genomischen DNA mit *KpnI* führt in der Southern-Blot-Analyse mit der externen Sonde zu einer 4,7 kb Bande für das Wildtyp-Allel und einer zusätzliche 3,7 kb Bande für das homolog rekombinierte Allel. Bei der

Hybridisierung mit der internen Sonde wird jeweils das mutierte Allel der entsprechenden Größe (*KpnI*-Verdau: 7,5 kb und *BamHI*-Verdau: 3,5 kb) nachgewiesen. Von den 135 ES-Zell-Klonen zeigten aufgrund der Analysen sechs das richtige Rekombinationsereignis, welches einer Frequenz von 1:23 entspricht.



**Abb. II.27:** Rekombinationsschema sowie Analyse der mit dem *Irx1*- $\Delta$ hom-IRES-TAU-*lacZ*-*loxPNeoloxP*-Konstrukt transformierten ES-Zellen

**A.** Darstellung der mittels homologer Rekombination erzeugten Mutation im *Irx1*-Gen. Die obere Zeile gibt die genomische Organisation des *Irx1*-Allels an, die mittlere Zeile das Rekombinationskonstrukt (*Irx1*- $\Delta$ hom-IRES-TAU-*lacZ*-*loxPNeoloxP*-Konstrukt) und die untere Zeile die erwartete Struktur des mutierten *Irx1*-Allels.

**B.** Southern-Blot-Analyse genomischer DNA von ES-Zellen, welche mit *KpnI* verdaut und mit externer und interner Sonde hybridisiert wurden. Dabei wurde I und II mit der Sonde ga0,5 (externe Sonde) hybridisiert. Die obere Bande entspricht dem Wildtyp (4,7 kb) und die untere dem mutierten Allel (3,7 kb). Die Spur III. wurde ebenfalls mit *KpnI* verdaut und mit der internen Sonde (*neo*) hybridisiert. Diese markiert nur das mutierte Allel (7,5 kb). Die Spur IV. ist mit *BamHI* verdaut und ebenfalls mit der internen Sonde (*neo*) hybridisiert. Diese markiert gleichfalls nur das mutierte Allel (3,5 kb).

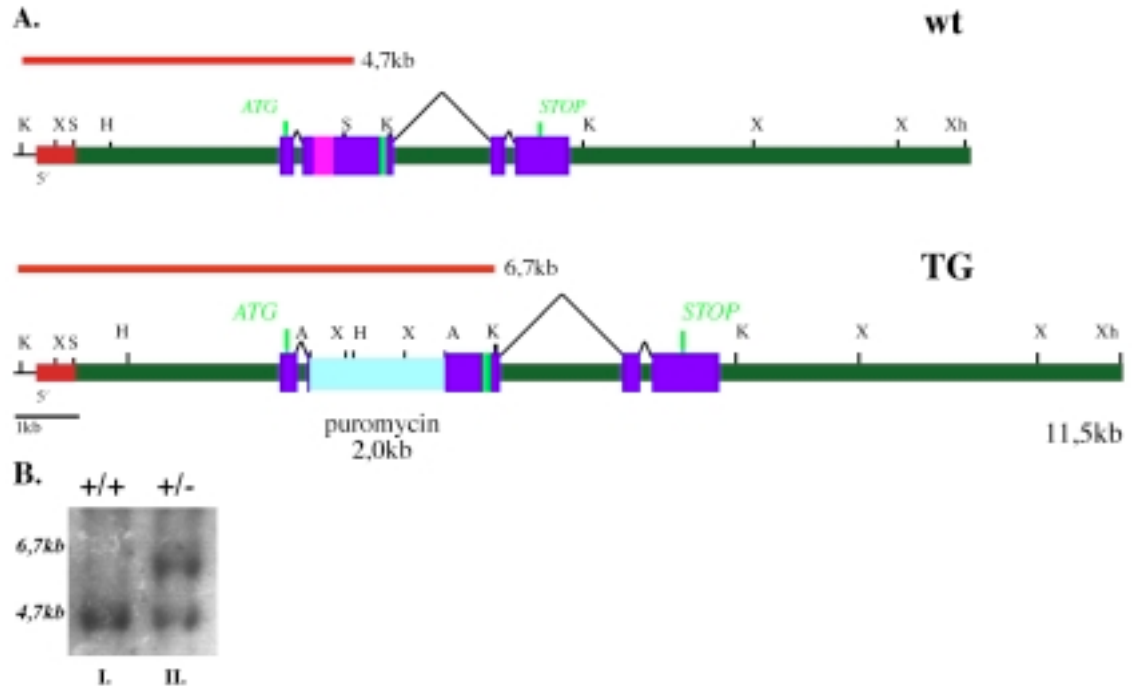
kb). Die interne Sonde gibt weiterhin Auskunft über die korrekte Struktur des Rekombinationskonstruktes.

Abkürzungen:  $\Delta hom$ : deletierte Homeobox; H: HindIII; I: IRES; K: KpnI; lacZ:  $\beta$ -Galaktosidasegen; S: SacII; X: XbaI; Xh: XhoI

Neben dem *Irx1- $\Delta hom$ -IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-Konstrukt wurden noch zwei weitere Konstrukte elektroporiert.

### *IRX1- $\Delta HOM$ -PURO-KONSTRUKT*

Zunächst wurde das *Irx1- $\Delta hom$ -puro*-Konstrukt in die ES-Zellen elektroporiert. Die Zellen wurde auf *Puromycin*- und *Gancyclovir*-Resistenz (gegen *Tk*) selektiert. Es konnten 290 ES-Zell-Klone nach der Selektion isoliert werden. Aus diesen Klonen wurden zur Identifizierung der homologen Rekombination DNA präpariert und einer Southern-Blot-Analyse mit verschiedenen Sonden unterzogen. Als externe Sonde wurde wieder das ga0,5-Fragment benutzt und als interne das *Puromycin*-Gen. Die genomische DNA wurde mit *KpnI* verdaut und zeigte nach der Hybridisierung mit ga0,5 eine 4,7 kb Bande für das Wildtyp-Allel und eine 6,7 kb Bande für das rekombinierte Allel. Mit der internen Sonde (*puromycin*) konnte jeweils das mutierte Allel nachgewiesen werden (*KpnI*-Verdau: 6,7 kb und *XbaI*-Verdau: 6,5 kb). Von den 290 ES-Zell-Klonen wurde für sieben eine korrekte homologe Rekombination nachgewiesen (Frequenz von 1 : 40)



**Abb. II.28:** *Irx1-Δhom-puromycin*-Konstrukt: Rekombinationsschema und Durchmusterung der ES-Zellen

**A.** *Irx1*-Mutation mittels homologer Rekombination. Die genomische Organisation des Wildtyp-Allels wird in der oberen Zeile und die erwartete Struktur des mutierten *Irx1* Allels in der unteren angegeben.

**B.** ES-Zell-Southern-Blot-Analyse der genomischer DNA. Diese wurden mit KpnI verdaut und mit der Sonde ga0,5 (externe Sonde) hybridisiert. Die untere Bande entspricht dem Wildtyp- (4,7kb; I.) und die obere dem mutierten Allel (6,7kb; I. und II.).

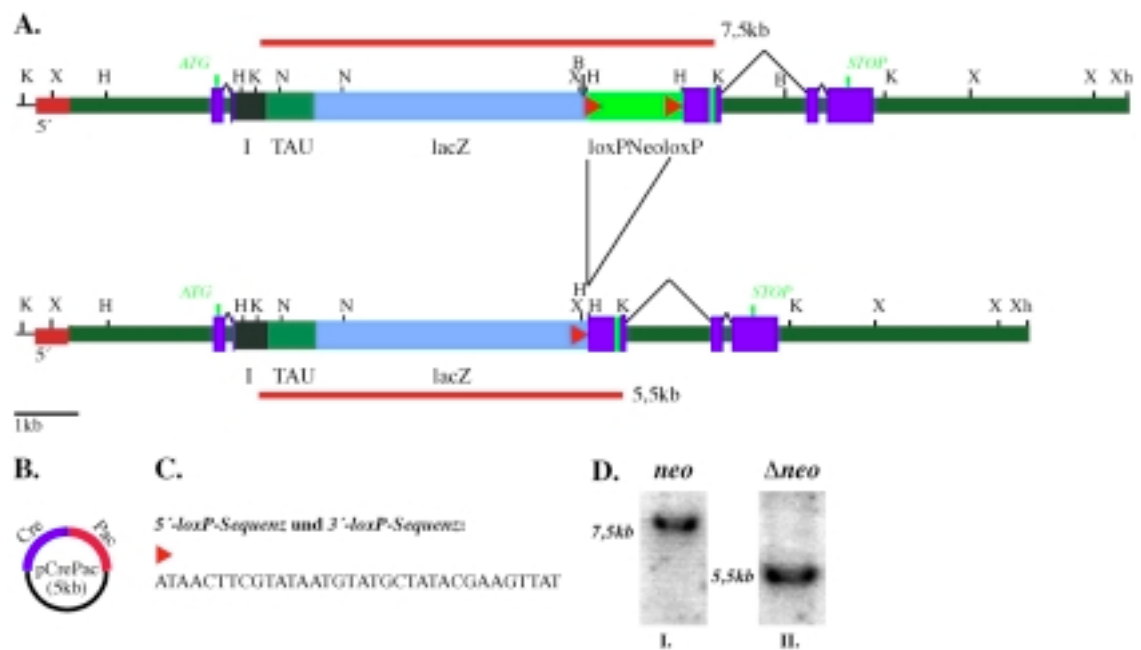
Abkürzungen:  $\Delta$ hom: deletierte Homeobox; H: HindIII; I: IRES, K: KpnI; lacZ:  $\beta$ -Galaktosidasegen; S: SacII; TG: transgenes Allel; Tk: HSV-Thymidin-Kinase-Gen; WT: Wildtyp Allel; X: XbaI; Xh: XhoI

### *IRX1-ΔHOM-IRES-TAU-LACZ-loxPΔNeo*

Die dritte durchgeführte Elektroporation hatte zum Ziel, das *Neomycin*-Gen aus den *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP* positiven ES-Zellen zu deletieren, um *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo* zu erhalten. Das *Neomycin*-Gen sollte entfernt werden, da der *Pgk*-Promotor des *Neomycin*-Gens in Gengruppen manchmal zu Fehlexpressionen oder zu "Rearrangements" führen kann (Meyers et al., 1998). Für das Entfernen wurde das *Cre-loxP*-System benutzt, bei dem das *Neomycin*-Gen von *loxP*-Sequenzen flankiert wird.

Dazu wurde der ES-Zell-Klon *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-#92* mit einem *Cre-Puromycin*-Plasmid elektroporiert (Taniguchi et al., 1998). Dieses Plasmid zeichnet sich dadurch aus, daß es eine *Cre*-Rekombinase und einen *Puromycin*-Selektionsmarker enthält. Nach der Elektroporation vermittelte das *Cre*-Enzym in den betroffenen ES-Zellen die Entfernung des *LoxPNeo* durch Rekombination der *LoxP*-Stellen. Mittels des *Puromycin*-Selektionsmarkers ist es möglich, die positiv elektroporierten ES-Zellen zu selektieren. Das *Cre-Puromycin*-Plasmid wird aber nicht in das Mausgenom integriert, da es als Plasmid und nicht linear transferriert wird (Watanabe et al., 1995; Taniguchi et al., 1998).

Die ES-Zellen werden wie bei der Elektroporation des *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-Konstruktes beschrieben, mit *KpnI* verdaut und mit der externen ga0,5-Sonde durchgemustert (Wildtyp: 4,7 kb; mutiertes Allel: 3,4 kb).



**Abb. II.29:** Entfernen des *Neomycin*-Gens aus *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-#92*: Rekombinationsschema und Durchmusterung der ES-Zellen für die Herstellung von *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo*.

**A.** Aus dem Klon #92 (*Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP-#92*) wurde das *Neomycin*-Gen mittels einer Rekombinase-Reaktion entfernt. Das *Neomycin*-Gen ist von *loxP*-Sequenzen flankiert (rote Dreiecke) und läßt sich mit einer *Cre*-Rekombinase deletieren. Die obere Reihe zeigt die Organisation des Klons #92 und

die untere Zeile die erwartete Struktur des mutierten *Irx1*-Allels ohne *loxPNeo*. Eine *loxP*-Sequenz verbleibt nach der Rekombinationsreaktion im Mausgenom.

**B.** Die Abbildung zeigt das pCrePac-Plasmid, welches in den ES-Zellen benutzt wurde, um mittels einer Cre-Rekombinasereaktion das *loxPNeo* herauszuschneiden (Taniguchi et al., 1998).

**C.** Die Abbildung zeigt die 34 Nucleotide lange *loxP*-Sequenz (rotes Dreieck), wie sie im *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-Rekombinationskonstrukt benutzt wurde.

**D.** ES-Zell-Southern-Blot-Analyse mit genomischer DNA. Diese wurde mit KpnI verdaut und mit einer externen und internen Sonde hybridisiert. Die Spur I. und II. wurde mit KpnI verdaut und mit der internen Sonde (*lacZ*) hybridisiert (mutiertes Allel mit *loxPNeo*: 7,5kb; mutiertes Allel ohne *loxPNeo*: 5,5kb). Diese interne Sonde gibt Aufschluß darüber, ob das *loxPNeo* deletiert ist.

Abkürzungen: Cre: Cre-Rekombinase; H: HindIII; I: IRES; K: KpnI; lacZ: β-Galaktosidasegen; Pac: Puromycin-Gen; S: SacII; Tk: HSV-Thymidin-Kinase-Gen; X: XbaI; Xh: XhoI

Die interne Sonde ist diesmal die wichtigere, da sie dazu dient, die Deletion von *Neomycin* nachzuweisen. Für die Hybridisierung mit der internen 4,2 kb-*lacZ*-Sonde wird die genomische DNA mit *KpnI* verdaut und hybridisiert (mutiertes Allel mit *loxPNeo*: 7,5 kb; mutiertes Allel ohne *loxPNeo*: 5,5 kb). Die erzielte Frequenz war 1 : 23.

### **II.4.5. MORULA-AGGREGATION VON ES-ZELLEN**

Die Pluripotenz der embryonalen Stammzellen wurde anhand der Herstellung von Chimären durch Blastozysteninjektion von ES-Zellen oder durch ES-Zell-Aggregation in eine Morula gezeigt. Die Chimären entwickeln sich normal und die ES-Zellen beteiligen sich an der Entwicklung aller embryonalen Gewebetypen, einschließlich der Keimbahn. Daher eignen sie sich hervorragend zur Herstellung von Mausmutanten (Mansouri, 2001; Robertson, 1987).

Je *Irx1*-Rekombinationskonstrukt (*Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP*-, *Irx1-Δhom-puromycin*- und *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo*) wurden drei ES-Zell-Klone zur Herstellung chimärer Mäuse durch Morula-Aggregation verwendet (s. Tabelle). Die ES-Zellen wurden mit Morulae aggregiert, die aus dem NMRI-Mausstamm gewonnen wurden und pro ES-Zell-Klon wurden

durchschnittlich 250 Aggregationen durchgeführt. Da sich nicht alle Morulae außerhalb des Körpers weiterentwickeln, wurden ca. 90 % der aggregierten Embryonen retransferiert. Ebenso entwickeln sich nicht alle transferierten Embryonen zu Chimären. Entscheidend für die Weiterentwicklung sind Faktoren wie die der Synchronisation der Ammenmütter oder die Sauberkeit während des Retransfers. Die Ergebnisse der Morula-Aggregation sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt:

*Morula-Aggregation von  $Irx1-\Delta hom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP$ -ES-Zellen:*

GEPICKTE KLONE: 135      POSITIVE KLONE: 6x : #9, #15, #23, #27, # 41, #92

ES-ZELL-KLON	AGGREGATION (ES-ZELLEN)	ANZAHL DER CHIMÄREN	KEIMBAHN	F1-GENERATION
<b>AZ-27</b>	255	10/46	100%	ok
AZ-41	210	1/40		
AZ-92	240	5/54		

**Tabelle II.1:** Ergebnisse der Morula-Aggregation von  $Irx1-\Delta hom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP$ . Aus der Elektroporation der ES-Zellen wurden sechs korrekte transgene ES-Zell-Klone erhalten (6:135). Bei diesem  $Irx1$ -Rekombinationskonstrukt wurden drei ES-Zell-Klone aggregiert, wobei z.B. für Klon #27 10 Chimären aus 46 Neugeborenen hervorgingen. Die Chimären des ES-Zell-Klons #27 (AZ-27) ermöglichten den Keimbahntransfer.

*Morula-Aggregation von  $Irx1-\Delta hom-Puromycin$ -ES-Zellen:*

GEPICKTE KLONE: 290      POSITIVE KLONE: 7x : #6, #8, #10, #11, #116, #160, #185

ES-ZELL-KLON	AGGREGATION (ES-ZELLEN)	ANZAHL DER CHIMÄREN	KEIMBAHN	F1-GENERATION
<b>AZ-2-116</b>	255	10/46	100%	ok
AZ-2-160	370	9/24		
AZ-2-185	230	8/32		
<b>AZ-2-6</b>	240	5/26	100%	ok
AZ-2-8	180	6/30		

## II. ERGEBNISSE

<b>AZ-2-11</b>	160	15/23	100%	ok
----------------	-----	-------	------	----

**Tabelle II.2:** Ergebnisse der Morula-Aggregation von *Irx1-Δhom*-Puromycin. Aus der Elektroporation der ES-Zellen wurden sieben korrekt transgene ES-Zell-Klone erhalten (7:290). Bei diesem *Irx1*-Rekombinationskonstrukt wurden sechs ES-Zell-Klone aggregiert, wobei aus dreien Chimären hervorgingen, die das Transgen in die Keimbahn transferierten. Die Chimären der ES-Zell-Klone #6, #11 und #116 (AZ-2-6, AZ-2-11 und AZ-2-116) führten zum Keimbahntransfer, und es konnten daraus jeweils Mauslinien etabliert werden.

### *Morula-Aggregation von Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo-ES-Zellen:*

**GEPICKTE KLONE:** 117      **POSITIVE KLONE:** 5x : #1, #26. **#72, #90, #116**

<i>ES-ZELL-KLON</i>	<i>AGGREGATION (ES-ZELLEN)</i>	<i>ANZAHL DER CHIMÄREN</i>	<i>KEIMBAHN</i>	<i>F1-GENERATION</i>
<b>AZ-3-72</b>	240	5/45	1 x 1%	ok
<b>AZ-3-90</b>	270	9/98	1 x 100%	ok
<b>AZ-3-116</b>	300	12/53	1 x 100%	ok

**Tabelle II.3:** Ergebnisse der Morula-Aggregation von *Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo*. Aus der Elektroporation der ES-Zellen wurden fünf korrekt transgene ES-Zell-Klone erhalten (5:117). Bei diesem *Irx1*-Rekombinationskonstrukt wurden 3 ES-Zell-Klone aggregiert, welche zu Chimären führten. Die Chimären der ES-Zell-Klone #72 #90 und #116 (AZ-3-72, AZ-3-90 und AZ-3-116) führten zum Keimbahntransfer und es konnten daraus jeweils Mauslinien (AZ-3-72 1x; AZ-3-90: 2x; AZ-3-116: 2x) etabliert werden.

Nach ca. sechs Wochen wurden die Chimären mit NMRI-Wildtypmäusen verpaart. Der Grad des Chimärismus ist dabei anhand der Fellfarbe erkennbar. Je höher dieser Grad, desto höher ist auch die prozentuale Wahrscheinlichkeit, daß die chimäre Maus die transgene Information auch in ihren Keimzellen trägt und somit diese Information an ihre Nachkommen weitergibt. Eine Keimbahntransmission konnte bei den Nachkommen anhand der Augenfarbe erkannt werden. Mäuse mit schwarzen Augen entstammten der Keimbahn der transgenen ES-Zellen (Stamm: 129SV), wohingegen Mäuse mit roten Augen von den nicht-transgenen ES-Zellen (Stamm: NMRI) abstammen. Keimbahntransmitierende Chimären wurden auf dem Inzuchtstamm SV129



und dem Auszuchtstamm NMRI weitergezüchtet. Der Mausstamm SV129 bietet die Vorteile eines genetisch "sauberen (reinen)" Hintergrundes, da auch die ES-Zellen diesem entstammen. Leider ist bei diesen aber die Zahl der Nachkommen und auch die Pflegebereitschaft der Mütter eingeschränkt. Diese letztgenannten Probleme treten nicht in einem NMRI-Hintergrund auf, dafür liegt ein genetischer Mischhintergrund vor, der bei Phänotyp-Analysen zu beachten ist. Daher entstammen alle folgenden Daten den Verpaarungen mit 129SV-Mäusen, außer sie werden ausdrücklich erwähnt. Heterozygote Tiere der F1-Generation wurden miteinander bis zur Homozygotie verpaart.

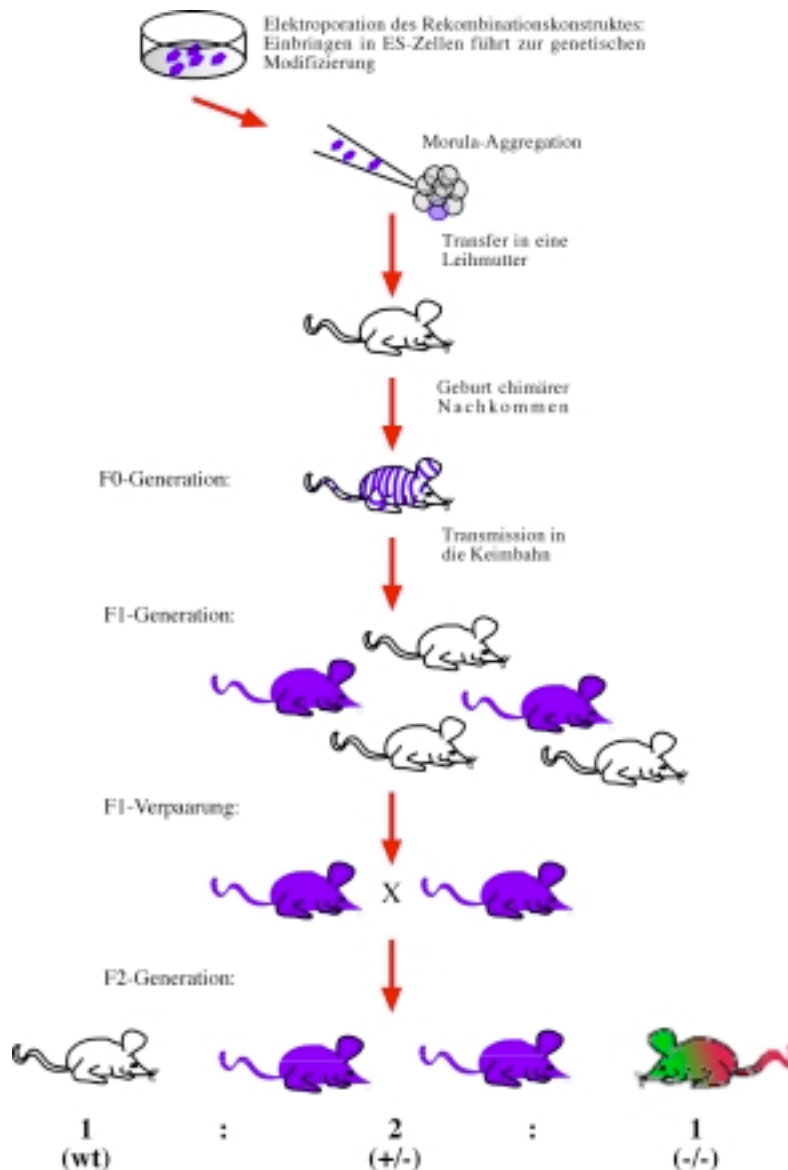


Abb. II.30: Schematische Darstellung der Aggregation und des Verpaarungsschema

Nach der Aggregation wurden die chimären Mäuse (F0, blau-weiß) mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Die Transmission in die Keimbahn konnte über die Fellfarbe (weiß/blau) nachgewiesen werden. *Irx1*-heterozygote F1-Mäuse wurden miteinander zur Homozygotie verpaart. Der Genotyp der Nachkommen entspricht der zweiten Mendelschen Regel und teilt sich wie folgt auf:

1 (wildtyp; wt) : 2 (heterozygot; +/-) : 1 (homozygot; -/-)

Es konnten insgesamt sieben Mauslinien etabliert und daraufhin analysiert werden, die jeweils unabhängigen ES-Zell-Klonen entstammen. Diese wiederum zeichnen sich durch jeweils verschiedene Chimären aus.

<i>REKOMBINATIONSKONSTRUKT:</i>	<i>MAUSLINIE:</i>
<i>Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPNeoloxP:</i>	AZ-27
<i>Irx1-Δhom-puromycin:</i>	AZ-2-11 AZ-2-116 AZ-2-160
<i>Irx1-Δhom-IRES-TAU-lacZ-loxPΔNeo:</i>	AZ-3-72 AZ-3-90 AZ-3-116

Die sieben Mauslinien (NMRI-Hintergrund) wiesen keinen Unterschied im Phänotyp auf und so wurde für die weitere Analyse der *Irx1*-defiziente Mausstamm AZ-27 ausgewählt.

## II.5. ANALYSE DER *IRX1*-DEFIZIENTEN MÄUSE

### ***II.5.1 IRX1-DEFIZIENTE MÄUSE STERBEN WÄHREND DER EMBRYONALEN ENTWICKLUNG***

**D**ie genotypische Analyse von Mäusen der F2-Generation ergab, daß *Irx1*-homozygot defiziente Mäuse nicht geboren werden. Alle untersuchten *Irx1*-heterozygoten Tiere waren phänotypisch unauffällig und ließen sich normal verpaaren. In weiteren Analysen wurden die Stadien E18,5, E15,5, E12,5 und E10,5 auf mögliche homozygote Embryonen hin untersucht. Es traten nie

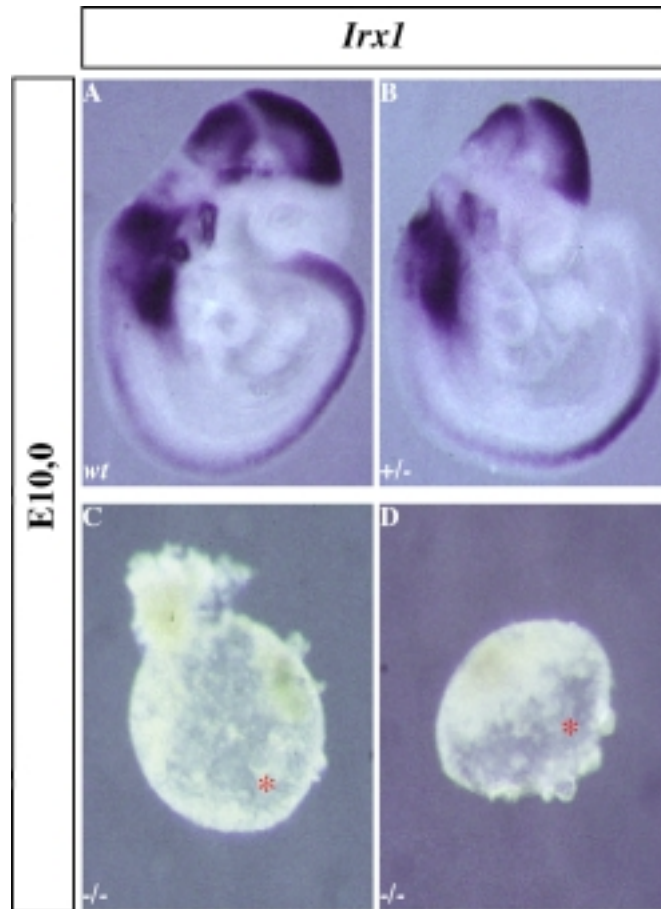
homozygote *Irx1*-Mutanten auf. Unter 356 Embryonen und Mäusen, die untersucht wurden, ergab sich ein Verhältnis von 117 (Wildtyp) zu 239 (heterozygot) zu null (homozygot). Das beobachtete Verhältnis der Genotypen (1 : 2 : 0) läßt darauf schließen, daß die homozygoten Embryonen bereits vor dem Stadium E10,5 sterben. Eine Auflistung der untersuchten Mäuse findet sich in folgender Tabelle:

<i>MAUSLINIE:</i>	<i>GENOTYP:</i> (E10,5-ADULT)
	WT : +/- : -/-
AZ-27 :	87 : 173 : 0
AZ-2-X (AZ-2-11; AZ-2-116; AZ-2-160)	20 : 44 : 0
AZ-3-Y (AZ-3-72; AZ-3-90; AZ-3-116)	10 : 22 : 0
	117: 239 : 0
=>	1 : 2 : 0

Dieses Ergebnis blieb über mehrere Generationen konsistent (Es wurden bisher bis zur vierten Generation untersucht).

### ***II.5.2. IRX1-DEFIZIENTE MÄUSE ZEIGEN EINEN STARKEN EMBRYONALEN PHÄNOTYP***

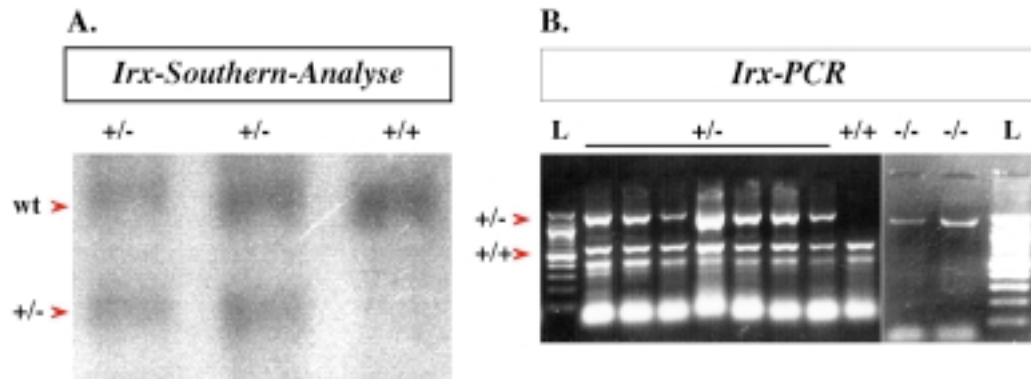
**I**n der weiteren Analyse wurden noch frühere embryonale Stadien (E5,5-E10,0) untersucht. Bei E10,0 treten die ersten abnormen "Gewebe" auf. Diese *Irx1*-defizienten Körper zeigen Strukturen von kleinen Bällen aus embryonaler Membran. Es ist keine zelluläre Organisation wie z.B. eine Achsenbildung erkennbar, ferner sind weder neuronale noch einfache axiale Anlagen erkennbar. Die Embryonen weisen lediglich eine runde Form ohne ersichtliche Organisation und Strukturierung auf.



**Abb. II.31:** *Irx1*-Phänotyp im Stadium E10,0

Die Abbildung zeigt eine *Irx1*-whole mount-Analyse eines heterozygoten Wurfes. Die analysierten Embryonen befinden sich Stadium E9,5-10,0. Die heterozygoten Embryonen (B) zeigen im Vergleich zu einem Wildtyp-Embryo (A) eine normale *Irx1*-Expression und ein normales Erscheinungsbild, sind also phänotypisch unauffällig. Es ist allerdings erwähnenswert, daß der heterozygote Embryo etwas jünger erscheint (E9,5). Dieses spiegelt die normale Variabilität eines Wurfes wieder. Dagegen sind die *Irx1*-Mutanten (C, D) in ihrer ballförmigen Struktur ganz wesentlich zurückgeblieben und bestehen aus embryonalen Membranen (roter Stern), die keine weiteren Organisation oder Differenzierung zeigen. (Diese Analyse wurde auf einem SV129-Inzuchtstamm durchgeführt.)

Die Genotypisierung der *Irx1*-Mäuse erfolgte mittels einer Southern-Blot- bzw. einer PCR-Analyse. Für die frühen embryonalen Stadien wurde auf die PCR-Technologie zurückgegriffen. Dies ermöglicht den Einsatz von weniger DNA als in der Southern-Blot-Analyse, was vor allem bei den winzigen homozygoten Embryonen nötig war.



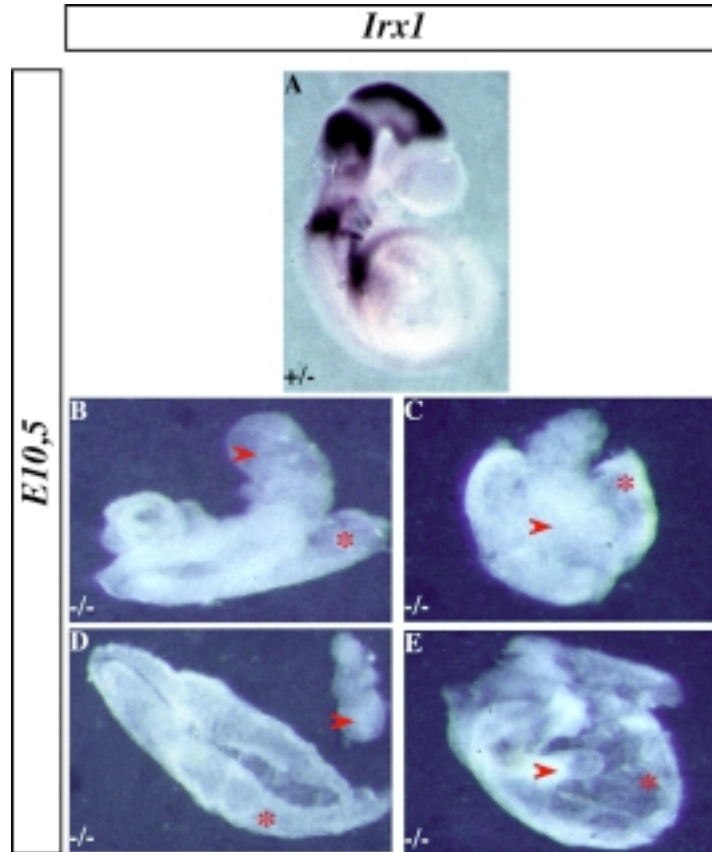
**Abb. II.32:** Genotypisierung der *Irx1*-Mutanten

Die Genotypisierung der *Irx1*-Mutanten erfolgte mittels Southern-Blot-Analyse (E8,5 bis adult). Dazu wurde mit der externen Sonde (ga0,5) gearbeitet, die im Wildtyp-Fall eine 4,7 kb Bande und im heterozygoten Zustand eine zusätzliche 3,7 kb Bande anzeigt (A). Für die Genotypisierung jüngerer Stadien (E6,0 - E8,5) wurde auf die PCR-Analyse zurückgegriffen. Dazu wurde eine PCR auf der *Irx1*-Homeobox und auf das Rekombinationskonstrukt (*Neomycin* oder  $\beta$ -Galaktosidase) durchgeführt. Die Kombination aus *Irx1*-Homeobox- mit *Neomycin*-PCR ergab, wie in B gezeigt, folgende Größen: Wildtyp: 620 bp; heterozygot: 1200 bp + 620 bp; homozygot: 1200 bp).

Abkürzungen: L: 100bp-DNA-Marker

Für die Analyse eines frühen Phänotyps kann der genetische Hintergrund von entscheidender Bedeutung sein, da sich zu diesem Zeitpunkt Modulationen wesentlich stärker auswirken. Das bedeutet, daß in einem Auszuchtstamm (wie z.B. der verwendete NMRI-Mausstamm) durch genetisches Gleichgewicht der Phänotyp milder ausfallen kann, als in einem Inzuchtstamm (wie der untersuchte SV129-Mausstamm) (Winnier et al., 1995). Daher wurde die Analyse der Embryonalentwicklung auch mit dem NMRI-Mausstamm durchgeführt. Bei Analyse der Mausmutanten auf diesem genetischen Hintergrund, schreitet die Entwicklung der Embryonen etwas weiter fort (überleben bis E10,5). Auch in diesem Falle liegen kleine ballförmige Strukturen vor, diese zeigen aber in deren Mitte fingerförmige embryonale Überreste, die auf eine gewisse axiale Strukturierung hindeuten.

Aus diesen Reststrukturen ist ersichtlich, daß die *Irx1*-defizienten Mausembryonen ein Problem während der frühen embryonalen Entwicklung haben.



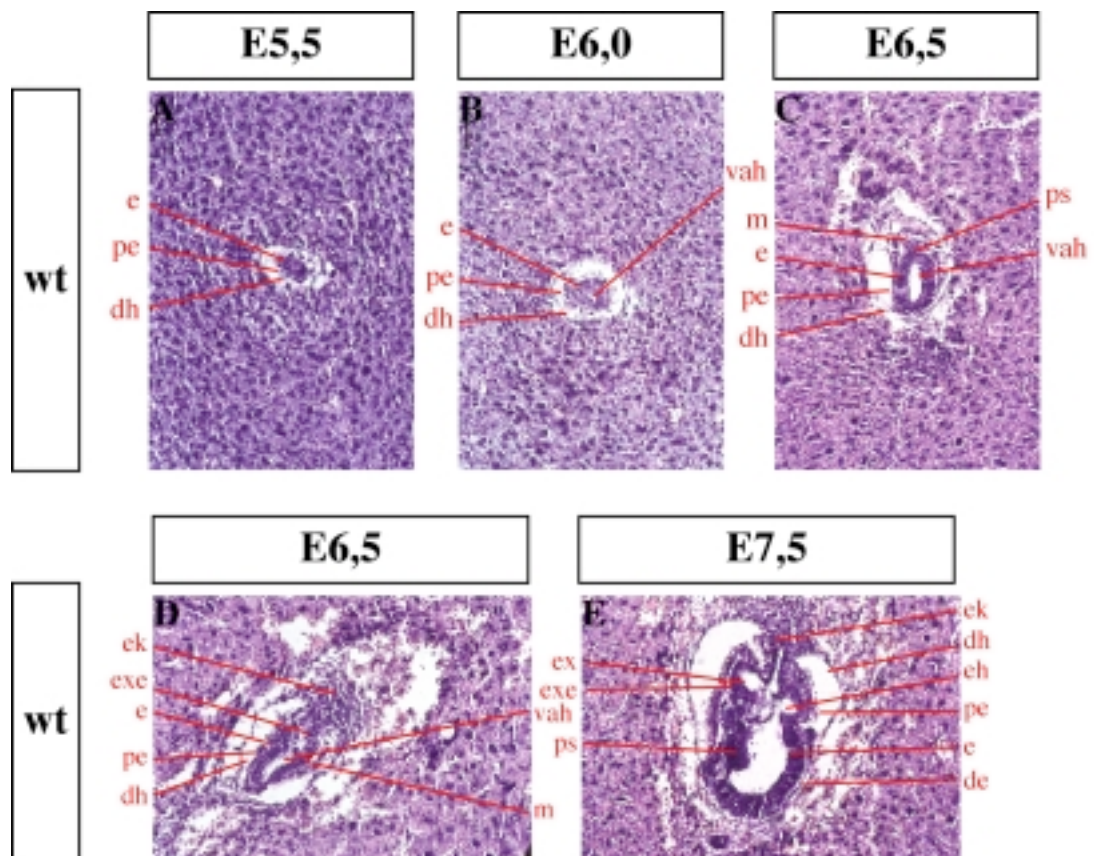
**Abb. II.33:** *Irx1*-Phänotyp im Stadium E10,5

Auf einem genetischen Hintergrund eines Mauseinzuchtstammes (NMRI) entwickeln sich die *Irx1*-defizienten Embryonen bis zu einem Alter von E10,5 (B - E). Die Embryonen wurden mittels einer *Irx1*-whole-mount-Analyse untersucht. In der Abbildung A ist ein heterozygoter Embryo (E10,5) desselben Wurfes dargestellt. Dieser zeigt eine normale *Irx1*-Expression und ist phänotypisch unauffällig. Die Embryonenreste der Mutanten (B - E) sind als fingerförmige, nicht differenzierte Strukturen (rote Pfeile) erkennbar. Es wurden die Embryonalhüllen geöffnet (rote Sterne), um den Embryo freizulegen.

### ***II.5.3. IRX1 IST WESENTLICH FÜR DIE GASTRULATION DER MAUS***

**F**ünfeinhalb Tage nach der Befruchtung (E5,5) beginnt der implantierte Mausembryo mit der Gastrulation, d.h. mit der Bildung von Keimblättern. Während dieses Stadiums ist der Embryo ca. 250 µm lang und im Durchmesser

70 µm und besteht aus Endoderm und Ektoderm. Bis zum Stadium E6,0 ist der Eizylinder in zwei Teile unterteilt. Die proximale Region besteht aus extraembryonalem Ektoderm, und im distale Bereich liegt das embryonale Ektoderm vor. Es entstehen im embryonalen Bereich die proamniotische und im extraembryonalen Teil die ekto-plazentale Höhle. Im Mausembryo liegt innen als dicke Zellschicht das Ektoderm und außen als dünne Schicht das Endoderm. Das große Lumen des Dottersacks wird erst nach und nach durch die extraembryonalen und embryonalen Teile aufgefüllt. Zellen aus dem extraembryonalen Ektoderm teilen sich zur dorsalen Seite hin und bilden den ekto-plazentalen Kegel. Dieser wandert in das mütterliche Gewebe ein, zerstört auf seinem Weg Blutzellen und bildet Riesenzellen aus. Es wird später ein Teil der Plazenta werden (Rugh, 1990).



**Abb. II.34:** Saggitale und transverse Paraffinschnitte von Wildtyp-Embryonen der Stadien E5,5 bis E7,5.

Die Abbildung zeigt Embryonen, die in den Uteri belassen und analysiert wurden. Sie wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten (15µm) und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Schnitte A bis C stellen transverse und D und E saggitale Schnitte dar.

(Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung): Hämatoxylin färbt die Zellkerne (dunkellila) und Eosin das Plasma (lila-rosa) an.)

Abkürzungen: de: distales Endoderm; dh: Dottersackhöhle; e: Ektoderm; eh: ektoplazentale Höhle; ek: ektoplazentaler Kegel; ex: Exocoelom; exe: extraembryonales Ektoderm; m: Mesoderm; pe: proximales Endoderm; ps: Primitivstreifen; vah: voramniotische Höhle

Im Stadium E6,5 ist der Primitivstreifen im proximalen Teil des Embryos als eine Verdickung des Ektoderms zu erkennen. Die Zellen der dritten Keimschicht, dem Mesoderm, sind als einzelne runde, mesenchymale Zellen zwischen dem Primitivstreifen und dem proximalen Endoderm erkennbar. Die frischen Mesodermzellen wandern zwischen Ektoderm und Endoderm nach lateral und posterior, aber nicht nach anterior aus. Einige der Mesodermzellen wandern auch in den extraembryonalen Bereich, wo sie im weiteren Verlauf eine Höhle, das Exocoelom, die Dottersackmembran und die proamniotische Falte bilden (Rugh, 1990).

Nach 7 Tagen (E7,0 - 7,5) beginnt die Bildung der Kopfanlage. Das embryonale Ektoderm verdickt sich am distalen Ende des Eizylinders und Zellen wandern aus dem Primitivstreifen nach lateral und anterior. Die Zellen wandern nach anterior bis zur Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Gewebe und bilden dort die Kopfanlage (Hogan et al., 1994).

Im Stadium von E6,5 beginnt die *Irx1*-Expression im extraembryonalen Bereich des Embryos und markiert die Grenze am extraembryonalen zum embryonalen Übergang. In der *Irx1*-Mutante ist ein Phänotyp mit Auftreten des ersten Mesoderms erkennbar. Dieses wird normalerweise in der Region der Primitivstreifenanlage gebildet und wandert von dort aus. Dabei wird mehr oder weniger zeitlich parallel (Beddington und Robertson, 1999) das embryonale und extraembryonale Mesoderm gebildet.

Bis zur Bildung des extraembryonalen Mesoderms sehen die *Irx1*-defizienten Embryonen phänotypisch unauffällig aus. Nach Beginn der Mesodermbildung akkumulieren im Bereich des extraembryonalen Mesoderms Zellen, die im Wildtyp-Embryo nicht vorhanden sind. Die Zellen zeigen keine großen Vakuolen wie Endodermzellen, noch sind sie in einem epithelialen Zellverband organisiert wie ektodermale Zellen. Ihre Zellform ist rundlich und mit ihrer



lockeren Zellorganisation ähneln sie mesodermalen Zellen. Mit dem Einsetzen der Mesodermbildung wird wesentlich mehr extraembryonales Mesoderm als normal gebildet. Weiterhin bildet sich kein Exocoelom aus, wohingegen aber die ektoplazentale Höhle vorhanden ist.

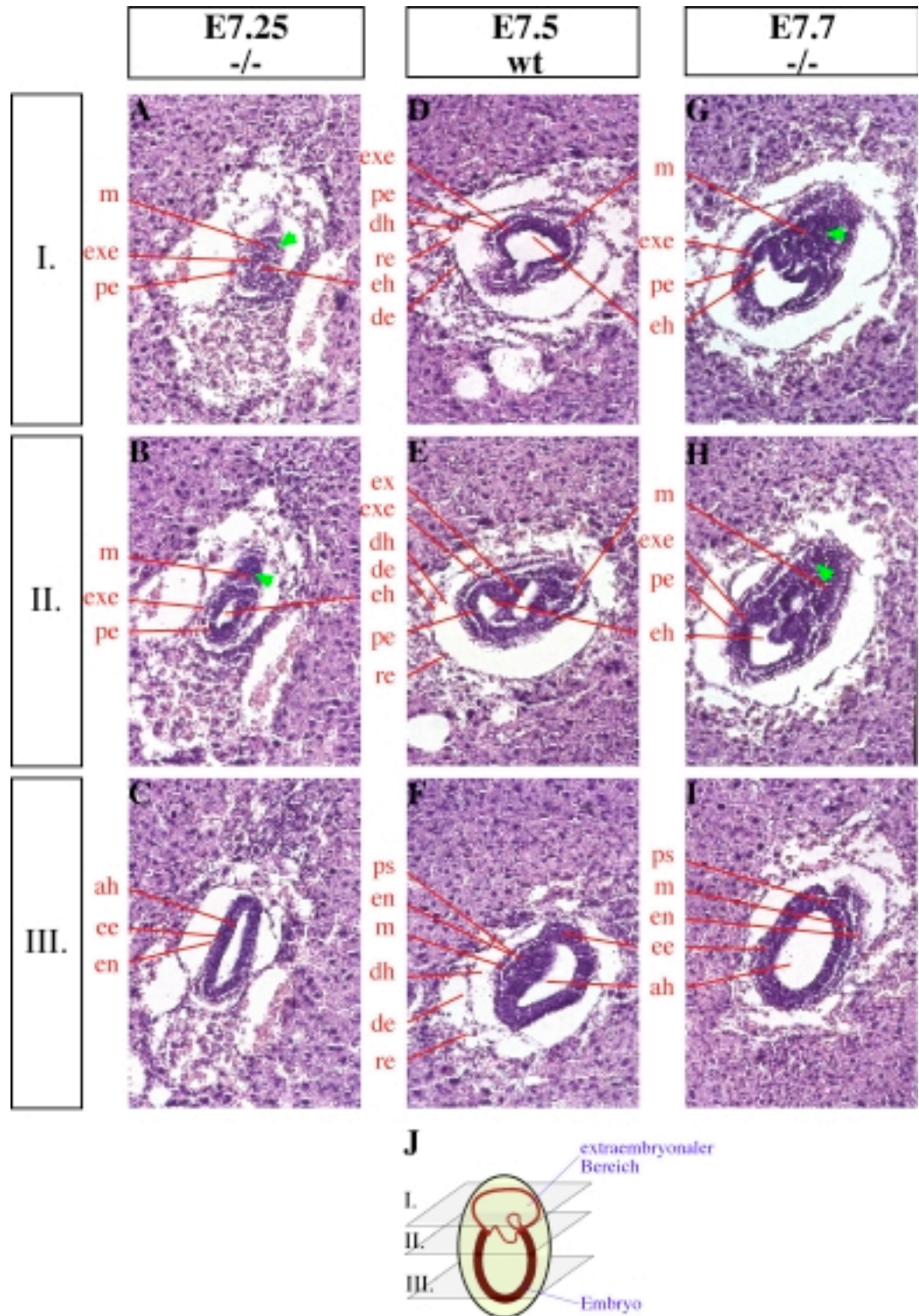
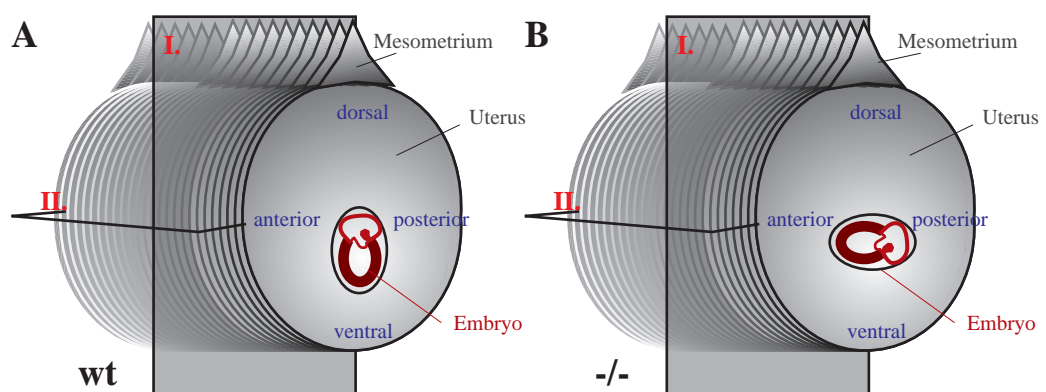


Abb. II.35: *Irx1*-defiziente Embryonen zeigen eine vermehrte Bildung an Zellen im Bereich des extraembryonalen Mesoderms.

Die Abbildungen zeigen transverse Schnitte durch Embryonen mit dem umgebenden Uterus (A - I). Die Schnitte wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. In der ersten Säule ist ein veränderter Embryo im Stadium E7,25 anhand von drei transversen Schnitten gezeigt (A - C). In der zweiten Säule ist ein E7,5 alter Wildtyp-Embryo (D - F) und in der dritten ein E7,5 alter *Irx1*-defizienter Embryo in derselben Weise gezeigt (G - I). In den *Irx1*-defizienten Embryonen ist eine stärkere Zellproliferation im Bereich des extraembryonalem Mesoderms ersichtlich (B + H). Im Stadium E7,5 ist ein Fehlen des Exocoeloms erkennbar. Dieser Phänotyp ist nicht bei dem E7,25 alten Embryo zu sehen, da dort die Membranbildungen im extraembryonalen Bereich noch nicht soweit fortgeschritten sind. Das Genotypisieren der *Irx1*-defizienten Embryonen erfolgte anhand der Morphologie, da eine Genotypisierung nach der HE-Färbung nicht möglich ist. (Diese Analyse wurde auf einem NMRI-Auszuchtstamm gemacht.)

Abkürzungen: ah: amniotische Höhle; ee: embryonales Ektoderm; eh: ektoplazentale Höhle; en: Endoderm; exe: extraembryonales Ektoderm; de: distales Endoderm; dh: Dottersackhöhle; m: Mesoderm; pe: proximales Endoderm; ps: Primitivstreifen; re: Reicherts Membran

Normalerweise ist der Embryo während der Implantation mit seiner Längsachse im 90° Winkel zur Längsachse des Uterus angeordnet. Da sich der Embryo nach ventral zu seinem Eizylinder entwickelt, befindet sich seine dorsoventrale Achse im 90° Winkel zur Längsachse des Uterus, und seine anterior-posteriore Achse ist im 90° Winkel zum Mesometrium. Bei ca. 65% der *Irx1*-mutanten Embryonen ist dieser Winkel verändert, und der Embryo ist um ca. 90° gedreht.



**Abb. II.36:** Die Abbildung zeigt die Orientierung des Embryos zum Uterus im normalen und im *Irx1*-defizienten Fall.

Der Embryo ist im 90° Winkel zur Uteruslängsachse und seine anteriore-posteriore Achse ist um 90° zum Mesometrium orientiert (A). Diese Orientierung ist in der Mutante aufgehoben und der Embryo ist um weitere 90° gedreht.

Weiterhin sind die Schnittebenen angegeben:

I.-Schnittebene: sagital zum Embryo und transvers zum Uterus

II.-Schnittebene: transvers zum Embryo und horizontal zum Uterus

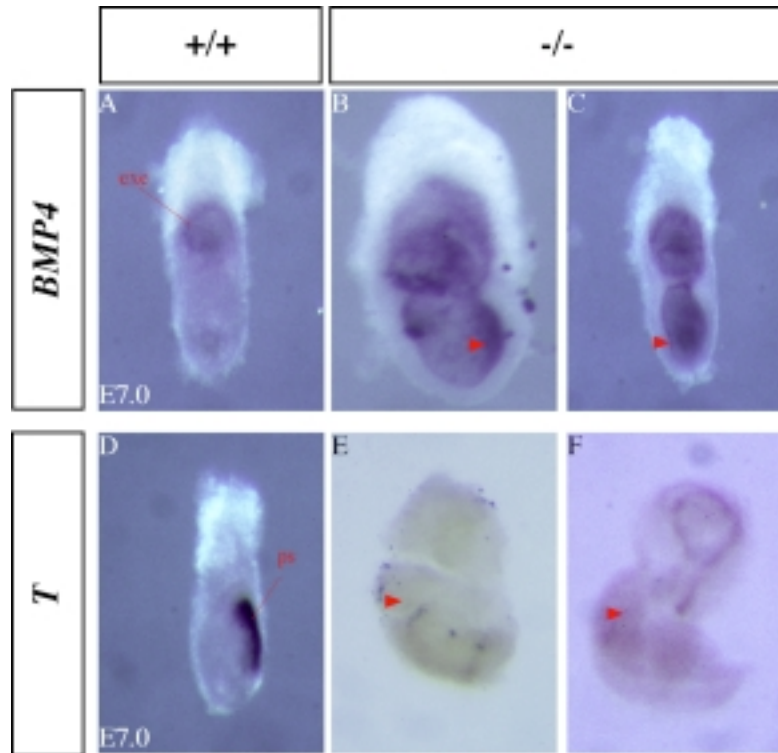
Der Phänotyp der *Irx1*-defizienten Embryonen ist an verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklungen variabel, sogar innerhalb eines Wurfes. In einigen Fällen äußert sich der Phänotyp derart, daß später in der Entwicklung nur leere Deziduen vorliegen und in anderen Fällen traten leere Dottersäcke oder sehr kleine und vollständig unorganisierte oder tote Embryonen auf. Die meisten Mutanten stoppen in ihrer Entwicklung während der Gastrulation. Eine ähnliche Phänotypvarianz trat auch bei den *BMP4*- und *Smad2*-defizienten Embryonen auf (Winnier et al., 1995; Nomura und Li, 1998).

### *EXPRESSION GASTRULATIONSSPEZIFISCHER MARKER IN DER Irx1-MUTANTE*

Neben den morphologischen Veränderungen sind auch noch eine Reihe von genetischen Veränderungen zu beobachten. So sind die gastrulationsspezifischen Gene *BMP4*, *Brachyury (T)*, *Otx2* und auch *Gbx2* während der Gastrulation fehlexprimiert.

*BMP4* ist normalerweise mit Beginn der Gastrulation im extraembryonalen Ektoderm exprimiert (Winnier et al., 1995). Es stellt somit einen Marker für den extraembryonalen Bereich dar. Diese Expression verschiebt sich in der *Irx1*-Mutante nach distal und so ist *BMP4* nicht nur im extraembryonalen Bereich, sondern auch im embryonalen Bereich exprimiert.

Eine weitere Genexpression, die in der *Irx1* Mutante verändert ist, ist die von *T*. Dieses ist im Wildtyp-Zustand in den frisch aus dem Primitivstreifen auswandernden Mesodermzellen aktiv und stellt ist ein Marker für die embryonalen Zellen des Mesoderms und auch indirekt für den Primitivstreifen (Herrmann et al., 1990; Wilson et al., 1995). *T* ist in den *Irx1*-defizienten Embryonen nicht exprimiert.



**Abb. II.38:** *BMP4* und *T* sind in der *Irx1* Mutante fehlexprimiert.

Die Abbildung zeigt *in-situ*-Hybridisierungen (*whole mount*) mit *BMP4*- und *Brachyury* (*T*)-RNA-Sonden auf Wildtyp- und *Irx1*-defiziente Embryonen. Die Embryonen entstammen jeweils (je Sonde) einem Wurf des Alters E7,0.

*BMP4* ist Wildtyp Fall im extraembryonalen Ektoderm mit der distalen Grenze zum Epiblasten exprimiert (A). Diese Expression verschiebt sich in der *Irx1*-Mutante nach distal und *BMP4* ist ebenfalls in den Derivaten des Epiblasten exprimiert. (Diese Analyse wurde mit einem NMRI-Auszuchtstamm gemacht.)

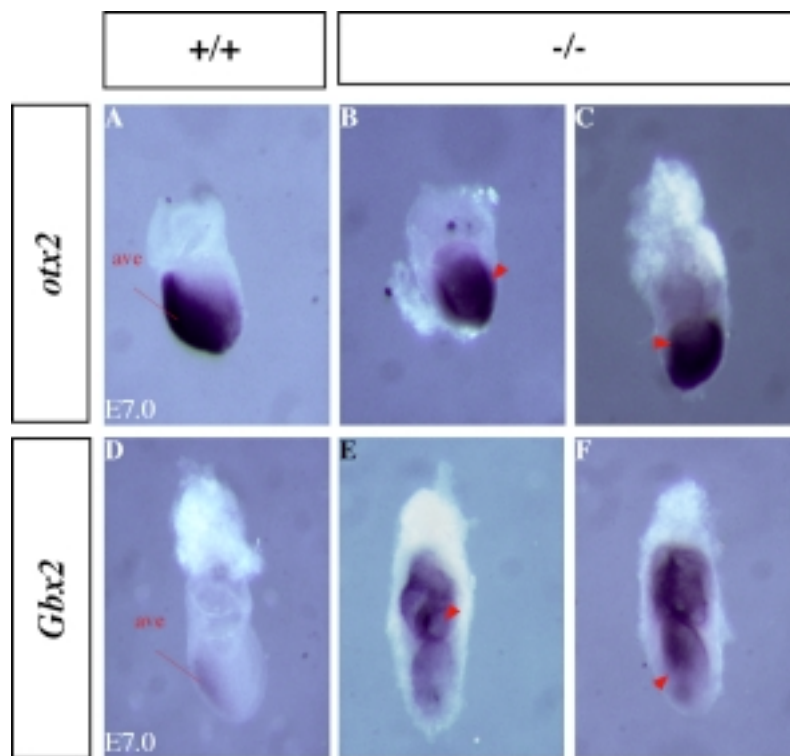
*Brachyury* (*T*) ist normalerweise in den frisch gebildeten Mesodermzellen entlang des Primitivstreifens exprimiert (D). In Embryos, die defizient für *Irx1* sind, ist die *T*-Expression verschwunden (E + F).

Abkürzungen: exe: extraembryonales Ektoderm; ps: Primitivstreifen

Neben *BMP4* und *T* sind auch *Otx2* und *Gbx2* durch den Wegfall von *Irx1* betroffen. Die Expression von *Otx2* ist ein guter Marker für das anteriore viszerale Endoderm (AVE) (Acampora et al., 1995). Dies markiert die zukünftige Kopffregion. Normalerweise ist *Otx2* zunächst in einem breiten Muster exprimiert, um sich dann in der Region des AVE zu konzentrieren. Diese Veränderung der *Otx2*-Expression ist in den *Irx1*-defizienten Embryonen gestört

und nicht zu beobachten. Dort ist *Otx2* stets im gesamten embryonalen Bereich exprimiert.

Als ein weiterer Marker für die zukünftige Kopfanlage dient *Gbx2* (Wassarman et al., 1997). Auch dieses Gen ist in der AVE exprimiert, aber schwächer und auf die AVE konzentriert. In Embryonen, die defizient für *Irx1* sind, weist die *Gbx2*-Aktivität Veränderungen auf. So ist sie in den Mutanten nicht konzentriert, sondern breit im gesamten Embryo und damit auch im extraembryonalen Bereich exprimiert.



**Abb. II.39:** *Otx2* und *Gbx2* sind in der *Irx1*-Mutante fehlexprimiert.

Die Abbildung zeigt *whole-mount-in-situ*-Hybridisierungen mit *Otx2*- (A - C) und *Gbx2*- (D - F) RNA-Sonden auf Wildtyp- und *Irx1*-defizienten Embryonen. Die Embryonen entstammen jeweils (je Sonde) einem Wurf des Alters E7,0. (Diese Analysen wurde mit einem NMRI-Auszuchtstamm gemacht.)

*Otx2* (A - C) ist im normalen Embryo im embryonalen Ektoderm exprimiert. Dabei zeigt *Otx2* zunächst (E6,5) eine sehr breite Expression, um sich dann im Bereich der späteren AVE zu konzentrieren. Diese beginnende Konzentrierung ist gut zu beobachten (A). In den *Irx1*-defizienten Embryos findet keine *Otx2*-Konzentrierung in der AVE-Region statt, sondern *Otx2* bleibt im gesamten embryonalen Bereich exprimiert.

*Gbx2* (*D - F*) markiert im Wildtyp-Fall, ähnlich wie *Otx2*, die Region der zukünftigen AVE-Region. Dabei zeigt *Gbx2* im Stadium E7,0 schon sehr deutlich den AVE-Streifen an (*D*). In den *Irx1*-mutanten Embryonen ist *Gbx2* im gesamten embryonalen Bereich exprimiert und nicht auf die AVE beschränkt (*E + F*).

Abkürzungen: ave: Region des anterior viszeralem Endoderm

# III. DISKUSSION

**M**olekulargenetische Untersuchungen in anderen Organismen zeigten, daß Vormustergene eine Rolle in der embryonalen Musterbildung spielen. Die Klärung der Funktion des *Irx1*-Gens als Vertreter der *Iroquois*-Genfamilie steht im Mittelpunkt der hier beschriebenen Studie.

## ***DIE STRUKTUR DES IRX1-GENS***

**D**ie Analyse ergab eine Lokalisation des *Irx1*-Gens auf dem Maus-Chromosom 13. Es liegt mit *Irx2* und *Irx4* in einer tandemartigen Organisation vor, wobei die Abstände der einzelnen *Irx*-Gene mit 200 - 400 kb äußerst gering sind. Diese Tandemanordnung trifft ebenfalls bei *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* zu (Peters et al., 2000). Die Analyse der humanen Homologen *Irx1*, *Irx2* und *Irx4* bewies die evolutive Konservierung der genomischen Organisation. Sie sind ebenfalls auf einem Abschnitt des Chromosoms 5 lokalisiert. Es gibt also neben der spezifischen Regulation der einzelnen Gene wahrscheinlich auch regulative Prozesse, die die gesamte tandemartige Organisation betreffen und somit jeweils alle drei Gene zusammen an- oder abschalten.

Die Sequenzanalyse des *Irx1*-Gens ergab eine theoretische Proteinsequenz von 461 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Dieses Protein weist als wesentliche Strukturen eine Homeodomäne mit Helix-Schleife-Helix-Motiv und eine *Iro*-Domäne auf. Innerhalb der Homeodomäne zeigen alle Mausmitglieder der *Iroquois*-Homeobox-Genfamilie eine hohe evolutive Konservierung mit einer Aminosäurenidentität von 90 - 100%. Die Homeodomäne der *Iroquois*-Gene zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß sie an der Aminosäureposition 50 der Erkennungshelix ein Alanin haben. Da

dieses in keiner anderen bekannten Homeodomäne auftritt, deutet es auf eine besondere Bindungsfunktion hin. Die Aktivität als Transkriptionsfaktor wird durch saure Regionen, die sich auf der carboxyterminalen Seite des Proteins befinden, möglicherweise unterstützt.

*Irx1* weist als ein weiteres spezifisches Motiv eine *Iro*-Domäne (Burglin, 1997) auf. Sie ist spezifisch für alle *Iroquois*-Proteine und zeichnet sich durch eine hohe evolutive Konservierung innerhalb der Genfamilie aus. Die *Iro*-Domäne dient der Protein-Protein-Interaktion, denn an sie bindet ein neu entdecktes Protein.

Als dritte interessante Region weist das *Irx1*-Protein eine *MAP-Kinase*-Erkennungstelle auf. Über sie kann die Aktivität des *Irx1*-Transkriptionsfaktors reguliert werden (Gómez-Skarmeta et al., 1996).

### ***DIE EXPRESSION DES IRX1-GENS***

*Irx1* ist in einem spezifischen zeitlichen und räumlichen Muster während der embryonalen Entwicklung der Maus exprimiert. Die Aktivität startet im Stadium E6,5 kurz vor Einsetzen der Gastrulation und sie wird während der gesamten embryonalen Entwicklung aufrechterhalten. Die Genaktivität beginnt im Stadium E6,5 zunächst im extraembryonalen Bereich und ist einen Tag später (E7,5) im lateralen Mesoderm und im Primitivknoten nachweisbar. Die anteriore Expression ist im Zentralnervensystem deutlich ab E8,0 zu sehen.

Von diesem Stadium an ist *Irx1* zusätzlich in den Mes- und auch Metenzephalonanlagen exprimiert. Es zeichnet sich durch eine sehr klare Grenzbildung zum expressionsfreien Telenzephalon und der ebenso expressionsfreien Mes- und Metenzephalon-Grenze aus. Weiterhin zeigt *Irx1* Genaktivität im Rhombenzephalon und im ventralen Neuralrohr. Diese Aktivität ist spezifisch für *Irx1* und grenzt sie von den anderen Mitgliedern der murinen *Irx*-Familie ab. Die Expression ist nicht auf zentralnervöse Bereiche beschränkt, sondern zeigt sich auch während der Lungen- und Extremitätenentwicklung. Die Genaktivität von *Irx1* in diesen Organen beschränkt sich zeitlich auf einen Abschnitt der jeweiligen Entwicklung. *Irx1*-Expression markiert zum Beispiel die prospektiven Finger noch bevor sie morphologisch sichtbar werden.



**UMFANGREICHE ZELLBEWEGUNGEN CHARAKTERISIEREN DIE MAUSGASTRULATION**

Die erste Polarität ist in der Zygote anhand der Position der Polarkörper erkennbar und unterteilt sie in einen animalen und einen vegetativen Pol (Gardner, 1997). Drei Tage nach der Befruchtung liegt eine Blastozyste vor, in welcher sich zwei Gewebe abzeichnen: zum einen das Trophoektoderm und zum anderen die Innere Zellmasse (IZM).

Bisher ging man davon aus, daß die extraembryonalen Gewebe lediglich zum Schutz und der Versorgung des Embryos dienen (Gardner, 1998). Neuere Untersuchungen zeigen, daß der extraembryonale Bereich auch für die Orientierung und die Musterbildung des embryonalen Bereichs wichtig ist (Beddington und Robertson, 1999; Pedersen, 2001). Die Polarität des präimplantierten Embryos läßt Vorhersagen über die Organisation des extraembryonalen Gewebes zu (Weber et al., 1999). Interessanterweise konnte in neuesten Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der Spermiumeintrittsstelle und der extraembryonal-embryonalen Grenze gezeigt werden (Piotrowska und Zernicka-Goetz, 2001).

Die zukünftige Körperachse ist erstmals nach sechseinhalb Tagen der embryonalen Entwicklung morphologisch sichtbar, wenn mit der Bildung des Primitivstreifens die Gastrulation einsetzt (Wolpert et al., 1999). Die homogen erscheinenden Epiblastenzellen durchlaufen eine epitheliale-mesenchymale Veränderung und breiten sich lateral und anterior zwischen Ektoderm und viszeralem Endoderm aus und bilden das Mesoderm (Hogan et al., 1994; Tam und Behringer, 1997). Somit manifestiert sich mit der Bildung des Primitivstreifens die anterior-posteriore- (A - P) und zugleich die dorso-ventrale- (D - V) Achse. Indirekt wird auch die links-rechts-Achse bestimmt, da diese von den beiden anderen Achsen abhängig ist (Beddington und Robertson, 1999).

Die Morphogenese und Musterbildung des Vertebratenembryos ist abhängig von der korrekten Interaktion zwischen benachbarten Geweben. Im prägastrulären Mausembryo liegt der Epiblast in einer Hülle aus viszeralem Endoderm, von dem eine Reihe von regulatorischen Funktionen im

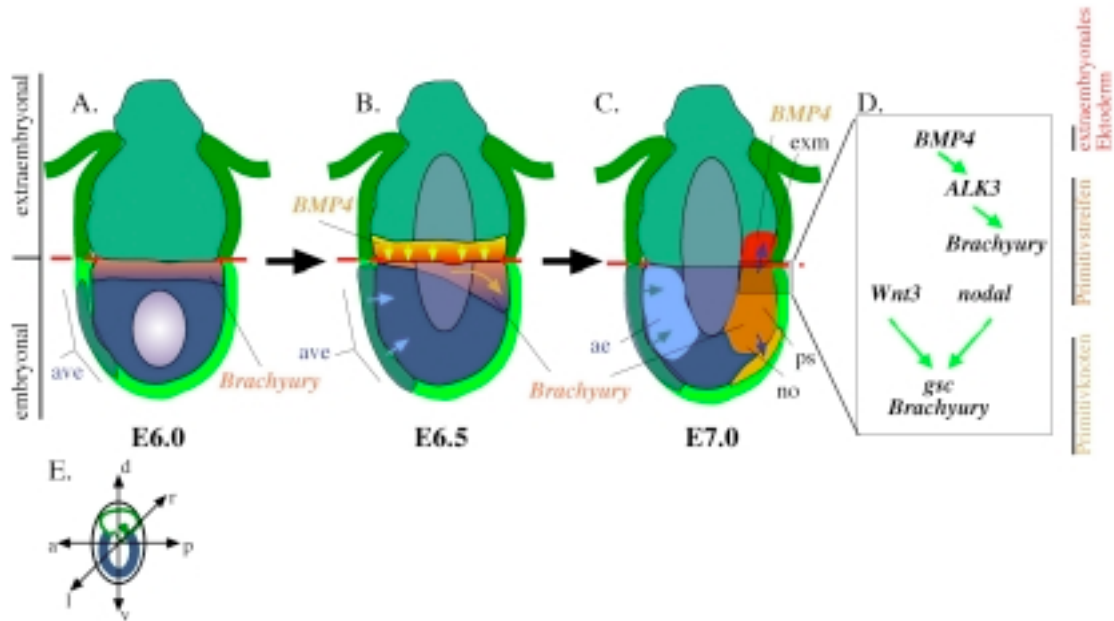
---

postimplantierten Embryo ausgehen (Rossant, 1995). So sind beispielsweise Signale aus dem viszeralem Endoderm für die Bildung der embryonalen Höhlen, das Wachstum und das Überleben des Ektoderms essentiell (Belaousoff et al., 1998; Coucouvanis und Martin, 1999; Rossant, 1995). Die Musterbildung des anterioren Epiblasten wird initiiert durch eine differentielle Genexpression im darüberliegenden viszeralem Endoderm (Beddington und Robertson, 1999; Viebahn, 1999). In der Maus kann das anteriore viszerale Endoderm (AVE) lediglich mittels molekularer Marker charakterisiert werden, da es morphologisch nicht erkennbar ist (Beddington und Robertson, 1999). Differentielle Genexpression verschiedener Gene, wie das *VE-1 Antigen* (Rosenquist und Martin, 1995), *Otx2* (Acampora et al., 1995; Ang und Rossant, 1994), *Hesx1* (Thomas und Beddington, 1996), *Lim1* (Belo et al., 1997), *gooseoid* (Belo et al., 1997), *Hex* (Thomas et al., 1997; Thomas et al., 1998), *Gbx2* (Wassarman et al., 1997) und *cereberus-related* (Belo et al., 1997; Thomas et al., 1997) ist im AVE nachweisbar und zwar noch bevor ein Primitivstreifen gebildet ist (Beddington und Robertson, 1999).

Die Musterbildung des posterioren Epiblasten ist noch nicht geklärt. Zu Beginn der Gastrulation, wenn der Körperbau des eigentlichen Embryos etabliert wird (Tam und Behringer, 1997), sind Gene wie *Brachyury (T)* (Hermann, 1991; Kispert und Hermann, 1994), *Nodal* (Conlon et al., 1994), *Wnt3* (Liu et al., 1999) und *eomesodermin* (Russ et al., 2000) im posterioren Ektoderm exprimiert und markieren noch vor der Primitivstreifenbildung das zukünftige Mesoderm (Dyer et al., 2001). Das Protein *BMP4*, welches zunächst durch extraembryonales Ektoderm sekretiert wird (Coucouvanis und Martin, 1999; Waldrip et al., 1998) und später in der Allantois und dem extraembryonalen Mesoderm am posterioren Teil des Primitivstreifens aktiv ist (Lawson et al., 1999; Winnier et al., 1995), scheint eine wesentliche, allerdings nicht essentielle Rolle in der Induktion des Mesoderms und der Formierung der hämatopoetischen und vaskulären Zellen zu haben (Lawson et al., 1999; Winnier et al., 1995).

*Brachyury (T)* stellt einen der ersten Marker für den Primitivstreifen dar und ist anfangs im proximalen Epiblasten direkt anstoßend an das extraembryonale

Ektoderm ringförmig exprimiert. Durch Zellbewegungen im proximalen Eizylinder verschiebt sich die Expression an den Ort der Gastrulationsinitiation (Thomas und Beddington, 1996; Hermann, 1991; Kispert und Hermann, 1994).



**Abb. III.1:** Schematische Darstellung der zellulären Bewegungen während der Gastrulation.

Das anteriore viszerale Endoderm (ave) induziert im darunter liegenden anterioren Ektoderm die anteriore Entwicklung (A-C; blaue Pfeile und induziertes blaues anteriores Ektoderm).

Die genetische Grundlage des mesoderm-induzierenden posterioren viszeralen Endoderms (PVE) ist noch nicht geklärt (Beddington und Robertson, 1999). Bei E6.0 beginnt die Brachyury (T)-Expression am proximalen Teil des Epiblasten, angrenzend an den extraembryonalen Bereich. BMP4 ist ab dem Stadium E6.3 im extraembryonalen Ektoderm, mit der distalen Grenze zum embryonalen Teil exprimiert. Dabei interagiert BMP4 sowohl mit dem AVE (nicht gezeigt) als auch mit dem PVE. Im Stadium E6.5 wandern die T-exprimierenden Zellen nach caudal (brauner Pfeil in B.) und der Primitivstreifen wird genau gegenüber des AVE gebildet. Im Stadium E7.0 wird extramembranales Mesoderm, welches BMP4 exprimiert, im posterioren Teil des Primitivstreifens gebildet (rotes Feld in C.). Der Primitivstreifen verlängert sich und es entsteht embryonales Mesoderm, welches T exprimiert (dunkelorange Feld in C.). Ferner entsteht der Primitivknoten am anterioren Ende des Primitivstreifens. Von dort aus wird das axiale Mesendoderm (orange Feld in C.) gebildet.

Die Abbildung D zeigt, daß die BMP4-Aktivität, kommend aus dem extraembryonalen Ektoderm, in der PVE-Region die Expression des BMP-Rezeptors ALK3 reguliert und dieser wiederum den Primitivstreifenmarker T. Wnt3 und Nodal kontrollieren im

Primitivstreifen die Expression der wesentlichen Gene des Primitivknotens, wie *gsc* und *T*.

In der Abbildung E sind die verschiedenen embryonalen Achsen dargestellt.

Abkürzungen: a: anterior; ae: anteriores Ektoderm; ALK3: *Bmpr1*-Genexpression; ave: anteriores viszerales Endoderm; *BMP4*: *BMP4*-Genexpression; d: dorsal; exm: extraembryonales Mesoderm; *gsc*: Goosecoid-Genexpression; l: links; no: Primitivknoten; nodal: Nodal-Genexpression; p: posterior; ps: Primitivstreifen(mit Mesodermbildung); pve: posteriores viszerales Endoderm; r: rechts; *T*: Brachyury-Genexpression; *Wnt3*: *Wnt3*-Genexpression; v: ventral

## ***DIE FUNKTION VON IRX1 WÄHREND DER MAUSGASTRULATION***

### *IRX1-AKTIVITÄT IM POSTERIOREN BEREICH DES EMBRYOS*

*Irx1* ist im embryonalen Stadium E6,5 im extraembryonalen Ektoderm exprimiert und zwar in einem breiten Streifen angrenzend an den Übergang von extraembryonalem zu embryonalem Gewebe. Dieser Expressionsbereich überlappt sowohl zeitlich als auch räumlich mit der *BMP4*-Expression. *BMP4* ist zu diesem Zeitpunkt ebenfalls dort in einem schmalen Band exprimiert und definiert dieselbe Grenze zum embryonalen Bereich hin (Waldrup et al., 1998). Die *BMP4*-defizienten Embryonen stoppen ihre Entwicklung im Eizylinderstadium und es entsteht keine Expression des Primitivstreifenmarkers *Brachyury (T)* (Winnier et al., 1995).

In den *Irx1*-defizienten Embryonen ist die *BMP4*-Expressionen ganz wesentlich verändert. So ist in den Mutanten die Expressionsdomäne breiter als im Wildtyp, d.h. die *BMP4*-Expression stoppt nicht an der Grenze zum embryonalen Teil, sondern erstreckt sich weiter distal. Daraus läßt sich auf eine Interaktion zwischen *Irx1* und *BMP4* schließen, genauer gesagt, auf eine reprimierende Wirkung des *Irx1*-Proteins auf die *BMP4*-Expression. Fällt der *Irx1*-Repressor weg, so erstreckt sich infolgedessen die Expressionsdomäne von *BMP4* auf einen größeren Bereich. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, daß *Xiro1* (*X. laevis*-Homolog zu *Irx1*) die *Bmp4*-Expression reprimiert. Ferner zeigt es sich, daß *Bmp4* reziprok *Xiro1* reprimiert (Gómez-Skarmeta et al., 2001). Dieses deutet auf eine konservierte Regulation von *Irx1* mit *BMP4* hin. In der

Maus markiert diese Regulation die Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Bereich.

In den *Irx1*-defizienten Embryonen sind neben dem veränderten *BMP4*-Expressionsmuster auch Fehlbildungen des extraembryonalen und ebenso auch des embryonalen Bereich zu beobachten. So sind die extraembryonalen Höhlen mit histologisch mesodermal erscheinenden Zellen angefüllt. Dieses deutet auf eine übermäßige Bildung an möglicherweise extraembryonalem Mesoderm hin, welches in extraembryonalen Höhlen akkumuliert. Im Wildtyp Fall scheint demnach *Irx1* die Anzahl der Zellen zu begrenzen, die aus dem Epiblasten durch den Primitivstreifen wandern um extraembryonales Mesoderm zu bilden.

Ein weiterer Hinweis für die Interaktion von *Irx1* mit dem *BMP4*-Signalweg ist in den Mausmutanten von *Smad2* zu beobachten (Waldrip et al., 1998). Sie bilden vermehrt extraembryonales Mesoderm, das, aber im Gegensatz zu den *Irx1*-defizienten Mäusen, in der Amnionhöhle akkumuliert (Waldrip et al., 1998; Sirard et al., 1998; Nomura und Li, 1998). Andere Mitglieder des *BMP*-Signalweges zeigen andere Veränderungen in der Mesodermproduktion. So ist in den defizienten Embryonen von *BMP4* (Winnier et al., 1995), *ALK2* (Gu et al., 1999), *ALK3* (Mishina et al., 1995), *Smad4* (Sirard et al., 1998) und *Tlx-2* (Tang et al., 1998) eine Mesodermreduktion zu beobachten. In *BMP*-Rezeptor (*BMP1*; *ALK3*)-defizienten Mäusen wird der Eizylinder gebildet, aber ohne jegliches Mesoderm (Mishina et al., 1995; Beppu et al., 2000).

Ein Aspekt des Phänotyps von *Irx1*-defizienten Mäusen ist im embryonalen Teil zu beobachten. In den *Irx1*-defizienten Embryonen ist keine *Brachyury* (*T*) Expression vorhanden. Im Wildtyp ist *T* ab E6,0 in einem schmalen Band im embryonalen Bereich mit der proximalsten Expression an der Grenze zum extraembryonalen Bereich hin aktiv (Thomas und Beddington, 1996).

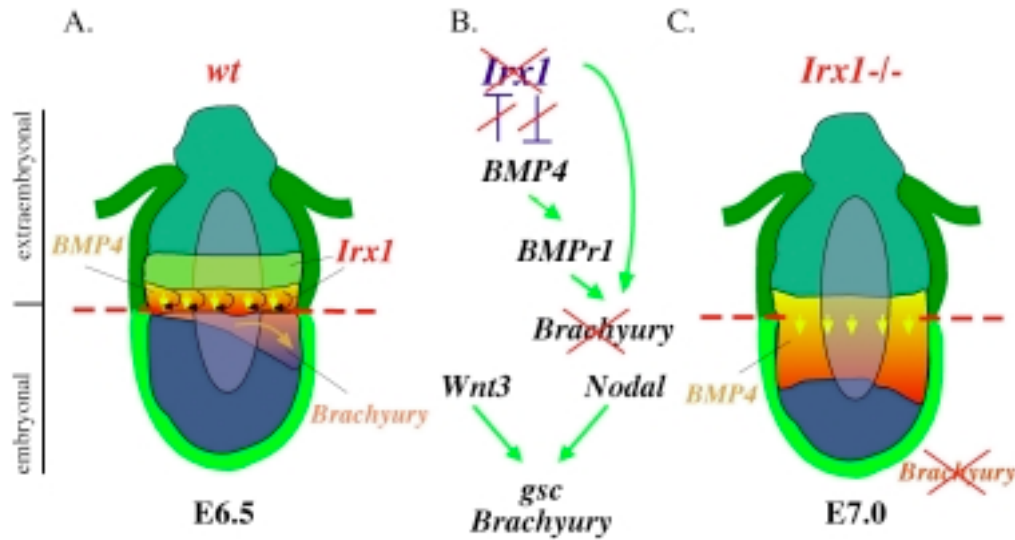
Das Fehlen der *T*-Expression weist auf eine direkte Regulation zwischen *Irx1* und *T* hin. Die *T*-Aktivität dient im allgemeinen als Marker für das frisch gebildete embryonale Mesoderm des Primitivstreifens und somit markiert es auch indirekt den Primitivstreifen selbst (Wilson et al., 1995; Hermann, 1991; Kispert und Hermann, 1994). Die fehlende *T*-Expression in den *Irx1*-defizienten Embryonen ist überraschend, da, bestimmt anhand histologischer Kennzeichen,

embryonales Mesoderm gebildet wird. Demnach muß über die Verwendung von *T* als allgemeiner Marker für neu gebildetes embryonales Mesoderm nachgedacht werden. Es scheint, daß *T* nur eine Subpopulation von Mesodermzellen markiert. Das Fehlen von *T*, welches für den korrekten Ablauf von Zellbewegungen im Epiblasten verantwortlich ist (Wilson et al., 1995), kann bedeuten, daß die Rekrutierung von prospektiven Mesodermzellen gestört ist.

Denkbar ist, daß *Irx1* zusammen mit *BMP4* für der Bildung der Grenze zwischen embryonalem und extraembryonalem Bereich essentiell ist. Durch die Bildung dieser Grenze wird die Expression von *T* reguliert und im weiteren Verlauf werden diese *T*-exprimierenden Zellen zum posterioren Teil gelenkt, wo sie den Bereich des beginnenden Primitivstreifens definieren. Da in der *Irx1*-Mutante diese Grenzbildung, durch die fehlende *Irx1*-*BMP4* Interaktion nicht mehr gewährleistet ist, findet keine *T*-Expression statt.

Es ist bekannt, daß das Entwicklungsschicksal des gebildeten Mesoderms abhängig ist, vom Ort des Einwanderns der Epiblastenzellen durch den Primitivstreifen (Beddington und Robertson, 1999). Am Zeitpunkt und Ort der Primitivstreifeninitiation entsteht extraembryonales Mesoderm (Belaousoff et al., 1998). Der verlängerte Primitivstreifen bildet embryonales Mesoderm (Belaousoff et al., 1998; Beddington und Robertson, 1999). Da in den *Irx1*-defizienten Embryonen eine alleinige Überproduktion an mesodermal erscheinenden Zellen in den extraembryonalen Höhlen zu beobachten ist, muß es eine Trennung zwischen der Bildung des extraembryonalem und embryonalem Mesoderms geben.

Damit wird die Beobachtung gestützt, daß das posteriore viszerale Endoderm ohne Primitivstreifen eine mesoderm-induzierende Eigenschaft besitzt und somit der isolierte Epiblast des Vor-Primitivstreifensstadiums sich in extraembryonal-mesodermale Strukturen differenzieren kann (Belaousoff et al., 1998).



**Abb. III.2:** Veränderte posteriore Genexpression in den *Irx1*-defizienten Embryonen

Die Abbildung zeigt die *Irx1*-Expression im Verhältnis zu *BMP4* und *Brachyury* (T) im Wildtyp (A) und im mutierten Embryo (C). In *Irx1*-defizienten Embryos ist die *BMP4*-Expression nach distal ausgeweitet und hält nicht die Grenze zwischen embryonal und extraembryonal ein (C). Ferner ist der Primitivstreifenmarker T nicht exprimiert (C). Dies deutet auf eine gegenseitige Repression von *Irx1* und *BMP4* hin und auf eine Aktivierung von *Irx1* auf T im posterioren Bereich des Embryos (A; schwarze Pfeile: *Irx1*, gelbe Pfeile: *BMP4*).

Abkürzungen: ALK3: *Bmpr1*-Genexpression; T: *Brachyury*-Genexpression

### IRX1-AKTIVITÄT IM ANTERIOREN BEREICH DES EMBRYOS

Interessanterweise ist in den *Irx1*-defizienten Embryonen auch eine Fehlexpression von *Otx2* im Bereich des anterioren viszeralen Endoderms zu beobachten, denn es findet keine Konzentration der Transkripte in der AVE-Region statt. *Otx2* ist im Wildtyp-Fall einer der wesentlichen Marker dieser Region. Die Funktion von *Otx2* wurde anhand von *Otx2*-defizienten Embryonen gezeigt. Sie führen zwar im Eizylinderstadium eine normale posteriore Rotation durch, das viszerale Endoderm aber verbleibt distal. Dies führt dazu, daß diese Embryonen weder Mittel- noch Vorderhirn entwickeln (Matsuo et al., 1995; Ang et al., 1996; Acampora et al., 1995). Die Bedeutung der extraembryonalen Interaktion mit dem AVE konnte mittels *Otx2*-defizienter Chimären gezeigt werden. In Blastozysten injizierte ES-Zellen bilden vorrangig den Epiblasten und seine Abkömmlinge. Auf diese Weise lassen sich Chimären herstellen, bei

denen das extraembryonale Gewebe einen Genotyp hat und der Epiblast einen anderen (Beddington und Robertson, 1998). Injiziert man Wildtyp ES-Zellen in *Otx2*-defiziente Morulae, findet keinerlei anteriore Entwicklung statt. Injiziert man andererseits *Otx2*-defiziente ES-Zellen in eine Wildtyp-Morula, so findet eine normale anteriore Entwicklung statt (Rhinn et al., 1998).

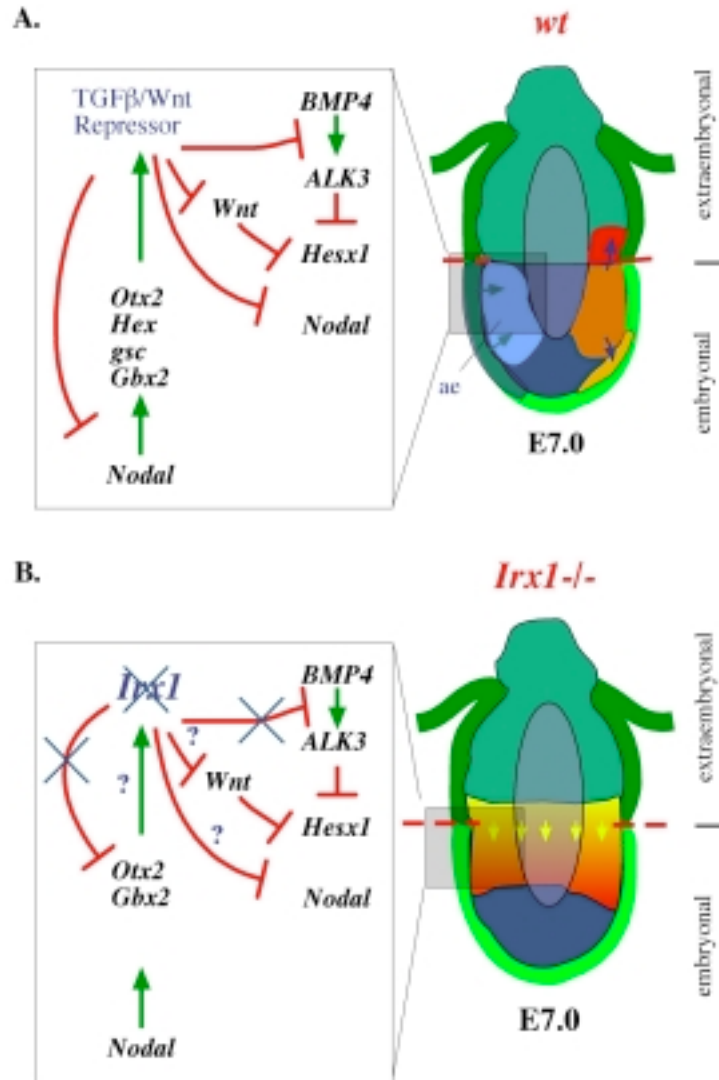
In *Irx1*-defizienten Mäusen ist neben der *Otx2*- auch die *Gbx2*-Expression (Wassarman et al., 1997) verändert und zwar ebenfalls wesentlich breiter als im Wildtyp-Fall. Ihre Genaktivitäten konzentrieren sich nicht auf das AVE. Beide Gene bleiben über den gesamten Epiblasten exprimiert. Daraus läßt sich schließen, daß *Irx1* normalerweise beide Gene in ihrer Expression reprimiert. Das Fehlen der *Irx1*-Regulation führt dazu, daß die genetische Definierung des AVE durch *Otx2* und *Gbx2* gestört ist.

Ähnlich wie für den posterioren Bereich läßt sich aus den Beobachtungen eine Interaktion zwischen dem gastrulären Embryo und den *Irx1*-exprimierenden extraembryonalen Zellen schließen.

Die *BMP4*-Genaktivität im anterioren Bereich ist für die Aktivierung des *BMP*-Repressors *ALK3* (*BMP<sub>r</sub>1*) und indirekt von *Hesx1* verantwortlich (Beddington und Robertson, 1999). In den *Irx1*-defizienten Embryonen ist auch die anteriore *BMP4*-Expression betroffen, denn sie ist, wie oben beschrieben, nach distal verschoben.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich nicht nur für den posterioren, sondern auch für den anterior viszeralen Endodermbereich eine Interaktion mit dem extraembryonalen Bereich schließen, denn auch hier hat das Fehlen des *Irx1*-Gens einen wesentlichen Einfluß auf das weitere Entwicklungsschicksal.





**Abb. III.3:** Postuliertes anteriores Regulationsschema sowie eine Darstellung der veränderten Genexpression in *Irx1*-defizienten Embryonen

Es gibt erste Ideen zur genetischen Regulation des anterioren Bereiches (Beddington und Robertson, 1999). Ähnlich wie im posterioren Teil des Embryos erfolgt auch hier eine Induktion mittels des *BMP4*-exprimierenden extraembryonalen Ektoderms auf die embryonalen Bereiche. So reguliert *BMP4* in der AVE-Region die Expression des *BMP4*-Rezeptors (*ALK3*) und dieser wiederum den AVE-Marker *Hesx1* (A). Ferner postuliert R. Beddington die Existenz eines TGFβ/Wnt-Repressors (A). Dieser Repressor könnte *Irx1* sein, denn bei Wegfall von *Irx1* beobachtet man eine Verbreiterung der *BMP4*-Expressionsdomäne (B). Ist ein postulierter *Otx2*/*Gbx2*-Repressor inaktiv, so werden beide Gene nicht mehr reprimiert und konzentriert sich auch nicht auf den AVE-Bereich. Exakt das ist in der *Irx1*-Mutante zu beobachten (B).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß *Irx1* ein Vormustergen darstellt, das eine ganz essentielle Funktion während der Gastrulation hat. *Irx1* ist wesentlich

an der Regulation der extraembryonalen Mesodermbildung beteiligt und der beobachtete Phänotyp unterstützt die postulierte regulative Bedeutung des extraembryonalen Bereiches für die Entwicklung des Mausembryos. Erst durch die Interaktion von *Irx1* und *BMP4* ist eine korrekte Grenzbildung zwischen extraembryonal und embryonal möglich. Das ist entscheidend für die Umsetzung der späteren anterior-posterioren Achse. *Irx1* spielt sowohl in der Regionalisierung des AVE-Bereiches wie auch der posterioren Primitivstreifenregion eine wesentliche Rolle.

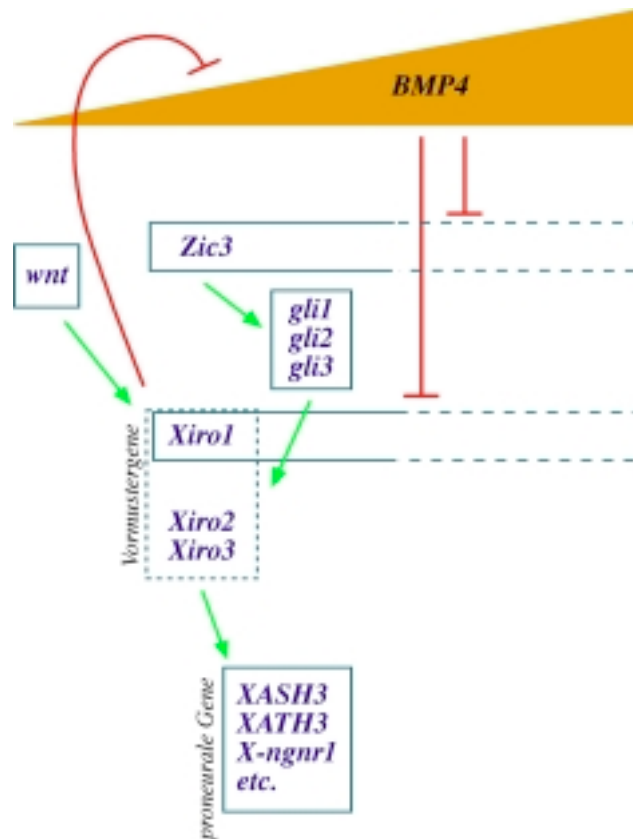
Nach der Diskussion der *Irx1*-Funktion in der Gastrulation des Mausembryos, soll nun eine mögliche Funktion in der späteren Embryonalentwicklung betrachtet werden. Grundlage dazu bilden die Funktionsanalysen der *X. laevis Iroquois*-Homologe.

### ***DIE FUNKTION DER XIRO-GENE WÄHREND DER ORGANOGENESE***

**D**ie mögliche Funktion der *Irx* homologen Gene - *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3* - während der Neuralleistendifferenzierung in *Xenopus laevis* (Mayor et al., 1999), soll als Grundlage für eine mögliche genetische Funktionsdiskussion in der Maus dienen.

Die Determinierung der Neuralleistenzellen erfolgt in *X. laevis* während der Gastrulation. Bis zur Mitte der Gastrulation ist *BMP4* im gesamten Ektoderm exprimiert (Schmid et al., 1995), wo es, vermutlich durch *Smad1* vermittelt, die Expression an Neuralplattengen in inhibiert (Wilson et al., 1997). Auch *Smad1* ist im gesamten Ektoderm exprimiert und *BMP*-Proteine kontrollieren dessen Aktivität. Während der Gastrulation werden Neuralinduzierer, wie *chordin*, *folliculin* und *noggin* im dorsalen Mesoderm aktiviert und sie inhibieren *BMP4*. Aktives *BMP4* liegt in einem ventrodorsalen Gradienten vor (Hemmati-Brivanlou und Melton, 1997). Die höchste *BMP4*-Konzentration induziert die höchste *Smad1*-Aktivität (Suzuki et al., 1997). Dieser Gradient im dorsalen Mesoderm und der zukünftigen Neuralplatte wird durch den *Wnt*-Signalweg kontrolliert (Baker et al., 1999). Der *Wnt*-Signalweg schaltet *Xiro1* an, das seinerseits *BMP4* reprimiert (Gómez-Skarmeta et al., 2001). Im Bereich abnehmender *BMP4*-Konzentration im dorsalen Ektoderm werden einige

Neuralplattengene wie *Zic3* (Nakata et al., 1997) aktiviert. Die Aktivität von *Zic3* in der Neuralplatte schaltet einer Reihe von Proneuralgenen in dieser Region, indirekt an (Nakata et al., 1997). Dabei ist anzumerken, daß diese proneuralen Gene die *achaete-scute*-Homologen in der Maus darstellen. Die proneuralen Gene werden direkt durch die Vormustergene *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3* reguliert (Gómez-Skarmeta et al., 1998). Eine Aktivierung der *Xiro*-Gene erfolgt wiederum durch die *gli*-Gene, welche Homologe zu den *Gli*-Genen der Maus bzw. zu *cubitus interruptus* der Fliege darstellen (Gómez-Skarmeta et al., 1998).



**Abb. III.4:** Die genetische Regulation der Iroquois-Gene in *X. laevis* bei der Bildung der Neuralleistenzellen.

Die Abbildung zeigt die genetische Regulation der Iroquois-Gene, *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3*, während der Determinierung der Neuralleistenzellen. Dabei liegt eine vereinfachte Regulation von *Zic3*-*gli*-*Xiro*- auf die proneuralen Gene vor. Ferner wird eine Regulation von *Xiro1* durch den Wnt-Signalweg deutlich. Wnt-aktiviertes *Xiro1* reprimiert *BMP4*, was zu einer gradientenartigen Expression von *BMP4* führt. Hohe *BMP4*-Proteinkonzentrationen reprimieren wiederum die *Xiro1*-Aktivität.

Die genetischen Interaktionspartner der Genkaskade sind zwischen *X. laevis* und *Drosophila m.* in ihrer gegenseitigen Regulation konserviert (Mayor et al., 1999). Es stellt sich die Frage, ob diese Regulation auch während der Mausentwicklung erhalten geblieben ist. Zwei Gene dieser Kaskade, *Wnt3* und *BMP4* bewirken in der Interaktion z.B. die Ausbildung des AVE in der Gastrulation. Für dies Entwicklung wird von R. Beddington die Existenz eines *TGFβ*-Repressors (*BMP4*-Repressors) postuliert (Beddington und Robertson, 1999). *Irx1* könnte wie in *X. laevis* auch in der Maus regulativ zwischen *Wnt* und *BMP4* stehen.

In der weiteren embryonalen Entwicklung stellen die *Gli*- und *Mash*-Gene mögliche regulative Partner von *Irx1* dar.

### ***DIE FUNKTION VON IRX1 WÄHREND DER ORGANOGENESE DER MAUS***

**F**ür die Analyse der möglichen konservierten Regulationen von *Irx1* wurden zwei methodische Ansätze genutzt. Zum einen wurden die Mausmutanten von *Gli1* (Park et al., 2000) und *Gli2* (Mo et al., 1997) und zum anderen der *Mash1*-Promotor (Verma-Kurvari et al., 1998) auf eine Interaktion mit *Irx1* untersucht.

#### *IRX1-GLI-EXPRESSIONSVERGLEICH WÄHREND DER EXTREMITÄTENBILDUNG*

**I***rx1* zeichnet sich durch ein spezifisches Expressionsmuster während der Entwicklung der Finger aus. Die Genaktivität in den Extremitäten beginnt ab dem Stadium E11,5, noch bevor die Phalangenstruktur erkennbar ist. *Irx1* ist ein exzellenter Marker für die frühe Fingerentwicklung. Es ist zunächst im sich kondensierenden Mesenchym und später im sich entwickelnden Knorpel der Phalangen aktiv. Dabei zeichnet sich die Genaktivität stets durch eine scharfe Grenzbildung aus. *Irx2* ist ebenfalls während der Extremitätenentwicklung aktiv. Allerdings startet die Expression einen Tag später und dabei zunächst in den Phalangen I und V und nicht II bis IV, wie dies bei *Irx1* der Fall ist. Bei dem Vergleich der Genaktivitäten von *Irx1* und *Irx2* mit den Genen *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* während der Extremitätenentwicklung zeigten sich Übereinstimmungen. So zeigen *Irx1-Gli1* und *Irx2-Gli2* überlappende Expressionsdomänen. Dagegen

ist das Aktivitätsmuster von *Gli3* anders, und so erscheint eine mögliche Interaktion von *Irx1* und *Irx2* mit *Gli3* in diesem Organ unwahrscheinlich.

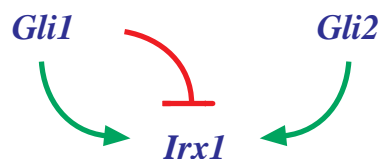
Eine Interaktion von *Irx1* mit *Gli1* und *Irx2* mit *Gli2* während der Entwicklung der Finger ist möglich.

#### *IRX1-EXPRESSION IN GLI-DEFIZIENTEN MÄUSEN*

In *Gli1*-defizienten Embryonen ist die *Irx1*-Expression verändert. *Irx1* ist im Telenzephalon und auch in der Mesenzephalon-Metenzephalon-Grenze exprimiert, wo es normalerweise nicht aktiv ist. Das deutet darauf hin, daß *Gli1* für die Begrenzung der *Irx1*-Aktivität von Bedeutung ist, also reprimierend auf *Irx1* wirkt. Im Neuralrohr der *Gli1*-defizienten Embryonen fehlt die *Irx1*-Expression im medialen Teil. Dies läßt sich als eine positiv aktivierende Regulation von *Irx1* durch *Gli1* deuten. In einigen Regionen stellt *Gli1* bezüglich *Irx1* einen Repressor und in anderen einen Aktivator dar.

Auch in den *Gli2*-defizienten Embryonen ist die *Irx1*-Expression verändert. In *Gli2*-mutanten Embryonen gibt es keine Neuralrohrexpression, wohingegen die Gehirnexpression im Mesenzephalon und Metenzephalon unverändert ist. Dies deutet auf eine aktivierende Funktion von *Gli2* auf *Irx1* im sich entwickelnden Neuralrohr hin.

Zusammenfassend läßt sich die Interaktion zwischen *Irx1* und den beiden *Gli*-Genen wie folgt darstellen: *Irx1* wird von *Gli1* sowohl aktiviert als auch reprimiert. Bei *Gli2* kann man von einer positiven Regulation sprechen.



**Abb. III.5:** Regulation von *Irx1* durch *Gli1* und *Gli2*

Aus den in-situ-Analysen läßt sich ein Regulation von *Irx1* durch *Gli1* und *Gli2* erkennen. So wird *Irx1* durch *Gli1* je nach Organ sowohl aktiviert wie auch reprimiert. Dagegen verhält sich *Gli2* als reiner Aktivator gegenüber *Irx1*.

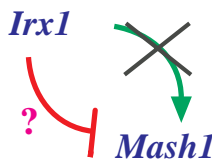
Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen aus *Drosophila m.* wie auch aus *X. laevis*. Die Regulationen zwischen *Irx1* und *Gli1* bzw. *Gli2* sind somit evolutiv konserviert.

#### ANALYSE DER POSTULIERTEN *IRX1-Mash1-INTERAKTION*

*Irx1* ist mit Beginn der Entwicklung der Intestinalanlage im Stadium E8,5 im Bereich des Vorderdarm exprimiert, exakt im Bereich der Lungeninduktion. Während der Bildung der Lungenknospen ist das *Irx1*-Transkript ausschließlich im Epithel, nicht aber in der mesenchymalen Schicht nachweisbar. Die epitheliale Expression bleibt bis zum Alveolarstadium erhalten.

Aufgrund dieser spezifischen Expression und der beschriebenen Funktion des humanen *achaete-scute*-Homologs, *hASH1* während der Lungenkrebsbildung, wurde eine Zellkulturanalyse verschiedener humaner Lungenkrebszelllinie durchgeführt. Die Analyse ergab, daß im Kleinzellkrebs ein verändertes *Irx1*-Expressionsmuster in der Northern-Blot-Analyse auftritt. So ist neben der Wildtyp-Transkriptbande eine weitere, nahezu doppelt so große zweite Bande vorhanden. Dies deutet auf eine Veränderung in der Transkription des des *Irx1*-Gens hin, was mit der Krebsentstehung in Zusammenhang stehen kann.

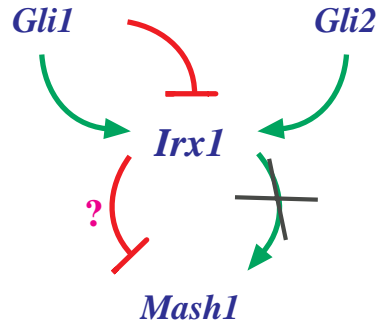
Das murine *achaete-scute*-Homolog *Mash1* und *Irx1* zeigen im weiteren im ZNS überlappende Expressionsbereiche. Die *in vitro*-Analyse des 5'-Enhancer-Elements des *Mash1*-Promotors (Verma-Kurvari et al., 1998) ergab, daß *Irx1* nicht den *Mash1*-Promotor aktiviert. Dies kann bedeuten, daß *Irx1* *Mash1* nicht positiv reguliert, wie es von *Drosophila m.* her zu erwarten gewesen wäre.



**Abb. III.6:** *Irx1-Mash1*-Interaktion

*Irx1* aktiviert nicht das 5'-Enhancer-Element des *Mash1*-Promotors. Denkbar wäre nun eine negative Regulation (Repression) von *Irx1* auf *Mash1*.

Es ist daher denkbar, daß *Irx1* den *Mash1*-Lokus reprimiert statt aktiviert. Für die reprimierende Funktion von *Irx1* spricht, daß *Irx1* sowohl in der Maus als auch in *X. laevis* (Gómez-Skarmeta et al., 2001) bezüglich *BMP4* reprimierend agiert. Weiterhin sprechen neuere Daten für eine reprimierende Funktion des *cIrx1* (Huhn) gegenüber *Cash1* (K. Storey, Oxford, pers. Mitteilung). Außerdem umfaßt die Maus-*Iroquois*-Genfamilie fünf weitere Mitglieder, so daß auch andere *Irx*-Gene Regulationspartner von *Mash1* sein könnten. Demnach ist die Regulation von *Gli-Irx-Mash* in der Maus nur teilweise evolutiv konserviert. Die Interaktionspartner der regulativen Kaskade sind identisch, nicht aber die funktionelle Ausprägung.



**Abb. III.7:** Regulation von *Irx1* durch die *Gli*-Gene und das *Mash1*-Gen

Aus den in-situ-Analysen läßt sich ein Regulation von *Irx1* durch *Gli1* und *Gli2* erkennen. *Mash1* wird nicht direkt von *Irx1* aktiviert.

*Irx1* hat also neben der beschriebenen frühen Funktion während der embryonalen Entwicklung auch noch weitere Funktionen während der Organogenese.

# IV. MATERIAL UND METHODEN

## IV.1. ORGANISMEN

### *IV.1.1 MÄUSE UND EMBRYONEN*

NMRI (Weibchen) und C57Bl/6/xSJL oder B6D2/F1 Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover bezogen. Zur Erzeugung von Embryonen für RNA-Präparationen, *in-situ*-Hybridisierungen und Morula-Aggregationen, wurden die Mäuse ü.N. verpaart und der Tag des Vaginalpfropfes als Tag 0,5 post coitum der Embryonalentwicklung (E0,5) gezählt. Der Tag der Geburt wurde als Tag 0 der postnatalen Entwicklung (P0) gezählt.

#### *Gli-Mäuse*

Die verwendeten *Gli1*- und *Gli2*-Mausmutanten wurden freundlicherweise von A. Joyner zu Verfügung gestellt (Park et al., 2000; Mo et al., 1997).

### *IV.1.2 BAKTERIEN*

Transformationen wurden mit den *E. coli*-Stämmen *DH5 $\alpha$*  (Hanahan, 1985), *XL-10-Gold* (Stratagene), *SURE* (Stratagene) durchgeführt. Als Wirt für  $\lambda$ -*gt10* Phagen wurde der Stamm *LE392* verwendet.

### *IV.1.3 ES-ZELLEN*

Zur homologen Rekombination wurden die embryonalen Stammzellen der *MPI II* Linie verwendet. Sie entstammen dem genetischen Mausstamm 129Sv/J.



## IV.2 MATERIALIEN

### *IV.2.1 CHEMIKALIEN*

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz), J.T. Baker (Deventer, Holland), Roth (Karlsruhe), Biomol (Ilvesheim) und Gibco Laboratories (Detroit, USA) bezogen. Phenol verschiedener pH-Werte wurde von der Firma Amresco (Solan, Ohio) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "p.a." (zur Analyse).

### *IV.2.2 RADIOCHEMIKALIEN*

Radiochemikalien ( $^{32}\text{P}$ -dCTP und  $^{35}\text{S}$ -dUTP) kamen von der Firma Amersham (Braunschweig).

### *IV.2.3 VERBRAUCHSMATERIAL*

Das Plastikmaterial wurde von den Firmen Falcon, Greiner, Eppendorf, Sarstedt und Nunc bezogen.

### *IV.2.4 ENZYME*

Enzyme der Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Stratagene (La Jolla), Gibco-BRL (Karlsruhe), Boehringer (Mannheim), Biolabs (Frankfurt), Promega und Pharmacia (Freiburg) wurden verwandt.

### *IV.2.5 REAKTIONSSETS ("KITS")*

Es wurden folgende Kits benutzt:

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
Multiprime DNA labelling system	Amersham Life Science
Probe Quant G-50 Micro Columns	Amersham
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Trizol	Life Technologies
Oligotex mRNA Kit	Qiagen

#### ***IV.2.6 MEMBRANEN***

Es wurde mit Nylon-Membranen der Firma Qiagen (Düsseldorf) gearbeitet.

#### ***IV.2.7 DNA-BIBLIOTHEKEN***

##### *genomische $\lambda$ -Phagenbibliothek*

Die genomische Bibliothek wurde freundlicherweise von Dr. G. Schütz (Kaestner et al., 1993) zur Verfügung gestellt.

##### *cDNA-Bibliothek*

Das Durchmustern zweier Bibliotheken diente dazu, die *Irx1*-cDNA zu vervollständigen. Die ersten Fragmente wurden aus einer E8,5-cDNA-Bibliothek gewonnen (Zülch, 1997), die freundlicherweise von Dr. B. Hogan (Fahrner et al., 1987) zur Verfügung gestellt wurde. Bei der verwendeten E10,5-cDNA-Bibliothek handelt es sich um eine Bibliothek der Firma Stratagene (Oligo-dT und Random-primed; E10,5; C57/Bl6; #938303).

#### ***IV.2.8 VEKTOREN***

Klonierungen wurden vorrangig mit dem Plasmid Bluescript II KS+ (Stratagene, USA), pGEM-T oder pGEM-T-Easy (Promega) oder dem "special .very.low.copy-Vector" (freundlicherweise von D. Treichel zur Verfügung gestellt) durchgeführt.

#### ***IV.2.9 GRÖßENMARKER***

Für die DNA-Auftrennung wurden zwei verschiedene Größenmarker verwandt:

##### *a) 1 kb-Marker (Biolabs):*

kb: 10,0, 8,0, 6,0, 5,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,5, 1,0, 0,5

*b) 100 bp-Marker (Biolabs):*

bp: 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

Als Größenmarker für die RNA-Auftrennung wurde der *RNA-Marker 0,28-6,58 kb* von Promega verwandt:

bp: 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281

#### **IV.2.10 OLIGONUKLEOTIDE**

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Köln) oder NAPS (Göttingen) bezogen. Die Oligonukleotide dienten entweder als Sequenzierprimer oder sie wurden zur PCR benutzt.

T7-Primer (Stratagene) : 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

T3-Primer (Stratagene) : 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'

Primer AZ1 (5'-#r2): 5'-TCA TAC TTG ACT TCC TGT TGG GGC CCC A-3'

Primer AZ2 (5'-#r1): 5'-CAT AGG GAT AAT AAG CAG GCG-3'

Primer AZ3 (3'-#s4): 5'-AGA TCT TGG GCT TGC TGT-3'

Primer AZ4 (5'-#s5): 5'-CAC CTG TCA CAT AGG CAA G-3'

Primer AZ5 (5'-#s3): 5'-GAG GAG ATC GAC CTG GAG AGC ATT-3'

Primer AZ6 (3'-ho): 5'-ÁAT GCT CTC CAG GTC GAT CTC CTC-3'

Primer AZ7 (5'-ho): 5'-CGC CTG CTT ATT ATC CCT ATG-3'

Primer neoA: 5'- CGG ATC AAG CGT ATG ATG CAG CCG -3'

Primer neoB: 5'- CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG- 3'

Primer lacZ1: 5'- TTGGCGTAAGTGAAGCGAC- 3'

Primer lacZ2: 5'- AGCGGCTGATGTTGAACTG- 3'

#### **IV.2.11 FILME**

Alle Farbfotografien wurden mit den Kunstlichtfilmen, Extrachrome 320 T und 64T der Firma Kodak gemacht. Die Autoradiogramme wurden auf XAR-3 oder BIOMAX-Filmen (beide von der Firma Kodak) exponiert, und die *in-situ*-Hybridisierungen wurden in Kodak NTB-2 Flüssigfilm getaucht.

#### **IV.2.12 PHOTOARBEITEN UND SEQUENZBEARBEITUNG**

Die Photos der Embryonen bzw. Schnitte wurden mit Zeiss-Mikroskopen (Binokular und Axiophot) aufgenommen und digital weiterverarbeitet. DNA-Sequenzbearbeitung wurden mittels der Computerprogramme Sequencher, DNA-Strider, GCG (Genetics Computer Group Inc.), Multialign und BLAST (NCBI) durchgeführt.

Die Genbank-Nummern (Accession number) der bearbeiteten *Iroquois*-Sequenzen lauten: *Irx1* (Y15002); *Irx2* (Y15000); *Irx3* (Y15001); *Irx4* (AF124732); *Irx5* (AF271053); *Irx6* (AJ271055).

#### **IV.2.13 ZELLINIEN**

Es wurde die noradrenerge *PC12*-Zelllinie (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan; (Greene und Tischler, 1976)) und folgende Lungenkrebszelllinien (SCLC: small cell lung cancer cell lines) der Gesellschaft American Type Culture Collection (ATCC) benutzt:

*NCI-N417*: ATCC No: CRL-5809

*NCI-H592*: ATCC No: HTB-116

*NCI-H345*: ATCC No: HTB-180

*NCI-H82*: ATCC No: HTB-175

*NCI-H69*: ATCC No: HTB-119

#### **IV.2.14 IN-SITU-HYBRIDISIERUNGSSONDEN**

Die folgenden *in-situ* Hybridisierungssonden wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt: *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* von A. Joyner (Mo et al., 1997); *Brachury* (*T*) von B. Hermann (Herrmann et al., 1990); *BMP4* von B. Hogan (Hogan, 1996); *Mash1* von F. Guillemot (Guillemot et al., 1993); *Otx2* von S.L. Ang (Acampora et al., 1995); *Irx2* von M.B. Becker (Bosse et al., 2000); *Gbx2* von M. Lewandowski (Wassarman et al., 1997)

#### **IV.2.15 MEDIEN, NÄHRBÖDEN, STANDARD-LÖSUNGEN**

Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches über eine „Millipore-Anlage“ gereinigt war und danach autoklaviert oder sterilfiltriert wurde (vorhandene Ausnahmen werden bei der jeweiligen Methode erwähnt). Die folgenden Lösungen sind Bestandteil verschiedener Methoden und werden daher vorangestellt und bei der einzelnen Methode nur noch mit Namen erwähnt.

**1x SSC:**

0,15 M NaCl

15 mM NaCitrat, pH 7,0

**TE:**

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

1 mM EDTA

**STE:**

150 mM NaCl

8 mM Tris-Cl pH 8

0,8 mM EDTA pH 8,0

**10 x TBE:**

108 g Tris base  
40 ml 0,5M EDTA, pH 8,0  
55 g Borsäure  
ad 1.000 ml H<sub>2</sub>O

**LB – Medium:**

10 g NaCl  
10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Hefe-Extract  
in 1 l VE-Wasser, pH 7,0  
Nährböden enthielten zusätzlich  
1,5 % Agar und Topagar(-ose) 0,7 %  
Agar(-ose).

**Neutralisierungslösung:**

1,5 M NaCl  
0,5 M Tris/HCl (pH 7,4)

**Hybridisierungslösung:**

7 % SDS  
0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2

**Kanamycin:**

10 mg/ml in H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert

**Proteinase K:**

Proteinase K (Boehringer) wurde mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml in H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

**EtBr-Lösung:**

100 mg Ethidiumbromid in 10ml H<sub>2</sub>O gelöst und im Dunkeln aufbewahrt; verwendete Konzentration betrug 2mg/ml.

**10 x Ladepuffer für RNA:**

50 % Glycerin (steril)  
1 mM EDTA  
0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylen Cyanol FF

**10 x Ladepuffer für DNA:**

0, 25 % Bromphenolblau  
0. 25 % Xylen Cyanol FF  
10x TAE  
25% Glycerin  
1 % SDS  
1 mM EDTA

**Denaturierungslösung:**

0,5 M NaOH (pH 14,0)  
1,5 M NaCl

**Waschpuffer für  
Hybridsierungen:**

1 % SDS  
40 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2

**Tetracyclin:**

12,5 mg/ml in Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert

**Phenol/Chloroform/  
Isoamylalkohol :**

Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (PCI) im Volumenverhältnis 25:24:1.

**RNase A:**

10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl gelöst, zur Inaktivierung der DNasen für 15 Min. bei 95 °C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt; bei -20 °C gelagert

**SM-Puffer:**

100 mM NaCl  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,01 % Gelantine

**10 x PBS-Puffer:**

1,3 M NaCl  
70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O pH 7,0

**NZY-Topagar (Topagar):**

21 g NZY-broth  
7 g Agarose  
in 1 l VE-Wasser

**Chloroform/Isoamylalkohol (CI):**

Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 24:1.

**Ampicillin:**

25 mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtriert, und bei -20 °C gelagert

**Zellkulturmedien**

Medien stammten von den Firmen Gibco (Paisley, England), Flow Laboratories (Irvine, England) und Boehringer (Mannheim).

## IV.3 METHODEN

Alle molekularbiologischen Standardmethoden, die nachfolgend nicht aufgeführt sind, wurden nach der Beschreibung von Sambroock oder Ausubel durchgeführt (Sambroock et al., 1989; Ausubel et al., 1987).

### ***IV.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN***

#### *PLASMIDPRÄPARATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT*

Zur schnellen Gewinnung kleinerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, 2000) von der Firma Qiagen (Düsseldorf) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) in Verbindung mit einer Affinitätsaufreinigung an einer Silicongelmembran, die bei hohen Salzkonzentrationen DNA bindet und bei niedrigen eluiert. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer P1, P2, N3, PB, PE und EB sind in den Herstellerangaben zu finden.

Es wurden 3-5 ml einer *E. coli*-Kultur ü.N. in LB-Medium mit Selektionsmarker bei 37°C angezogen. Die Kultur wurde 10 Min. mit 4.000 rpm bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 250 µl Puffer P2 zugeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und nach maximal 5 Min. Inkubation bei RT 350 µl Puffer N3 zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand auf die QIAprep Spin-Säule in das 2 ml Auffangröhrchen gegeben. Durch nochmalige 1minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT wurde die DNA an die Säulenmatrix gebunden. Danach wurde einmal mit 0,5 ml Puffer PB und einmal 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Dabei wurde jeweils der Waschpuffer auf die Säule gegeben, 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Säulendurchfluß verworfen. Am Schluß wurde die DNA in ein sauberes Eppendorfgefäß eluiert. Dazu wurden 50 µl Puffer EB

auf die Säule gegeben, 1 Min. bei RT inkubiert und danach erneut 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert.

Die Konzentration der so gewonnenen DNA entspricht ungefähr 200-400 ng/ $\mu$ l.

#### *PLASMIDISOLATION MIT DEM QIAFILTER MAXIPREP KIT*

Zur Aufreinigung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der "QIAfilter Plasmid Maxi Kit" (Qiagen, 2000) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Kit funktioniert ebenfalls nach einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), diesmal in Verbindung mit einer Anionen-Austauschersäule. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF und TE sind in den Herstellerangaben zu finden.

Es wurden 50-100 ml *E. coli*-Kultur ü.N. in LB-Medium mit Selektionsmarker bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben angezogen. Die Kultur wurde durch 10minütige Zentrifugation mit 4.000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml kaltem P1-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 ml P2-Puffer wurde 6 mal invertiert, 5 Min. bei RT inkubiert und 10 ml gekühlter P3-Puffer zugegeben. Um die QIAfilter Cartridge nicht mit ausfallendem Protein zu verstopfen, wurde nach einer 5minütigen Inkubation bei RT nochmals 10 Min. mit 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dann in die QIAfilter Cartridge gefüllt. Während der nun folgenden 10 Min. Inkubation bei RT wurden eine QIAGEN-tip 500-Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Das Zellysate wurde durch die QIAfilter Cartridge gedrückt und auf die QIAGEN-tip 500-Säule aufgetragen. Es folgte zweimaliges Waschen der Säule mit je 30 ml QC-Puffer. Die DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer eluiert, durch Zugabe von 10,5 ml eiskaltem Isopropanol gefällt und durch eine 30 Min. Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut durch Zentrifugation mit 15.000 g (4 °C, 10 Min.) pelletiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurde die isolierte Plasmid-DNA an der Luft getrocknet und in TE oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### ***IV.3.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN***

Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA wurden durch einen optischen Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz von Standard-DNA und Probe in Agarosegelen durchgeführt (Sambroock et al., 1989).

### ***IV.3.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE***

Bei der Agarosegelelektrophorese (Thorne, 1966; Helling et al., 1974; McDonell et al., 1977; Johnson und Grossman, 1977; Southern, 1975) werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. DNA wandert aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode.

Für analytische und präparative Zwecke wurden Agarosegele angefertigt. Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend wurden 0,7 - 3 %ige Agarosegele mit jeweils 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit Ladepuffer versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei kurzwelligem UV-Licht (258 nm) fotografiert. Präparative Gele sollten, um die Bildung von Thymidin-Dimeren und Strangbrüche zu vermeiden, nur langwelligem, energieärmerem UV-Licht (Wellenlänge > 300 nm) ausgesetzt werden.

### ***IV.3.4 GEWINNUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN MIT DEM QIA-QUICK GEL EXTRACTION KIT***

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des "QIA-quick Gel Extractions Kit" von der Firma Qiagen durchgeführt. Das dabei verwendete "QIAquick Spin-Protokoll" (Qiagen, 2000) arbeitet mit dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an eine Silikon-Gel-Membran. Dabei macht man sich zunutze, daß DNA bei hohen Salzkonzentrationen an der Säulenmatrix haften bleibt, während Kontaminationen gewaschen werden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann die DNA eluiert werden. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer QG, PE und EB sind in den Herstellerangaben zu finden.

Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in 5 Volumina Puffer QG auf ein Volumen Gel aufgenommen. Dies wurde in einem



Eppendorfgefäß bei 50 °C 10 Min. unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Nachdem sich das Gel vollständig aufgelöst hatte, wurde die Farbe der Mischung kontrolliert. Hatte sie eine violette Färbung, so wurden 10 µl 3 M NaAc zugegeben, hatte sie eine gelbe Färbung, so wurde gleich zum nächsten Schritt übergegangen. Nun wurde die Lösung auf die QIAquick Spin Column gegeben und 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Danach wurde der Säulendurchfluß verworfen und je einmal mit 0,5 ml Puffer QG und 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Nach jedem dieser beiden Schritte wurde 1 Min. 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Säulendurchfluß verworfen. Am Schluß wurden 30 µl Puffer EB auf die Säule gegeben, 1 Min. lang bei RT inkubiert und die DNA durch eine letzte Zentrifugation 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT eluiert.

### ***IV.3.5 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA***

Das Restriktionsschneiden wurde gemäß den Angaben des Enzymherstellers und nach Sambroock (Sambroock et al., 1989) durchgeführt. Restriktionsansätze mit mehreren Enzymen konnten gleichzeitig erfolgen, wenn die Enzyme dieselben Reaktionsbedingungen erforderten. Unterschieden sich die Reaktionspuffer nur in der NaCl Konzentration, wurde zuerst mit der niedrigeren Salzkonzentration und dem entsprechenden Enzym inkubiert, anschließend wurde die Salzkonzentration für das zweite Enzym eingestellt, bevor dieses zugegeben wurde. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Ionen, mußte nach dem ersten Schneiden eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt werden, bevor mit dem anderen Enzym geschnitten werden konnte.

### ***IV.3.6 AUFREINIGUNG VON DNA-LÖSUNGEN MITTELS PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION***

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion (Kirby, 1956; Marmur, 1960) wurde zu einem Volumen einer wässrigen DNA-Lösung ein Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol gegeben (Mengenverhältnis 25 : 24 : 1). Nach intensivem Mischen auf dem Vortexer wurde die Emulsion zur Phasentrennung bei RT mit 13.000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Danach

befanden sich denaturierte Proteine, Membranbestandteile und organisch lösliche Moleküle in der unteren Phenol/Chloroform-Phase und in der Interphase. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase.

Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Je nach benötigtem Reinheitsgrad der DNA kann der Vorgang mehrmals wiederholt werden. Anschließend wurde, um Phenolspuren zu beseitigen, nach obigem Schema eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) durchgeführt. Die DNA wurde in der Regel nach der Extraktion mit Ethanol gefällt.

#### ***IV.3.7 ETHANOLFÄLLUNG VON DNA AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN***

Es wurde 1/10 des Volumens der DNA-Lösung 3M Natriumacetat zugegeben. Danach wurden 2,5 Volumina des jetzigen Volumens absoluten (oder 96 %igen) Ethanols zugegeben und gemischt. Die Fällung wurde für ca. 30 Min. bei 4 °C oder 5 Min. bei -20 °C inkubiert. Zum Sedimentieren der gefällten DNA wurde für 5 bis 10 Min. bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Um die DNA zu waschen, z.B. um Salzreste zu entfernen, wurden 0,5 ml 70 % Ethanol in ein Eppendorfgefäß mit gefällter DNA gegeben und kräftig gemischt. Es folgte wieder eine Zentrifugation für 3 - 5 Min. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in Puffer oder Wasser (pH >6.0) aufgenommen.

#### ***IV.3.8 ISOPROPANOLFÄLLUNG VON DNA AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN***

Eine Isopropanolfällung hat den Vorteil, daß zur Fällung nur weniger Isopropanol (als Ethanol im Vergleich) zugegeben werden muß und daß die DNA mit weniger Salz ausfällt. Nachteile der Isopropanolfällung sind die geringere Flüchtigkeit des Isopropanols und das weniger feste und durchsichtigere Pellet nach der Zentrifugation.

Anstatt Ethanol wurden 0,7 Volumina Isopropanol zur DNA-Lösung zugegeben. Weiter wurde wie bei der Ethanolfällung verfahren.

### ***IV.3.9 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN***

Das Enzym *T4*-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines anderen DNA-Stranges. Zum Ablauf dieser endergonischen Reaktion ist ATP erforderlich. Die Produkte einer Ligation wurden in *E. coli* transformiert und so vermehrt.

Ligationen wurden mit 20 - 50 ng Vektor und dem 3-fachen molaren Überschuß des entsprechenden Fragments in Ligase-Puffer mit 1 mM ATP und 1 U *T4*-DNA-Ligase angesetzt. Überhang-Ligationen („sticky ends“) wurden 3 h. bei 20 °C oder ü.N. bei 14 °C, Ligationen mit stumpfen Enden („blunt ends“) stets ü.N. bei 14 °C inkubiert.

#### *10X LIGASE-PUFFER:*

660 mM Tris/HCl (pH 7,6)  
66mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 M DTT

### ***IV.3.10 „BLUNT END“-KLONIERUNG***

Sollten Fragmente mit überhängenden 5'- oder 3'- Enden in einen „blunt end“-Vektor kloniert wurden, so wurden:

- 5' Überhänge mit Klenow-Fragment der *DNA-Polymerase I* (Boehringer Mannheim) und den entsprechenden Nukleotidmix direkt im Reaktionsansatz aufgefüllt (*Klenow* arbeitet in den meisten Puffern zufriedenstellend).

- 3' Überhänge mit *T4*-Polymerase (stärkere 3' - 5' Exonukleaseaktivität als *Klenow*) abgebaut.

### ***IV.3.11 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN***

#### *HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN*

Bei der Elektroporation wird eine Mischung aus Bakterien und DNA einem kurzen, aber intensiven elektrischen Feld von 1,8 kV, welches einen exponentiellen Abfall zeigt, ausgesetzt (Dower et al., 1988). Dies führt zur vorübergehenden Bildung von Poren in der Membran von lebenden Zellen (Calvin und Hanawalt, 1988), durch welche die DNA in die Zelle gelangen kann.

Die Porenentstehung ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich die Membrankomplexe der Phospholipiddoppelschicht in einem elektrischen Feld als Dipol verhalten und die Struktur der Membran so verändert wird (Neumann et al., 1982).

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden *E. coli* auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und 5 h bis ü.N. bei 37 °C leicht geschüttelt. Mit diesen 5 ml wurde 1 l LB-Lösung angeimpft und bei 37 °C geschüttelt (300 rpm), bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Nun wurde das Wachstum gestoppt, indem die Bakterien ca. 15 - 30 Min. in einem Eiswasserbad abgekühlt wurden. Hiernach wurden die Zellen durch ein 15 Min. Zentrifugieren (4200 rpm, 4 °C) pelletiert. Die Bakterien wurden in 1 l eiskaltes ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und nach dem Lösen wie bereits beschrieben erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, doch diesmal wurde das Pellet nur in 0,5 l ddH<sub>2</sub>O bzw. beim zweiten Mal in 20 ml 10 % Glycerinlösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das nun erhaltene Pellet in 2 - 3 ml 10 %-Glycerinlösung aufgenommen und gut gemischt. Die Konzentration betrug nun in etwa 3\*10<sup>10</sup> Zellen/ml. Danach wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Die Zellen sind nun fertig für eine Elektroporation und können nach Bedarf aufgetaut werden.

#### *TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION*

Die kompetenten Bakterien (ca. 50 µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz gemischt. Danach wurden die Bakterien in kalte Elektroporationsküvetten überführt und der Elektroporationsapparat eingestellt (1,8 kV, 25 mF und 200 W beim Pulscontroller). Nach der Elektroporation wurde direkt 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Die Bakterienlösung wurde in ein steriles Reaktionsgefäß transferiert und ca. 30 Min. bei 37 °C leicht geschüttelt, bevor sie auf Selektivagar ausplattiert wurde.

#### *SOC-MEDIUM:*

Bacto-Trypton 2 %  
Bacto-Yeast Extrakt 0,5 %  
NaCl 10 mM

KCl 2,5 mM  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)  
Glucose 20 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)

#### ***IV.3.12 SEQUENZIERUNG ("CYCLE SEQUENCING")***

Zum Sequenzieren der DNA wurde ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese beruht (Sanger et al., 1977; Tabor und Richardson, 1987). Einzelsträngige DNA dient dabei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Es wurde ein Primer zugegeben, der mit der DNA hybridisieren kann. DNA-Polymerasen benötigen für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden wurden auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz gegeben. Diesen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers. Werden die ddNTPs in den neuen DNA-Strang eingebaut, so stoppt das Kettenwachstum, da keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNA-Stränge läßt sich die Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Längenunterschiede von einem Basenpaar können aufgelöst werden. Die ddNTPs sind je nach Base unterschiedlich fluoreszenzmarkiert, so daß nach einer Gel-Elektrophorese jedes DNA-Fragment mit einer Laserapparatur detektiert werden kann.

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde auf einem ABI PRISM-377 DNA Sequencer durchgeführt. Im Reaktionsansatz wurden 300 - 400 ng DNA, 10 pmol Primer und 4,5 ml Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Lösung zugegeben. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 11,5 - 13,5 ml statt. Das Cycle sequencing-Programm (30'' 95 °C, 10'' 50 °C, 4' 60 °C, 25 Zyklen) wurde in einem Biometra Trio-Thermoblock durchgeführt. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und im Big Dye-Auftragspuffer aufgenommen. Die Reaktion wurde dann auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Integrale werden mit der Computersoftware Sequencer ausgewertet.

**IV.3.13 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)**

(Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986)

Die Konzentration der Primer wurde photometrisch bestimmt. Alle Primer wurden zur Genotypisierung von transgenen Mäusen eingesetzt. Primerpaar AZ-neo-#1+2 wurden zur Detektion der *Neo*-Resistenz und AZ-lacZ-#1+2 zur Detektion des LacZ-Markergens eingesetzt. AZ-Irx-#1+2 erkannten das normale *Irx1*-Allel, welches in den transgenen Mäusen deletiert war.

Alle Primer wurden von der Firma Eurogentec bzw. NAPS synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert, so daß diese nur noch in H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration bestimmt werden mußte.

*BEISPIEL FÜR EINEN REAKTIONSANSATZ:*

- 5 µl 10x Puffer (enthält 25 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Primer1 (10 µM)
- 1 µl Primer2 (10 µM)
- 50 ng-1.000 ng DNA-Matrize
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- x µl H<sub>2</sub>O (auf 50 µl auffüllen)

-----  
Σ 50 µl

*REAKTIONSBEDINGUNGEN*

<b>1.Schritt:</b>	94°C	2'
<b>2.Schritt:</b>	94°C	20''
<b>3.Schritt:</b>	55 - 65 °C	20''
<b>4.Schritt:</b>	72°C	1-2'

*Schritte 2. - 4.* 25 - 30 mal wiederholen

*5.Schritt:* 4°C Temperatur halten

*GENOTYPISIERUNGS-PCR:*

Zum Genotypisieren wurde zum einen eine *Irx1*-PCR, die den deletierten Homeoboxbereich erfaßt, und zum anderen eine *Neomycin*- oder *lacZ*-PCR durchgeführt.

<i>IRX1-HOM-PCR</i>	<i>NEO-PCR</i>	<i>LACZ-PCR</i>
Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: AZ-#3 + AZ-#7	Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: AZ-neoA + AZ-neoB	Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: AZ-lacZ1 + AZ-lacZ2
Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 58°C Zyklenzahl: 30x	Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 70°C Zyklenzahl: 25x	Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 60°C Zyklenzahl: 30x

Die PCR-Reaktion wurde in einem Biometra Trio-Thermoblock mit Deckelheizung durchgeführt.

**IV.3.14 SOUTHERN-BLOT-ANALYSE**

Die nachfolgend aufgeführte Analyse wurde nach der Beschreibung von Southern oder Chomczynski durchgeführt (Southern, 1975; Chomczynski und Quasba, 1984).

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde in Agarosegelen aufgetrennt, gefärbt und mit einem Längenmaß fotografiert. Das Gel wurde 15 Min. lang unter Schütteln mit 0,25 M HCl behandelt (Depurinisierung; reduziert die Größe der DNA-Fragmente im Gel und verbessert dadurch die Effizienz, mit der große Fragmente auf die Filter transferiert werden können) und anschließend mit VE-Wasser gespült. Da ausschließlich Nylon-Membranen verwendet wurden, konnte der Transfer der DNA unter alkalischen Bedingungen erfolgen („alkalisches Blotting“). Hierzu wurde die DNA für mindestens 30 Min. in Denaturierungslösung denaturiert und anschließend ca. 30 Min. in der Neutralisierungslösung geschwenkt. Zum Blotten wurde der Aufbau nach Southern verwendet. Als Transferlösung diente 20x SSC. Der Transfer dauerte 4 - 24 h, je nach Größe der Fragmente und Menge der DNA in dem Gel. Nach dem Blotten wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt und

luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (0,3 J/cm<sup>2</sup>) kovalent auf dem Filter fixiert.

*DENATURIERUNGSLSG.:*

0,5 M NaOH  
1,5 M NaCl

*NEUTRALISIERUNGSLSG.:*

1,5 M NaCl  
0,5 M Tris  
HCl (pH 7,2)

### ***IV.3.15 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA- UND RNA-BLOTS***

#### *RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN*

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem "Multiprime DNA labelling system" von Amersham. Bei diesem System (Feinberg und Vogelstein, 1983) wird doppelsträngige DNA bei 95°C zu Einzelstrang-DNA denaturiert. Zu der ssDNA werden Klenow-Enzym, Zufallssequenz-Hexamerprimer, dNTPs und <sup>32</sup>P-markiertes dCTP gegeben. Die Primer lagern sich auf der ssDNA-Matrize an, so daß das Klenow-Enzym mit der Polymerisation eines komplementären Stranges beginnen kann. Bei der Polymerisation werden auch <sup>32</sup>P-dCTPs in den Strang eingebaut, so daß man eine markierte DNA-Sonde erhält.

Es wurden 50 ng DNA in linearer Form eingesetzt. Mit H<sub>2</sub>O wurde das Volumen auf 11,5 µl aufgefüllt. Die DNA wurde für 5 Min. im 95°C-Heizblock denaturiert und sofort 1 Min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 µl Puffer, 2,5 µl Primern, 5µl <sup>32</sup>P-dCTP (50mCi) und 1 µl Klenow-Polymerase (1U/µl) wurde die Reaktion für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Probe auf 50 ml mit STE aufgefüllt. Damit nicht eingebaute Nukleotide entfernt wurden, wurde die Reaktionsmischung über eine *G-50*-Mikrosäule (Sephadex G-50 Probe Quant; Pharmacia) gegeben. Die Säule wurde dazu zunächst kurz auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend die Ausflußöffnung geöffnet. Die Säule wurde in ein Eppendorfgesäß gestellt und bei 735 xg eine Min. zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorfgesäß gestellt, die Reaktionsmischung vorsichtig auf die Säule pipettiert und für zwei Min. bei 735 xg zentrifugiert. Der



Durchfluß enthielt die aufgereinigte Sonde, die freien Nukleotide wurden von der Säule zurückgehalten.

Um die Qualität der Sonde zu prüfen, wurden 1 µl von 50 µl Säulendurchfluß für eine Szintillationszählung eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Sonde sollte ein Signal von 15 - 25 Millionen counts liefern.

Die Sonde wurde für 10 Min. bei 95°C denaturiert und sofort danach in die Hybridisierungslösung gegeben.

##### *HYBRIDISIERUNG DER MEMBRANEN*

Die Prähybridisierung, Hybridisierung und das Waschen der Membran erfolgte in Hybridisierungsflaschen, die im 65°C-Schrank kontinuierlich gedreht wurden.

Die Membranen wurden zunächst für mindestens 1 Stunde (meist ca. 2 h) mit 20 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Nach der Prähybridisierung wurde die vorbereitete, radioaktiv markierte DNA-Sonde für 10 Min. im Heizblock bei 95°C denaturiert und sofort in 20 ml Hybridisierungslösung (auf 65°C vorgewärmt) gegeben. Die Konzentration der Sonde sollte ungefähr 10<sup>6</sup> counts/ml betragen. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsflasche gefüllt. Die Hybridisierung wird im 65 °C-Schrank über Nacht durchgeführt. Die Membranen wurden mehrmals je 30 Min. bei 65 °C gewaschen.

Die Exposition erfolgte mit einem Biomax-Film bei -70 °C. Die Expositionsdauer beträgt meistens ein bis drei Tage. Die Entwicklung des Films wurde mit einer Entwicklermaschine durchgeführt.

##### *GENOTYPIEREN DER IRX1-MAUSMUTANTEN MITTELS SOUTHERN-BLOT ANALYSE*

Das Genotypisieren der *Irx1*-Mausmutanten erfolgte bis zu einem embryonalen Alter von E8,5 mittels Southern-Blot-Analyse. Da die homozygoten Embryonen so wenig Gewebe aufwiesen, wurde mit ihnen stets eine Genotypisierung mittels PCR durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA (aus Schwanz-Biopsie oder Embryonalehülle gewonnen) enzymatisch verdaut. Für die Analyse mit der externen Sonde (ga0,5) wurde die genomische

DNA mit *KpnI* verdaut und aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte dann mit der radioaktiv markierten ga0,5-Sonde. Zwei Modifikationen haben sich dabei als sinnvoll herausgestellt. Zum einen wurde die markierte Sonde mit Fisch-Sperma-DNA gegenhybridisiert (5 Min. bei 95°C) und zum anderen hat sich der Hybridisierungspuffer der Fa. Stratagene (*Quickhyb*-Solution) sehr als effizient erwiesen. Beides zusammen reduziert die Hintergrundreaktionen. Die so hybridisierten Blots wurden gewaschen und danach wie oben beschrieben exponiert.

Waschschritte:

<b>Zeit:</b>	<b>Lösungen:</b>	<b>Temperatur:</b>
2x 15 Min.	2x SSC/0,1 %SDS	RT
1x 30 Min.	0,1x SSC/0,1 %SDS	65°C

#### ***IV.3.16 DURCHMUSTERN EINER cDNA- ODER GENOMISCHEN MAUS-DNA-BIBLIOTHEK NACH REKOMBINANTEN BAKTERIOPHAGEN UND DEREN ISOLIERUNG***

Das nachfolgend aufgeführte Durchmustern einer DNA-Bank, wurde nach der Beschreibung von Ausubel durchgeführt (Ausubel et al., 1995).

##### *VORBEHANDLUNG DER WIRTSBAKTERIEN*

Von dem Bakterienstamm LE392 wurde eine 100 ml-ü.N. Kultur in LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub> angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 4.000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in der Hälfte des ursprünglichen Volumens in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen. Diese Bakterien waren nun für eine Infektion mit Lambda-Phagen kompetent. Die Bakterien wurden bei 4 °C aufbewahrt und blieben etwa eine Woche verwendbar.

##### *TITERBESTIMMUNG EINER PHAGENBIBLIOTHEK*

Die Ausplattierung einer genügend hohen Anzahl von Phagen aus einer Bibliothek war Voraussetzung für die erfolgreiche Identifizierung eines bestimmten Klons. Daher mußte der aktuelle Titer der verwendeten Bibliothek

bekannt sein. Hierzu wurde jeweils eine Verdünnungsreihe in SM-Puffer angesetzt, um den Titer der Bibliothek durch Auszählen von Phagenplaques bestimmen zu können. Diese Reihe umfaßte fünf Verdünnungen von 1 : 10<sup>2</sup> bis 1 : 10<sup>6</sup>. Aus der Anzahl der Plaques und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren ließ sich die Zahl der infizierenden Phagen pro Volumeneinheit der Bibliothek errechnen.

### *AUSPLATTIEREN DER PHAGENBIBLIOTHEK*

Die Phagen wurden mit einer Dichte ausplattiert, die gerade noch Einzelphagen erkennen ließ. Die gewünschte Phagenzahl wurde mit der entsprechenden Menge Bakterien 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die infizierten Bakterien mit ca. 46 °C warmem Topagar gemischt und auf 37 °C vorgewärmte Agarplatten plattiert. Nach Erstarren der Topagar wurden die Platten umgekehrt für ca. 5 - 9 h bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques einen Durchmesser von ca. 1,0 mm erreicht hatten. Anschließend wurden die Platten bis zum Herstellen der Filter bei 4 °C aufbewahrt.

### *TRANSFER DER PHAGEN AUF NYLON-MEMBRANEN UND HYBRIDISIERUNG*

Trockene ungeladene Nylonmembranen wurden in passender Größe beschriftet und mit der unbeschrifteten Seite auf den Phagenrasen gelegt und die Markierungen auf den äußeren Plattenboden übertragen. Nach ca. 1 Min. wurde der Filter abgezogen. Von der Platte konnten mehrere Filter nacheinander gezogen werden. Die Filter wurden mit der DNA-Seite nach oben in getränktes Whatman mit folgenden Lösungen gelegt:

#### *1. DENATURIEREN:*

5 Min. 1,5M NaCl, 0,4M NaOH

#### *2. NEUTRALISIEREN*

5 Min. 1M Tris/HCl (pH 8), 1,5M NaCl

#### *3. ÄQUILIBRIEREN*

5 Min. 2x SSC

#### *4. LUFTTROCKNEN*

Zuletzt wurde die Phagen-DNA durch UV-Bestrahlung (300 m J/cm<sup>2</sup>, 302 nm) an die Nylonmembran kovalent gebunden. Mittels der Hybridisierung mit

der radioaktiv markierten Sonde konnten die positiven, also die hybridisierenden Phagenklone, ermittelt werden.

### *ISOLIERUNG REKOMBINANTER PHAGENKLONE*

Die Markierungen der hybridisierten Filter wurden auf die entwickelten Röntgenfilme entsprechend ihrer Lage übertragen, um die Signale den Phagen-Plaques auf den Agarplatten zuordnen zu können. Die ausgewählten Phagen-Plaques wurden mit sterilen Pipettenspitzen ausgestochen und in SM-Puffer transferiert. Die Phagen wurden ü.N. bei 4 °C oder 3 - 4 h. bei Raumtemperatur eluiert. In den folgenden Selektionsrunden („Rescreenings“) wurden die im ersten Durchgang erhaltenen Phagen in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert, die Phagen-DNA wurde, wie oben beschrieben, auf Nylonmembranen transferiert, diese dann mit der radioaktiven Sonde hybridisiert und die entsprechenden positiven Phagenplaques ausgestochen. Dieses Nachmustern wurde solange wiederholt, bis eindeutige Einzelphagen isoliert werden konnten.

### *ANLEGEN EINEN PHAGENSTOCKS*

Mit dieser Methode wurde eine hochkonzentrierte Lösung ("high titer stock") der isolierten Phagen hergestellt, die als Grundstock für präparative Plattenlysate diente. Die Phagen wurden in einer Dichte ausplattiert, die eine konfluente Lyse ergab. Die Lysate wurden mit 10 ml SM (bei 15 cm Plattendurchmesser) überschichtet, und langsam bei 4 °C üN geschüttelt. Bakterien oder Agarosestücke wurden durch 10 min Zentrifugieren mit 3.000 rpm abgetrennt. Zur Abtötung der Bakterien wurde der Überstand mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Phagen sind in dieser Lösung mehrere Monate bis Jahre haltbar, wenn auch mit fallendem Titer.

### *DNA-ISOLIERUNG AUS LAMDA-PHAGEN (PLATTENLYSAT-METHODE)*

Der entsprechende Phagenklon wurde auf einer 150 mm Petrischale konfluent ausplattiert. Anschließend wurden die Phagen mit 10 ml SM und einigen Tropfen Chloroform ü.N. bei 4 °C von der Platte gewaschen. Der

Überstand wurde unter Zugabe von DNase und RNase (Endkonzentrationen jeweils 10 µg/ml) 30 min bei 37 °C in 50 ml Röhrchen (Falcon) verdaut, zentrifugiert (3.500 rpm, 30 min, Minifuge T), und der Überstand mit gleichem Volumen 20 % Polyethylenglykol-6.000/2 M NaCl für 2 h (4 °C) präzipitiert. Die Phagen wurden pelletiert (3.500 rpm, 30 min), getrocknet, in 500 µl SM gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Mit weiteren 200 µl SM wurden die Falcon-Röhrchen einmal nachgewaschen. Nach einer Chloroformextraktion erfolgte ein weiterer RNase-Verdau (Endkonzentration 20 µg/ml; 15 min bei 37°C) und ein Proteinase-K-Verdau (Endkonzentration von 10 µg/ml; nach Zugabe von 5 µl 10 % SDS und 5 µl 0,5 M EDTA-Lösung; 15 min bei 37 °C). Abschließend wurde eine Phenol- und Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (nicht vortexen) der Phagen-DNA durchgeführt, diese mit dem gleichen Volumen Isopropylalkohol oder Ethanol gefällt und 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Phagen DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl TE gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

*SM-PUFFER:*

NaCl 100 mM  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
Tris/HCl, pH 7,5 50 mM  
Gelatine 0,01 %

### ***IV.3.17 PRÄPARATION GENOMISCHER MAUS-DNA***

Das Gewebe (ca. 1 cm Schwanz oder embryonales Gewebe) wurde in 500 µl Proteinase K-Puffer, der 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) enthielt, gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die unverdauten Haare und Knochen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (5 Min., 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A), die genomische DNA im Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt und zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A). Das DNA Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl TE gelöst (bei 37 °C unter leichtem Schütteln). Für eine PCR-Analyse genügt bereits die embryonale Membran eines E8.0 alten Embryos. Für jüngere Embryonen muß der gesamte Embryo benutzt werden. Dies kann auch nach einer *in-situ*-Hybridisierungsanalyse erfolgen.

*PROTEINASE-K-PUFFER:*

NaCl 200 mM

Tris/HCl, pH 8.5 100 mM  
EDTA 5 mM  
SDS 0,2 %

### ***IV.3.18 ARBEITEN MIT RNA***

Die nachfolgend aufgeführte RNA-Analyse, wurde nach der Beschreibung von Ausubel durchgeführt (Ausubel et al., 1995).

#### *VORBEREITUNGEN FÜR DAS ARBEITEN MIT RNA*

Voraussetzung für das erfolgreiche Arbeiten mit RNA ist die Minimierung der RNase-Aktivität sowie die Vermeidung von RNase-Kontaminationen. Zu diesem Zweck wurden bei der Gewebepreparation sowie bei allen anderen Arbeiten mit RNA stets Handschuhe getragen. Das frisch präparierte Gewebe wurde bei -70 °C aufbewahrt. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn gründlich mit Ethanol gereinigt. Sämtliche Glasgeräte wurden für 2 h bei 220 °C gebacken und das Wasser für alle Lösungen mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Alle Lösungen wurden zusätzlich autoklaviert. Der Versuchsansatz wurde während der RNA-Präparation, wenn möglich, auf Eis gehalten. Verwendete Gelkammern, Schlitten und Kämmen wurden vorher gründlich mit Seife bzw. 0,1 % SDS gereinigt, in 0,25 M NaOH eingeweicht, dann mit DEPC-Wasser und nochmal mit 100 %igem EtOH gespült.

#### *ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS EMBRYONALGEWEBE MIT TRIZOL (LIFE TECHNOLOGIES)*

Bei dem *TRIZOL*-Protokoll wurde das Gewebe in einer monophasischen Mischung aus saurem Guanidiniumthiocyanat, saurem Phenol und Chloroform homogenisiert (Chomczynski und Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Guanidiniumthiocyanat ist ein sehr effektives Mittel zur Proteindenaturierung (Nozaki und Tanford, 1970); Extraktion mit saurem Phenol und Chloroform ermöglicht nach Zentrifugation die effektive Trennung von RNA in der wässrigen Phase von DNA und Protein in der Phenol/Chloroformphase.

Dazu wurden Embryonen verschiedenen Alters, Mausgehirne bzw. Lungen von 1 Tag und älteren Mäusen in PBS (mit DEPC) präpariert und sofort in

flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur RNA-Präparation wurde eingefrorenes Gewebe direkt aus dem  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schrank in ein steriles Greinerröhrchen mit Trizol gegeben. Es wurde 1 ml Trizol pro 50 - 100 mg Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde solange homogenisiert, bis keine Gewebeteilchen mehr sichtbar sind. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu ermöglichen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol wurde das Röhrchen für 15 Sek. intensiv geschüttelt. Es schloß sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 - 3 Minuten an. Die Probe wurde zur Phasentrennung mit 12.000 g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Min. zentrifugiert. Die farblose obere Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt. Die rote untere Phase enthielt DNA und Proteine und wurde verworfen. Zur RNA-Fällung wurden 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem 1 ml Trizol zugegeben. Die Probe wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12.000 g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 Min. zentrifugiert. Die ausgefällte RNA bildete ein Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit mindestens 1 ml 75 % Ethanol pro 1 ml eingesetztem Trizol gewaschen. Die Probe wurde mit einem Vortexer gemischt und mit 7.500g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird in RNase-freiem DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Damit sich die RNA besser löste, konnte sie für 10 Min. bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden. Die RNA wurde bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *ISOLIERUNG VON POLYA<sup>+</sup>-RNA AUS GESAMT-RNA MIT DEM OLIGOTEX MRNA-KIT (MINI-PRÄPARATION)*

Der Oligotex-Kit von Qiagen beruht auf der Bindung von mRNA mit polyadenylierten 3'-Enden an Oligo-dT-Primer, die an eine Festphasenmatrix gekoppelt sind. Die Bindung erfolgt in einem Hochsalzpuffer, die Elution bei Niedrigsalzbedingungen (Qiagen, 2000).

Dazu wurde die Oligotex-Suspension auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , der Elutionspuffer auf  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Da die Gesamt-RNA weniger als 250  $\mu\text{g}$  betrug, wurde die Mini-Präparation durchgeführt. Die RNA wurde in 250  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Dazu

wurden 250 µl 2x Bindepuffer und 15 µl Oligotex-Suspension gegeben und das ganze 3 Min. bei 65 °C inkubiert, um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Zur Hybridisierung der RNA an die Oligo-dT-Primer wurde 10 Min. bei RT inkubiert. Danach wurde 2 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl OW2 Waschpuffer resuspendiert und die Suspension auf Spin-Säule gegeben. Diese wurde 30 Sek. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Danach wurde ein zweites Mal mit 400 µl OW2 Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (30 Sek., 13.000 rpm, RT) wurde die Spin-Säule in RNase-freies Eppendorfgefäß gestellt und mit 30 - 50 µl vorgeheiztem (70 °C) Elutionspuffer durch eine 30 sekundige Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT eluiert. Zur besseren Ausbeute kann der Elutionsschritt nochmals wiederholt werden. Die Lagerung der polyA<sup>+</sup>-RNA erfolgte bei -70 °C.

### ***IV.3.19 NORTHERN BLOT***

Mit einem Northern Blot (Thomas, 1980; Sambroock et al., 1989) lassen sich spezifische Sequenzen in einem Gemisch von RNA-Molekülen, welche mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden, nachweisen.

Bei einem Northern Blot wird die RNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und danach mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran übertragen und dort fixiert. Die Membran kann dann für eine Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde benutzt werden.

#### *NORTHERN BLOT: ELEKTROPHORESE*

Um ein RNA-Gel mit einem Volumen von 100 ml zu gießen, wurden 88 ml DEPC-H<sub>2</sub>O mit 1 g Agarose aufgekocht und die Flüssigkeit auf 55°C abgekühlt. Erst dann wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 1,8 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Die Elektrophorese wurde 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer zugegeben. Für die Probedenaturierung wurden 4,5 µl RNA-Lösung (ca. 20 µg Gesamt-RNA oder 1-3 µg polyA<sup>+</sup>-RNA) mit 2,0 µl 10x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10,0 µl deionisiertem Formamid versetzt. Die Mischung wurde für 15 Min. bei 55 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt.



Nach Zugabe von 2  $\mu$ l Auftragspuffer und 1  $\mu$ l EtBr wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Der aufgetragene RNA-Marker wurde genauso behandelt. Der Gellauf erfolgte für ca. 3 Stunden bei 100 Volt, bis die Bromphenolblau-Bande ungefähr 2/3 des Gels durchlaufen hatte.

Nach dem Gellauf wurde auf dem UV-Tisch mit einem fluoreszierenden Lineal neben der Markerspür fotografiert, damit sich später die Größe der Marker-Banden bestimmen läßt. Dann wurde das Gel für 20 Min. in 20x SSC inkubiert. MOPS-Puffer, verwendetes H<sub>2</sub>O und sonstige Lösungen müssen RNase-frei sein.

### *NORTHERN BLOT: TRANSFER*

Der Aufbau und der Ablauf des Northern Blots entsprechen dem des Southern Blots. Allerdings bedarf die bereits einzelsträngig vorliegende RNA keiner Denaturierung und Neutralisierung. Nach dem Blotten wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (300 m J/cm<sup>2</sup>, 366 nm) kovalent auf der Membran fixiert. Die Membran war, trocken gelagert, bei RT mehrere Monate haltbar und konnte für Hybridisierungen eingesetzt werden.

### *NORTHERN BLOT: HYBRIDISIERUNG*

Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschrirte wurden in rotierenden Hybridisierungsflaschen in Wärmeschränken analog zur Hybridisierung von DNA-Blots durchgeführt:

#### *PRÄHYBRIDISIERUNG*

bei 65 °C für 2 Stunden

#### *HYBRIDISIERUNG*

bei 63 - 65 °C ü.N. mit radioaktiver Sonde (ca. 10<sup>6</sup> counts/ml)

### *NORTHERN BLOT: WASCHSCHRITTE UND EXPOSITION*

Northernblots wurden auf folgende Weise gewaschen:

Waschschritt 1: frische Prähybridisierungslösung, 30 Min. bei 60 °C

Waschschritt 2 - 4: Waschpuffer 20 Min. bei 60 °C

Zwischen jedem Waschschrirte wurde die Radioaktivität der Membran mit dem Geigerzähler gemessen, wobei darauf zu achten war, daß die Membran

stets feucht blieb. War die Radioaktivität der Membran niedrig genug, wurden nicht mehr alle Waschschrte zu Ende ausgeführt.

Danch wurde die Membran noch feucht in Plastikfolie eingeschweißt oder in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit Klebebändern in einer Expositionskassette befestigt. Es wurden immer zwei Filme aufgelegt, wobei der eine nach 3 Tagen und der zweite je nach Stärke des Signals nach 1,5 - 3 Wochen entwickelt wurde. Die Exposition wurde bei -70 °C durchgeführt. Als Filmmaterial wurden Biomax-Filme benutzt. Die Entwicklung des Films erfolgte mit einer Entwicklermaschine.

#### ***IV.3.20 RADIOAKTIVE MRNA IN-SITU-HYBRIDISIERUNG AN SCHNITTEN***

Das nachfolgend aufgeführte radioaktive in-situ-Hybridisierung wurde nach der Beschreibungen von McDougall, Manning, Wilkinson und Hogan durchgeführt (McDougall et al., 1972; Manning et al., 1975; Wilkinson, 1992; Hogan et al., 1994).

##### *ALLGEMEINES ZUR RADIOAKTIVEN IN-SITU-HYBRIDISIERUNG*

Die *in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode, die zur Analyse von Expressionsmustern von Genen genutzt wird. Bei der radioaktiven mRNA-*in-situ*-Hybridisierung wird eine radioaktiv markierte RNA-Sonde hergestellt, die zur im Gewebe vorhandenen mRNA komplementär ist, dadurch an diese hybridisiert und sie so erkennbar macht. Ein Überziehen der Schnitte mit einer Filmemulsion und anschließendes Exponieren und Entwickeln läßt das radioaktive Signal als eine weiß erscheinende Färbung im Dunkelfeldmikroskop sichtbar werden. Zusätzlich werden die Schnitte einer histologischen Färbung unterzogen, welche im Hellfeldmikroskop betrachtet werden kann.

Diese Methode ermöglicht organ-, gewebe- und unter Umständen auch zellspezifische Analyse des Expressionsmusters eines Gens. Zudem können im Gegensatz zum Whole-mount-*in-situ*-Hybridisierungsverfahren auch ältere Embryonen und adultes Gewebe leicht bearbeitet werden, da die Hybridisierung auf Gewebeschnitten stattfindet und somit das Problem der Penetration der Sonde ins Gewebe nicht entsteht.

*HERSTELLUNG EINER MATRIZE FÜR DIE IN-VITRO-TRANSKRIPTION*

Die entsprechenden Fragmente befanden sich in einem *pBluescriptKS+* - Plasmid, das jeweils flankierend zum Polylinker hochspezifische Bakteriophagen-Promotoren besitzt (*T3*- und *T7*-Promotoren). Anschließend wurden mindestens 1 µg Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Es ist für die spätere *in-vitro*-Transkription von Vorteil, wenn der Restriktionsverdau eine stumpfe Schnittstelle ergibt. Die Vollständigkeit der Enzymreaktion wurde auf einem Minigel kontrolliert. Nach einer Phenol- und Chloroformextraktion wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

*IN-VITRO-TRANSKRIPTION DER RNA-SONDEN*

Es wurde der Transkriptionskit von Boehringer (Ingelheim) verwendet. Folgender Transkriptionsansatz wurde bei RT pipettiert und danach 60 Min. bei 37 °C inkubiert:

*ANSATZ:*

- 1 µl Transkriptionspuffer(10x)
- 0,5 µl RNasin (30 U/µl)
- 1 µl GTP, CTP, ATP-Gemisch (je 10 mM)
- 5 µl Matrizen-DNA (200 ng/µl)
- 2 µl  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP (800Ci/mmol)
- 0,5 µl T7, T3 oder SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl) je nach Vektor

Zur späteren Auswertung des Signals wurde eine Sinnstrang- und eine Gegenstrang-Sonde präpariert. Die Gegenstrang-Sonde hybridisierte als Komplement an die zelluläre mRNA und bildete so stabile Hybride, die die Position der zellulären mRNA anzeigten. Die Sinn-Sonde war dagegen nicht in der Lage, mit dem zellulären Transkript zu hybridisieren, da sie der zellulären mRNA entsprach, und diente so als Kontrolle für eventuelle Hintergrundreaktionen.

*AUFREINIGUNG DER RNA-SONDEN*

Nach der *in-vitro*-Transkription wurde die DNA-Matrize mit DNase verdaut, indem zum Transkriptionsansatz 3 µl *DNase I* (RNase frei, 20 U/ml) pipettiert wurden und der Ansatz 10 Min. bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 40 µl RNase-freiem STE-Puffer auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und anschließend wie bei der Aufreinigung der DNA-Sonden auf eine vorbereitete *G-50*-Mikrosäule (Sephadex Probe-Quant; Pharmacia) gegeben und 2 Min. mit 735 g bei RT zentrifugiert. Die bei der Transkription nicht eingebauten Nukleotide wurden dadurch entfernt. Zur RNA-Sonde, die sich im Eluat befand, wurden 50 µl deionisiertes Formamid gegeben und 1 µl der Sonde mit einer Szintillationslösung im Szintillationszähler gemessen.

*PRÄPARIEREN DER EMBRYONEN UND GEHIRNE FÜR DIE RNA-IN-SITU-ANALYSE*

Die Embryonen wurden in 1x PBS frisch aus den Uteri präpariert, ab Stadium E15,5 die Gehirne aus den Embryonen isoliert, und ü.N. in 4 % PFA in 1x PBS bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen oder Gehirne mehrmals in 1x PBS gewaschen und danach folgendermaßen behandelt:

Ablauf:

a. 1x PBS	24 h	h. 75 % Isopropanol, 25 % Toluol	4 h
b. 0,86 % NaCl(Saline)	24 h	i. 50 % Isopropanol, 50 % Toluol	4 h
c. 70 % Ethanol	24 h	j. 25 % Isopropanol, 75 % Toluol	4 h
d. 80 % Ethanol	24 h	k. 100 % Toluol	24 h
e. 90 % Ethanol	24 h	l. Paraplast-Plus, 60 °C	24 h
f. 100 % Ethanol	24 h	m. Paraplast-Plus, 60 °C	24 h
g. 100 % Isopropanol	24 h	n. Paraplast-Plus, 60 °C	24 h

Nach der Dehydrierung wurden die Embryonen in der gewünschten Orientierung mit Hilfe einer Einbettmaschine in Paraffin eingebettet und bis zur Herstellung der Schnitte bei RT gelagert.

*4 % PFA IN 1x PBS:*

40 g Paraformaldehyd (PFA)  
ad 1.000 ml mit 1x PBS  
bei 60 °C gelöst

*HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN*

Dazu wurde der in Paraffin eingebettete Embryo in ein Mikrotom der Firma Leica eingespannt und geschnitten. Die 5 - 15 µm dicken Schnitte wurden anschließend auf der Wasseroberfläche eines 45 °C-Wasserbades entspannt und von dort auf einen Superfrost-Objektträger der Firma Menzel Gläser (Braunschweig) aufgenommen. Diese geringe Schnittstärke ist von Vorteil, da sie eine zelluläre Analyse erlaubt. Die Schnitte wurden für 1 h auf eine 37 °C-Wärmeplatte gelegt, ü.N. bei 37 °C getrocknet, am darauffolgenden Tag bei RT bis zur Verwendung gelagert.

*PRÄHYBRIDISIERUNG*

Die Prähybridisierung dient dem Entparaffinieren der Schnitte, außerdem zum Vorbereiten der Hybridisierung. Dazu wurden die Objektträger folgendermaßen behandelt:

Ablauf:

a. 100 % Xylolersatz	10 Min.	o. 10 mg/ml Proteinase-K	7 Min.
b. 100 % Xylolersatz	10 Min.	p. 1x PBS	5 Min.
c. 100 % Ethanol	2 Min.	q. 4 % PFA	20 Min.
d. 95 % Ethanol	2 Min.	r. 1x PBS	5 Min.
e. 90 % Ethanol	2 Min.	s. Acetyl.-Mix.	10 Min.
f. 80 % Ethanol	2 Min.	t. 1x PBS	5 Min.
g. 70 % Ethanol	2 Min.	u. 0,86 % NaCl (Saline)	5 Min.
h. 50 % Ethanol	2 Min.	v. 30 % Ethanol	2 Min.
i. 30 % Ethanol	2 Min.	w. 50 % Ethanol	2 Min.
j. 0,86 % NaCl (Saline)	5 Min.	x. 70 % Ethanol	2 Min.
k. 1x PBS	5 Min.	y. 80 % Ethanol	2 Min.
l. 4 % PFA	20 Min.	z. 90 % Ethanol	2 Min.
m. 1x PBS	5 Min.	aa. 95 % Ethanol	2 Min.
n. 1x PBS	5 Min.	bb. 100 % Ethanol	2 Min.

Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten für ca. 30 Min. bei RT getrocknet.

*ACETLYL.-MIX:*

0,1 M Triethanolamin  
0,05 M Acetanhydrid

*PROTEINASE-K-PUFFER:*

20mM Tris/HCl, pH 7,5  
1mM EDTA, pH 8,0

*HYBRIDISIERUNG DER SCHNITTE*

Die RNA-Sonde wurde mit *in-situ*-Hybridisierungspuffer auf  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ l verdünnt. Vor dem Auftragen wurde der Hybridisierungsmix 2 Min. bei 80 °C denaturiert. Für jeden Schnitt wurden ca. 10  $\mu$ l Hybridisierungsmix benötigt. Der Tropfen mit der Hybridisierungslösung wurde mit einem silikonisierten Deckgläschen möglichst luftblasenfrei abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 50 °C in einer dicht abschließbaren Plastikschiessel, die durch 50 % Formamid/2x SSC feucht gehalten wurde und eine gesättigte Atmosphäre schaffte.

*IN-SITU-HYBRIDISIERUNGS-PUFFER:*

10 % Dextransulfat  
50 % deion. Formamid  
100 mM DTT  
300 mM NaCl  
10 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6,8  
10 mM Tris/HCl pH 8,0  
5 mM EDTA, pH 8,0  
5 mg/ml Hefe-tRNA  
0,2 mg/ml Ficoll-400  
0,2 mg/ml PVP

*WASCHEN DER OBJEKTE*

Die Objektträger wurden in Träger einsortiert und 20 - 30 Min. bei 65 - 70 °C in Waschpuffer bewegt, je nach der erfordernten Stringenz. Anschließend wurden die Schnitte 3 - 5 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C gewaschen. Zur RNase-Behandlung wurden die Objektträger jeweils 15 Min. im NTE ohne RNase, dann 15 Min. im NTE mit 20 mg/ml RNase A und nochmals 15 Min. ohne RNase jeweils bei 37 °C behandelt. Danach wurden die Schnitte 30 Min. in Waschpuffer bei 37 °C und jeweils 15 Min. in 2x SSC und 0,1x SSC bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % und 100 %

Ethanol, jeweils 2 Min.). Nachdem die Schnitte gut getrocknet waren, wurden sie in einer Röntgenfilmkassette ü.N. auf Standard-Röntgenfilm (BIOMAX, Firma Kodak) exponiert, um die Stärke des Signals für die Expositionszeit abschätzen zu können.

*WASCHPUFFER:*

50 % Formamid  
2x SSC  
0,01 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

*NTE:*

0,5 M NaCl  
0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA

*EXPONIEREN, ENTWICKELN UND FÄRBen DER IN-SITU-HYBRIDISIERUNGEN*

In einer Dunkelkammer (ohne Rotlicht) wurden die Objektträger in eine 1:1 mit Wasser verdünnte Kodak NTB-2 Emulsion getaucht, die auf 42 °C erwärmt wurde, und 2 h bei RT getrocknet. Die Objektträger wurden dann in eine lichtdichte Plastikbox einsortiert. Die Objektträger wurden so bei 4 °C 10 Tage exponiert. Schließlich wurden die Objektträger in der Dunkelkammer (ohne Rotlicht) 3 Min. in D19 Entwickler (80 g/ 500 ml) der Firma Kodak entwickelt. Es folgten 1 Min. Behandlung in 1 %iger Essigsäure, 3 Min. Fixierung in 30 %iger Natriumthiosulfatlösung und mehrmaliges Waschen in dH<sub>2</sub>O (2x 10 Min. bei RT, 5 Min. bei 42 °C, 10 Min. bei RT und 30 Min. bei RT). Eine Färbung wurde für 20 Min. in einer gefilterten Giemsa-Lösung durchgeführt. Die gefärbten Objektträger wurden vorsichtig, aber gründlich mit Leitungswasser (nicht deionisiert) gespült. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Einschlußmittel (Eukitt) unter Deckgläschen eingedeckelt. Fotografien wurden mit einem Leitz Labovert Hellfeld-Dunkelfeld-Mikroskop und einem Kunstlichtfilm (Fa. Kodak, 320T) gemacht.

*GIEMSA-STOCKLÖSUNG:*

0,75 g Giemsa  
50 ml Methanol  
50 ml Glycerin

*GIEMSA FÄRBE LÖSUNG:*

8 ml Giemsa-Stocklösung  
4 ml Na-Phosphat-Puffer (0,2 M), (pH 6,0)  
188 ml ddH<sub>2</sub>O

***IV.3.21 MRNA-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG AN GANZEN EMBRYONEN („WHOLE-MOUNT“-HYBRIDISIERUNGSTECHNIK)***

Die *whole-mount-in-situ*-Hybridisierungstechnik erlaubt die Lokalisierung einer spezifischen mRNA in Geweben und ganzen Embryonen. Die *whole-*

*mount-in-situ*-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Wilkinson durchgeführt (Wilkinson, 1992).

*VORBEREITUNG DER EMBRYONEN UND GEHIRNE*

Die Embryonen wurden in 1x PBS bei RT präpariert und direkt in 4 % PFA/1x PBS überführt. Über Nacht wurden sie dann bei 4 °C in der PFA-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen auf folgende Weise dehydriert:

1x PBT	5 Min.	4 °C
1x PBT	5 Min.	4 °C
25 % MeOH/PBT	5 Min.	
50 % MeOH/PBT	5 Min.	
75 % MeOH/PBT	5 Min.	
100 % MeOH	5 Min.	

Schließlich wurden die Embryonen in frisches Methanol überführt, wo sie bei -20 °C mehrere Tage aufbewahrt werden konnten.

*HERSTELLUNG DER IN-VITRO-RNA-SONDE*

Das Herstellen einer DNA-Matrize zur *in-vitro*-RNA-Synthese erfolgte wie oben beschrieben.

*In-vitro-Transkription*

Folgender Transkriptionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert:

*TRANSKRPTIONSANSATZ:*

DEPC-H <sub>2</sub> O	11 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
10x DIG-Nukleotid-Mix	1 µl
linearisiertes Plasmid (1 µg/µl)	1 µl
RNasin (30 U/µl)	1 µl
RNA-Polymerase (10-50 U/µl)	1 µl

Nach Entnahme eines 1 µl Aliquots für ein Analysegel (1 % Agarose/TBE Gel) wurde der Ansatz unter Zugabe von 2 µl DNase (20 U/ml, RNase-frei)



weitere 15 min bei 37 °C inkubiert, mit 100 µl TE aufgefüllt und mittels G50-Säulen (Pharmacia) aufgereinigt..

*10X DIG-NUKLEOTID MIX:*

GTP, ATP, CTP, 10 mM  
 UTP 6,5, mM  
 DIG-UTP, 3,5 mM

*10X TRANSKRIPTIONSPUFFER:*

Tris/HCl (pH 7,5), 400 mM  
 MgCl<sub>2</sub>, 60 mM

*HYBRIDISIERUNG, ANTIKÖRPERINKUBATION UND FÄRBUNG*

Sämtliche Waschschrte wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei RT für 5 Min. durchgeführt.

*Hybridisierung*

Zur Hybridisierung der Sonde wurden die Embryonen zunächst durch eine abfallende Methanolreihe (75 % in PBT, 50 % in PBT, 25 % in PBT) rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBT wurden die Embryonen in 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBT für 1 h bei RT gebleicht. Anschließend wurden sie dreimal in PBT gewaschen. Die Embryonen wurden je nach Alter unterschiedlich lange mit Proteinase K behandelt, wodurch die Zugänglichkeit der Sonde und des Antikörpers erhöht wurde. Hierfür wurden die Embryonen in 10 µg Proteinase-K/ml PBT gemäß folgenden Richtzeiten bei RT inkubiert.

**Embryoalter:**

Tag 6,5 - 8,5 p.c.	2 Min.
Tag 9,5 - 10,5 p.c	5 Min.
Tag 9,5 - 10,5 p.c	12 Min.
ab Tag 12,5 p.c	15 Min.

Der Proteinaseverdau wurde durch Waschen mit 2 mg Glycin/ml PBT gestoppt. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBT wurden die Embryonen in 0,2 % Glutaraldehyd in 4 % PFA/PBT für 20 min refixiert. Anschließend wurden die Embryonen zweimal in 1x PBT gewaschen, bevor sie für 1 h bei 70 °C in Prähybridisierungslösung äquibriert wurden. Die Hybridisierung erfolgte bei 70 °C ü.N. durch Zugabe der RNA-Sonde (0,1 mg/ml).

*(PRÄ-) HYBRIDISIERUNGSLÖSUNG:*

SDS, 1 %  
 Formamid, 50 %  
 Heparin, 50 µg/ml  
 Hefe-tRNA, 50 µg/ml  
 SSC (pH 4,5), 5x

*Waschschritte*

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen wie folgt gewaschen und die nichthybridisierte RNA abgebaut.

<i>Ablauf:</i>			h. Lösung 2	5 Min.	
a. Lösung 1	30 Min.	70 °C	i. Lösung 3	5 Min.	
b. Lösung 1	30 Min.	70 °C	j. Lösung 3	30 Min.	65 °C
c. Lösung 1/2	10 Min.	70 °C	k. Lösung3	30 Min.	65 °C
d. Lösung 2	5 Min.		l. TBST	5 Min.	
e. Lösung 2	5 Min.		m. TBST	5 Min.	
f. Lösung 2/ RNaseA	5 Min.	37 °C	n. TBST/ 10 % FCS	90 Min.	
g. Lösung 2/ RNaseA	5 Min.	37 °C			

*LÖSUNG 1*

Formamid, 50%  
 SDS, 1 %  
 SSC (pH 4,5), 5x

*LÖSUNG 3:*

Formamid, 50 %  
 SSC (pH 4,5), 2x

*PBT:*

0,1 % Tween-  
 20 in 1x PBS

*LÖSUNG 2*

NaCl, 0,5 M  
 Tris/HCl, pH 7,5,  
 10 mM  
 Tween-20, 0,1 %  
 ggf. RNase, 20 mg/ml

*10x TBST (100ML):*

NaCl, 8 g  
 KCl, 0,2 g  
 Tris/HCl (pH 7,5), 1 M  
 Tween-20, 10 ml  
 vor Gebrauch Verdünnung auf 1x  
 und Zugabe von 0,48 mg/ml  
 Levamisol

*Antikörperinkubation*

Die Sonde war mit DIG-dUTP markiert. Nach der Inkubation mit dem gegen die Digoxigenin-markierte RNA gerichteten Antikörper konnte die Farb-Enzym-Reaktion gestartet werden.

Um unspezifische Bindung des Antikörpers mit embryonalen Proteinen zu vermeiden, wurde der Antikörper vorbehandelt. Hierfür wurden 3 mg Embryo-Pulver in 0,5 ml TBST für 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 5 µl FCS zugegeben. 1 µl Anti-DIG-Antikörper-AP (Boehringer-Mannheim) wurden anschließend für 1 h bei 4 °C in dem Ansatz inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation (4 °C, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurde der Überstand mit 1% FCS/TBST auf 2 ml aufgefüllt. In dieser Lösung wurden die Embryonen ü.N. bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert.

*Embryo-Pulver:* 1 g embryonales Gewebe wurde in 4 Volumina Aceton (4 °C) mit einem Polytron-Mixer homogenisiert und für 30 min auf Eis gehalten. Nach 10 Min. Zentrifugation (1500 rpm, Heraeus Biofuge A) wurde das Pellet mit kaltem Aceton gewaschen, wieder zentrifugiert und abschließend das Pellet zu einem feinem Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde bei 4 °C gelagert.

#### *Entfernen des Antikörpers*

Um überschüssige Antikörper zu entfernen, sowie die Embryonen für die Färbung zu äquilibrieren (pH-Wert und Salzkonzentration), wurde am Tag nach der Antikörperinkubation wie folgt bei RT gewaschen:

#### **Ablauf:**

TBST	5 Min.
TBST	5 Min.
TBST	5 Min.
TBST	60 Min.
TBST	60 Min.
TBST	60 Min.
TBST	60 Min.
NTMT	5 Min.
NTMT	ü.N.

#### *NTMT-LÖSUNG*

NaCl, 100 mM  
Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM  
Levamisol, 2 mM  
MgCl<sub>2</sub>, 50 mM  
Tween-20, 1 %

### *Färbung und Analyse*

Zur Färbung wurden die Embryonen dreimal für 10 Min. in NTMT gewaschen. Anschließend wurde mit 200 µl NBT/BCIP-Stammlösung (Boehringer-Mannheim) in 10 ml NTMT bei RT (abgedunkelt) gefärbt. Nach 3 h bis ü.N. wurde die Farbreaktion durch Überführung der Embryonen in 1x PBT gestoppt. Anschließend wurden die Embryonen nochmals in PBT gewaschen (>15 Min.), über 50 % Glycerin/PBT in 80 % Glycerin/PBT überführt und bei 4 °C gelagert. Nun waren sie für weitere Untersuchungen und zum Fotografieren fertig.

Digoxygenin ist ein natürliches, im Fingerhut vorkommendes Steroid. Dig-dUTP wird anstelle von dTTP in die DNA inkorporiert. An digoxygenierte DNA oder DNA/RNA bindet ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter, gegen Digoxygenin gerichteter Antikörper. Die *alkalische Phosphatase* katalysiert die Oxidation des farblosen Substrates BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat*) zu Indigo (blau). In gekoppelter Reaktion wird farbloses NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu blauem *Diformazan* reduziert.

Die enzymatische Blaufärbung der Gehirne bzw. Embryonen gibt den spezifischen Ort der Hybridisierung zwischen zellulärer RNA und *in-vitro*-transkribierter Gegenstrang-Sonde wieder. Folglich ist so eine räumliche Aussage über die Expression des Transkripts möglich.

### *VIBRATOMSCHNEIDEN VON WHOLE-MOUNT-GEFÄRBTEN EMBRYONEN BZW. GEHIRNEN*

Das Schneiden der durch die *in-situ*-Hybridisierung gefärbten Embryonen bzw. Gehirnen ermöglichte es, auch die Organstrukturen zu analysieren. Es wurden Embryonen der Stadien E9,5 und E10,5 und die Gehirne der embryonalen Stadien E13,5 bis E18,5 untersucht. Die Embryonen wurden sagittal und quer geschnitten, die Gehirne E13,5 bis E17,5 horizontal und das E18.5-Gehirn koronal.

Um das Gewebe näher zu untersuchen, welches das Gen exprimiert, wurden Vibratomschnitte von 40 µm angefertigt. Sie ermöglichten es, einen Eindruck von tieferliegenden Gewebeschichten zu erhalten und auch dreidimensionalen

Eindruck von der Schnittebene zu erhalten. Zunächst wurden die Embryonen bzw. Gehirne aus dem 80 % Glycerol/PBT, über 50 % Glycerol/PBT und schließlich in PBT überführt. Dann wurde das Gewebe in die Gelatine-Albumin-Lösung gelegt, damit das Gewebe physiologisch ausgeglichen ist. Parallel wurden 2 ml der Gelatine-Albumin-Lösung mit 80 µl einer 50 %igen Gluteraldehydlösung gemischt. Dies wurde leicht angetrocknet bevor der Embryo auf diesem Block in der gewünschten Position plaziert wurde. Nun wurden 2 ml einer frisch angemischten Gelatine-Albumin-Lösung mit 80 µl einer 50 %igen Gluteraldehydlösung dazugegeben. Nach 30 minütigem Aushärten, wurde der Block auf dem Vibratomblock befestigt. Die 40-µm-Schnitte wurden mit einem Vibratomschneidegerät („Pelco-1.000“) unter Wasser durchgeführt. Die Schnitte wurden einzeln auf vorbehandelte Objektträger (s. mRNA-*in-situ*-Hybridisierung) aufgezogen und mit einer Lösung (Moviol, Fa. Hoechst) eingedeckelt.

*GELATINE-ALBUMIN-MIX:*

Gelatine 490 mg  
Albumin 30 g  
Saccharose 20 g

#### ***IV.3.22 NACHWEIS VON β-GALAKTOSIDASE (X-GAL-FÄRBUNG)***

Embryonen bzw. Gehirne des gewünschten Alters wurden in 1x PBS präpariert und bei 4 °C in Fixierlösung für 30 Min. fixiert. Anschließend wurden die Embryonen/Gehirne zweimal bei RT in 1x PBS für 20 Min. gewaschen. Zum Nachweis der β-Galaktosidase wurden die Embryonen in *X-Gal*-Färbelösung bei 30 °C für mindestens 12 h inkubiert.

*FIXIERLÖSUNG*

Formaldehyd, 1 %  
Glutaraldehyd, 0,2 %  
NP-40, 0,02 %  
in 1x PBS

*X-GAL-FÄRBELOESUNG:*

X-Gal, 1 mg/ml  
K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM  
K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM

Nach erfolgter β-Galaktosidase-Färbung wurden die Embryonen/Geirne in PBS gewaschen und anschließend in einer ansteigenden Glycerin/PBS-Reihe (30

%, 50 %, 80 %) aufgeklärt. In jeder Lösung wurden die Embryonen für 1 - 2 Tage belassen.

### ***IV.3.23 METHODEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN***

Das nachfolgend aufgeführte Arbeiten mit eukaryotischen Zellen, wurde nach der Beschreibung von A. Mansouri durchgeführt (Mansouri, 2001).

Generell wurden die Zellen in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37 °C vorgewärmt. Alle Arbeiten wurden mit Plastikmaterial (Pipetten, Gewebekulturschalen und -platten) durchgeführt.

#### *MEDIUM FÜR DIE KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN FIBROBLASTEN*

DMEM (Gibco BRL), 4500 mg/l  
FCS (Gibco BRL), 10 %

#### *MEDIUM FÜR DIE KULTIVIERUNG VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN*

DMEM, 500 mg/l  
FCS, 5 %  
β-Mercapto-Ethanol, 0,1 mM  
L-Glutamin, 2 mM  
nicht-essentielle Aminosäuren, 1 x  
Na-Pyruvat, 1 mM  
LIF, 500 U/ml

#### *PRÄPARATION VON PRIMÄREN NEOMYCIN- BZW. PUROMYCIN-RESISTENTEN FIBROBLASTEN*

Zehn Tage 13 - 15 p.c. Embryonen *neomycin-* bzw. *puromycin-*resistenter Mäuse wurden präpariert und mit 1x PBS gewaschen. Der Kopf wurde abgetrennt, Herz, Leber und andere Organe aus den Embryonen entfernt. Das Gewebe wurde mehrmals in 1x PBS gewaschen, um das Blut zu entfernen. Das Embryonengewebe wurde in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 50 ml 0,25 %igem Trypsin und sterilen Glasperlen (ø 4-5 mm) 30 Min. bei 37 °C gerührt. Die Zellen wurden pelletiert (5 Min., 1.200 rpm), der Überstand abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Fibroblasten wurden auf 14,5-cm-Zellkulturschalen plattiert und kultiviert.

### *MITOTISCHE INAKTIVIERUNG VON FIBROBLASTEN*

Konfluente Mausfibroblasten wurden unmittelbar vor Benutzung als Fibroblasten-Zellen durch Behandlung mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Dazu wurde dem Fibroblastenmedium Mitomycin C zugesetzt (100 mg/ml) und die Mitomycin C-Behandlung 2,5 h bei 37 °C durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen und trypinisiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die Gewebekulturschalen waren zuvor mit einer 0,1 %igen Gelatine-Lösung für 15 Min. behandelt worden.

### *TRYPsinBEHANDLUNG VON ZELLEN*

Das Medium wurde von der Gewebekulturschale abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden ca. 5 Min. mit 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zur Abrundung der Zellen (mikroskopische Kontrolle) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt, die Zellzahl pro ml mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät.

### *KULTIVIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN (ES-ZELLEN)*

Embryonale Stammzellen wurden auf Fibroblasten-Zellrasen aus mitotisch inaktivierten Mausfibroblasten kultiviert. Die Zellen wuchsen in scharf abgerundeten Kolonien und wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Dem Medium wurden 15 % FCS zugesetzt und täglich gewechselt. Die Zugabe von LIF (*Leukemia Inhibiting Factor*) blockiert eine Differenzierung der embryonalen Stammzellen.

### *DNA-TRANSFER IN EMBRYONALE STAMMZELLEN DURCH ELEKTROPORATION*

Die embryonalen Stammzellen wurden nach der Trypsinbehandlung gezählt und zweimal mit PBS gewaschen. Ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen wurden in 0,8 ml PBS suspendiert, mit 25 mg den Rekombinationskonstruktes sorgfältig gemischt und in die Elektroporationsküvette (Biorad; 4 mm Elektrodenabstand) überführt. Die

Zellsuspension wurde für 5 Min. bei RT inkubiert und anschließend die Zellen mit einem Impuls von 500  $\mu\text{F}$  und 250 V elektroporiert. Mittels dieses Strompulses werden die ES-Zellen mit dem Rekombinationskonstrukt transformiert. Die Zellen wurden nach dem Strompuls für 5 Min. nicht bewegt, anschließend in ES-Zellmedium aufgenommen und auf den vorbereiteten Fibroblasten-Zellrasen ausplattiert.

*SELEKTION EMBRYONALER STAMMZELLEN NACH ELEKTROPORATION, UM IRX1-KO-LOXPNEOLOXP BZW. IRX1-KO-PURO POSITIVE ES-ZELLEN ZU ISOLIEREN.*

Um die positiv transgenen ES-Zellen zu selektieren, wurden entsprechend der verschiedenen benutzten Rekombinationskonstrukte folgende Wege eingeschlagen:

*Irx1-KO-loxPneoloxP*

Das Medium elektroporierter ES-Zellen wurden 24 h nach der Elektroporation gegen ein mit *G418* enthaltendes Selektionsmedium ausgewechselt (300 mg/ml *G418*). Das Selektionsmedium wurde täglich erneuert.

*Irx1-KO-puro*

Das Medium elektroporierter ES-Zellen wurden 24 h nach der Elektroporation gegen ein mit *G418* und *Puromycin Dihydrochlorid* enthaltendes Selektionsmedium ausgewechselt (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Puromycin Dihydrochlorid*; 2 mM *Gancyclovier*). Das Selektionsmedium wurde täglich erneuert. Ab dem fünften Tag wurde nur noch mit *Puromycin Dihydrochlorid* selektioniert.

*SELEKTION EMBRYONALER STAMMZELLEN NACH ELEKTROPORATION, UM IRX1-KO-LOXP $\Delta$ NEO POSITIVE ES-ZELLEN HERZUSTELLEN.*

In ES-Zellen, die für das *Irx1-KO-loxPneoloxP* positiv transgen waren, wurde das *loxPNeomycin*-Gen mittels einer *Cre*-Recombinasereaktion entfernt, um die Mauslinie *Irx1-KO-loxP $\Delta$ neo* herzustellen. Dabei wurden die Vorteile des sequenzspezifischen *Cre/loxP*-Rekombinasesystems des Bakteriophagen *P1* benutzt (Sauer, 1993). Die *Cre*-Rekombinase vollzieht sowohl in Bakterien als



auch in eukaryotischen Zellen eine Rekombinationsreaktion an der Position der *loxP*-Sequenz. DNA, welche von dieser *loxP*-Sequenz (ein 34 bp langes DNA-Element, welches aus dem Bakteriophagen *P1* gewonnen wird) flankiert wird, wird durch die *Cre*-Rekombinase herausgeschnitten. Daher kann das *Neomycin*-Gen, welches von diesen *loxP*-Sequenzen flankiert wird, nach der homologen Rekombination entfernt werden (Sauer, 1993).

Um das *Neomycin*-Gen bereits in den ES-Zellen zu entfernen, wurden die positiv transgen ES-Zellen ein zweites mal elektroporiert und zwar diesmal mit dem *pCre-Pac*-Plasmid (freundlicherweise von T. Yagi zur Verfügung gestellt; (Taniguchi et al., 1998; Watanabe et al., 1995)). Dieses Plasmid enthält das *Puromycin*-Gen und das *Cre*-Rekombinasegen. Nach der Elektroporation wird auf *Puromycin* selektiert (s.o.). In allen *puro*-positiven ES-Zellen erfolgt eine *Cre*-Rekombinasereaktion (Taniguchi et al., 1998) und in diesem Verlauf wird das *Neomycin*-Gen entfernt. Die resultierenden ES-Zellen heißen im weiteren Verlauf *Irx1-KO-loxP $\Delta$ neo*.

#### *GEWINNUNG VON ES-ZELL-EINZELKLONEN*

Etwa am 8. Tag nach der Elektroporation konnten einzelne ES-Zellklone isoliert werden. Dazu wurden die Zellklone unter dem Stereomikroskop mit einer sterilen gestopften Pipettenspitze isoliert. Die Zellen eines ES-Zellklons wurden in 40  $\mu$ l Trypsin/EDTA in ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt, 5 Min. bei RT inkubiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt. Die Trypsinierung wurde durch Überführung der Zellen in eine mit inaktivierten Fibroblasten-Zellen vorbereitete 24-Loch-Gewebekulturplatten gestoppt. Die vereinzelt ES-Zellen wurden bis zum konfluenten Wachstum kultiviert. Danach wurden die Klone wiederum trypsiniert, die eine Hälfte in DMSO-haltigem Medium weggefroren und die andere Hälfte zur Gewinnung von genomische DNA weiterkultiviert. Die ES-Zell-DNA wurde mit Hilfe von Southern-Blot-Analysen auf homologe Rekombinationsereignisse untersucht.

*EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN*

*Primäre Fibroblasten*

Die Fibroblastenzellen wurden mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen und 5 Min. bei 1.500 rpm pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und langsam ü.N. auf -70 °C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

*Embryonale Stammzellen*

Die ES-Zellen wurden mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen und pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen. In Gefrieröhrchen wurden die ES-Zellen langsam ü.N. auf -70 °C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

*MEDIUM FÜR FIBROBLASTEN:*

Zellkulturmedium  
+ 10 % DMSO

*MEDIUM FÜR ES-ZELLEN:*

ES-Zellmedium  
+ 10 % FCS  
+ 10 % DMSO

*Auftauen von Zellen*

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5 ml Medium überführt und die Zellen in der Labofuge pelletiert (1.500 rpm, 5 Min.). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Medium aufgenommen und ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

***IV.3.24 MAUS-FISH-ANALYSE DER TRANSGENEN ES-ZELLEN***

Die DNA-Sonden wurden bei 15 °C für 1 h mittels des BioNick labeling Kits am dATP biotinyliert (Gibco BRL) (Heng et al., 1992).

Der Ablauf der FISH-Detektion erfolgte nach Heng et al, 1992, und Heng und Tsui 1993. Dabei wurde die Chromosomen auf den Objektträgern für 1h bei 55 °C gebacken. Nach RNase-Behandlung wurden die Objekte bei 70 °C für 2 Min. in 70 % Formamid/2xSSC denaturiert, gefolgt von einer Dehydrierung mittels

einer EtOH-Reihe. Die Sonden wurden für 5 Min. in einem Hybridisierungsmix aus 50 % Formamid/10 % Dextransulfat bei 75 °C denaturiert. Die entsprechende Sonde wurde dann auf die denaturierten Chromosomen-Objektträgern aufgetragen und so ü.N. hybridisiert. Danach wurden die Objekte gewaschen und das Signal amplifiziert und detektiert. Die *FISH*-Signale und das DAPI-Bandenmuster wurde separat analysiert und fotografiert. Das Herstellen der *FISH*-Kartierungs-Daten wurde durch Überlagerung der *FISH*-Signale und der DAPI-Chromosomen-Bandenmuster erreicht (Heng und Tsui, 1993).

Als Material für die Maus-*FISH*-Analyse wurde Maus-ES-Zellen benutzt und für die humane Analyse Blutzellen.

#### ***IV.3.25 HERSTELLUNG VON MAUS-CHIMÄREN AUS ES-ZELLEN DURCH MORULAAGGREGATION***

Das nachfolgend aufgeführte Arbeiten mit ES-Zellen, wurde nach der Beschreibung von A. Mansouri durchgeführt (Mansouri, 2001).

##### *GEWINNUNG VON 8-ZELLSTADIEN (MORULAE) AUS TRÄCHTIGEN MÄUSEN*

Superovulierte C57Bl/6J- oder NMRI-Weibchen, die am Tag E2,5 trächtig waren, wurden nach Betäubung mit CO<sub>2</sub> durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden auf den Rücken gelegt, das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Bauchraum geöffnet. Der Uterus wurde mit einer stumpfen Pinzette gefaßt, und mit einer spitzen Pinzette wurden Mesometrium und Fettgewebe abgestreift. Das Ovidukt wurde zwischen Uterus und Ovar abgetrennt und bis zur Durchspülung in M2 Medium bei RT inkubiert. Die 8-Zellstadien, die sich zum Zeitpunkt der Präparation im Ovidukt befanden, wurden folgendermaßen gewonnen: Unter dem Binokular wurde das Fimbrium mit einer feinen, stumpfen Pinzette über ein Glasschälchen gehalten, eine 2,5 ml Spritze mit einer 27g-Kanüle vorsichtig in das Lumen Fimbriums eingeführt, und die 8-Zellstadien unter leichtem Druck herausgespült. Anschließend wurden die 8-Zellstadien unter dem Binokular mit einer ausgezogenen Pasteurpipette (über einen Schlauch mit Mundstück) aufgesaugt und die 8-

Zellstadien mehrfach in M2 Medium gespült und in M16 Medium abgelegt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter dem Binokular durchgeführt.

<b>M2 Medium:</b>		<b>M16 Medium:</b>	
10x Hank's Puffer	3 ml	10 x Earle's-Puffer	1ml
NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	141 µl	NaHCO <sub>3</sub> 7,5 %	270 µl
Hepes-Puffer 1 M	630 µl	Na-Pyruvat 100 mM	33 µl
Na-Pyruvat 100 mM	99 µl	Pen/Strep 10.000 U/ml	100 µl
Pen/Strep 10.000 U/ml	300 µl	BSA	40 mg
NaOH 1 M	30 µl	Na-Lactat	26 mg
BSA	120 mg	ad H <sub>2</sub> O	10 ml
Na-Lactat	78 mg	M16 Medium:	
ad H <sub>2</sub> O	30 ml	10 x Earle's-Puffer	1ml

Die Medien wurden 1x pro Woche frisch angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

#### *VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN FÜR MORULA-AGGREGATION*

Die ES-Zellen einer 3,5-cm-Gewebekulturplatte wurden trypsiniert und in ES-Zell-Medium aufgenommen. Der Überstand mit den ES-Zellen wurde abgenommen und die Zellen pelletiert (1.300 rpm, 5 Min.). Diese wurden erneut in frischen ES-Zellmedium aufgenommen. Unter dem Binokular wurden anschließend ES-Zellaggregate geeigneter Größe mit einer ausgezogenen Pasteurpipette isoliert, mehrfach in M16 Medium gewaschen und auf die Aggregationsplatte übertragen.

#### *AGGREGATION VON ES-ZELLEN MIT 8-ZELLSSTADIEN*

Bevor 8-Zellstadien mit ES-Zellen aggregiert werden konnten, mußte die *Zona pellucida* von den 8-Zellstadien entfernt werden. Dazu wurden die 8-Zellstadien nacheinander in Tyrode's Säure gewaschen, wodurch die *Zona pellucida* sich auflöste. Anschließend wurden die 8-Zellstadien mehrfach in M16 Medium gut gewaschen und in die Vertiefungen einer Aggregationsplatte in M16 Medium abgelegt. In den Vertiefungen der Aggregationsplatte wurde ein Zellhaufen aus ca. 4 - 15 ES-Zellen an das 8-Zellstadium aggregiert und beides ü.N. bei 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden

die aggregierten Embryonen in einem Tropfen M16 Medium gewaschen, gesammelt und in pseudoschwangere Weibchen (Fostermäuse) übertragen.

<i>TYRODE'S SÄURE:</i>	g/100 ml
NaCl	0,800
KCl	0,020
CaCl <sub>2</sub> ·x2H <sub>2</sub> O	0,024
MgCl <sub>2</sub> ·x2H <sub>2</sub> O	0,010
Glukose	0,100
Polyvenylpyrrolidone (PVP)	0,400

Die Lösung wird mit 5 M HCl auf pH 2,5 eingestellt und sterilfiltriert.

#### *TRANSFER AGGREGIERTER EMBRYONEN IN PSEUDOSCHWANGERE FOSTERMÄUSE*

Pseudoschwangere Fostermäuse wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen erzeugt. Zur Injektionsnarkose pseudoschwangerer Fostermäuse wurden 0,7 - 0,8 ml Avertin intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde auf den Bauch gelegt und der Rücken wurde zwischen Rippenbogen und Beckenkamm mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde mit einem sagitalen Schnitt (1 cm) neben der Wirbelsäule, unmittelbar unter dem Rippenbogen eröffnet. Der Hautschnitt wurde über den Fettkörper oberhalb des Uterus verschoben, die Bauchdecke mit einer spitzen Pinzette gefaßt und mit einem Schnitt eröffnet. Der am Ovar anliegende Fettkörper wurde aufgesucht, mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und zusammen mit Ovar, Ovidukt und Uterushorn aus der Bauchhöhle herausgehoben. Der Fettkörper wurde mit einer Arterienklammer fixiert. Der Uterus wurde mit einer feinen Pinzette kurz vor dem Übergang in das Ovidukt fixiert und mit einer 26 g-Kanüle unterhalb der Pinzette perforiert. In diese Öffnung wurde eine Glaskapillare eingeführt, in die zuvor die aggregierten Embryonen (in ca. 10-20 µl M16-Medium) aufgenommen worden waren. Die Embryonen wurden durch leichten Druck in das Lumen des Uterus eingespült. Die Arterienklemme wurde entfernt, der Uterus mit Ovidukt, Ovar und Fettkörper zurückgelegt und der Hautschnitt mit einer

Wundklammer versorgt. Die Fostermäuse wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose auf einer Wärmeplatte vor Unterkühlung geschützt.

*AVERTIN:*

Tribromethanol	0,5 g
Tert-Amylalkohol	0,25 g
H <sub>2</sub> O	39,5 g
bei 42 °C 4 h lösen, sterilfiltrieren	

### **IV.3.26 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN**

#### *ZELLKULTUR MIT PC-12-ZELLEN UND LUNGENKREBSZELLINIEN*

Experimente wurden mit *PC12*-Zellen und den Lungenkrebszelllinien *NCI-H69*, *NCI-H82*, *NCI-H345*, *NCI-H592* und *NCI-N417* durchgeführt. Die Zellen wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Benutzt wurde DMEM-Medium (Seromed) mit 1,5 % Glukose und 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Gibco/BRL) bei den Lungenkrebszelllinien und 8 % FCS, 50 U/ml Penicillin (Meiji Seika Co., Tokyo, Japan) und 50 µg/ml Streptomycin (Meiji Seika Co.). Die Zellen wurden in Plastikschaalen (Falcon) oder in Flüssigkultur (Falcon) inkubiert und alle zwei bis drei Tage durch Trypsin-Behandlung gesplittet. Das Medium wurde abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/EDTA (Flow) inkubiert, bis sich der Zellrasen ablöste und die Zellen keinen Kontakt mehr hatten. Die so vereinzelteten Zellen wurden 1 : 10 verdünnt und mit frischem Medium auf neue Platten ausplattiert.

#### *REPORTER PLASMIDKONSTRUKTE*

Das *Irx1*-Gen wurde zum einen in einen *pcDNA1.1*-Vektor (Invitrogen) mit *CMV*-Promotor (*Irx1*-pcDNA) und zum anderen in einen *pTRACER<sup>TM</sup>-CMV2*-Vektor (Invitrogen) mit *CMV*-Promotor und *Green-Fluoreszent-Protein (GFP)* (*Irx1*-pTRACER) kloniert. Beide Klonierungen erfolgten über eine *EcoRI*-Klonierung.

Die *Mash1*-Reporterkonstrukte (AZ-JIB, AZ-JIS, AZ-JIH) wurde freundlicherweise von J. Johnson zur Verfügung gestellt (Verma-Kurvari et al., 1998).

*CO-TRANSFEKTION MITTELS LIPOFECTAMIN (GIBCO,BRL)*

Drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, so daß die Schalen 0,2 - 0,3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Platte aufwiesen. Das entsprechende *Mash1*-Promotorkonstrukt (1 µg) wurde mit *CMV-GFP (pTRACER; 0,5µg)* und 2 µg *Irx1*-pcDNA oder *Irx1*-pTRACER cotransformiert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamin (Gibco/BRL). Nach 48 h wurde die β-Galactosidase-Aktivierung des *Mash1*-Promotors mittels lacZ-Färbung ermittelt.

*ZELLKULTUR MIT LUNGENKREBSZELLINIEN*

Die Lungenkrebszelllinien (SCLC; small cell lung cancer) NCI-H69, NCI-H82, NCI-H345, NCI-H592 und NCI-N417 wurden wie oben beschrieben behandelt. Mit den geernteten Zellen wurde eine RNA-Northern-Blot-Analyse durchgeführt.

***IV.3.27 HERSTELLUNG VON ANTISERA (IRX1-ANTIKÖRPER)***

*EXPRESSION UND REINIGUNG VON IRX1 PROTEIN AUS E. COLI*

Mit Standardmethoden wurden über PCR (Primer: *IR1-F, IR1-R, IR1-FC, IR1-F3, IR1-FN*; Annealingtemperatur: 58 °C; 30 Cyclen) amplifizierte *Irx1*-cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor *pET-HIS* kloniert und unter die Kontrolle eines *T7*-Promotors gestellt. Diese wurden in *E. coli BL21(DE3)*, einem mit *IPTG* induzierbaren Bakterienstamm, transformiert und selektiert (Studier et al., 1990). Einzelne Kolonien wurden in 5 ml LB/1 % Glukose-Medium angeimpft und inkubiert, bis die Kultur leicht trübe war. Danach wurde zur Inkubation *IPTG* zugegeben (0,5 mM) und weitere 3 h inkubiert. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation geerntet und das Zellpellet in Phosphatpuffer mittels Lysozymzugabe, Sonifizierung und Einfrieren und Auftauen lysiert. Zur Affinitätsreinigung wurden die am Aminotermius mit einem

Histidinhexamer-Tag versehenen, löslichen Fusionsproteine auf eine Nickelsäule (NiNTA, Qiagen; 5 ml Bettvolumen) gegeben. Die Säule wurde mit 10 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 10 ml Elutionspuffer durch einen pH-Sprung eluiert. Die 1 ml große Fraktionen wurden aufgefangen und mit jeweils 100 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Zum Nachweis des Fusionsproteins wurden Aliquots der Fraktionen in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Zur Quantifizierung wurde zu 5 µl Proteinlösung 1 ml verdünnte Bradford-Reagenzlösung (Biorad; 1 : 5 in H<sub>2</sub>O) gegeben und die OD<sub>595</sub> gemessen.

<i>PHOSPHATPUFFER</i>	<i>WASCHPUFFER</i>	<i>ELUTIONSPUFFER</i>
20 mM Na-Phospat (pH7,8)	20 mM Na-Phospat (pH6,0)	20 mM Na-Phospat (pH4,0)
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl

Primer IR1-F : 5'-CCGCTCGAGACTTGGGGGGCGCGCAGCAAGGA-3'

Primer IR1-R : 5'-GCAGACGGGAGGGCTGCGAGGATCC-3'

Primer IR1-FC : 5'-GACTCGAGACCTGTCACATAGGCAAGTTTT-3'

Primer IR1-F3 : 5'-ACCTCGAGAAGGCCGAGGACGACGAGGAGA-3'

Primer IR1-FN: 5'-CCGCTCGAGACTTGGGGGGCGCGCAGCAAGGA-3'

#### *IMMUNISIERUNG UND BLUTABNAHME*

Für jedes Peptid-Konjugat wurden je zwei Chinchilla-Bastard-Kaninchen immunisiert. Zur Injektion wurden je 250 µl Konjugat in einem Gesamtvolumen von 250 µl mit 250 µl komplettem Freund'schen Adjuvants gemischt und die Suspension durch vortexen und wiederholtes Aufziehen und Ausspritzen durch eine 25G-Kanüle homogenisiert. Dieses Gemisch wurde intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Immunisierungen wurden alle sechs Wochen wiederholt. Blut wurde jeweils ca. 10 Tage nach der Injektion aus der äußeren Ohrvene entnommen (max. 50 µl je Tier). Das Rohblut wurde zum Gerinnen über Nacht in den Kühlraum gestellt und am nächsten Tag abzentrifugiert (Sorvall HB-4 Rotor, 20 Min. bei 8.000 U/Min.), das resultierende Serum aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Diese Arbeit wurde in der Fa. Bioscience (Göttingen) durchgeführt.



*REINIGUNG VON ANTISERUM*

Zur Reinigung des Serums wurde eine Antigenaffinitätssäule hergestellt, um Antigen-spezifische Antikörper zu isolieren. Dazu wurde das Fusionsprotein an eine Säulenmatrix gekoppelt. Affi-Gel10 (Biorad) besteht aus, durch UV-Bestrahlung miteinander verbundenen Agarosekügelchen, die N-Hydroxysuccinimid-Estergruppen trägt. Liganden, die freie Alkylamino- oder Arylaminogruppen tragen, koppeln unter milden, wäßrigen Bedingungen spontan über die Estergruppen und bilden eine stabile Amid-Bindung zu den Kügelchen aus.

Die Proteinlösung wurde mehrfach gegen Kopplungspuffer dialysiert (HEPES, pH 7,5), um Tris und andere Substanzen zu entfernen, die mit ihren Aminogruppen interagieren könnten. Weiterhin wurde das Säulenmaterial mit drei Bettvolumen eiskaltem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Das dialysierte Protein wurde zur Kopplung zur feuchten Matrix gegeben und 4 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem die Lösung entfernt wurde, wurde die Matrix wie folgt gewaschen:

Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5	200 ml
Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5 1 M NaCl	200 ml
Glycin 100 mM, pH 2,5; 1 M NaCl	200 ml
Tris-HCl 10 mM, pH 8,8 bis Eluat neutral	
Triethylamin 100 mM, pH 11,5; 1 M NaCl	200 ml
Tris-HCl 10 mM, pH 8,8 bis Eluat neutral	

Die fertige Säule wurde bei 4°C stehend gelagert. Zur Reinigung wurden jeweils ca. 5 ml Serum dreimal hintereinander über die Säule gegeben, um eine vollständige Bindung von spezifischen Antikörpern an die Säule zu erhalten. Danach wurde wie folgt gewaschen und eluiert:

Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5	100 ml
Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5 0,5 M NaCl	100 ml
Glycin 100 mM, pH 2,5; 1 M NaCl	50 ml
Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 bis Eluat neutral	

Die Antikörper wurden durch einen pH-Sprung mit dem Glycin-Puffer eluiert, mit Tris-HCl (10 ml 1M, pH 7,5) neutralisiert und gefällt. Zur Fällung wurde ein äquivalentes Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter Rühren langsam zugegeben und die Lösung für 6 h bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurde abzentrifugiert (Sorvall HB4-Rotor 30 Min., 8.000 U/Min.). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, gegen PBS dialysiert und der gereinigte Antikörper in Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### ***IV.3.28 WESTERN-BLOT***

Die nachfolgend aufgeführte Proteinanalyse, wurde nach der Beschreibung von Towbin durchgeführt (Towbin et al., 1979).

#### *SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (LAEMMLI, 1970)*

Proben wurden in Laemmli-Ladepuffer gelöst, für 5 Min. auf 95 °C erhitzt und abzentrifugiert. Gewebeproben wurden im Ladepuffer mit Hilfe eines Branson-Cell Disruptors zerschallt, bis eine nichtvisköse Lösung entstanden war. Zur Herstellung eines kleinen Gels (Trenngel 6 x 11 x 0,1 cm) wurde die Trenngellösung angesetzt und zum Auspolymerisieren zwischen gereinigte, zusammengeklammerte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol gewaschen, die Sammelgellösung zugegossen und der Kamm zum Formen der Taschen eingeschoben. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine vertikale Gelkammer eingespannt. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze geladen. Elektrophoretisiert wurde bei max. 150 V für 2-3 h, bis die Lauffront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Geles erreicht hat.

<i>LAEMMLI-LADEPUFFER:</i>	<i>TRENNGEL:</i>	<i>ACRYLAMIDMIX:</i>
SDS, 2 %	H <sub>2</sub> O, 2 ml	Acrylamid, 29,2 %
Glycerol, 10 %	Acrylamidmix 1,7 ml	Methylenbisacrylamid
Tris-HCl, pH 6,8, 60 mM	Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M,	0,8 %
DTT, 100 mM	1,3 ml	in H <sub>2</sub> O
Bromphenolblau 0,01 %	SDS (10 %), 50 ml	
	APS (10 %), 50 ml	
	TEMED, 2 ml	
<i>SAMMELGEL:</i>	<i>LAEMMLI-LAUFPUFFER:</i>	<i>ACRYLAMIDMIX:</i>
H <sub>2</sub> O 2,1 ml	Tris-HCl, pH 8,3, 25 mM	Acrylamid, 29,2 %
Acrylamidmix, 0,5 ml	Glycin, 250 mM	Methylenbisacrylamid
Tris-HCl, pH 6,3, 1 M	SDS, 0,1 %	0,8 %
0,38 ml		in H <sub>2</sub> O
SDS (10 %), 30 ml		
APS (10 %), 30 ml		

Das *Irx1*-Protein wurde durch *in-vitro*-Translation mittels des Transkriptions- und Translationssystems (*TNT*, Promega) hergestellt.

#### *ELEKTROBLOTTEN VON PROTEINGELEN*

Das nachfolgend aufgeführte ElektrobloTTen von Proteingelen, wurde nach der Beschreibung von Khysen-Anderson durchgeführt (Khysen-Anderson, 1984).

Nach der Trennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine durch elektrophoretischen Transfer auf Kunststoffmembranen (Immobilon, Millipore) übertragen. Dazu wurde folgender Aufbau verwendet:

#### *ELEKTROBLLOT:*

- Elektrode (-)
- Drei Lagen Filtrierpapier in Transferpuffer
- Membran
- Polyacrylamid-Gel
- Drei Lagen Filtrierpapier in Transferpuffer
- Elektrode (+)

Zum Blotten wurde das Gerät "Novablot Electrophoretic Transfer Kit" der Firma LKB verwendet. Es wurde bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche 1,5 h lang geblottet. Nach dem Transfer wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt, um

die Position der Größenstandardproteine auf die Membran zu übertragen und die Qualität des Transfers zu beurteilen.

*TRANSFERPUFFER:*

Tris Base, 48 mM  
Glycin, 39 mM  
SDS, 0,037 % (vol/vol)  
Methanol, 20 % (vol/vol)  
add H<sub>2</sub>O

*FÄRBEÖSUNG:*

Ponceau-S, 0,2 %  
Trichloressigsäure, 3 %  
Sulfosalicylsäure, 3 %

*IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN*

Zum Entwickeln wurde die Membran nach dem Blotten eine Stunde unter ständiger Bewegung in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Absorption von Antikörpern an der Membran zu verhindern.

Danach wurde das in Blockierungslösung verdünnte Antiserum zugegeben. Das Ganze wurde in einem Plastikbeutel eingeschweißt und die Inkubation erfolgte auf einem Schütteltisch ü.N. bei 4 °C. Anschließend wurde der Blot viermal je 5 Min. lang bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem 1:200 in Blockierungslösung verdünnten Schwein-Anti-Kaninchenimmunglobulin-Peroxidase-Konjugat (DAKO No. P217) inkubiert. Nach erneutem Waschen (2x 5 Min., 2x 15 Min. PBS) wurde der Blot mit dem ECL-Chemilumineszenz-Reagenz (Amersham) nach den Vorschriften des Herstellers entwickelt. Die gewaschene Membran wurde für 1 Min. in der frisch angesetzten Entwicklungslösung inkubiert, kurz mit Filtrierpapier abgetupft, in Haushaltsfolie eingeschlagen und sofort auf Kodak-XAR Röntgenfilmen exponiert. Die Exponierungszeit betrug in der Regel nur wenige Sekunden. Alternativ wurden Blots mit Diaminobenzidin oder Chlornaphtol als Substrat entwickelt (Harlow und Lane, 1988). Zur Größenbestimmung wurden die Rf-Werte der Markerproteine gegen den Logarithmus der bekannten Molekulargewichte aufgetragen. Die Größe des zu bestimmenden Proteins wurde durch Interpolation aus dem gemessenen Rf-Wert berechnet.

*BLOCKIERUNGSLÖSUNG:*

Milchpulver 5 % in PBS

**IV.3.29 IMMUNHISTOCHEMIE***HERSTELLEN VON GEFRIERSCHNITTEN*

Gefrierschnitte wurden auf einem Kryostaten (Leitz) angefertigt. Dazu wurde zunächst eine Schicht Einbettmittel (Tissue-Tec; Miles) auf einem auf Trockeneis liegenden Objekthalter aufgetragen und angefroren. Nach nochmaligem Auftragen von Tissue-Tec wurde der gefrorene Embryo auf der noch flüssigen Schicht in die zum Schneiden gewünschte Position gebracht. Langsam wurde schichtweise mehr Einbettmittel um den Embryo aufgetragen bis dieser vollständig umhüllt war (Embryo sollte beim Einbetten nicht auftauen).

Es wurden 5 mm dicke Schnitte angefertigt, die vom Messer mit einem mit Gelatine und Chromalaun beschichteten Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden 15 Min. bei 50 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet und dann in einem mit Klebeband versiegelten Plastibrand-Objektträgerkasten trocken bei -20 °C aufbewahrt.

*IMMUNFÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN*

Die Gefrierschnitte wurden im Objektträgerkasten aufgetaut und in Färbegestelle einsortiert. Darin wurden die Schnitte mit Aceton nachfixiert (30 s, Raumtemperatur), die endogene Peroxidase inhibiert (0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 Min.) und mehrmals in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger einzeln herausgenommen, PBS durch Papiertücher, der Antikörper, 1:200 verdünnt in Blockierungslösung, aufgetragen und für 6 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde viermal je 5 Min. in PBS gewaschen und der Nachweisantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Peroxidasekonjugat DAKO No. P744) wie oben angegeben (1:200 verdünnt) aufgetragen. Nach 60 Min. Inkubation wurde erneut gewaschen und mit DAB-Lösung 5 Min. lang entwickelt.

*BLOCKIERUNGSLÖSUNG*  
5 % Milchpulver in PBS

*DAB-ENTWICKLUNGSLÖSUNG*  
0,5 mg/ml DAB (Sigma)  
filtriert  
0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Danach wurde erneut mit PBS gewaschen, mit einer Alkoholreihe dehydriert, in Eukitt eingedeckelt und im Lichtmikroskop mit Nomarski-Interferenzkontrast beobachtet.

### ***IV.3.30 HISTOLOGISCHE METHODEN***

#### *HÄMATOXILIN-EOSIN-FÄRBUNG*

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung wurde zur Darstellung der frühen Embryonen im Uterus benutzt. Hämatoxilin bewirkt eine Blaufärbung der Zellkerne, während das Zytoplasma durch Eosin rot gefärbt wird. Die Schnitte werden wie o.a. als Paraffinschnitte hergestellt.

#### *Ablauf:*

a. Xylolersatz	3 Min.	l. dH <sub>2</sub> O	1 Min.
b. Xylolersatz	3 Min.	m. Eosin	2 - 3 Min.
c. 100 % EtOH	2 Min.	n. dH <sub>2</sub> O	1 Min.
d. 96 % EtOH	2 Min.	o. 50 % EtOH	2 Min.
e. 90% EtOH	2 Min.	p. 70 % EtOH	2 Min.
f. 80 % EtOH	2 Min.	q. 80 % EtOH	2 Min.
g. 70 % EtOH	2 Min.	r. 90 % EtOH	2 Min.
h. 50 % EtOH	2 Min.	s. 96 % EtOH	2 Min.
i. dH <sub>2</sub> O	einmal kurz eintauchen	t. 100 % EtOH	2 Min.
j. Hämatoxilin (Harris)	5 - 7 Min.	u. Xylolersatz	2 Min.
k. HCl-Alkohol	3x 10 - 30 s..	v. Xylolersatz	2 Min.

Im Anschluß wurden die Schnitte mit *Eukitt*-Einbettmedium eingedeckelt und ü.N. getrocknet.

#### *HCl-ALKOHOL*

500 ml 70 % EtOH  
5 ml konz. HCl

#### *EOSIN:*

0,5 g Eosin in 500ml dH<sub>2</sub>O  
lösen unter Zugabe von zwei  
Tropfen konz. Essigsäure,  
filtrieren

#### *HÄMATOXYLIN:*

fertige Lösung,  
filtrieren

### ***IV.3.31 ARBEITEN MIT GLI1- UND GLI2-MAUSMUTANTEN***

Die *Gli1*-Mauslinie wurde nach den Informationen von Dr. Park und die *Gli2*-Mauslinie entsprechend nach den Informationen von Dr. Mo verpaart und genotypisiert (Park et al., 2000; Mo et al., 1997).

# V. GLOSSAR, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

## GLOSSAR

**D**ie Bedeutung einiger Fachwörter ist hier nochmals aufgeführt.

**Aktivator:** Molekül, das die Aktivität eines Gens anschaltet

**Allel:** Zustandsform eines Gens

**Blastozyste:** Embryonalstadium der Säugetiere, das der Blastula anderer Tierembryonen entspricht und in dem die Einnistung in die Uterusschleimhaut erfolgt (Wolpert et al., 1999); die Blastozyste stellt den Tag E4.0 der Mausembryogenese dar

**Blotting:** Unter Blotting versteht man den Übertrag (Transfer) von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-, RNA- oder Proteingemischen auf spezielle Filter oder Membranen, die den spezifischen Nachweis einer bestimmten Nukleinsäuresequenz oder Proteinspezies erlauben

**cDNA:** komplementäre DNA; wird in der Gentechnik *in vitro* und mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* an isolierter, polyadenylierter, eukaryotischer mRNA, die als Matrize dient, erzeugt

**Cre-Rekombinase:** Enzym, welches die *loxP*-Sequenz erkennt und eine Rekombinasereaktion durchführt. Befinden sich zwei *loxP*-Stellen in der selben Orientierung, wird das Fragment, welches sich zwischen zweier solcher Sequenzen, einschließlich einer *loxP*-Stelle, entfernt. Sind beide *loxP*-



Sequenzen in gegensätzlicher Orientierung, wechselt die *Cre*-Rekombinase die Orientierung des eingefassten Fragmentes.

**detektieren:** nachweisen, erkennen

**downstream:** wörtlich: stromabwärts; in einer Kaskade: unterhalb, als nachgeschalteter Faktor; bei einem Gen: weiter 3´ gelegen

**eigentlicher Embryo:** der Bereich des Embryos, ohne den extraembryonalen Bereich; engl.: embryo proper (räumlicher Begriff) (Beddington und Robertson, 1999)

**Embryo:** Frühstadium der Entwicklung mit embryonalem und extraembryonalem Bereich (räumlicher Begriff)

**Enhancer:** DNA-Sequenzen in 5´-Richtung vor eukaryotischen Promotoren, deren Funktion die Erhöhung der Transkriptionsrate ist

**Epiblast:** primitives Ektoderm

**ES-Zellen (embryonale Stammzellen):** pluripotente Stammzellen, die aus der Mausblastozyste hergestellt werden und sich *in vivo* zu allen Geweben, einschließlich der Keimbahnzellen, differenzieren

**gastrulärer Embryo:** Embryo, der sich im Gastrulationsstadium befindet; Zeitraum E6,5 bis E8,0 (Hogan et al., 1994)

**generieren:** herstellen

**Gen-Knock-out (KO):** gezielte Deletion oder Inaktivierung (eines Gens); Verlustmutante

**Genexpression:** Aktivität eines Gens

**Homologe Gene:** Gene, die signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Nukleotidsequenz besitzen, da sie von einem gemeinsamen Urgen abstammen

**Homologe Rekombination:** Rekombination zweier DNA-Moleküle an einer bestimmten Stelle, an denen sich ihre Sequenzen ähneln (Wolpert et al., 1999); Erzeugung neuer Kombinationen des genetischen Materials durch Austausch von Nukleinsäuremolekülen

**Insert:** Insert-DNA, Passagier-DNA, Fremd-DNA

**in-situ-Hybridisierung:** Technik, mit deren Hilfe man nachweisen kann, wo im Embryo bestimmte Gene exprimiert werden.

**IRES:** interne ribosomale Verstärkerstelle (engl. internal ribosomal enhancer site)

**Keimbahn:** Zellen, die sich zu Spermien und Eizellen entwickeln

**Kluster:** Zellgruppe

**Konservierung:** evolutive Erhaltung

**Konstrukt:** DNA-Molekül, das durch *in-vitro*-Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle entstanden ist

**lacZ-Gen:**  $\beta$ -Galaktosidase-kodierendes Cistron des *Lac*-Operons von *E. coli*

**LoxP:** 34bp-Sequenz, welche spezifisch von der *Cre*-Rekombinase erkannt wird

**Mauschimären:** Mäuse, die mittels ES-Zell-Aggregation oder ES-Zell-Injektion in Blastozysten hergestellt werden. Diese haben Organe und Gewebe welche ES-Zell- oder "Gastembryo"-Ursprungs sind. Weiterhin zeigt die Fellfarbe eine Mischfarbe, welche ein Hinweis über den Grad des Chimarismus darstellt.

**Morula:** frühes Stadium des Säugerembryos ab ca. 8 Zellen (Blastomere) oder mehr. Sie zeigt die Gestalt einer Beere (Morula)

**Northern-Blot:** RNA-Blot, RNA-Transfer

**Pluripotenz:** Kapazität von Zellen sich in die meisten Zelltypen des Organismus zu entwickeln. So entwickeln sich die Maus-ES-Zellen sich zu allen Geweben bis auf die Plazenta. Totipotente Zellen können sich dagegen in alle Zelltypen entwickeln.

**prägastrulärer Embryo:** Embryo, der sich vor dem Gastrulationsstadium befindet; Zeitraum E5,5 bis E6,5 (Hogan et al., 1994)

**Primer:** jede Oligonukleotidsequenz, die nach Hybridisierung mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure einen kurzen doppelsträngigen Bereich mit freier 3'-OH-Gruppe liefert und damit ein weiteres Auffüllen über *DNA-Polymerasen* oder *Reverse Transkriptasen* ermöglicht

**Probe:** Sonde (durch Denaturieren einzelsträngiger RNA oder DNA), welche zum Hybridisieren benutzt wird

**Promotor:** *RNA-Polymerase*-Bindungsstelle, Ort der Initiation der Transkription

**prospektiv:** zukünftig

**Repressor:** Molekül, das die Aktivität eines Gens unterdrücken

**Reportergen:** Im Gegensatz zu selektierbaren Markergenen, die eine Auslese rekombinanter Klone oder transgener Organismen gestatten, kann ein erfolgreicher Gentransfer auch über Reportergene anhand eines leicht erkennbaren Phänotyps erfolgen (z. B. *β-Galaktosidase*-Färbung).

**Selektionsmarker:** Bezeichnung für eine DNA-Sequenz, die es ermöglicht ein Auswahlverfahren für Organismen, die einen veränderten Geno- oder Phänotyp haben, durchzuführen

**Southern-Blot:** DNA-Blot, DNA-Transfer

**transgene Maus:** Maus mit verändertem Genom durch z. B. stabile Integration eines neuen Gens oder die Inaktivierung eines bestimmten Gens

**targeting construct:** Rekombinationskonstrukt

**upstream:** wörtlich: stromaufwärts; in einer Kaskade: oberhalb, als vorgeschalteter Faktor; bei einem Gen: weiter 5' gelegen

**Western-Blot:** Protein-Blot, Protein-Transfer

**whole-mount-Hybridisierung:** *in-situ*-Hybridisierung auf ganzen Embryonen

**whole-mount-in-situ-Hybridisierung:** Gesamtkörper-*in-situ*-Hybridisierung

## ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Neben den konventionellen physikalischen Einheiten, chemischen Symbolen und dem Ein- und Dreibuchstabenkode für Aminosäuren finden folgende Abkürzungen und Symbole Verwendung:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase)
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
d	Tag
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser (Millipore)
dATP	desoxy-Adenosintri-phosphat
dCTP	desoxy-Cytidintri-phosphat
dGTP	desoxy-Guanosintri-phosphat
dTTP	desoxy-Thymidintri-phosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	desoxy-Nukleotidtri-phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	ötales Kälber Serum (fetal calf serum)
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galaktosid
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukaemia Inhibiting Faktor
Lsg.	Lösung
$\mu$	micro
m	milli
M	molar
Min.	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Neo	Neomycin
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
p.c.	post coitum
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu	infektiöse Partikel (plaque forming units)
PIPES	Pipazarin-N-N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PVP	Polyvenyl-Pyrrolidon
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RSA (BSA)	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
ST I	Standard-I Nährmedium/Agar
ss	einzelsträngige
SSC	NaCl/NaCitrat (standard saline citrate solution)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Entwicklungskontrollgen *Irx1* gehört zur murinen *Iroquois*-Genfamilie. Diese umfaßt sechs Familienmitglieder, welche in zwei Tandemstrukturen im Genom organisiert sind. *Irx1* zeichnet sich durch eine konservierte Homeo- und eine *Iro*-Box aus. Die Homeobox stellt ein klassisches DNA-Bindungsmotiv dar, wohingegen die *Iro*-Box für ein neues Protein-Protein-Bindungsmotiv kodiert.

Das Gen *Irx1* zeigt ein spezifisches räumliches und zeitliches Expressionsmuster. *Irx1*-Expression läßt sich im Embryo ab dem Stadium E6,5 und nach der Geburt nachweisen. Im prägastrulären Embryo ist *Irx1* im extraembryonalen Ektoderm exprimiert und diese Expression verändert sich im Laufe der Gastrulation, so daß an deren Ende das embryonale Mesoderm und der Primitivknoten *Irx1*-Aktivität aufweisen. Während der Entwicklung zeigt *Irx1* eine spezifische Expression sowohl während der Bildung des zentralen Nervensystems als auch während der embryonalen Lungen- und Extremitätenentwicklung. Dabei stellt *Irx1* einen exzellenten Marker für die Entwicklung der Phalangen dar. Die Analyse der Expression von *Irx1* während der Fingerentwicklung wurde im Vergleich zu *Irx2* und den *Gli*-Genen, als potentielle Regulatorgene, durchgeführt.

Für die Analyse der Funktion des *Irx1*-Gens in der späteren embryonalen Entwicklung wurden die potentiell evolutiv konservierten Regulationspartner untersucht. Die Analyse der *Gli1*- und *Gli2*-Mausmutanten konnte eine Interaktion mit *Irx1* zeigen, was auf eine konservierte Regulatorfunktion hindeutet. Die *in vitro*-Analyse eines potentiellen Zielgens von *Irx1* ergab, daß keine Aktivierung des *Mash1*-Promotors vorliegt. Die Regulation *Gli-Irx-Mash* ist in der Maus nur teilweise evolutiv erhalten geblieben, so sind die

Interaktionspartner der regulativen Kaskade identisch, aber nicht die funktionelle Ausprägung.

Die Funktion von *Irx1* wurde durch eine gezielte Inaktivierung des Gens über homologe Rekombination in ES-Zellen untersucht. *Irx1*-defiziente Embryonen sterben embryonal und letzte Reste mutanter Embryonen sind maximal bis zum Stadium E10,5 zu erkennen. *Irx1*-defiziente Embryonen weisen eine vermehrte Bildung an mesodermal erscheinenden Zellen im extraembryonalen Bereich auf. Dies führt dazu, daß die extraembryonalen Höhlen sich nicht ausbilden, sondern mit Zellen angefüllt sind. Es konnten Mißexpressionen verschiedener embryonal bedeutsamer Gene wie *BMP4*, *Brachyury*, *Gbx2* oder *Otx2* gezeigt werden. Sie sind die genetischen Marker für das extraembryonale Mesoderm, den Primitivstreifen oder das anteriore viszerale Endoderm. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, daß *Irx1* eine essentielle Rolle während der Gastrulation spielt und wesentlich an der Bildung und Umsetzung der induktiven Funktionen der posterioren und auch der anterioren viszeralen Entwicklung beteiligt ist.



# VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avataggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to the defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.
- Ang, S.-L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., and Rossant, J. (1996). A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122, 243-252.
- Ang, S. L., and Rossant, J. (1994). *HNF-3 $\beta$*  is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-574
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. S., and Lake, R. J. (1999). *Notch* signalling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. I + II (New York: John Wiley & Sons).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1995). *Short protocols in molecular biology*, 3rd Edition (New York: John Wiley & Sons).
- Baker, J. C., Beddington, R. S. P., and Harland, R. M. (1999). *Wnt* signalling in *Xenopus* embryos inhibits *BMP4* expression and activates neural development. *Genes Dev.* 13, 3149-3159.

- Ball, D. W., Azzoli, C. G., Baylin, S. B., Chi, D., Dou, S., Donis-Keller, H., Cumaraswamy, A., Borges, M., and Nelkin, B. (1993). Identification of a human *achaete-scute* homologue highly expressed in neuroendocrine tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5648-5652.
- Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E., and Cepko, C. L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. Science 283, 1161-4.
- Bard, J. B. L., and Kaufmann, M. H. (1994). The mouse., J. B. L. Bard, ed. (London: Wolfe Publishing).
- Becker, M. B., Zülch, A., and Gruss, P. (2001). *Irx2* and *Irx1* expression in early lung development. Mech. Dev. in Press.
- Beddington, R. S. P., and Robertson, E. J. (1998). Anterior patterning in mouse. TIG 14, 277-284.
- Beddington, R. S. P., and Robertson, E. J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. Cell 96, 195-209.
- Belaousoff, M., Farrington, S. M., and Baron, M. H. (1998). Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. Development 125, 5009-5018.
- Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B., and Papalopulu, N. (1998). *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* genes and functions in neural specification. EMBO J. 17, 191-203.
- Belo, J. A., Bouwmester, T., Leyns, T., Kertesz, L., Gallo, N., Follettie, M., and De Robertis, E. M. (1997). *Cerberus-like* is a secreted factor with neuralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. Mech. Dev. 68, 45-57.

- Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K. (2000). *BMP type II receptor* is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.* 221, 249-58.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1512-1523.
- Bosse, A., Stoykova, A., Nieselt-Struwe, K., Chowdury, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and P, G. (2000). Identification of a novel mouse *Iroquois* homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localization of all members of the mouse *Iroquois* gene family. *Dev. Dyn.* 218, 160-174.
- Bosse, A., Zülch, A., Becker, M. B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate *iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.* 69, 169-181.
- Bronson, S., and Smithies, O. (1994). Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269, 27155-8.
- Bruneau, B., Bao, Z., Tanaka, M., Schott, J., Izumo, S., Cepko, C., Seidman, J., and Seidman, C. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev. Biol.* 217, 266-277.
- Burglin, T. R. (1997). Analysis of *TALE* superclass homeobox genes (*MEIS*, *PBX*, *KNOX*, *Iroquois*, *TGF*) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25, 4173-4180.
- Bürki, K. (1986). *Experimental embryology of the mouse*. (Basel: Karger).
- Büscher, D., and Rüther, U. (1998). Expression profile of *Gli* family members and *Shh* in normal and mutant mouse limb development. *Dev. Dyn.* 211, 88-96.
- Calvin, N. M., and Hanawalt, P. C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170, 2796-2801.

- Capecchi, M. R. (1989). Altering the mouse genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.
- Chitins, A., Henrique, D., J., L., Ish-Horowitz, D., and Kintner, C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos is regulated by homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* 375, 761-766.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *Biotech.* 15, 532-536.
- Chomczynski, P., and Quasba, P. K. (1984). Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122, 340-344.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chou, and Fasman (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-178.
- Cohen, D. R., Cheng, C. W., Cheng, S. H., and Hui, C. C. (2000). Expression of two novel mouse *Iroquois* homeobox genes during neurogenesis. *Mech. Dev.* 91, 317-321.
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Hermann, B., and Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for *nodal* in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 126, 1919-1928.
- Coucouvanis, E., and Martin, G. R. (1999). *BMP* signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126, 535-46.
- Dambly-Chaudière, C., and Leynes, L. (1992). The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int. J. Dev. Biol.* 36, 85-91.

- Doetschman, T., Maeda, N., and Smithies, O. (1988). Targeted mutation of the *Hprt* gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl .Acad. Sci. U S A* 85, 8583-7.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R., and Baron, M. H. (2001). *Indian hedgehog* activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neuroectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* 128, 1717-1730.
- Fahrner, K., Hogan, B. L. M. and Flavell, R. A. (1987). Transcription of *H-2* and *Qa* genes in embryonic and adult mice. *EMBO J.* 6, 1265-1271.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Funayama, N., Sato, Y., Matsumoto, K., Ogura, T., and Takahashi, Y. (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* 126, 4129-38.
- Gardner, R. L. (1998). Axial relationships between egg and embryo in the mouse. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39, 35-71.
- Gardner, R. L. (1997). The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 124, 289-301.
- Gardner, R. L., and Rossant, J. (1979). Investigation of the fate of 4 - 5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 52, 141-152.

- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
- Gehring, W. J. (1994). *Guidesbook to the Homeobox Genes.*, D. Duboule, ed. (Oxford: Oxford University Press).
- Gómez-Skarmeta, J. L., del lal Calle-Mustiemces, E., and Modolell, J. (2001). The *Wnt*-activated *Xiro1* gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates *Bmp4*. *Development* 128, 551-560.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., del lal Calle-Mustiemces, E., Ferrés-Marcó, M. D., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolitan*, two members of the novel *Iroquois* complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* 85. 95-105.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., del lal Calle-Mustiemces, E., Modolell, J., and Mayor, R. (1998). *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* 17, 181-190.
- Gómez-Skarmeta, J. L., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolitan* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* 10, 2935-2945.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culi, J., Ferrés-Marcó, M. D., Belmonte, D., and Modolell, J. (1995). *Cis*-regulation of *achaete* and *scute*: Shared *enhancer-like* elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev.* 9, 1869-1882.
- Goriely, A., Diez del Corral, R., and Storey, K. G. (1999). *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech. Dev.* 87, 203-6.

- Greene, L. A., and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2424-2428.
- Gu, Z., Reynolds, E. M., Song, J., Lei, H., Feijen, A., Yu, L., He, W., MacLaughlin, D. T., van den Eijnden-van Raji, J., Donahoe, P. K., and Li, E. (1999). The *type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2)* is required for gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126, 2551-2561.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, D. J., Anderson, D. J., and Joyner, A. L. (1993). *Mammalian achaete-scute homolog 1* is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.
- Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, D. J., Rossant, J., and Joyner, A. L. (1994). Essential role of *Mash-2* in extraembryonic development. *Nature* 371, 333-336.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of a chick. *J. Morph.* 88, 49-92.
- Hanahan, D. H. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*, D. M. Glover, ed. (Oxford: IRL Publisher).
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). Antibodies. A laboratory manual., C. S. Harbour, ed. (New York: Cold Spring Harbour Laboratory).
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Cateret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of Split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-171.
- Helling, R. B., Goodman, H., and Boyer, H. W. (1974). Analysis of *endonuclease R EcoRI* fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. of Virology* 14, 1235-1244.

- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. A. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* 88, 13-17.
- Heng, H. H. Q., Squire, J., and Tsui, I.-C. (1992). High resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9509-9513.
- Heng, H. H. Q., and Tsui, I.-C. (1993). Modes of *DAPI* banding and simultaneous *in situ* hybridization. *Chromosoma* 102, 325-332.
- Hermann, B. G. (1991). Expression pattern of the *Brachyury* gene in *whole mount Twis/Twis* mutant embryos. *Development* 127, 4905-4913.
- Herrmann, B. G., Labelt, S., Poustka, A., King, T. R., and Lehrach, H. (1990). Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-622.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, 2nd Edition (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Hogan, B. L. (1996). *Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development*. *Genes Dev.* 10, 1580-1594.
- Hogan, B. L., and Yingling, J. M. (1998). Epithelial/mesenchymal interactions and branching morphogenesis of the lung. *Curr. Opin. Gene Dev.* 8, 481-486.
- Jessell, T. M., and Sanes, J. R. (2000). The decade of the developing brain. *Curr. Opin. Neuro. Biol.* 10, 599-611.
- Johnson, P. H., and Grossman, L. I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16, 4217-4225.



- Kaestner, K. H., Lee, K.-H., Schlöndorff, J., Hiemisch, H., Monaghan, A. P., and Schütz, G. (1993). Six members of the mouse *forkhead* gene family are developmentally regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 76628-76631.
- Kaufmann, M. H., and Bard, J. B. L. (1999). The anatomical basis of mouse development. (London: Academic Press).
- Khysen-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.
- Kirby, K. S. (1956). A new method for the isolation of desoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between desoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* 66, 495-504.
- Kispert, A., and Hermann, B. G. (1994). Immunohistochemical analysis of the *Brachyury* protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev. Biol.* 161, 179-193.
- Laemmli, E. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4*. *Nature* 227, 680-685.
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A., Wright, C. V., Korving, J. P., and Hogan, B. (1999). *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424-36.
- Lewis, M. T., Ross, S., Strickland, P. A., Snyder, C. J., and Daniel, C. W. (1999). Regulated expression patterns of *IRX-2*, an *Iroquois*-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tis. Res.* 296, 549-54.
- Leyns, L. (1991). Patterns des organes sensorieles: isolement et étude de gènes. (Bruxelles: Université Libre de Bruxelles).

- Leyns, L., Gomez-Skarmeta, J., and Dambly-Chaudiere, C. (1996). *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 59, 63-72.
- Liu, P. W., M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R., and Bradley, A. (1999). Requirement for *Wnt3* in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* 22, 361-365.
- Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D. Q. (1996). Identification of *neurogenin*, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- Manning, J. E., Hershey, N. D., Broker, T. R., Pellegrini, M., Mitchell, H. K., and Davidson, N. (1975). A new method of *in situ* hybridization. *Chromosoma* 53, 107-117.
- Mansouri, A. (2001). Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice., Volume 175, P. M. Starkey and R. Elaswarapu, eds. (Totowa, NY: Humana Press Inc.).
- Mansouri, A. (2000). *Mouse Knockouts*., 2nd, (Macmillian Refernce Ltd.).
- Marmur, J. (1960). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* 9, 2646-58.
- Mayor, R., Young, R., and Vargas, A. (1999). Development of Neural Crest in *Xenopus*., Volume 43, R. A. Pedersen and G. P. Schatten, eds. (San Diego: Academic Press).
- McDonell, M. W., Simon, M. N., and Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of *T7* DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110, 119-146.

- McDougall, J. K., Dunn, A. R., and Jones, K. W. (1972). *In situ* hybridization of adenovirus RNA and DNA. *Nature* 236, 346-348.
- McMahon, A. P. (2000). Neural patterning: The role of *Nkx* genes in the ventral spinal cord. *Genes Dev.* 14, 2261-2264.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J., and Simon, M. A. (1997). *mirror* encodes a novel *PBX*-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* 11, 1073-1082.
- Meyers, E. N., Lewandowski, M., and Martin, G. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by *Cre*- and *Flp*-mediated recombination. *Nat. Genet.* 18.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Ueno, N., and Behringer, R. R. (1995). Genomic organization and chromosomal location of the *mouse type I BMP-2/4 receptor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 310-7.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., and Behringer, R. R. (1995). *Bmpr* encodes a *type I bone morphogenic protein receptor* that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 9, 3027-3037.
- Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., and Cheng, S. H. (1997). Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in the skeletal patterning and development. *Development* 124, 113-123.
- Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M., and C.C., H. (1998). Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of the lung, trachea and oesophagus. *Nat. Genet.* 20, 54-57.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Nature* 292, 635-638.

- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K. F. i. (1997). *Xenopus Zic3*, a primary regulator both in neural and neural crest development. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94, 11980-5.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. 1, 841-845.
- Nomura, M., and Li, E. (1998). *Smad2* role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. Nature 393, 786 - 790.
- Ohsako, S., Hyer, J., Pangianiban, G., Oliver, I., and Caudy, M. (1994). *hairy* function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. Genes Dev. 8, 2743-2755.
- Orenic, T., Chidsey, J., and Holmgren, R. (1987). *Cell* and *cubitus interruptus* dominant: two segment polarity genes on the fourth chromosome in *Drosophila*. Dev. Biol. 124, 50-56.
- Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matise, M. P., Beeghly, A., Hui, C. c., Nakashima, M., and Joyner, A. L. (2000). Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in *SHH* signalling in combination with a *Gli2* mutation. Development 127, 1593-1605.
- Patten, B. M. (1971). The Early Embryology of the Chick. (New York: McGraw-Hill)
- Pedersen, R. A. (2001). Sperm and mammalian polarity. Nature 409, 473 - 474.
- Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., and Rüther, U. (2000). Organization of mouse *Iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. Genome Res. 10.
- Piotrowska, K., and Zernicka-Goetz, M. (2001). Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. Nature 409, 517-21.

- Posakony, J. W. (1994). Nature versus nature: Asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76.
- Qiagen. (2000). Qiagen-Handbook (Hilden).
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M., and P., H. (1993). *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev.* 3, 997-1007.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M., and Ang, S. L. (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845-56.
- Robertson, E. J. (1987). Embryo-derived stem cell lines, in *Tertocarcinomas and Embryonic Stem Cells.*, E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL).
- Rosenquist, T. A., and Martin, G. R. (1995). *Visceral endoderm-1 (VE-1)*: an antigen marker that distinguishes anterior from posterior embryonic visceral endoderm in the early post-implantation embryo. *Mech. Dev.* 49, 117-121.
- Rossant, J. (1995). Development of the extraembryonic lineages. *Sem. Dev. Biol.* 6, 237-247.
- Rugh, R. (1990). *The Mouse - Its Reproduction and Development.* (Oxford: Oxford University Press).
- Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M. M., and Ish-Horowicz, L. (1989). The *Drosophila hairy* protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to *N-myc*. *EMBO J.* 8, 3095-3103.
- Russ, A. P., Wattler, S., Colledge, W. H., Aparicio, S. A., Carlton, M. B., Pearce, J. J., Barton, S. C., Surani, M. A., Ryan, K., Nehls, M. C., and al., e. (2000). *Eomesodermin* is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404.

- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -*globin* and *HLA-DQa* DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable *DNA polymerase*. *Science* 239, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -*globin* genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sambroock, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Edition, C. S. H. Laboratory, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sauer, B. (1993). Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of *Cre* recombinase. *Meth. Enzym.* 225, 890-900.
- Schmid, J. E., Suzuki, A., Ueno, N., and Kimelman, D. (1995). Localized *BMP-4* mediates dorsal/ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* 169, 37-50.
- Simpson, P. (1997). *Notch* signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7.
- Sirard, C., de la Pompa, J. L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S.E. and Rossant, J. (1998). The tumor

- suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 12, 107-119.
- Skeath, J. B., and Carroll, S. B. (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* 5, 984-995.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stern, C. (1954). Two or three bristles. *Am. Sci.* 42, 213-247.
- Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G. (1990). System for high-level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: applications to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunol. Meth.* 4, 121-152.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorf, J. W. (1990). Use of *T7 RNA polymerase* to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60-89.
- Suzuki, A., Ueno, N., and Hemmati-Brivanlou, A. (1997). *Xenopus msx1* mediates epidermal induction and neural inhibition by *BMP4*. *Development* 124, 3037-3044.
- Tabor, S., and Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified *bacteriophage T7* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.
- Tam, P. P. L., and Behringer, R. R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* 68, 3-25.
- Tan, J. T., Korzh, V., and Gong, Z. (1999). Expression of a zebrafish *iroquois* homeobox gene, *Ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech. Dev.* 87, 165-8.

- Tanabe, Y., and Jessel, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-1123.
- Tang, S. J., Hoodless, P. A., Lu, Z., Breitmann, M. L., McInnes, R. R., Wrana, J. L., and Buchwald, M. (1998). The *Tlx-2* homeobox gene is a downstream target of *BMP* signalling and is required for mouse mesoderm development. *Development* 125, 1877-1887.
- Taniguchi, M., Sanbo, M., Watanabe, S., Naruse, I., Mishina, M., and Yagi, T. (1998). Efficient production of *Cre*-mediated site-directed recombinants through the utilization of the *puromycin* resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES-cells. *Nucleic Acid Res.* 26, 679-680.
- Ten Have-Opbroek, A. (1991). Lung development in the mouse embryo. *Exp. Lung Res.* 17, 111-130.
- Theil, T., Kaesler, S., Grotewold, L., Bose, J., and Rütger, U. (1999). *Gli* genes and limb development. *Cell Tis. Res.* 296, 75-83.
- Theiler, K. (1989). The house mouse. Atlas of embryonic development. (Berlin, Heidelberg, New, York, Tokyo: Springer).
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thomas, P., and Beddington, R. S. P. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol.* 6, 1486-1496.
- Thomas, P. Q., Brickman, J., Pöpperl, H., Krumlauf, R., and Beddington, R. S. R. (1997). Axis duplication and anterior identity in the mouse embryo., Volume LXII (New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).



- Thomas, P. Q., Brown, A., and Beddington, R. S. P. (1998). *Hex*: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125, 85-94.
- Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-65.
- Thorne, H. V. (1966). Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *J. Mol. Biol.* 24, 203-211.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4353.
- Treisman, J., Gonczy, P., Vashishtha, M., Harris, E., and Desplan, C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59, 553-562.
- Verma-Kurvari, S., Savage, T., Smith, D., and Johnson, J. E. (1998). Multiple elements regulate *Mash1* expression in the developing CNS. *Dev. Biol.* 197, 106-116.
- Vervoort, M. (2000). *hedgehog* and *wing* development in *Drosophila*: a morphogen at work? *Bioassays* 22, 460-468.
- Viebahn, C. (1999). The anterior margin of the mammalian gastrula: comparative and phylogenetic aspects of its role in axis formation and head induction. *Curr. Top. Dev. Biol.* 46, 63-103.
- Waldrip, W. R., Bikoff, E. K., Hoodless, P. A., Wrana, J. L., and Robertson, E. J. (1998). *Smad2* signalling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 92, 797-808.
- Wassarman, K. M., Lewandowski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., and Martinez, S. M., G. (1997). Specification of the anterior hindbrain and

- establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* 124, 2923-2934.
- Watanabe, S., Kai, N., Yasuda, M., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. (1995). Stable production of mutant mice from double gene converted ES cells with *puromycin* and *neomycin*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 213, 130-137.
- Weber, R. J., Pedersen, R. A., Wianny, F., Evans, M. J., and Zernicka-Goetz, M. (1999). Polarity of the mouse embryo is anticipated before gastrulation. *Development* 126, 5591-5598.
- Wehner, R., and Gehring, W. (1995). *Zoologie*, Volume 23. Aufl. (Stuttgart, New York: Thieme-Verlag).
- Wilkinson, D. G. (1992). *in situ* hybridisation; a practical approach. (London: Oxford University Press).
- Wilson, P. A., Lagna, G., Suzuki, A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by *BMP4* and its signal transducer *Smad1*. *Development* 124, 3177-3184.
- Wilson, V., Manson, L., W.C., S., and Beddington, R. S. P. (1995). The *T* gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* 121, 877-886.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., and Hogan, B. M. (1995). *Bone-morphogenic protein-4* is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9, 2105-2115.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., and Meyerowitz, E. (1999). *Entwicklungsbiologie* (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

Zülch, A. (1997). Struktur- und Funktionsanalyse eines *Iroquois*-verwandten Gens der Maus -*Irx2*. In Abt. Molekulare Zellbiologie, MPIBPC (Göttingen: Universität zu Göttingen).

Zülch, A., Becker, M. B., and Gruss, P. (2001). Expression pattern of *Irx1* and *Irx2* during mouse digit development. Mech. Dev. in Press.

## VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die durch ihr Verständnis, ihre Geduld, ihre eigene Motivation und Begeisterungsfähigkeit mir den Laboralltag mit viel Freude erfüllt haben. Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und mit am Gelingen meiner Promotion beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Gruss für seine Unterstützung und die Möglichkeit, dieses faszinierende Thema in seinem Labor zu bearbeiten. Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. M. Schäfer für die vielen hilfreichen Diskussionen und für die Übernahme der Begutachtung. Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Entgegenkommen.

Meinen großen Dank möchte ich Ahmed Mansouri und auch Maria Belaousoff aussprechen, die mit hilfreichen Erklärungen und Diskussionen maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Christopher Brink für die täglichen Hilfen und gesellschaftspolitischen Unterhaltungen.

Danken möchte ich auch meinen Laborstudenten Nora Speer, David Hecker und Wencke Armsen, mit denen es immer einen riesen Spaß gemacht hat zusammenzuarbeiten.

Ich richte meinen Dank an Dieter Treichel, Barbara Meyer und Joachim Berger für ihre tolle Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor Maria Belaousoff, Christopher Brink, Guy Goudrou, Nicole Andrejewski und Martin Balastik bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch der " *Iroquois*-Gruppe" mit Juan Modolell (Spanien), José Luis Gómez-Skarmeta (Spanien), Roberto Mayor (Chile), May-Britt Becker, Kate Storey (England) und Peter Gruss für die vielen Ideen und Diskussionen.

Besonders herzlicher Dank gilt May-Britt Becker, Nora Speer, Christopher Brink und Maria Belaoussoff, für die Hilfe, Korrektur und kritischen Kommentare in den letzten Tagen.

Marianne Schuster möchte ich für die Rechtschreibkorrekturen danken, die sie trotz ihrer eigenen vielen Arbeit gerne übernahm.

Ich möchte all jenen danken, die mir vielseitig geholfen haben, wie Jens Krull, Sabine Geisendorf, Silke Eckert, Silke und Sharif, den Mitgliedern der Tierstall-Truppe unter der Leitung von Rainer Libal und dem Spül-Küchen-Team.

Ich danke meiner geliebten May-Britt - einfach für alles !

Mein Dank gilt meinen geliebten Eltern, die mich immer in jeder erdenklichen Weise unterstützt und gefördert haben.

# IX. PUBLIKATIONEN

Bosse, A., **Zülch, A.**, Becker, M. B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate *iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.* *69*, 169-181.

**Zülch, A.**, and Gruss, P. (2000). Functional analysis of the two gene trap lines 9A-85 and 6A-126. AMGEN report, 205-211.

Becker, M.-B., **Zülch, A.**, and Gruss, P. (2001). Von der undifferenzierten Zelle zum komplexen Organismus. *Biologie in unserer Zeit* *2*, 88-97.

**Zülch, A.**, Becker, M. B., and Gruss, P. (2001). Expression pattern of *Irx1* and *Irx2* during mouse digit development. *Mech. Dev.* *in Press*.

Becker, M. B., **Zülch, A.**, and Gruss, P. (2001). *Irx2* and *Irx1* expression in early lung development. *Mech. Dev.* *in Press*.

**Zülch, A.**, Becker, M.-B., and Gruss, P. (2001). *Irx1*, a prepattern gene essential during murine gastrulation. in Vorbereitung.

**Zülch, A.**, Becker, M. B., Mansouri, A., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001). The proneural gene *Mash1* is essential for *C-cell* differentiation. in Vorbereitung.

Lemaire, L., **Zülch, A.**, and Gruss, P. (2001). *PAX4* is misexpressed in human pancreatic cancer. in Vorbereitung.

# X. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:	<b>Armin Uwe Zülch</b> Am Weendespring 24A 37077 Göttingen *16.01.1970, in Homberg/Efze ledig deutscher Staatsbürger
1980 - 1989	Besuch des Gymnasiums in Homberg/Efze Abschluß: Allgemeinen Hochschulreife; Note "sehr gut"
1989 - 1991	Wehrdienst
Okt. 1991 - Jan. 1997	Studium der Biologie an der Universität Göttingen
Okt. 1993	Diplomvorprüfung: Molekulare Genetik, Zoologie, Anorganische Chemie und Physik; Note: "gut"
Nov. 1993 - Okt. 1995	Hauptstudium mit Schwerpunkt Molekulare Genetik
Nov. 1995	Mündliche Diplomhauptprüfung im Hauptfach Molekulare Genetik und den Nebenfächern Entwicklungsbiologie und Biophysik
Jan. 1996 - Jan. 1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Peter Gruss. Thema: "Struktur- und Funktionsanalyse eines <i>Iroquois</i> -verwandten Gens der Maus - <i>Irx2</i> "
Feb. 1997	Verleihung des Hochschulgrades Diplom-Biologe an der Universität Göttingen; Note: "sehr gut"
März 1997- Mai 2001	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Peter Gruss. Thema: "Funktionsanalyse des <i>Irx1</i> -Gens"