
ELEKTROPORATION:

EINE METHODE ZUR TRANS-
FEKTION VON WIRBELTIEREMBRYONEN

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Diplom-Biologen Wolfgang Andres Vukovich
aus Wien (Österreich)

Göttingen, 2002

D7

Referent: Prof. Dr. Michael Kessel

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Ehlers

Tag der mündliche Prüfung:.....24.4.2002.....

Die Arbeit wurde von März 1998 bis März 2002 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen an der Abteilung für Molekulare Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. M. Kessel angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Von der deskriptiven Analyse zum Experiment	8
1.2 Gentransfermöglichkeiten	11
1.3 Theorie der Elektropermeabilisierung	14
1.4 Frühe Embryogenese des Huhns	22
1.5 Musterbildungsprozesse bei der Anlage der Neuralplatte	23
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	27

2. Material und Methoden

2.1 Material	28
2.1.1 RADIOCHEMIKALIEN	28
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	28
2.1.3 Reaktionssets	28
2.1.4 ENZYME	29
2.1.4.1 Restriktionsenzyme	29
2.1.4.2 Sonstige Enzyme	29
2.1.5 MEMBRANEN	29
2.1.6 VEKTOREN	29
2.1.7 ANTIKÖRPER	29
2.1.7.1 Primäre Antikörper	29
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper	30
2.1.8 GRÖßENMARKER	30
2.1.9 OLIGONUKLEOTIDE	30
2.1.10 FILME	31
2.1.11 PHOTOARBEITEN UND SEQUENZBEARBEITUNG	31
2.1.12 ZELLINIEN	31
2.1.13 MEDIEN/NÄHRLÖSUNGEN/STANDARDLÖSUNGEN	31
2.2 Methoden	33
2.2.1 ISOLIERUNG VON PLASMID DNA AUS BAKTERIEN	33
2.2.1.1 Plasmidpräparation mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit	33
2.2.1.2 Plasmidpräparation mit dem Qiafilter Maxiprep Kit	34
2.2.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN VON NUKLEINSÄUREN	34
2.2.3 HERSTELLUNG DER DNA LÖSUNG FÜR EMBRYO ELEKTROPORATION	34
2.2.4 AGAROSE GEL ELEKTROPHORESE	34
2.2.5 GEWINNUNG VON DNA FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN	35
2.2.5.1 Qia-Quick Gel Extraction Kit	35
2.2.5.2 Elektroelution	35
2.2.6 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA	36
2.2.7 AUFREINIGUNG VON DNA LÖSUNGEN	36

2.2.7.1 Phenol/Chloroform Extraktion- - - - -	36
2.2.7.2 Dialyse- - - - -	37
2.2.7.3 Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen - - - - -	37
2.2.7.4 Isopropanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen - - - - -	37
2.2.8 LIGATIONEN VON DNA FRAGMENTEN - - - - -	37
2.2.8.1 Klonierung von doppelsträngigen synthetischen Oligonukleotiden	38
2.2.8.2 T4 DNA Polymerase - - - - -	38
2.2.8.3 Klenow Polymerase- - - - -	39
2.2.8.4 Dephosphorylierung von DNA Enden - - - - -	39
2.2.9 ISOLIERUNG VON EMBRYONALER RNA - - - - -	39
2.2.10 CDNA ERSTSTRANGSYNTHESE - - - - -	40
2.2.11 STANDARD POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR) - - - - -	41
2.2.12 REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASE KETTEN REAKTION - - - - -	41
2.2.13 MARKIERUNG VON RNA SONDEN - - - - -	42
2.2.14 AUFREINIGUNG VON RNA SONDEN - - - - -	43
2.2.15 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA FRAGMENTEN - - - - -	43
2.2.16 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN - - - - -	44
2.2.16.1 Kommerziell bezogene Bakterienstämme - - - - -	44
2.2.16.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien - - - - -	45
2.2.16.2 Bakterielle Transformation durch Elektroporation - - - - -	46
2.2.16.3 Bakterielle Transformation durch Hitzeschock - - - - -	46
2.2.17 DNA SEQUENZIERUNG - - - - -	46
2.2.18 NORTHERN BLOT - - - - -	47
2.2.18.1 Gel und Transfer auf Nitrozellulosemembranen - - - - -	47
2.2.18.2 Hybridisierung der Membranen - - - - -	48
2.2.19 <i>IN-SITU</i> HYBRIDISIERUNG AM GANZEN EMBRYO - - - - -	49
2.2.20 RADIOAKTIVE <i>IN-SITU</i> ANALYSE - - - - -	52
2.2.21 EMBRYOLOGISCHE METHODEN- - - - -	55
2.2.21.1 Kollagenkultur - - - - -	55
2.2.21.2 In vitro Kultivierung von Hühnerembryonen - - - - -	56
2.2.21.3 Vorbereiten des Eies für Embryomanipulationen - - - - -	57
2.2.21.4 Präparation von Mäuseembryonen - - - - -	58
2.2.21.5 Gentransfer - - - - -	58
2.2.21.5.1 <i>In Kultur</i> - - - - -	59
2.2.21.5.2 <i>Im Ei</i> - - - - -	59
2.2.21.5.3 <i>In Explantaten</i> - - - - -	60
2.2.21.5.4 <i>In Mäuseembryonen</i> - - - - -	61
2.2.22 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN - - - - -	62
2.2.22.1 Auftauen von Zellen - - - - -	62
2.2.22.2 Splitten von Zellen - - - - -	62
2.2.22.3 Einfrieren von Zellen - - - - -	62
2.2.22.4 Transfektion von Zellen- - - - -	63
2.2.22.5 Kultivierung der transfizierten Zellen auf Objektträgern- - - - -	63
2.2.23 HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN - - - - -	63
2.2.24 HISTOCHEMIE - - - - -	64
2.2.25.1 Immunfärbung von Gefrierschnitten - - - - -	64
2.2.25.2 Nachweis von β -Galaktosidase (X-Gal Färbung) - - - - -	64
2.2.25 SIMULATIONEN MIT DEM PROGRAMM ANSYS - - - - -	65

3. Ergebnisse

3.1 Elektroporation	- 67
3.1.1 ELEKTROPORATION JUNGER HÜHNEREMBRYONEN	- 69
3.1.2 ELEKTROPORATION VON EXPLANTATEN	- 78
3.1.3 RETRANSPANTATION VON ELEKTROPORierten EXPLANTATEN	- 82
3.1.4 MIKROELEKTROPORATION MIT GLASKAPILLAREN	- 84
3.1.5 IN OVO ELEKTROPORATION	- 86
3.1.6 ELEKTROPORATION VON MÄUSEEMBRYONEN	- 91
3.1.7 ELEKTROPORATION VON VEKTOREN MIT ZWEI PROMOTOREN	- 93
3.1.8 CO-ELEKTROPORATION ZWEIER PLASMIDE	- 95
3.1.9 ANALYSE ELEKTROPORierter EMBRYONEN	- 97
3.1.10 DETEKTION TRANSKRIBierter PLASMIDSEQUENZEN	100
3.1.10.1 In elektroporierten Embryonen	100
3.1.10.2 In <i>In-situ</i> Proben	101
3.2 Das Gen Geminin	- 103
3.2.1 SEQUENZDATEN	103
3.2.2 EXPRESSION IN DER FRÜHEN HÜHNER- UND MAUSENTWICKLUNG	105
3.2.3 ZELLULÄRE LOKALISATION VON GEMININ AUS HUHN UND MAUS	108
3.2.4 ÜBEREXPRESSION VON GEMININ IM HÜHNEREMBRYO	110
3.3 Überexpression von BMP4 und DLX5	- 112

4. Diskussion

4.1 Elektroporation	- 116
4.1.1 ELEKTROPORATION VON KULTIVierten EMBRYONEN	116
4.1.2 ELEKTROPORATION UND RETRANSPANTATION VON EXPLANTATEN	120
4.1.3 ELEKTROPORATION IM EI-	121
4.1.4 ELEKTROPORATION VON MÄUSEEMBRYONEN	122
4.1.5 PROBLEMATIK DER ZELLULÄREN CO-EXPRESSION ZWEIER PROTEINE	123
4.1.5.1 Vektor mit zwei Promotoren	123
4.1.5.1.1 <i>Squelching</i>	123
4.1.5.1.2 <i>Inaktivierung eines Promotors durch p53</i>	124
4.1.5.1.3 <i>Durchlesen der RNA Polymerase blockiert den 2. Promotor</i>	125
4.1.5.1.4 <i>Differentielle Methylierung</i>	126
4.1.5.2 Co-Elektroporation zweier Plasmide	126
4.1.6 ENTSTEHUNG FALSCH POSITIVER SIGNALE IN DER ISH ANALYSE	128
4.1.6.1 Polymerase II terminiert nicht effektiv am BGH PolyA Signal	128
4.1.6.2 Keine Detektion von DNA	130
4.1.6.3 Transkribierte Vektor DNA in <i>In-situ</i> Proben	131
4.1.6.4 Apoptose als Ursache für falsch positive Signale	133
4.1.6.5 Lösungsmöglichkeiten	134
4.2 Geminin	- 135
4.2.1 SEQUENZDATEN	135
4.2.2 EXPRESSIONSDATEN	135
4.2.3 ZELLULÄRE LOKALISATION	137

4.2.4 ÜBEREXPRESSION VON GEMININ - - - - -	138
4.3 Überexpression von BMP4 und DLX5 - - - - -	140
4.3.1 Überexpression von BMP4- - - - -	140
4.3.2 Überexpression von DLX5- - - - -	142
5. Ausblick	
5.1 Einsatz des Elektroporationssystems in der Entwicklungsbiologie- - -	144
5.2 Einsatz verschiedener Transfektionssysteme für die somatische Gentherapie- - - - -	148
6. Anhang	
6.1 Publikation - - - - -	150
6.2 Zusammenfassung - - - - -	150
6.3 Abkürzungsverzeichnis - - - - -	152
6.4 Danksagung- - - - -	153
7. Literaturliste- - - - -	157

I EINLEITUNG

„The greatest progressive minds of embryology have not looked for hypotheses, they have looked at embryos.“ Jane Oppenheimer (1955)

„A hen is only an egg`s way of making another egg“ Samuel Butler

1.1 Von der deskriptiven Analyse zum Experiment

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus, ausgehend von einer einzelnen befruchteten Eizelle bis hin zu einem multizellulären Organismus ist ein brillianter Triumph der Evolution. Aus einer zunächst omnipotenten Stammzelle entwickeln sich während der Embryogenese viele Millionen von Zellen, die sich so zu unterschiedlichen und komplexen Organen wie Herz, Gehirn, Auge und Extremitäten differenzieren.

Einer der ersten Wissenschaftler, die sich neben Platon (im Dialog *Timaios*) mit der Entstehung der Welt und der Entwicklung von Organismen befassten, war Hippocrates im 5. Jahrhundert BC. Er sah in der Entwicklung eine Neuarrangierung der vier Grundelemente Feuer, Wasser, Erde und Luft. Ein Jahrhundert später sollte Aristoteles (384 - 322 AC) in seiner Schrift „*de generatione animalium*“ eine Frage aufwerfen, die bis Ende des 19. Jahrhunderts die Gedankengebilde der Entwicklungsbiologen stark beeinflusste. Er betrachtete die Embryonalentwicklung als einen Wachstumsprozess, bei dem sukzessive neue Strukturen und Funktionen entstehen. Diesen Prozess bezeichnete er als Epigenese und verglich ihn metaphorisch mit dem Knüpfen eines Netzes (Gohlke, 1959). Im Gegensatz dazu stand die Präformationslehre, nach der bereits im Ei der gesamte Organismus vorgebildet sei und nur noch wachsen und reifen müsse, ohne neuen Strukturen bilden zu müssen. Man glaubte, daß alle Embryonen seit Anbeginn der Welt existierten und daß der erste Embryo einer neuen Spezies alle zukünftigen Embryonen in sich trage. Einige Biologen im 17. und 18. Jahrhundert, darunter Malpighi und Melbranche waren der Ansicht, in menschlichen Spermien einen bereits perfekt ausgebildeten Menschen einen sog. Ho-

munculus zu sehen. Erst mit Hilfe des Nachweises durch den deutschen Botaniker Mathias Schleiden (1839), der den Beweis erbrachte, daß alle Lebewesen aus sich teilenden Zellen aufgebaut sind, kam die Präformationstheorie ins Wanken. Der entscheidende Schritt hin zur allgemeinen Akzeptanz der Epigenese als entwicklungsbiologisches Prinzip war die Feststellung durch August Weismann, daß die Keimzellen eines Organismus unabhängig von den somatischen Zellen sind und allein sie die Erbinformation an die nächste Generation weitergeben.

Erkenntnisse über Konzepte und Mechanismen der Embryonalentwicklung wurden stets durch vergleichende Studien an Modellorganismen gewonnen. Sie mußten zum einen in großer Zahl verfügbar und ihre Embryonen sollten robust und leicht manipulierbar sein. Als ältestes Modellsystem der Entwicklungsbiologie ist das Huhn zu nennen, an dem bereits William Harvey (1651) in seiner Schrift *“Ex ovo omnia“* die ersten Schlußfolgerungen über die Ontogenese der Wirbeltiere zog.

Wilhelm Roux (1880) erkannte als erster, daß die Entwicklungsprozesse nur mit experimentellen Zugriffen und nicht allein mit Beobachtungen und Spekulationen aufgeklärt werden können. Deswegen gab er seiner neuen Forschungsrichtung den Namen Entwicklungsmechanik. Damit wollte er zum Ausdruck bringen, daß hinter diesen komplexen Prozessen der Entwicklung des Tierkörpers kausale Beziehungen zwischen der Erbinformation und der zellulären Maschinerie bestehen müssen, die mit geschickten Experimenten aufgeklärt werden können. Dies soll im folgenden an einigen ausgewählten Beispielen exemplarisch erläutert werden.

Wilhelm Roux (1880) konnte u.a. zeigen, daß nach Tötung einer der beiden Zellen eines zweizelligen Froschembryos sich ein weitgehend wohlgeformter halber Embryo entwickelt. Dieses Ergebnis unterstützte die Mosaiktheorie der Keimentwicklung von Weismann (1880), nach der Charakter und Schicksal jeder Zelle durch asymmetrische Zellteilungen festgelegt wird.

Durch Experimente von Hans Driesch an Seeigelembryonen wurde jedoch nachgewiesen, daß der Embryo sehr wohl in der Lage ist, in seine Entwicklung regulativ einzugreifen. Driesch wiederholte das Experiment von Roux an einem zweizelligen Seeigelkeim. Er erhielt jedoch keine halbe Pluteus-Larve sondern vielmehr einen vollständigen Keim, jedoch von geringer Größe. Der sich entwickelnde Zellverband ist imstande, Zell- und damit Informationsverluste zu kompensieren und eine normale Entwicklung aufrecht zu erhalten. Eine regulative Entwicklung setzt dabei voraus, daß die einzelnen Zellen wäh-

rend der Entwicklung miteinander interagieren.

Dies konnte eindrucksvoll durch das Induktionsexperiment von Ilse Mangold und Hans Spemann (1924) gezeigt werden. Unter Induktion versteht man dabei die Interaktion von signalgebenden und signalempfangenden Zellen, bei der sich die reagierenden Zellen in ihrem Entwicklungsverlauf verändern (Gurdon, 1987). Hans Spemann transplantierte die dorsale Blastoporuslippe der frühen Amphibiengastrula einer pigmentierten Spezies auf die ventrale Seite einer unpigmentierten Spezies. Bei Verpflanzung dieser Struktur entstand ein zweiter Embryo mit eigenem Nervengewebe und axialen Strukturen, die sich nicht aus dem transplantierten Gewebe, sondern vielmehr aus dem ventralen Ektoderm bildeten, einem Gewebetyp, der sich normalerweise zur Epidermis entwickeln würde. Die transplantierte Urmundlippe selbst hingegen differenzierte sich zu axialem Mesoderm und der Bodenplatte des Neuralrohrs und war in der Lage, umgebende mesodermale Zellen zu paraxialem Mesoderm umzuprogrammieren (*).

Neue Erkenntnisse und moderne Techniken erlaubten immer differenziertere Eingriffe. So untersuchten z.B. Lee et al. durch gezielte Ablatierung der Dachplatte des Neuralrohres durch Expression des Diphtherie Toxins den Einfluß des dorsalen Neuralrohres auf die Musterbildung des Oberflächen-Ektoderms (Lee et al., 2000). Unter Musterbildung versteht man dabei die Umsetzung des genetischen Bauplans eines Organismus in einen morphologischen Anlagenplan durch Differenzierungsvorgänge in den Zellen, wie z.B. Zellbewegungen, kontrolliertes Zellwachstum und Apoptose. Mit Hilfe dieser Technik läßt sich gezielt der induktive und musterbildende Einfluß einzelner Keimblätter oder Organstrukturen untersuchen. Um jedoch auf zellulärem Level die induktive Wirkung einzelner Zellen oder ganzer Zellverbände zu untersuchen, muß man in der Lage sein, das intrinsische Potential einer Zelle durch Mißexpression einzelner Gene zu verändern und zu beeinflussen. Einige Möglichkeiten, diesen Gentransfer zu erreichen, sollen im folgenden beschrieben werden.

(*) Soweit nicht gesondert zitiert sind die dargestellten historischen Daten und Zusammenhänge aus *Developmental Biology* (Gilbert, 2000) und aus *Principles of Development* (Wolpert, 1998) entnommen worden.

1.2 Gentransfermöglichkeiten

Die moderne Gentechnologie umfasst alle Methoden zur Identifizierung, Isolierung, Vermehrung, Analyse und Expression von Genen. Voraussetzung dafür ist der Gentransfer, also das Einbringen des Gens in eine Wirtszelle (Watson et al., 1993). Dabei sind biologische, chemische und physikalische Methoden zur Einführung von DNA in Zellen in den letzten 4 Jahrzehnten entwickelt worden. Bei den biologischen Methoden wird in erster Linie zwischen viralen und nicht-viralen Gentransfer-Systemen unterschieden. Der Gentransfer in Zellen gehört zur natürlichen Vermehrungsstrategie der Viren. Deshalb können Viren benutzt werden, um Fremd-DNA in Wirtszellen und auch in deren Genom einzuschleusen, so daß die Fremd-DNA in der Wirtszelle amplifiziert wird. Für die Transfektion von Säugerzellen werden DNA-Viren, wie z.B. Simian Virus 40, Polyoma oder Adenoviren, aber auch Retroviren, deren Erbinformation aus RNA besteht, verwendet (Koch-Brandt, 1993; Günzburg, 1997). Als Alternative zur viralen Transfektion ist die Protoplastenfusion (Schaffner et al. 1980) zu nennen, bei der die Membran der Protoplasten, die zahlreiche Plasmidkopien tragen, mit der Membran der Zielzelle fusioniert.

Bei den biochemischen Methoden wird die Fremd-DNA über Endocytose in die Wirtszelle aufgenommen. Dazu wird die DNA vorher mit organischen Polymeren komplexiert, die ihre negative Ladung neutralisieren. Die älteste Methode ist die Calciumphosphat-Transfektion, die 1973 von Graham und van der Eb etabliert wurde (Graham und van der Eb, 1973). Andere Methoden benutzen Polykationen, wie z.B. Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran, Polybrene (Chaney et al., 1986) oder Transferrin-Polykation-Konjugate, bei denen es zu einer rezeptorvermittelten Endozytose kommt. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von kationischen Lipidmolekülen, z.B. DOTMA(N[1-(2,3dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-amoniumchlorid), auch als Lipofektin bezeichnet. Durch Ultraschallbehandlung werden hier Lipidvesikel gebildet, welche die DNA komplexieren, an die negativ geladene Zelloberfläche absorbieren und mit der Plasmamembran fusionieren (Remy et al, 1994; Liszewski, 1998). Die Struktur dieser als Lipoplexe bezeichneten Partikel ist recht komplex und erinnert in ihrer Form an bestimmte Viren. Einfacher als Lipoplexe sind Liposomen, einfache Lipidvesikel, die einen Durchmesser von 0.025 bis 0.1µm besitzen und aus amphiphilen Lipidmolekülen aufgebaut sind. Liposomen spiegeln in ihrer Struktur, d.h. in der Anordnung zur doppelschichtigen sandwichartigen Membran den Aufbau der Plasmamembran tierischer Zellen wieder. Da-

bei ordnen sich die amphiphilen Lipidmoleküle so an, daß die Köpfe der äußeren Schicht zum umgebenden wässrigen Milieu weisen und die der inneren ins ebenfalls wässrige Zentrum. Da Liposomen jedoch wesentlich kleiner als ein verdrilltes Plasmid sind, ist die Aufnahme von DNA in diese Genfähren recht ineffizient. Um die Zellspezifität dieser Vesikel zu erhöhen, ist es möglich, sie mit Antikörpern zu versehen, die unterschiedliche Moleküle auf der Zelloberfläche erkennen.

Bei den biophysikalischen Methoden wird die Fremd-DNA mit Hilfe von physikalischen Verfahren in die Wirtszelle eingebracht. Hierzu zählt die Mikroinjektion der DNA direkt in den Zellkern (Graessmann, 1994), wie sie bei der Herstellung transgener Tiere angewendet wird, als auch der DNA- Transfer mittels beschleunigter Goldpartikel, bei der die DNA mittels Mikroprojektilen in die Zelle geschossen wird (Klein et al., 1987). Diese Methode hat sich vor allem bei der Herstellung transgener Pflanzen mit ihren dicken Zellwänden bewährt (Pecorino und Lo, 1992), ist aber ebenfalls sehr geeignet zur Transfektion postmitotischer Neuronen in Gehirnschnitten (Donald et al., 1994). Selbst nach Injektion nackter Plasmid-DNA in Muskelgewebe konnte in einem erheblichen Anteil der Zellen Reporter-genaktivität nachgewiesen werden (Wolff et al., 1990). Elektroporation und Laserporation (Palumbo et al., 1996) schließlich bewirken eine lokale Perforierung der Zellmembran und damit die Aufnahme kleiner Moleküle.

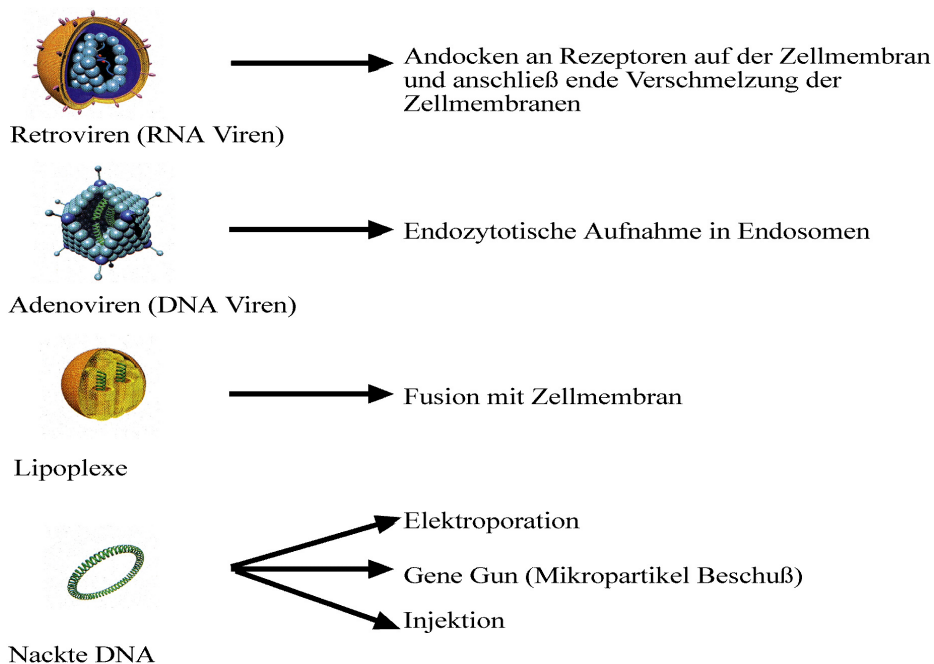


Abb.1: Übersicht über verschiedene Transfektionsmethoden für eukaryontische Zellen und Gewebe

Eine immer weiter verbreitete Methode ist die Elektroporation, da hier einerseits die Transfektion von Zellen möglich ist, die anderen Methoden nicht zugänglich ist, und andererseits eine hohe Effizienz erreichbar ist. Der Einfluß elektrischer Felder auf Zellen ist schon seit langem Objekt wissenschaftlicher Untersuchungen. So wurde schon in den 20-er und 30-er Jahren dieses Jahrhunderts von dielektrischen Effekten (Muth, 1927) und vom Zusammenbruch der Zellmembran durch ein elektrisches Feld berichtet (Kraus, 1932). Erst in der zweiten Hälfte des Jahrhunderts fanden diese elektrisch induzierten Effekte eine biotechnologische Anwendung. So konnten Pohl und Hawk (1966) lebende von toten Zellen mittels Dielektrophorese trennen. Sale und Hamilton zeigten ein Jahr später, daß Bakterien und Hefen durch elektrische Felder hoher Intensität und kurzer Dauer getötet werden können (Sale and Hamilton, 1967). Sie führten diesen Effekt auf den irreversiblen elektrischen Durchbruch der Zellmembran zurück. Im Jahre 1973 bewies Zimmermann, daß bei entsprechend gesetzten Feldparametern auch der reversible elektrische Durchbruch der Membran möglich ist.

Zahlreiche Anwendungsgebiete in der molekularen Zellbiologie aber auch in der Gentherapie wurden seitdem aufbauend auf diesem physikalischen Prinzip entwickelt. Darunter fallen die Produktion monoklonaler Antikörper (Foung et al., 1989), Zell-Zell Fusionen (Teissie et al., 1982), Zell-Gewebe Fusionen (Heller et al., 1990) und Insertionen von Proteinen in die Cytoplasmamembran (Mouneimne et al., 1991). Elektropormeabilisierte Zellen können dabei nicht nur DNA sondern auch fluoreszente Farbstoffe wie Propidiumiodid, synthetische Oligonucleotide, RNA oder sogar Proteine aufnehmen (Rols et al., 1998). Diese Methode des Gentransfers blieb zunächst auf eu- und prokaryontische Zellen in Suspensionskultur beschränkt. Elektro- sowie chemokompetente *Escherichia coli* Bakterien sind mittlerweile aus der Forschung sowie aus der großtechnischen Produktion von Wirkstoffen wie Insulin oder Wachstumsfaktoren nicht mehr wegzudenken. Die Elektroporation von murinen embryonalen Stammzellen hat die Erforschung vieler Genfunktionen durch die Erzeugung von „knockout“ Mutanten erst ermöglicht. Mit Hilfe von Puls Generatoren, die eine konstante Spannung über einen bestimmten Zeitraum lieferten, gelang es erstmals Gewebe *in vivo* im lebendenden Tier zu transfizieren (Titomirov et al., 1991). Inzwischen gibt es Erkenntnisse über den Einsatz dieser Transfektionsart in verschiedenen Tiermodellen und an unterschiedlichen Gewebetypen wie Leber (Heller et al., 1996), Gehirntumoren (Nishi et al., 1996), Haut (Zhang et al., 1996), Herz (Harrison et al., 1998), murinen Melanomen (Rols et al., 1998), dem Ovidukt in Hühnern (Ochiai et

al., 1998) und murinen Hodengewebe (Muramatsu et al., 1997).

Im folgenden soll der theoretische Hintergrund der Elektropermeabilisierung näher erläutert werden.

1.3 Theorie der Elektropermeabilisierung

„The observation of transient permeability changes induced by electric impulses in cell membranes is fundamental and opens new perspectives for our understanding of membrane processes.“ Manfred Eigen

Sowohl die Zellmembran als auch künstliche Lipidmembranen besitzen aufgrund der amphiphilen Struktur der Membranlipide Eigenschaften eines elektrischen Kondensators. Deshalb wird der elektrische Durchbruch einer Zellmembran am besten am Modell eines Plattenkondensators mit parallel dazu geschaltetem Widerstand veranschaulicht. Das Membraninnere, die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide, stellt das Dielektrikum zwischen den „Platten“ dar, die von dem wässrigen Außenmedium und den polaren Köpfen der Lipide gebildet werden. Die Poren und Kanäle der Zellmembran stellen den parallel geschalteten Widerstand dar. Der Widerstand des Außenmediums liegt wiederum in Serie zur Membran. Ein Plattenkondensator kann nur bis zu einem bestimmten Potential, das vom Plattenabstand und von der Dielektrizitätskonstante abhängig ist, aufgeladen werden. Oberhalb dieses Grenzwertes kommt es zu einem elektrischen Durchbruch und damit verbunden zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Dieser elektrische Durchbruch ist bei technischen Kondensatoren normalerweise irreversibel. Unter bestimmten Voraussetzungen (wie z.B. bei dem Erreichen des für den Durchbruch notwendigen Membranpotentials innerhalb weniger Mikrosekunden) ist die elektrisch induzierte Membranstörung bei Zellen reversibel, und die Zellmembran besitzt nach kurzer Zeit wieder ihre ursprünglichen Eigenschaften. Die Zellmembran wird bis zu einer Spannung U aufgeladen, die durch folgende Gleichung **„integrierte Laplacegleichung“** in vereinfachter Form gegeben ist:

$U_{(E)}$	=	$f \times r \times E \times \cos \alpha$
$U_{(E)}$	=	anliegende Spannung [V]
F	=	Formfaktor
r	=	Zellradius [cm]
E	=	äußeres angelegtes Feld [kV/cm]
$\cos \alpha$	=	Winkel zwischen den Polen der Zelle und der Feldrichtung

Abb.2: Laplace Gleichung. Abhängigkeit der Durchbruchsspannung einer Zelle vom Zellradius, dem angelegten Feld, dem Formfaktor einer Zelle und dem Winkel zwischen den Polen der Zelle und der Feldrichtung.

Die Spannung U bezeichnet das Potential über der Zellmembran an einem beliebigen Punkt der Membran, der sich im Winkel α zum elektrischen Feld befindet, wobei U den Wert der Durchbruchspannung U_c erreichen kann. Die Durchbruchspannung U_c ist außerdem abhängig von einem Formfaktor f , dem Radius a der Zelle und der Feldstärke E des angelegten Feldes. Der Formfaktor f berücksichtigt entsprechend der geometrischen Form der Zelle die Feldverzerrung. Für sphärische Zellen beträgt er 1.5, für einen unendlich langen Zylinder ist $f=1$. Der Grenzwert des für den Durchbruch notwendigen Potentials über der Membran U_c beträgt bei Raumtemperatur 1 V, bei 4°C in etwa 2 V. Die entsprechende Feldstärke des angelegten Feldes, bei welcher der Durchbruch erzielt wird, bezeichnet man als E_c oder E_{krit} . Wird ein elektrisch homogenes Feld der Feldstärke $E=E_c$ angelegt, so induziert man entsprechend der Gleichung aufgrund der Abhängigkeit vom Winkel α einen Membrandurchbruch an den Polen der Zelle, also an den Stellen, die den Elektroden am nächsten liegen (an diesen Bereichen wird das höchste Potential U_c erreicht, da wegen $\alpha=0$; $\cos\alpha=1$ ist). Beim Anlegen eines Feldes höherer Feldstärke wird aufgrund der Winkelabhängigkeit die permeabilisierte Membranfläche größer.

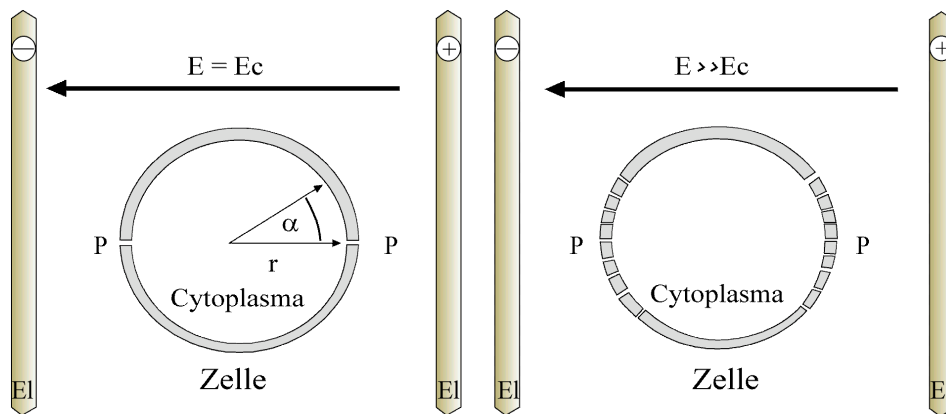


Abb. 3: Induktion eines Membrandurchbruchs durch Anlegen eines elektrischen Feldes. In dem dargestellten Schema, das keine aktuellen Größenverhältnisse wiedergibt, wird das Verhalten einer Zelle in einem externen elektrischen Feld veranschaulicht. Die Durchbrüche in der Zellmembran sind an den Polen der Zelle lokalisiert, da dort das höchste Potential anliegt. Die Pfeile spiegeln die Richtung des elektrischen Feldes wieder. α stellt den Winkel zwischen den Polen der Zelle und der Feldrichtung dar. E steht für die Feldstärke, wobei E_c diejenige Feldstärke symbolisiert, bei der der Membrandurchbruch erfolgt. (El) Elektroden, (r) Zellradius, (P) Zellpol.

Die Verwendung von hypoosmolalen Porationsmedien gewährleistet eine sphärische Form der Zellen und somit eine einfache Anwendung der integrierten Laplace-Gleichung. Zusätzlich wird durch das Anschwellen der Zellen die für den Membrandurchbruch notwendige Feldstärke E_{krit} herabgesetzt. Je nach Zelltyp kann sich die Zellmembran vom Cytoskelett ablösen, was sowohl die Permeabilisierung erleichtert als auch das Ausheilen (aufgrund der höheren Fluidität der Membranbestandteile) der Membran nach dem Puls. Neben der Osmolalität kommt auch der Leitfähigkeit des Porationsmediums eine wichtige Rolle zu. Bei gegebenem Zellradius hängt die Relaxationszeit der exponentiellen Aufladung der Membran umgekehrt von der spezifischen Leitfähigkeit des Mediums ab. Es hat sich gezeigt, daß entgegen den gängigen theoretischen Vorstellungen der Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium nach der Poration mit abnehmender Leitfähigkeit des Mediums zunimmt. Diese Befunde sind auf transiente elektrische Deformationskräfte zurückzuführen, die aus der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem angelegten externen elektrischen Feld und dem induzierten Dipol im Cytosol resultieren. Da die Oberfläche der meisten Zellen negativ geladen ist, wird dieses Dipolmoment durch Ladungstrennung oder Neuorientierung von Dipolen in der Zellmembran induziert. Diese Prozesse treten im Nanosekundenbereich in schwach leitenden Medien vor der Aufladung

der Membran auf, sind aber bis in den Mikrosekunden-Bereich der Membranaufladung wirksam und beeinflussen entscheidend die Permeabilisierung der Membran.

Wenn eine Zelle mit einem bestimmten Transmembran-Ruhepotential einem externen elektrischen Feld ausgesetzt wird, wird die der Anode zugewandte Seite hyperpolarisiert und die der Kathode ausgesetzte Seite depolarisiert (Hibino et al., 1991; Sersa et al., 1996b). Die Leitfähigkeit einer ungefähr 6 nm dicken Plasmamembran (Dielektrizitätskonstante: $\epsilon_m \approx 2-3$) ist dabei weitaus geringer als die des sie umgebenden Mediums und des Cytoplasmas ($\epsilon_c \approx 80$). Wird eine Zelle einem kurzzeitigen (μs - ms) elektrischen Feld ausgesetzt, steigt die an der Membran anliegende Spannung $U(t)$ bzw. das Transmembranpotential, das normalerweise bei -70 mV liegt, bis auf 0.5 bis 1 V an. Wird dieses Schwellenpotential erreicht, kommt es zum reversiblen elektrischen Durchbruch („reversible electrical breakdown“ REB). Er ist gekennzeichnet durch eine drastische Erhöhung der Leitfähigkeit von 10^{-8} Scm^{-2} bis auf 1 Scm^{-2} und einer damit verbundenen raschen Entladung der Membran (Weaver et al., 1995). Durch die Erhöhung der elektrischen Feldenergie innerhalb der Membran in Kombination mit den thermalen Fluktuationen der Lipiddoppelschichten kommt es zur Bildung einer heterogenen Population von Poren und zur Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle, die typischerweise ein Aktivierungspotential von 50 mV besitzen (Tsong, 1991). Durch diese Poren fließen hauptsächlich Na^+ and Cl^- Ausgleichsionenströme, die zur Entladung der Membran beitragen und sie dadurch vor mechanischer Beschädigung schützen.

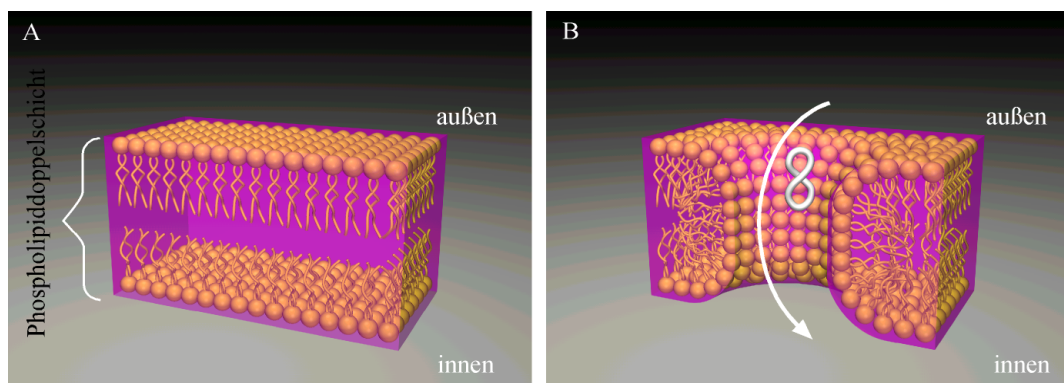


Abb.4: Aufbau einer durch ein externes Feld induzierten Elektrophore. (A) zeigt die Struktur der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran. (B) Das Feld führt zu einer Neuorientierung der Phospholipidmoleküle und damit zur Bildung hydrophiler Poren, durch die Makromoleküle und Farbstoffe aufgenommen werden können.

Durch diese Elektrophoren in der Plasmamembran kommt es ebenfalls zum Austritt von Cytoplasma in das umgebende Medium, wodurch sich dessen Leitfähigkeit erhöht. In-

dem man ermittelt, bei welchen Feldstärken diese Leitfähigkeitserhöhung auftritt, erhält man einen Anhaltspunkt, bei welcher Spannung eine für diesen Zelltyp optimale Elektroporationsbedingung erreicht wird. Da es durch die Poren zu einem relativ unspezifischen Austausch an Ionen, Proteinen und chemischen Substanzen mit der extrazellulären Umgebung kommt, wird die Zelle osmotisch stark gestreßt. Die Überlebensrate der Zellen hängt unter anderem vom Zelltyp, der Zusammensetzung des extrazellulären Mediums und dem Volumenverhältnis intra- und extrazellulärer Flüssigkeit ab.

In dieser Arbeit wurden sowohl homogene als auch inhomogene elektrische Felder zur Transformation von Embryonen eingesetzt. Beide Feldtypen unterscheiden sich grundsätzlich in der Anordnung ihrer Feld- und Potentiallinien. Dieser Sachverhalt hat entscheidenden Einfluß auf die Transfektionseffizienz.

Um diesen Sachverhalt zu erläutern, soll im folgenden kurz der Zusammenhang zwischen der Feldstärke und dem Verlauf der Feld- sowie der Äquipotentiallinien veranschaulicht werden.

Die elektrische Feldstärke, die als der Quotient aus Kraft pro Ladung zu definieren ist, kann mit Hilfe von Feldlinien veranschaulicht werden (Dobrinski, 1993). Vereinbarungsgemäß verlaufen Feldlinien in positiver Richtung von der positiven zur negativen Ladung.

Die Feldlinien einer einzelnen Punktladung sind geradlinig radial und symmetrisch. Die Feldstärke nimmt mit dem Quadrat der Entfernung von der Punktladung ab, ebenso die Dichte der Kraftlinien. Stellt man das elektrische Feld durch Kraftlinien dar, so ist die Dichte der Kraftlinien ein relatives Maß für die Stärke des elektrischen Feldes; je enger dabei die Kraftlinien beieinander liegen, um so größer ist die Feldstärke. In ähnlicher Weise kann die relative Stärke des elektrischen Feldes durch den Abstand der Äquipotentiallinien voneinander angegeben werden, sofern dabei immer die gleiche Potentialdifferenz besteht. Um elektrische Ladungen auf einer Äquipotentiallinie, die ja senkrecht auf den Feldlinien steht, zu verschieben, ist keine Arbeit aufzuwenden, da alle Punkte einer Äquipotentiallinie keine Potentialdifferenz aufweisen, d.h. die Spannung zwischen ihnen ist gleich Null.

Bringt man eine lebende Zelle mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen in ein elektrisches Feld, so wirken auf die frei beweglichen Ladungsträger elektromagnetische Kräfte. Unter dem Einfluß dieser Kräfte bewegen sich die negativen Ladungsträger (meist

handelt es sich um Elektronen) entgegen der Feldrichtung, positive wandern in der Feldrichtung. Die dadurch aufgezwungene Ladungstrennung bezeichnet man als Influenz. Durch diesen Vorgang entsteht ein dem ursprünglichen Feld entgegengerichtetes Feld. In einem homogenen Feld hat die Feldstärke überall den gleichen Betrag und die gleiche Richtung und kann daher als Schar paralleler Geraden dargestellt werden, die senkrecht zwischen den Leitern verläuft.

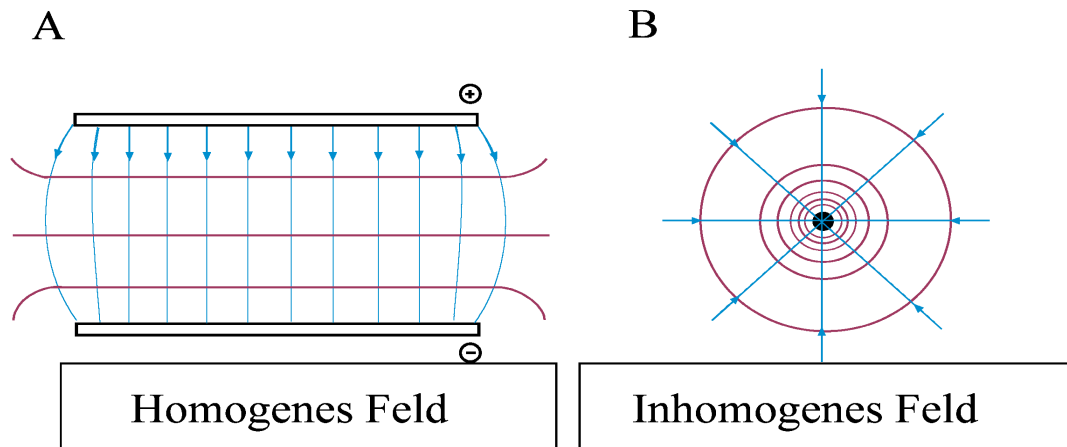


Abb.5: Darstellung der Feld- und Potentiallinienverteilung zwischen zwei parallelen (A) und einem punktförmigen Leiter (B). Der Verlauf der Feldlinien ist durch blaue Linien angedeutet, wobei die Richtung durch die Pfeilspitzen markiert wird. Rote Linien geben die Lage der Äquipotentiallinien wieder.

Unter dem Begriff der Elektroporation sind zwei unterschiedliche Phänomene zusammengefaßt, nämlich die Elektropermeabilisierung und die Elektrotransformation. Unter Elektropermeabilisierung versteht man die Induktion eines permeablen Membranzustandes unter Einfluß eines externen elektrischen Feldes. Der Prozeß der Elektrotransformation beschreibt dagegen das Durchdringen der Zellmembran durch die DNA infolge elektrophoretischer Kräfte (Klenchin et al., 1991; Sukharev et al., 1992). Die Elektroporation wird allgemein durch drei Faktoren beeinflusst, die jedoch in unterschiedlicher Weise die Elektropermeabilisierung und die Elektrotransformation beeinflussen. Dabei handelt es sich um die Stärke des externen Feldes, der eine Zelle ausgesetzt wird, die Pulsdauer sowie die Anzahl der Pulse. Rols und Teissie konnten zeigen, daß die Permeabilisierung hinsichtlich der Pulsdauer sowie der Pulsanzahl einem Sättigungsgrad unterliegt, wohingegen die Transformationseffizienz weiter pseudoexponentiell ansteigt (Rols und Teissie, 1990b). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Präsenz der DNA während des elektrischen Pulses (Winterbourne et al., 1988), da die strukturellen Veränderungen der Membran offenbar nur sehr kurzlebig sind (~ 2 sec) (Wolf et al., 1994). Diese Hypothese wird

unterstützt durch eine Studie von Hibino et al., die nachweist, daß die durch eine Elektropermeabilisierung angestiegene Leitfähigkeit der Membran sehr kurz ist (im msec Bereich) (Hibino et al., 1993). Die Aufnahme von Farbstoffen hingegen unterliegt vermutlich einem anderen Mechanismus, da dieser Prozeß über einen sehr viel längeren Zeitraum aktiv ist. Der elektrische Puls beeinflusst die Konformation und Orientierung der DNA im Feld sowohl durch die Feldstärke als auch durch die Pulslänge. Da es infolge der Polarisierung und der damit verbundenen Ladungstrennung zur Dipolbildung innerhalb eines langgestreckten DNA-Moleküls kommt, bewirkt das Feld eine Rotation der Moleküle, so daß sie mit ihrer Längsachse entlang der Feldlinien ausgerichtet sind (Porschke et al., 1984; Neumann et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß es durch einen Puls von 10 msec Länge und einer Feldstärke von 1kV/cm infolge der Elektrophorese zu einer Konzentrierung der DNA um den Faktor 5 an der Zellmembran kommt (Wolf et al., 1994). Unter diesem Gesichtspunkt der Überkonzentration von DNA kann man sowohl die Beobachtung erklären, daß die Kombination eines nicht-permeabilisierenden Pulses gefolgt von einem permeabilisierenden die Transformationseffizienz erhöht als auch die Tatsache der Erniedrigung der Effizienz durch Verdünnung der DNA unmittelbar nach einem Puls (Andreason und Evans, 1989; Sukharev et al., 1992). Ungeklärt ist, warum es durch Erhöhung der Plasmidkonzentration zur verstärkten Zellyse kommt. Es besteht die Vermutung, daß dies auf den verstärkenden Einfluß der bei diesen Experimenten verwendeten Träger DNA zurückzuführen ist (Rols et al., 1992).

Das elektrische Feld zwischen den Elektroden wirkt jedoch nicht gleichmäßig auf alle dort vorhandenen Zellen. Canatella et al. haben gezeigt, daß in Zellkulturen die Elektroporationseffizienz, also die Zahl der Zellen, die einen Farbstoff wie Fluorescein oder Calcein aufnehmen, mit zunehmender Zelldichte sinkt (Canatella et al., 2001). Gleichzeitig steigt jedoch die Überlebensrate der Zellen an. Dies beruht darauf, daß mit zunehmender Zelldichte die lokale Feldstärke, der eine einzelne Zelle ausgesetzt ist, reduziert wird (Susil et al., 1998). Die umgebenden Zellen führen durch ihre isolierenden Eigenschaften zu Veränderungen des elektrischen Feldes. Diese Situation muß bei der Elektroporation von Geweben oder ganzen Embryonen berücksichtigt werden, da hier zum einen die „Packungsdichte“ der Zellen noch wesentlich höher ist als in einer Suspension. Zum anderen sind die Zellen in eine extrazelluläre Proteinmatrix eingebunden, die zusätzlich gegenüber externen elektrischen Einflüssen abschirmt.

Wie effektiv die Elektroporation ist, hängt davon ab, wie lange die Membran einem elek-

trischen Feld definierter Stärke ausgesetzt ist. Die Zeitkonstante τ , über die ein bestimmtes Feld effektiv wirkt, wird bei der Verwendung von Rechteckpulsen bereits bei kleineren Voltzahlen erreicht als bei exponentiell abnehmenden Pulsen. Diese werden hauptsächlich bei der Transformation von Mikroorganismen und Bakterien wie *E. coli* eingesetzt.

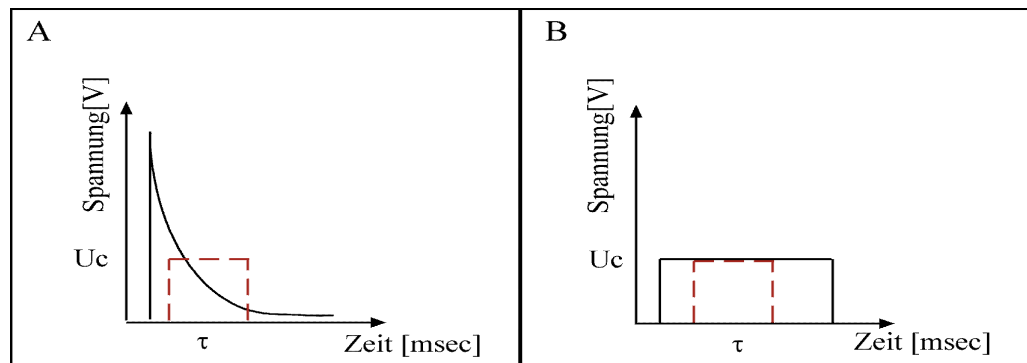


Abb.6: Vergleich des Spannungsverlaufs bei einem exponentiell abnehmenden (A) Puls (typisch für die Entladung eines Kondensators) und einem rechteckigen Puls mit konstantem Spannungsverlauf (B). Es ist ersichtlich, daß die zum Erreichen der Durchbruchsspannung nötige Pulshöhe bei einem rechteckigen Spannungsverlauf bereits bei kleineren Voltzahlen zustande kommt. τ ist die Zeitkonstante, über die das Feld auf die Zellen einwirken muß, um einen Membrandurchbruch zu erhalten.

Wenn Gewebe elektrischen Rechteckpulsen ausgesetzt wird, entsteht Wärme gemäß folgender Gleichung:

$$Q = V^2 \times T / (4.2 R)$$

wobei V (Volumen [μm^3]), Q (Wärme [J]), R (Widerstand [Ohm/cm]) und T (Zeitkonstante τ) darstellen.

Nach Muramatsu ist die Transfektionseffizienz ungefähr der entstehenden Wärme proportional (Muramatsu et al., 1998). Ein Puls von 1000 V/cm und 100 μsec entspricht daher einem Puls von 25 V/cm und 160 msec bzw. 2 Pulsen von jeweils 80 msec Dauer. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muß die Pulsdauer genau definiert und unabhängig von der Leitfähigkeit des Mediums sein. Bei den konventionellen Geräten, die mit der herkömmlichen Porationstechnik arbeiten, können überdies verschiedene Probleme auftreten. Die Applikation langer Feldpulse in leitenden Porationsmedien kann sowohl in Folge hoher Stromflüsse als auch durch drastische pH-Änderungen in

Elektrodennähe und dadurch bedingte Freisetzung von Ionen (v.a. Aluminium) aus den Elektroden zur irreversiblen Schädigung der Zellen führen. Die Zellen werden dabei auf zweierlei Weise geschädigt und zwar durch das elektrische Feld und den nach Elektropermeabilisierung auftretenden Stromfluß. Das elektrische Feld führt dabei unspezifisch zur Aktivierung bzw. Inaktivierung spannungssensitiver Ionenkanäle und kann eine irreversible Konformationsänderung der Membranproteine bewirken (Tsong et al., 1990). Infolge des Stromflusses heizt sich das Zytoplasma bis auf 45°C auf. Die freie Enthalpie zwischen einer aktiven korrekten Proteinkonformation und einer inkorrekten inaktiven Faltung ist gering, sie beträgt typischerweise lediglich 5-10 kcal/mol (Tanford, 1970). Vor allem die Elektronentransferkomplexe der Atmungskette und die ATP Synthese Maschinerie in der inneren Mitochondrienmembran werden durch die Wärmezufuhr irreversibel geschädigt. Das Auftreten freier Sauerstoffradikale potenziert diesen Effekt, da es zur Oxidation von Proteinen und Lipiden kommt.

1.4 Frühe Embryogenese des Huhns

Die Embryonalentwicklung des Huhns wird von der Eiablage bis zum Schlüpfen nach einem von Hamburger und Hamilton entwickelten, auf morphologischen Kriterien basierenden System in 46 Stadien von Stadium HH1 bis HH46 eingeteilt (Hamburger und Hamilton, 1951). Während der Stadien HH1 bis HH8 findet die Gastrulation des Amnionten Embryos statt, wobei der Primitivstreifen, der als Äquivalent des Urmundes der Amphibien zu betrachten ist, ausgehend von der Koller'schen Sichel von posterior nach anterior wandert. Durch die Spitze des Primitivstreifens wandern im Stadium HH3 zunächst Zellen ein, die das definitive Endoderm bilden, aus dem sich alle endodermalen Derivate, wie Magen, Darm und Pankreas ableiten. Die Strukturen des axialen Mesoderms, wie das Notochord und der Kopffortsatz, entstehen aus Zellen, die ab Stadium HH4 durch den Knoten einwandern, während zeitgleich die Immigration der paraxialen, intermediären und lateralen Mesodermanteile in den Primitivstreifen stattfindet. Die anteriore-posteriore Position der Zellen im Primitivstreifen ist dabei ausschlaggebend, welchen Mesodermtyp sie bilden. Je caudaler sie einwandern, desto lateraler ist die Mesodermstruktur, die aus ihnen hervorgeht. Zeitgleich mit dem Einwandern der Zellen und der Bildung des Kopffortsatzes beginnt eine Regression des Primitivstreifens, wobei weiterhin auswandernde mesodermale Zellen den cranialen Teil des Notochords ausbilden.

Dadurch bildet sich ein Gradient hinsichtlich der Entwicklungsstufen innerhalb des Embryos aus. Im Kopfbereich beginnt bereits die Organogenese von Nervensystem, Darm und Herz, während posterior weiter Gastrulation stattfindet.

1.5 Musterbildungsprozesse bei der Anlage der Neuralplatte

Es sollen im folgenden die Funktion und die Charakteristika einiger Proteinfamilien, insbesondere TGF β -Faktoren und Homeodomänproteine, dargestellt werden, die bei der Anlage der Neuralplatte eine Rolle spielen.

In Vertebraten wird die Neuralplatte als erste Stufe eines sich entwickelnden ZNS während der Gastrulation durch Unterteilung des Ektoderms in neurale und nicht-neurale Domänen festgelegt. Die Induktion der Neuralplatte sowie die Dorsalisierung des Mesoderms erfolgt in Amphibien durch die dorsale Blastoporuslippe, in Teleosten durch den Schild (Oppenheimer, 1936) und in Vögeln durch den Hensen'schen Knoten an der Spitze des Primitivstreifens (Waddington, 1933). Signale, die von diesem Speman'schen Organisator ausgehen, können prospektive Epidermiszellen zu neuronalen Vorläuferzellen umprogrammieren und zur Induktion sekundärer Achsen führen.

Signaltransduktion durch BMP (bone morphogenic protein) Moleküle blockiert die Ausbildung neuraler Vorläuferzellen im Ektoderm in Vertebraten (*Xenopus*) und induziert in Form eines Konzentrationsgradienten die Etablierung der dorso-ventralen Achse in Invertebraten (*Drosophila*). Neurale Induktion kann man daher auch als lokale Suppression dieses Signalweges durch BMP Antagonisten wie *chordin*, *noggin*, *folliculin* betrachten (Piccolo et al., 1996; Zimmermann et al., 1996; Fainsod et al., 1997), die durch den Spemannschen Organisator freigesetzt werden. BMP4 ist im Huhn und im Frosch (*Xenopus laevis*) im Übergangsbereich zwischen neuralem und epidermalem Ektoderm exprimiert und induziert die Differenzierung der in dieser Region entstehenden Neuralleistenzellen (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999).

Dorsale Überexpression von BMP4 inhibiert neurale Differenzierungsprozesse im Ektoderm der animalen Hemisphere des Froschembryos (Sasai et al., 1995). Im Gegensatz dazu führt eine Mißexpression von BMP4 oder seiner Antagonisten im Huhn weder im Bereich der prospektiven Neuralplatte noch im nicht-neuralen Ektoderm zu einer Beeinflussung der Musterbildungsprozesse während der Gastrulation (Streit et al., 1998; Streit

und Stern, 1998). Insbesondere sind *chordin* und *noggin* nicht in der Lage, in kompetentem Ektoderm neurales Gewebe zu induzieren. Nur an der Grenze zwischen neuralem und nicht-neuralem Ektoderm, an der neurale Marker wie SOX3 und nicht-neurale Marker wie die Homeoboxgene MSX1 und DLX5 sowie TGF β -Faktoren wie BMP5 und BMP7 co-exprimiert sind, kann die Größe der Neuralplatte durch ektopische Expression von BMP4, *noggin* und *chordin* beeinflusst werden (Streit und Stern, 1999). Die Grenze der Neuralplatte wird daher durch die Interaktionen zwischen neuralem und nicht-neuralem Ektoderm sowohl im Frosch als auch im Huhn etabliert (Moury und Jacobson, 1990; Dickinson et al., 1995; Selleck und Bronner-Fraser, 1998; LaBonne und Bronner-Fraser, 1998). MSX1 Expression wird dabei sowohl von den Fibroblasten Wachstumsfaktoren FGF4 und FGF8 (Streit und Stern, 1999) als auch von BMP4 (Marazzi et al., 1997; Suzuki et al., 1997) induziert und kann wiederum in Form einer positiven Rückkopplungsschleife BMP4 aktivieren (Bei und Maas, 1998). Die Expression von BMP4 selbst wird ebenfalls in Form einer positiven Rückkopplungsschleife verstärkt (Biehs et al., 1996). In der frühen Embryonalentwicklung liegt eine weitgehende Überlappung von MSX1 und BMP4 Transkripten vor. Beide sind in HH4 Embryonen im posterioren Primivstreifenbereich, im umgebenden Epiblasten, im lateralen Mesoderm und in einem Ring um die Grenze der Neuralplatte herum exprimiert. Ab HH8 beschränkt sich die Expression beider Gene auf die dorsalen Neuralfalten des sich schließenden Neuralrohres. In späteren Entwicklungsphasen wird die dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr durch BMP4 und BMP7, die im dorsalen Oberflächen-Ektoderm exprimiert sind, beeinflusst (Liem et al., 1995). Im Frosch, *Xenopus laevis*, ist BMP4 in der Marginalzone der Gastrula exprimiert, induziert dosisabhängig ventrales Mesoderm und hat eine antagonisierende Funktion in bezug auf den Speman'schen Organisator. In Abhängigkeit von der Höhe der extrazellulären BMP4 Konzentration, die durch seine Inhibitoren *noggin* (Lamb et al., 1993; Zimmerman et al., 1996), *chordin* (Sasai et al., 1995), *follistatin* (Hemmati-Brivanlou et al., 1994), *Xnr3* (Hansen et al., 1997), *cerberus* (Bouwmeester et al., 1996) und *gremlin* (Hsu et al., 1998) gesteuert wird, werden verschiedene mesodermale Derivate wie Muskeln, das Notochord, der Pronephros und Blutzellen angelegt und spezifiziert (Dosch et al., 1999).

TGF β -Faktoren

BMPs zählen zur Überfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF β) und regulieren als sekretierte Signalproteine eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, Differenzierungsvorgänge und die Morphogenese einzelner Organsysteme (Ying, 1989; Massague, 1990; Sporn und Roberts, 1992). Die Synthese der BMP Moleküle erfolgt als große funktionsunfähige Vorläufer-Proteine. Da ihre mRNA eine Signalsequenz enthält, die sie als sekretorische Proteine kennzeichnet, erfolgt die Translation direkt in das Lumen des Golgi Apparates, wo sie proteolytisch prozessiert werden. Allen Mitgliedern der BMP-Familie gemeinsam ist ein Strukturmotiv aus 7 Cysteinresten im sekretierten Bereich, die sie von den übrigen TGF β -Faktoren, die neun Cysteinreste aufweisen, unterscheidet (Massague, 1990). Kristallographische Studien zeigten, daß die Cysteinreste das Zentrum des Monomers bilden, indem sie intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Daopin et al., 1992; Schlunegger und Grutter, 1992). Die Sekretion erfolgt als inaktive Dimere, die erst durch proteolytische extrazelluläre Abspaltung eines nicht kovalent mit dem aktiven Plasmid verknüpften Bereiches aktiviert werden (Gray und Mason, 1990; Hammonds et al., 1991). Diese Region hat eine Bindungsdomäne für Kollagen und Fibronectin, die ein Ansammeln des inaktiven Proteins in der extrazellulären Matrix ermöglichen könnte (Taipale et al., 1996). Die Expressionsmuster verschiedener BMPs zeigen häufig überlappende Expressionsdomänen, was eine Interaktion dieser Proteine nahelegt. In der Tat gelang es, *in vitro* Heterodimere von BMP4-BMP7 und BMP2-BMP7 zu erzeugen, deren biologische Aktivität um ein Vielfaches höher war als die der jeweiligen Homodimere (Hazama et al., 1995; Suzuki et al., 1997). BMPs können durch ebenfalls sekretierte Antagonisten wie *Chordin*, *Noggin*, *Follistatin* (Yamashita et al., 1995) gebunden und dadurch inaktiviert werden. Die Signaltransduktion der TGF β erfolgt durch Bindung an heterodimere transmembrane Rezeptoren, die eine Serin Threonin Kinase Aktivität besitzen. Diese Rezeptoren können in zwei Klassen Typ I und Typ II eingeteilt werden. Lagert sich ein BMP Molekül an, kommt es zu einer Konformationsänderung einhergehender Phosphorylierung von Proteinen der SMAD Familie durch den Typ I Rezeptor (Wrana und Attisano, 1996). Aktivierte Smad Proteine gelangen in den Zellkern und wirken dort in verschiedenen Kombinationen als Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren und bilden einen Teil des Transkriptionskomplexes (Hoodless et al., 1996).

DLX Gene

Ein mit der frühen BMP4 Expression weitgehend überlappendes Expressionsmuster zeigt das Homeoboxgen *Dlx5* als epidermaler Marker im Huhn (Pera et al., 1999). Homeoboxgene regulieren als Transkriptionsfaktoren wichtige entwicklungsbiologische Prozesse, indem sie Zellen ihre funktionelle Identität verleihen und ihre Position während der Musterbildung determinieren (Morasso et al., 1996). Die Homeobox stellt dabei ein sequenzspezifisches DNA Bindungsmotiv dar (Manak und Scott, 1994). Die Genfamilie der *distal-less* Gene, die als Tandemcluster auf verschiedenen Chromosomen angeordnet sind, umfaßt in Säugetieren 6 und im Zebrafisch mindestens 8 Mitglieder (*Dlx1-7*) (Price et al., 1991; Robinson und Mahon, 1994; Stock et al., 1996). Sie wurde zunächst in *Drosophila* identifiziert und charakterisiert (Cohen et al., 1989). *Dlx* Gene sind in den Branchialbögen, in der Vorderhirnanlage und im distalen Bereich der sich entwickelnden Gliedmaßen räumlich und zeitlich restringiert exprimiert. Ihre Inaktivierung führt in der Maus zu Defekten in der Ausbildung der fazialen Schädelknochen, zu einer gestörten Musterbildung im Telencephalon und zu mangelnder Ossifikation des Skelettes (Acampora et al., 1999). Die entsprechende *Drosophila* Mutante ist durch das Fehlen sämtlicher Gliedmaßen gekennzeichnet. Die Transkriptionsregulation durch *Dlx* Proteine ist komplex, da sie mittels der Homeodomäne sowohl Homo- als auch Heterodimere mit anderen Homeodomän-Proteinen wie *Msx2* ausbilden können. Die Wirkung dieser Heterodimere ist jedoch antagonistisch zu den Homodimeren (Zhang et al., 1998).

Geminin

Ein weiteres Molekül, das in der Lage ist, die Musterbildung während der Anlage der Neuralplatte zumindest im Frosch zu beeinflussen, ist *Geminin*. Es wurde zunächst in *Xenopus* aufgrund seiner Fähigkeit isoliert, die Neuralplatte auf Kosten der Epidermis und der Neuralleiste zu expandieren (Kroll et al., 1998). Das Protein ist bifunktionell aufgebaut. Seine N-terminale Domäne ist in der Lage, aus ventraler Epidermis dorsales neurales Gewebe zu induzieren, wohingegen seine C terminale Domäne ein „coiled-coiled“ Proteininteraktionsmotiv besitzt und eine Rolle in der Regulation der DNA Replikation spielt. Tada et al. (2001) konnten zeigen, daß *Geminin* den Faktor CDT1 bindet, der den Aufbau des Pre-Replikationskomplexes (MCM) in der G1 Phase steuert. *Geminin* bindet CDT1 in der G2 Phase und verhindert dadurch eine Neuintiierung der Replikation. Am Ende der M-Phase wird *Geminin* degradiert und CDT1 steht wieder für eine neue Runde der DNA Replikation zu Verfügung. Die inhibitorische Bindung durch *Geminin* ist damit

nur eine von mehreren Kontrollen, wie Phosphorylierungsgrad, Kernexport und Degradation, mit denen die Zelle sicherstellt, daß ihr Genom nur einmal während eines Zellzyklus vermehrt wird (Elsasser et al., 1999; Nguyen et al., 2000). Da die Differenzierung von Zellen einhergeht mit Austritt aus dem Zellzyklus, kann man vermuten, daß *Geminin* ebenfalls die Balance zwischen Zellproliferation und -differenzierung beeinflusst.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Es war Zielsetzung dieser Arbeit, durch Etablierung der Elektroporation am frühen Vertebraten Embryo in die frühe Embryogenese zielgerichtet eingreifen zu können. Mit dieser Methode ist man in der Lage, das induktive Potential von Einzelzellen und deren Entwicklungsprogramm während der Errichtung des Vertebratenbauplanes zu untersuchen und zu verändern. Durch Überexpression von Genen, Expression dominant negativer Konstrukte oder durch die Ausschaltung von Genfunktionen kann man im Modellsystem Huhn gezielt in den Prozeß der Zellspezifizierung eingreifen. Bevor eine Zelle ein bestimmtes Entwicklungsschicksal einschlägt und ihre zelluläre Identität, die sich durch die Aktivierung ihres ganz spezifischen genetischen Programms auszeichnet, erhält, wird ihre Funktion und Aufgabe im Zellverband durch Signalmoleküle vermittelt. Insbesondere durch Manipulationen der frühen Musterbildungsprozesse während der Anlage der primären Keimblätter ist es möglich, die Rolle dieser Signalmoleküle, ihre Position in der genetischen Kaskade und ihre potentiellen Antagonisten zu untersuchen. Durch Kombination mit klassischen mikrochirurgischen Eingriffen, wie etwa der isotopischen und isochronischen Transplantation von Anlagen mit induktivem Potential, erhält man einen neuen Ansatz, um das Wechselspiel der Zellen während der Entwicklung zu verstehen. Speziell bei der Musterbildung im Ektoderm und damit bei der Anlage der Neuralplatte sollte das Wechselspiel zwischen BMP4, DLX5 sowie *Geminin* untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 RADIOCHEMIKALIEN

^{32}P -dCTP stammte von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig).

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

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

2.1.3 REAKTIONSSETS (“KITS”)

Kit	Hersteller
GeneAmp RNA PCR Kit	Perkin Elmer Corporation
Multiprime DNS labelling system	Amersham Life Science
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen

2.1.4 ENZYME

2.1.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme der Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Karlsruhe), NEB (New England Biolabs, Bad Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), SERVA/Promega (Heidelberg) und Stratagene (La Jolla) kamen zum Einsatz.

2.1.4.2 Sonstige Enzyme

RNAseA: RNAseA in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl auf 10 mg/ml gelöst. ProteinaseK: ProteinaseK (Boehringer) auf 10 mg/ml Endkonzentration in dH₂O gelöst, Lagerung bei -20°C. Bovine intestinale Alkaline Phosphatase (Boehringer), T4-DNS-Ligase (konzentriert, Boehringer), Klenow-Fragment (Boehringer).

2.1.5 MEMBRANEN

Für Hybridisierungen und DNA-Transfer wurde mit Nylon-Membranen der Firma Qiagen (Düsseldorf) gearbeitet.

2.1.6 VEKTOREN

Bluescript II KS⁺ (Stratagene), pTracerTM-CMV2 (Invitrogen), pDSRed (Clontech) waren die verwendeten Basisvektoren.

2.1.7 ANTIKÖRPER

2.1.7.1 Primäre Antikörper:

1. slug [(Spezies Spezifität: Huhn, Xenopus), IgG, Developmental Studies Hybridoma Bank (Liem et al., 1995; Liem et al., 1997)]
2. Msx1/2 [(Spezies Spezifität: Huhn, Ratte, Maus), IgG, Developmental Studies Hybridoma Bank (Liem et al., 1995)]
3. GFP [Monoklonaler Maus IgG_{2a}, detektiert auch die Varianten YFP, BFP, CFP (Clontech)]
4. Myc [Monoklonaler Antikörper IgG₁, Invitrogen]

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper:

1. Alexa™ 568 (Ziege gegen Maus IgG (H+L)) [Molecular Probes],
2. Alexa™ 568 (Ziege gegen Kaninchen IgG (H+L)) [Molecular Probes]
3. Alexa 488 Ziege gegen Maus (IgG (H+L)) [Molecular Probes]
4. Ziege gegen Maus (IgG+IgM (H+L)), Peroxidase konjugiert [Dianova],

2.1.8 GRÖßENMARKER

Für die DNA-Auftrennung wurde folgender Größenmarker verwandt:

1 kb-Marker (Biolabs): 10.0; 8.0; 6.0; 5.0; 4.0; 3.0; 2.0; 1.5; 1.0; 0.5 kb

2.1.9 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. Für die Generierung von PCR Matrizen zur Herstellung von *In-situ* Proben wurde die T7 Sequenz an den rückwärts Primer des entsprechenden Gens angehängt.

T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
SP6	5'-CCCAAGCTTGATTAGGTGAC-3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
mBMP4 vorwärts mBMP4 zurück	5'-ATGCTCGAGGTCATCCTACTATGCCAAGTC-3' 5'-CGTCCATGGCGCTGAAATCCACATAGAGAG-3'
CMV vorwärts pCDNA zurück	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
AMP vorwärts AMP zurück	5'-TTACCATCTGGCCCCAGTGCTG-3' 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGTG-3'
eGFP vorwärts eGFP zurück	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' 5'-GATGACTCTCGGCATGGACG-3'
LacZ vorwärts LacZ zurück	5'-TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3' 5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGT-3'
RFP vorwärts RFP zurück	5'-ATGGTGCGCTCCTCCAAG-3' 5'-CTACAGGAACAGGTGGTG-3'

2.1.10 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.

2.1.11 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, GCG (Genetics Computer Group Inc.) und BLAST (NCBI) durchgeführt.

2.1.12 ZELLINIEN

Verwendet wurden Affennierenzellen (Cos7), Hühner- sowie Mausfibroblastenzellen

2.1.13 MEDIEN, NÄHRBÖDEN, STANDARD-LÖSUNGEN

Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das über eine „Millipore-Anlage“ gereinigt war und danach autoklaviert oder sterilfiltriert wurde; etwaige 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.

Lösung	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani) Medium/Nährböden	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), Agar(-ose)
SOC-Medium	2 g Trypton, 0.5 g Hefeextrakt, 1 ml 1M NaCl, 0.25 ml 1M KCl. 100 ml dH ₂ O; 20 Min autoklavieren, anschließend erfolgt die Zugabe folgender sterilfiltrierter Lösungen: 1 ml 1M MgCl ₂ , 1 ml 1 M MgSO ₄ , 1 ml 2 M Glukose.
Zellkulturmedien	Medien stammten von den Firmen Gibco (Paisley, England), Flow Laboratories (Irvine, England) und Boehringer (Mannheim)

2. MATERIAL UND METHODEN

1x SSC	0.15 M NaCl 15 mM NaCitrat, pH 7.0
10 x TBE	108 g Tris base 40 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 55 g Borsäure ad 1.000 ml H ₂ O
Hybridisierungslösung	7% SDS 0.5 M Na ₂ HPO ₄ pH 7.2
Mowiol	9.6 g Mowiol, 24 g Glycerol in 24 ml dH ₂ O, 1 h rühren; 48 ml 0,2 M Tris, pH 8.5, 20 Min rühren; 50°C; Abzentrifugieren, 1000 g; Überstand bei -20°C lagern.
Ampicillin	25 mg/ml in H ₂ O, steril filtriert, und bei -20°C gelagert
10 x PBS-Puffer	1.3 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O pH 7.0
RNase A	10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 15 mM NaCl gelöst, zur Inaktivierung der DNSsen für 15 Min. bei 95°C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt; bei -20°C gelagert
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (PCI) im Volumenverhältnis 25:24:1.
10 x Ladepuffer für DNA	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylen Cyanol FF 10x TAE 25% Glycerin 1% SDS 1 mM EDTA
EtBr-Lösung	100 mg Ethidiumbromid in 10 ml H ₂ O gelöst und im Dunkeln aufbewahrt; verwendete Konzentration betrug 2 mg/ml.
Proteinase K	Proteinase K (Boehringer) wurde mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml in H ₂ O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.
TE	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 1 mM EDTA

Denaturierungslösung	0.5 M NaOH (pH 14.0) 1.5 M NaCl
4% PFA/PBS	10 g PFA in 250 ml 1XPBS gelöst, bei 4°C gelagert.
Saline	0.86% NaCl in dH ₂ O
X-Gal-Lösung	20 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C
Waschpuffer für Hybridisierungen	1% SDS 40 mM Na ₂ PO ₄ pH 7.2

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach der Beschreibung von Sambrook durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Sie sind daher hier nicht aufgeführt.

2.2.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN

2.2.1.1 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 und Doly, 1979) in Verbindung mit einer Affinitätsaufreinigung an einer Silikonmembran, die bei hohen Salzkonzentrationen DNA bindet und bei niedrigen eluiert. Die Zusammensetzung 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 Antibiotikum bei 37°C angezogen. Mit diesen wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Die Konzentration der so gewonnenen DNA entsprach zwischen 200-400 ng/μl.

2.2.1.2 Plasmidisolierung 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.

Mit dieser Methode konnten 50-100 ml *E. coli*-Kultur pro Säule aufgearbeitet werden.

2.2.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die betreffende DNA-Lösung wurde 1:200 in dH₂O verdünnt und die Absorption der Lösung spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD₂₆₀) von 1.0 entspricht einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml.

Alternativ dazu erfolgte die Konzentrationsbestimmungen durch einen optischen Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz mit Standard-DNA in Agarosegelen (Sambroock et al., 1989).

2.2.3 HERSTELLUNG DER DNA LÖSUNG FÜR EMBRYO ELEKTROPORATION

Nach einer zusätzlichen Phenol/Chloroform Extraktion der mit Hilfe des Qiafiltersystems gewonnenen DNA wurde diese in PBS auf eine Konzentration von 5µg/µl eingestellt. Zur besseren Visualisierung wurde die Lösung mit 0.01% Fast Green versetzt. Alternativ kann auch Nile Blau verwendet werden. Für die Elektroporation von endodermalem Gewebe mit dorsal ventral angeordneten Elektroden wurde die Lösung zusätzlich noch mit 15% Sucrose (w/v) versetzt.

2.2.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Bei der Agarosegelelektrophorese (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 ent-

sprechend wurden 0.7-3 prozentige Agarosegele mit jeweils 0.1 µg/ml Ethidium-bromid verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die eingesetzte DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit einem zehntel Volumen Ladepuffer versetzt. Nach der Elektro-phorese wurden die Gele bei kurzwelligem UV-Licht (258 nm) fotografiert. Präparative Gele dagegen wurden nur bei langwelligem, energieärmerem UV-Licht (Wellenlänge > 300 nm) fotografiert, um die Bildung von Thymidin-Dimeren und Strangbrüche zu vermeiden.

2.2.5 GEWINNUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

2.2.5.1 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 nach dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an eine Selikon-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 es wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.5.2 Durch Elektroelution

Die entsprechende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Agarosegelstück in einen Dialyseschlauch gegeben. Je nach Größe des Gelstücks wurden 400-700 µl TE (pH 8.0) zugegeben. Der Schlauch wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die DNA bei 120-150 V 30 Min bis 3 h eluiert. Anschließend erfolgte Überführung der Pufferlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Diese Lösung wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform/Isomylalkohol extrahiert. Schließlich erfolgte eine Ethanolpräzipitation. Das Präzipitat wurde in in dH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.6 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 kompatible 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 und dieses zugegeben. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Ionen, erfolgte nach dem ersten Schneiden eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung, bzw. eine Aufreinigung über den Nukleotid Removal Kit (Quiagen), bevor mit dem anderen Enzym geschnitten werden konnte. Für analytische Restriktionsverdauung wurden 500 ng bis 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym innerhalb von 2 h geschnitten und anschließend auf einem Agarosegel ausgewertet. Für präparative Verdauung wurden 10 µg DNA mit 100 U Restriktionsenzym für 4 h inkubiert.

2.2.7 AUFREINIGUNG VON DNA-LÖSUNGEN

2.2.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion (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 befinden sich denaturierte Proteine, Membranbestandteile und organisch lösliche Moleküle in der unteren Phenol/Chloroform-Phase und in der Interphase. Die DNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase.

Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Je nach benötigtem Reinheitsgrad der DNA wurde der Vorgang mehrmals wiederholt. Anschließend erfolgte, um Phenolspuren zu beseitigen, nach obigem Schema eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Daraufhin schloß sich eine Fällung der DNA mit Ethanol an.

2.2.7.2 Dialyse

10-50 µl DNA-Lösung wurde auf eine Dialyse-Membran gegeben, die auf 3-5 ml dH₂O in einer sterilen Kulturplatte (Nunc) schwimmt. Nach 20 Min wurde die so entsalzte Lösung unter mehrfachen Auf- und Abpipettieren wieder aufgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.7.3 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Zur DNA-Lösung wurde 1/10 ihres Volumens 3M Natriumacetat zugegeben. Danach wurde das 2.5-fache Volumen 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 folgten 5 bis 10 Min. Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm und danach Abnahme des Überstands. Um die DNA zu waschen, z.B. um Salzreste zu entfernen, schloß sich Waschen mit 0.5 ml 70% Ethanol an. 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.

2.2.7.4 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.

2.2.8 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 1U *T4*-DNA-Ligase

(Promega oder Roche) 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. Falls synthetische Oligonukleotide in einen Vektor ligiert wurden, so wurden diese in einem hundertfachen Überschuß gegenüber dem Vektor eingesetzt.

2.2.8.1 Klonierung von doppelsträngigen, synthetischen DNA-Oligonukleotiden

Bei einzelnen Klonierungsschritten wurden komplementäre, einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer Größe von 18 bis 40 Nukleotiden (NAPS, Göttingen oder Eurogentec, Belgien) verwendet. Zwei komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide wurden dabei auf eine Konzentration von 100 pmol/µl mit Wasser (Millipore) eingestellt und dann bei Raumtemperatur zu gleichen Verhältnissen gemischt. Mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK, Roche, Mannheim) wurden die Oligonukleotide innerhalb von 30 Min bei 37°C an den 5'-Enden phosphoryliert (siehe Tabelle). Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden mit dem Nukleotid-Removal-Kit von Qiagen mit einer Ausbeute von etwa 50% aufgereinigt und in 30 µl mit einer Endkonzentration von etwa 0.8 pmol/µl eluiert.

doppelsträngiges Oligonukleotid 50 pmol/µl	1 µl
10x PNK Puffer (500 mM TrisHCl pH 8.2, 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Spermidin)	6 µl
1 mM ATP	1.5 µl
Wasser (Millipore)	46.5 µl
10 U/µl PNK	5 µl
Gesamtvolumen	60 µl

2.2.8.2 T4-DNA-Polymerase

Die Einzelstrang-DNA-spezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase wurde zum Entfernen von 3'-Einzelstrang-DNA-Überhängen verwendet. Die Reaktion wurde mit 0.05 µg/µl (bis zu 5 µg) DNA, 1x T4-DNA Polymerase-Puffer, je 100 µM/dNTP und 3 u/µg DNS T4-DNA Polymerase (Boehringer Mannheim) 20 Min bei 12°C durchgeführt.

Danach wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 10 Min bei 75°C gestoppt und die Polymerase wurde durch Phenolextraktion aus dem Ansatz entfernt.

2.2.8.3 Klenow-Polymerase

Für das Auffüllen der beim Schneiden mit den meisten Restriktionsendonukleasen entstehenden 5'-Einzelstrang-Übehängen wurde das große Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E.coli* verwendet. Die Reaktion wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt im Anschluß an einen Restriktionsverdau wie folgt durchgeführt:

0.05 µg/µl DNA, 1x Puffer (der zum Verdau verwendete), je 33 µM dNTP, 1.0-1.5 u/µg DNA Klenow-Polymerase (Boehringer Mannheim); 5 Min 37°C, 12 Min RT.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM beendet und die Polymerase durch Phenolextraktion entfernt.

2.2.8.4 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Enden zur Verhinderung der Religation linearer Vektor-DNA-Fragmente, insbesondere bei "blunt-end" Klonierungen wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

50-100 ng/µl in 1x AP-Puffer, 1 U/µmol DNA-Enden intestinale alkaline Kalbsphosphatase (CIP); die Inkubation erfolgte in 20-50 µl für 1 h bei 37°C oder 15 Min bei 50°C. Anschließend wurde der Ansatz mit dH₂O auf 200 µl aufgefüllt und einer Phenolextraktion unterzogen.

2.2.9 GEWINNUNG EMBRYONALER 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% Diethyl-

pyrocarbonat (DEPC) behandelt, alle Lösungen autoklaviert. Der Versuchsansatz wurde während der RNA-Präparation, wenn möglich, auf Eis gehalten. Für die Isolation von Gesamt RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen verwendet). Bis zu 30 mg Gewebe wurden in 600 µl Puffer RTL (enthielt 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer) durch vorsichtiges Auf und Ab pipettieren homogenisiert und anschließend für 3 Min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) mit 13000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µl 70% Ethanol zum Überstand wurde das Gemisch auf eine RNeasy Minisäule aufgetragen und für 15 sec mit 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde mit 700 µl Puffer RW1 gewaschen (15 sec 13000 rpm), bevor 500 µl Puffer RPE aufgetragen wurden. Es wurde zweimal für 2 Min (13000 rpm) zentrifugiert, wobei die Eppendorfgefäße ausgetauscht wurden. Die RNA wurde mit 30 µl DEPC Wasser eluiert (1 Min 13000 rpm) und ihre Konzentration photometrisch bei 280 nm bestimmt.

2.2.10 CDNA ERSTSTRANG-SYNTHESE

Die reverse Transkription wurde mit dem „First-Strand cDNA Sythesis Kit“ (Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurden 3 bis 5 µg Gesamt-RNA in 20 µl Wasser (Millipore) aufgenommen und anschließend bei 65°C für 10 Min denaturiert. Zu dem Reaktionsansatz wurde weiterhin folgendes hinzupipettiert:

Gesamt-RNA (3 bis 5 µg)	20 µl
Random Hexanukleotid Primer (pd(N) ₆ Primer 0,2 µg/ml)	1 µl
DTT (100 mM)	1 µl
Bulk first-strand cDNA Reaction Mix	11 µl

Ansatz zur cDNA-Synthese.

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Teile des Reaktionsansatzes wurden direkt in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.11 STANDARD POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) wurde sowohl analytisch zur Orientierungsüberprüfung von DNA-Fragmenten in Vektoren und zur Expressionsanalyse in Form der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) als auch präparativ zur Herstellung von DNA-Konstrukten eingesetzt.

Die Primer wurden als DNA-Lösung oder in lyophilisierter Form geliefert, so daß diese nur noch in H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt werden mußte.

Die PCR zum Nachweis eines DNA-Fragments in einem Vektor bzw. die Überprüfung der Orientierung von klonierten DNA-Fragmenten in Vektoren wurde mit der Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) durchgeführt. Dazu wurden 1 bis 10 pg der Plasmid DNA, 0.4 µM je Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 1 U Taq-Polymerase und entsprechender Puffer (10 mM TrisHCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) verwendet. Es wurde das folgende Temperaturprofil entweder in einem Mastercycler (Eppendorf) oder in einem Trio-Thermoblock (Biometra) durchfahren.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 Min
2. Denaturierung	94°C	30 sec
3. Annealing	45°C bis 65°C	30 sec
4. Synthese	72°C	1 Min pro kb
5. Endsynthese	72°C	5 Min

Protokoll einer Standard-PCR. Die Schritte 2. bis 4. wurden in der Regel 30 mal wiederholt.

Für die Herstellung von PCR Matrizen zur Generierung von *In-situ* Proben wurde der T7 Primer als 3' gelegener Primer eingesetzt, sowie ein forward Primer, der innerhalb der jeweiligen cDNA positioniert war.

2.2.12 REVERSE-TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Zur Analyse der Genexpression von Markergenen in transfizierten Embryonen wurde die RT-PCR angewandt. Dazu wurde aus transfizierten Bereichen (GFP Expression) Gesamt-RNA gewonnen (siehe 2.9) und daraus cDNA synthetisiert (siehe 2.10). Für jeden PCR-

Nachweis wurde cDNA von rechnerisch 220 ng der Gesamt-RNA verwendet.

Die günstigsten Annealingtemperaturen der verwendeten Primer wurden zunächst näherungsweise berechnet (Baldino et al., 1989) und dann experimentell überprüft und verbessert. Die benötigte Zyklenanzahl wurde für jedes Primerpaar (Tabelle) ebenfalls empirisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel.

GAPDH	aufwärts ACGCCATCACTATCTTCCAG abwärts CAGCCTTCACTACCCTCTTG
SLUG	aufwärts 1. TATCATACCGCAGCCAGAGA aufwärts 2. CTGCTACCGTCTCCTCTACC abwärts 1. ACTCAGTGTGCTACGCAGCA abwärts 2. CTACGCAGCAGCCAGATTCC
MSX1	aufwärts 1. CTCCAGGAACCTGCTGCTGC aufwärts 2. ACCTTCGACACCGCTTCGGT abwärts 1. AGTAGCATAGAGTCCAACGG abwärts 2. ATCCACCAGGAAGTCTCTCT
DLX5	aufwärts 1. GGCTACTGCTCGCCTACCTC aufwärts 2. AGTACCAGTACGGCATGAAC abwärts 1. CAGCGCCAAGGGATGCTGTA abwärts 2. CCCTCAGTAGATCGTCCCGA
Ampicillin	aufwärts TTACCATCTGGCCCCAGTGCTG abwärts ATGAGTATTCAACATTTCCGTG
Geminin	aufwärts CAGTGATCTGATGAATTCCAA abwärts CTTCACTTGAAGCAAGATCTG

Übersicht der Primer, die zu dem Nachweis der Genexpression mit Hilfe der RT-PCR verwendet wurden. Als Annealing-Temperatur dienten 55°C für *GAPDH*, 52°C für *Geminin*, 45°C für *MSX1*, für *SLUG* und für *DLX5*.

2.2.13 MARKIEREN VON RNA-SONDEN MIT DIGOXIGENIN, FLUORESZEIN ODER ³⁵S UTP (Krieg und Melton, 1984)

Zur *In-situ*-Hybridisierung wurde mit Digoxigenin bzw. Fluoreszein markierte antisinn RNA verwendet, die nach dem sog. „Run-off“-Prinzip synthetisiert wurde. Dazu wurde das Plasmid am 5' Ende der cDNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, die 5'-überhängende Enden erzeugten. Es wurden 10 µg des Plasmids mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (100 U) in einem Ansatz von 100 µl linearisiert und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde in 10 µl Wasser (Millipore) aufgenommen und 1 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Linearisierung zu überprüfen. Zur radioaktiven Markierung von *In-situ* Proben wurde ³⁵S UTP (SJ 40383,

Amersham, 800Ci/mmol) bzw. 35-S CTP verwendet. Durch Doppelmarkierung mit 35S-UTP und 35S-CTP kann man die spezifische Aktivität und damit die Sensitivität der Probe erhöhen. Allerdings muß man auch unter Umständen einen höheren Hintergrund in Kauf nehmen. Die Synthese der RNA erfolgte in dem folgenden Ansatz:

linearisiertes Plasmid (1µg/µl)	1µl
10x Transkriptionspuffer (Roche, 400 mM TrisHCL pH 8.0, 60 mM MgCL ₂ , 100 mM DTT, 20 mM Spermidin)	2µl
10 x Digoxigenin oder Fluoreszein RNA labelling mix (Roche, 10 mM ATP, CTP bzw GTP, 6.5 mM UTP und 3.5 mM Digoxigenin bzw Fluoreszein-12-UTP)	2µl
RNAsin (100 U/ml Promega)	1µl
RNA Polymerase (SP ₆ , T ₃ oder T ₇ abhängig vom Promotor des Plasmids)	1µl
Wasser (Millipore)	13µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 h inkubiert und anschließend mit Wasser (Millipore) auf 50µl aufgefüllt.

2.2.14 AUFREINIGUNG VON RNA-SONDEN

Die radioaktiv bzw. mit Digoxigenin oder Fluoreszein markierten RNA-Moleküle für die *In-situ* Hybridisierung wurden mit Hilfe von Sephadex-Gelfiltrationssäulen (ProbeQuant G-50, Amersham Pharmacia) von freien Nukleotiden gereinigt. Ein Zehntel des Ansatzes wurde auf ein Agarosegel bzw. bei radioaktiven Proben auf ein denaturierendes 4.5% Polyacrylamidgel aufgetragen, um die Qualität und Quantität der Synthese zu überprüfen. Die Lagerung der RNA-Sonden erfolgte bei -20°C.

2.2.15 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 ³²P-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 ^{32}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_2O 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, 5 μl ^{32}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 μl mit TE aufgefüllt. Damit nicht eingebaute Nukleotide entfernt wurden, wurde die Reaktionsmischung über eine G-50-Mikrosäule (Sephadex G-50 Probe Quant; Pharmacia) oder eine P-30-Säule gegeben. Die G-50-Säule wurde dazu zunächst kurz auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend die Ausflußöffnung geöffnet. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß gestellt und bei $735\times g$ 1 Min. zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, die Reaktionsmischung vorsichtig auf die Säule pipettiert und für zwei Min. bei $735\times g$ 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 (65°C) gegeben.

2.2.16 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

2.2.16.1 Kommerziell bezogene Bakterienstämme

1. XL2-Blue ultrakompetente Zellen (chemokompetent) (Stratagene), Effizienz 5×10^9 (CFU/ μg), Genotyp: recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F' proAB lac q Z deltaM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a

2. XL1-Blue elektrokompente Zellen (Stratagene), Effizienz 1×10^{10} (CFU/ μg), Genotyp: recA1 end A1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F' proAB lac q Z deltaM15 Tn10 (Tetr)]

3. DH5 α chemokompetente Zellen (Life Technologies), Effizienz 1×10^8 F- ϕ 80dlacZ Z delta M15 delta (lacZYA-arg F) U169 deo R rec A1 end A1 hsdR17 (r_K^- , m_K^+) phoA sup E44 λ -thi-1 gyrA96 relA1

2.2.16.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Bei der Elektroporation wurde 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 führte 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 Membranmoleküle 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* (DH-5-alpha) auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie dieser Platte wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und 5 h bis ü.N. bei 37°C leicht geschüttelt. Mit diesen 5 ml wurde schließlich 1 l LB-Lösung inokuliert und bei 37°C geschüttelt (300 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht wurde. Nun folgte das Abstoppen des Wachstums, indem die Bakterien ca. 15-30 Min. in einem Eiswasserbad abgekühlt wurden. Die Kultur wurde daraufhin durch 15 Min. Zentrifugieren (4200rpm, 4°C) pelletiert. Zum Waschen erfolgte Aufnahme in 1 l eiskaltem ddH₂O und nach dem Lösen wie bereits beschrieben erneutes Zentrifugieren. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, doch diesmal nur in 0.5 l ddH₂O bzw. beim zweiten Mal in 20 ml 10% Glycerinlösung. Nach erneuter Zentrifugation wurde das nun erhaltene Pellet in 2-3 ml 10% Glycerinlösung aufgenommen und gut gemischt. Die Konzentration betrug nun durchschnittlich 3×10^{10} Zellen/ml. Danach wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70°C gelagert. Sie konnten so nach Bedarf aufgetaut werden. Es wurden gewöhnlich Kompetenzen von 10^6 - 10^8 (CFU/ μ g DNA) erreicht.

Die Kompetenz (CFU/ μ g) errechnet sich dabei aus folgender Formel:

$$CFU = \frac{100CFU}{50pg} \times \frac{1 \times 10^6}{\mu g} \times \frac{1ml}{0,1mlplatiert} \times 10 = 2 \times 10^8$$

2.2.16.3 Bakterielle Transformation durch Elektroporation

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

Transformationseffizienz wurde durch wiederholtes Einfrieren sowie durch die Verwendung von Luria Broth Medium anstelle von SOC (jeweils um den Faktor 2-3) negativ beeinflusst. Für Ligationsreaktionen ist sie ungefähr um den Faktor 10 geringer als für Kontrollplasmide. Eine Standardligationsreaktion enthielt ungefähr 100-1000 ng DNA. Die Zugabe von 1µl Ligationsansatz resultierte dabei in einer finalen Konzentration von 1-10 ng ligierter DNA bei den Zellen. Für die Transformation des gesamten Ligationsansatzes mußte dieser vorher auf einer Dialysemembran entsalzt werden.

2.2.16.4 Bakterielle Transformation durch Hitzeschock

Neben der Elektrotransformation wurde auch die Transformation durch Hitzeschock eingesetzt, um Plasmide in Bakterien einzubringen. Nach dem Auftauen wurden 100µl chemokompetente Zellen mit 1 µl Ligationsansatz vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden in einem 42°C Wasserbad gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Nach Zugabe von 0.9 ml SOC Medium wurde für eine Stunde bei 37°C mit 225 rpm geschüttelt (Thermoblock). Anschließend wurden verschiedene Mengen 50-200 µl auf angewärmte Agarplatten plattiert, die 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml X-Gal und 1 mM IPTG enthielten.

2.2.17 DNA SEQUENZIERUNG

Zum Sequenzieren der DNA wurde ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese beruht (Sanger et al., 1977). Einzelsträngige DNA diente 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 fluoreszenz-markiert, 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 DNS Sequencer durchgeführt. Im Reaktionsansatz wurden 300-400 ng DNS, 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 wurden mit der Computersoftware Sequencer ausgewertet.

2.2.18 NORTHERN BLOT

2.2.18.1 Gel und Transfer auf Nitrozellulosemembranen

Zum Nachweis von Ampicillin RNA in *in vitro* transkribierten *In-situ* Proben wurden Northern Blots angefertigt (Alwine et al., 1977). Bei dieser Methode wird die isolierte RNA auf einem denaturierenden Agarose Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das denaturierende Milieu des Gels bewirkt, daß die ausgeprägten Sekundärstrukturen, wie etwa Haarnadelschleifen der RNA aufgeschmolzen werden. Die *in vitro* transkribierte RNA wurde 30 Min bei 37°C mit DNase behandelt, um die Vektor DNA zu entfernen. Die DNase wurde durch Zugabe von 1mM EDTA sowie durch Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten inaktiviert. Die Aufreinigung erfolgte über G50 Spinsäulen (siehe 2.2.14). Die RNA Probe (4.5 µl aus 70 µl) wurde in dem Auftragsmedium auf

55°C für 15 Minuten aufgeheizt und dann auf Eis gekühlt. Vor dem Auftragen wurden 2 µl Auftragspuffer (50% Glycerol, 1 mM EDTA) zugesetzt und das Gel wurde bei einer Spannung von 100 V etwa 3 Stunden lang gefahren, bis die Lauffront der Proben zu 2/3 durch das Gel gewandert war. Anschließend wurde das Gel in 20x SSC eine Stunde lang gebleicht. Zum Blotten wurde der Aufbau nach Southern verwendet. Als Transferlösung diente 20xSSC. Der Transfer dauerte 4-24 h, je nach Größe der Fragmente und Menge der RNA in dem Gel. Nach dem Blotten wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt und bei 80°C gebacken. Teil-weise wurde die RNA anschließend nochmals durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (0.3 J/cm²) kovalent auf dem Filter fixiert.

MOPS Laufpuffer	20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM (Einstellen auf pH 7.0 mit 5 M NaOH)
RNA Puffer	50% deionisiertes Formamid, 25% Formaldehyd (37%), 10% 10x MOPS
Gel	10 ml 10x MOPS, 1.8 ml Formaldehyd (37%), 1 g Agarose (1%), 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), 88 ml H ₂ O

2.2.18.2 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 10⁶ counts/ml betragen. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung in die Hybridisie-

rungsflasche gefüllt. Die Hybridisierung wird im 65°C-Schrank über Nacht durchgeführt. Die Membranen wurden mehrmals je 30 Min. bei 65°C gewaschen.

Waschschritte:		
Zeit	Lösungen:	Temperatur:
2x 15 Min.	2x SSC/0.1% SDS	RT
1x 30 Min.	0.1x SSC/0.1% SDS	65°C

Die anschließende 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.

2.2.19 *IN-SITU-HYBRIDISIERUNG AM GANZEN EMBRYO*

Die Transkriptionsaktivität eines Gens wurde zum einen mit Hilfe der RT-PCR und zum anderen durch die *In-situ*-Hybridisierung am ganzen Hühnerembryo nachgewiesen. Die Expressionanalyse einzelner Gene erfolgte wie beschrieben (Wilkinson, 1992), wobei die gleichzeitige Detektion zweier verschiedener Genexpressionen in einem Embryo wie in der Literatur beschrieben unternommen wurde (Dietrich, 1997). Dabei wurden die Embryonen gleichzeitig mit je einer Digoxigenin- und mit einer Fluoreszein- markierten RNA-Sonde hybridisiert, die dann in zwei Schritten mit Hilfe von Digoxigenin- bzw. Fluoreszein-spezifischen Antikörpern (Roche) detektiert wurde. Die Hühnerembryonen wurden zunächst in PBS präpariert und in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen entweder einzeln in Netze in 24-Titerplatten oder zu mehreren in Netze (70 µm Maschenweite, Falcon) in 6 Titerplatten überführt und durch die unten tabellarisch aufgeführten Schritte geführt. Die Lagerung der Embryonen erfolgte wahlweise in 100%igen Methanol während der Methanolreihe für einige Tage bei -20°C oder vor der Hybridisierung im „storage-mix“ (50% Formamid, 25% H₂O, 25% SSC pH 4.5) für einen längeren Zeitraum bei -20°C. Zur Prähybridisierung, Hybridisierung und bei den Waschschritten in der Lösung 1 und 3 wurden die Embryonen mit einem kleinen Löffel in Eppendorfgefäße überführt und dann in einem Thermoblock (Eppendorf) bei 70°C über Nacht hybridisiert. Der Lösungswechsel erfolgte durch vorsichtiges Pipettieren mit einer Mikropipette. Nach dem zweiten Wa-

schen in Lösung 3 wurden die Embryonen zusammen mit Lösung 3 in eine 6- bzw. 24-Titerplatte mit 2% BBR in MAB überführt. Die Inkubationsdauer der Proteinase K Behandlung war abhängig von dem Entwicklungsstadium der Embryonen. Für Entwicklungsstadien jünger als HH 7 wurde sie für 1 Min durchgeführt und für spätere Stadien auf 3 Min verlängert.

1. Tag

PBT	2 x 5 Min
25% Methanol in PBT	5 Min
50% Methanol in PBT	5 Min
75% Methanol in PBT	5 Min
100% Methanol	5 Min
75% Methanol in PBT	5 Min
50% Methanol in PBT	5 Min
25% Methanol in PBT	5 Min
PBT	2 x 5 Min
6% H ₂ O ₂ /PBT	45 Min
PBT	3 x 5 Min
10 µg/ml ProtK/PBT	1-3 Min
2 mg/ml Glyzin/PBT	5 Min
PBT	2 x 5 Min
0.2% Glutaraldehyde/4% PFA/PBT	20 Min 4°C
PBT	2 x 5 Min
Optional: 50% Foramid, 5x SSC pH 4.5	Lagern bei -20°C
Prähybridisierungslösung	5 Min
Prähybridisierungslösung	1h 70°C
Hybridisierungslösung	über Nacht 70°C

2. Tag

Lösung 1 (50% Formamid, 5x SSC pH 4.5, 1% SDS)	2 x 30 Min, 70°C
Lösung 3 (50% Formamid, 2x SSC pH 4.5)	2 x 30 Min, 70°C
2% BBR/MAB	Waschen
2% BBR/MAB	1 h
20% FCS/2%BBR/MAB	1 h
anti Fluoreszein Antikörper (1:2000) in 20% FCS/2%BBR/MAB	über Nacht

3.Tag:

MAB	3 x Waschen
MAB	5 x 1 h
NTMT pH 8	Waschen
NTMT pH 8	3 x 10 Min
Fast Red in NTMT pH 8 *	45 Min bis 5 h
PBT	2 x 10 Min
0.1 M Glyzin/HCL pH 2,2	10 Min
PBT	5 x 10 Min
4% PFA/PBS	über Nacht 4°C

4. Tag:

PBT	2 x 5 Min
MAB	3 x Waschen
MAB	2 x 30 Min
2% BBR/MAB	1 h

20% FCS/2%BBR/MAB	1 h
anti Digoxigenin Antikörper (1:2000) in 20% FCS/2%BBR/MAB	über Nacht, 4°C

5. Tag:

MAB	3 x waschen
MAB	5 x 1 h
NTMT pH 9.5	Waschen
NTMT pH 9.5	3 x 10 Min
NBT/BCIP in NTMT pH 9,5*	2-24 h, im Dunkeln mit mehrfachen Lösungswechsel
PBT	2 x 10 Min
50% Glycerin/PBT	1 h
80% Glycerin/PBT	1 h, dann bei 4°C lagern

2.2.20 RADIOAKTIVE IN-SITU ANALYSE

Hühner bzw. Mäuseembryonen wurden auf das entsprechende Stadium (Hamburger-Hamilton) hin inkubiert und in PBS präpariert. Die Fixierung erfolgte in 4% PFA/PBS über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Embryonen zuerst für 2h in PBS gewaschen und anschließend in eine 0.86% NaCL Lösung für 2 h überführt. Zur Dehydratisierung wurden die Embryonen durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 95% 100% jeweils 2h) geführt. Im Anschluß wurden sie für 12 h in Isopropanol gelagert und danach für 2h in Toluol inkubiert.

Vor der abschließenden Einbettung in Paraplast Plus (Monoject Scientific) wurden sie in warmen Paraplast (59°C) 24 h inkubiert, um eine völlige Durchdringung des Gewebes mit Paraffin zu gewährleisten. Nachdem der Embryo in der Gießform korrekt orientiert worden ist, ließ man den Block abkühlen, welcher nun bei 4°C unbegrenzt gelagert werden konnte. 8 µm dicke Schnittserien wurden mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt. Die auf

der Wasseroberfläche aufschwimmenden Schnitte wurden auf Superfrost (Heinzel-Menzel) Objektträgern aufgenommen, wobei je nach Größe der Embryonen bis zu 8 Schnitte auf einem Objektträger angeordnet wurden. Das Wasser für das Mikrotom wurde zuvor mit 0.1% DEPC behandelt, um RNAsen zu inaktivieren. Auf den Objektträgern wurden die Schnitte für 2 h bei 37°C getrocknet und konnten dann bei 4°C gelagert werden.

Für die Hybridisierung wurden die Schnitte zunächst für 20 Minuten mit einmaligem Lösungswechsel mit Xylolersatz behandelt, um das Paraffin zu entfernen. In Analogie zur Einbettung erfolgte nun eine schrittweise Rehydratisierung mit Inkubationszeiten von jeweils 2 Minuten. Nach dem finalen Rehydrierungsschritt in 30%igem Ethanol wurden die Embryonen zunächst für 5 Minuten in Saline und anschließend für 5 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Fixierung für 20 Minuten in 4% PFA in PBS, dann wurden sie zweimal in PBS für 5 Min gewaschen und dann mit Proteinase K (20 µg/ml in 20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) 7 Min lang verdaut. Diese Maßnahme diente dazu, die RNA zu demaskieren und für die Probe zugänglich zu machen. Nachdem die Proteinase in PBS ausgewaschen worden war, wurden die Schnitte erneut für 5 Min in 4% PFA/PBS refixiert, wiederum in PBS gewaschen und für 10 Min in den Acetylierungs-Mix (250 ml 0.1 M Triethanolamin + 0.625 ml Essigsäureanhydrid) überführt, in dem eine Acetylierung der Proteine stattfand. Durch die Acetylierung werden die negativ geladenen Carboxy-Gruppen der Aminosäuren neutralisiert, wodurch der Hintergrund bei der anschließenden Hybridisierung stark vermindert wurde. Bevor die Embryonen danach wieder durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und anschließend getrocknet wurden, erfolgte vorher zunächst jeweils ein 5 minütiger Waschschrift in PBS und anschließend in Saline (0.86% NaCl).

Herstellen der Hybridisierungslösung:

Die Hybridisierungslösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Hybridisierungssalz (0.2g/100ml PVP (Polyvenylpolyocton), 0.2g/100 ml Ficoll, 1,38 g/100ml NaH ₂ PO ₄ pH 6.8, 50mM EDTA, 3 M NaCl, 0.1M Tris pH8	200 µl
Formamid (deionisiert)	1ml
DTT	200 µl
Dextransulfat 50%	400 µl

tRNA	1 µl
H ₂ O	199 µl

Die Probe wurde in dem Hybridisierungspuffer auf 1×10^5 cpm/µl verdünnt und konnte dann bei -20°C gelagert werden. Pro Embryoschnitt wurden je nach Größe etwa 15-20 µl der Hybridisierungslösung verwendet. Um Haarnadelschleifen und andere Sekundärstrukturen der RNA, die die Anlagerung der Proben erschweren, aufzulösen, wurde diese für 2 Min auf 80°C erhitzt und dann bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert. Nach dem Auftragen der Probe wurde auf die Schnitte ein 60x24 mm großes Deckglas aufgelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probe zu gewährleisten. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C in einer luftdicht schließenden Kammer.

Am Boden der Kammer lagen zwei Schichten 3MM Whatman Papier, das mit einer Lösung bestehend aus 50% Formamid und 2 x SSC durchtränkt war. Die Objektträger lagen dabei erhöht auf abgesägten Plastikpipetten, damit sie nicht mit dem feuchten Papier in Berührung kamen.

Waschschritte:

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger direkt in Glasküvetten überführt und 15 Min lang in einer Lösung aus 2x SSC pH 4.5, 50% Formamid und 1.4 ml/l β-Mercaptoethanol geschüttelt, damit sich die Deckgläser ablösen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Waschschritte:

2x SSC pH 4.5, 50% Formamid und 1.4 ml/l β-Mercaptoethanol	30 Min 65°C
2x SSC pH 4.5, 50% Formamid und 1.4 ml/l β-Mercaptoethanol	4-5 h 37°C
NTE-Puffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA)	15 Min 37°C
NTE-Puffer + 20µg/ml RNaseA	15 Min 37°C
NTE-Puffer	15 Min 37°C
2x SSC pH 4.5, 50% Formamid und 1.4 ml/l β-Mercaptoethanol	30 Min 37°C
2x SSC	15 Min RT
0.1x SSC	15 Min RT

Anschließend wurden die Schnitte erneut durch eine aufsteigende Methanolreihe jeweils 2 Min (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) dehydratisiert. Um zu überprüfen, ob ein spezifisches Signal vorhanden ist, wurde über Nacht ein Film in einer Röntgenkassette auf die Schnitte gelegt.

Autoradiographie:

Um das radioaktive Signal der *In-situ* Proben zu detektieren, wurden die Schnitte in eine flüssige Filmemulsion (Kodak NTB-2) eingetaucht. Die emittierte Strahlung führt zur Bildung von Silberkörnern auf den Strukturen des Schnittes, deren Lokalisation im Dunkelfeld analysiert werden konnte. Das Dippen der Schnitte erfolgte in völliger Dunkelheit, wobei die Obträger 2-3 mal in einer Küvette in die 42°C warme Filmlösung eingetaucht und dann für 2 h getrocknet wurden. Die Exposition erfolgte für etwa 10 Tage in lichtdicht verschlossenen Objektträgerschachteln. Zur Entwicklung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 3 min in Entwicklerlösung (Kodak D19, 80g/500ml) eingetaucht. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation (1 Min) in 0,1% Essigsäure abgestoppt. Nach einer weiteren Inkubation für 3 Min in einer 30% Thiosulfatlösung wurden die Objektträger dreimal 10 Min in Wasser gespült, bevor eine Gegenfärbung durch Giemsa (Stock: 0.85 g Giemsa, 50 ml Glycerol, 50 ml Methanol) Arbeitslösung (gefiltriert): 40 ml Stock + 20 ml Na-Phosphat Puffer pH 6 pro Liter) (~20 Min) erfolgte. Nach Ablauf der Färbung wird die Färbelösung ~30 Min unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen (nicht direkt ausgießen). Anschließend wurden die Schnitte getrocknet, in Eukitt eingebettet und im Dunkelfeld mikroskopiert.

2.2.21 EMBRYOLOGISCHE METHODEN

2.2.21.1 Kollagen-Kultur (Lumsden und Davis, 1983)

Diese Methode diente dazu, Gewebeexplantate zu kultivieren. Dazu wurden in Einsätzen, die sich in 24 Titer Platten befanden, 40 µl neutralisierte Rattenschwanz-Kollagenlösung vorgelegt. Diese Einsätze hatten an ihrem Boden eine semipermeable Membran. 9 mg Rattenschwanz-Kollagen (BOEHRINGER MANNHEIM) wurde in 3 ml 0.2% (v/v) steriler Essigsäure (pH 3) durch Schütteln über Nacht bei 4°C gelöst und war dann mehrere Wochen bei 4°C lagerbar. Die Arbeitslösung wurde am Tag des Gebrauchs folgendermaßen hergestellt:

Herstellen der Kollagenarbeitslösung:

Rattenschwanz Kollagen	200 µl
MEM-EARLE (SEROMED)	25 µl
Fetales Kälberserum	12.5 µl
L-Glutamin	5 µl
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	10 µl

Die Lösung hatte vor Zugabe des Natriumhydrogencarbonats einen stark sauren pH-Wert (~3) und besaß eine gelbe Farbe. Im basischen Bereich schlug der im Medium enthaltene Farbindikator nach rosa um. Es wurde solange NaHCO₃ zugegeben, bis sich der pH-Wert genau im neutralen Bereich befand (pH 7.5). Sichtbar war dies durch einen orangefarbenen Farbton des Indikators. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgte auf Eis, da Kollagen bei basischem pH bei Raumtemperatur schnell polymerisiert. Nachdem das Explantat luftblasenfrei in das Kollagen gebracht worden war, wurden die Gewebekultureinsätze (Nunc, 0,02 µm Anopore-Membran) bei 37°C 15 Min lang inkubiert, damit das Kollagen polymerisieren konnte. Während des Polymerisierens kam es häufig vor, daß das Gewebestück bis auf die Membran des Gewebekultureinsatzes absank. Dies war insofern problematisch, als bei der Ablösung des Kollagentropfens von der Unterlage nach der Inkubation das Explantat aufgrund der auftretenden Scherkräfte zerreißen konnte. Nach der Polymerisation wurde sowohl auf den Kollagentropfen als auch unter den Einsatz jeweils 500 µl Kollagenkulturmedium [Medium 199 (Sigma), 5% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 2mM L-Glutamin, 1% (v/v) Penicillin 5000 IU/ml und Streptomycin 5000 IU/ml (GIBCO)] gegeben. Die Explantate wurden für 12 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂) inkubiert. Die Gewebeteile wurden danach für 30 Min in der Kollagenmatrix in 4% PFA/PBS auf Eis inkubiert, danach vorsichtig mit Hilfe zweier Pinzetten von der Kollagenmatrix befreit und entweder für die *In-situ* Hybridisierung oder für eine LacZ-Färbung weiterprozessiert.

2.2.21.2 *In vitro* Kultivierung von Hühnerembryonen (New Kultur)

Die Kultivierung der Hühnerembryonen erfolgte wie beschrieben (New, 1955; Stern, 1993).

Die bebrüteten Eier wurden mit einer kleinen Schere am stumpfen Ende geöffnet, das dickflüssige Eiweiß wurde verworfen und das dünnflüssige Eiweiß in einer Petrischale

aufgefangen. Das von der Vitellinmembran umhüllte Eigelb wurde in eine Schale mit Pannett-Compton Saline gegeben (PC-Puffer: 4% (v/v) Stammlösung A und 6% (v/v) Stammlösung B in Wasser (Millipore) (Stammlösung A: 121 g/l NaCl, 15.5 g/l KCL, 10.4 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 12.7 g/ $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) bzw. Stammlösung B: 2.365 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.188 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$); (Pannett und Compton, 1924). Mit einer Pasteurpipette wurde die Vitellinmembran von anhaftendem Eiweiß befreit und das das Eigelb so orientiert, daß der Embryo oben auflag. Die Vitellinmembran wurde am Äquator mit einer gebogenen Schere aufgeschnitten und vorsichtig vom Eigelb abgezogen, so daß der Embryo an der Vitellinmembran haften blieb. Die Membran wurde mit der Embryoseite nach oben auf eine im Puffer liegende Urglasschale überführt. Nachdem ein Glasring mit einem Innendurchmesser von 22 mm auf die Vitellinmembran aufgelegt wurde, erfolgte eine mittige Zentrierung des Embryos. Überschüssiger Puffer und verbliebenes Eigelb wurde nun mit einer Mikropipette abgesaugt. Eine 3.5 cm Zellkulturschale wurde mit 4 ml des gesammelten dünnflüssigen Eiweiß gefüllt und der Glasring zusammen mit dem Embryo in die Zellkulturschale überführt. Anschließend wurde der Glasring mit zwei Spateln an der Schale festgedrückt, außerhalb des Glasrings befindliches Eiweiß wurde abgesaugt und sowohl Embryo als auch Vitellinmembran von Puffer, Eiweiß und Eigelb befreit. Die Kulturschale wurde in einem 38°C Brutschrank bis zum gewünschten Entwicklungsstadium inkubiert.

2.2.21.3 Vorbereiten des Eies für Embryomanipulationen

Die Eier wurden im Brutschrank bis zum Stadium HH 9-10 (~34 h) liegend inkubiert. Das Ei wurde vorsichtig mit 70% Ethanol abgewischt und möglichst ohne seine relative Lage zu verändern in ein Plastilin Bett gelegt. Mit einer spitzen Schere wurde die Schale sowohl am stumpfen Ende des Eies als auch an seinem höchsten Punkt perforiert. Durch das Loch am stumpfen Ende wurden mittels einer Kanüle in etwa 2-3 ml Eiweiß abgezogen. Dadurch wurde die dorsal auf dem Dotter liegende Keimscheibe, bzw. der Embryo abgesenkt, wodurch das Risiko vermindert wurde, ihn beim Aufschneiden der Schale zu verletzen. Mit Hilfe einer Schere oder einer Minikreissäge wurde das dorsal liegende Loch auf etwa 1x2 cm erweitert. Durch vorheriges Aufbringen von Klebeband (Tesafilm) konnte man verhindern, daß Schalenstücke auf Dotter und Embryo fielen. Um ein An-trocknen der Vitellinmembran am Embryo und damit dessen Absterben zu vermeiden, wurde der Embryo durch Aufpipettieren von Tyrode's Puffer (80 g NaCL, 2 g KCL, 2.71

g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g Glukose auf 1 Liter Wasser) stets feucht gehalten. Um Infektionen mit Bakterien zu verhindern, wurde dem Puffer zusätzlich 1% (v/v) Penicillin 5000 IU/ml und Streptomycin 5000 IU/ml zugesetzt. Mit einer angeschärften Wolframnadel wurde die Vitellinmembran über dem Injektionsgebiet angeritzt. Zu besseren Visualisierung wurde Tinte (1/10 in Tyrodes Puffer [Faber]) mit Hilfe einer rechtwinklig abgeboenen Kanüle (25 G, Henke/Sass/Wolf) in den Dotter unterhalb des Embryos gespritzt. Die richtige Wahl der Tintenmarke ist wichtig, da zahlreiche Hersteller der Tinte Phenol beifügen. Dies führt jedoch zum Absterben des Embryos.

2.2.21.4 Präparation der Mäuseembryonen

Verwendet wurden Embryonen des Mausstammes NMRI. Zur Altersbestimmung wurden sowohl die Tage post coitum als auch objektive morphologische Kriterien, wie die Somitenzahl („Theiler stages“, Einteilung nach Kaufmann) herangezogen. Die trächtigen Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Bauchraum direkt oberhalb des Urethers eingeschnitten und die Öffnung seitlich an beiden Seiten bis zu den Rippen weiter geführt. Die beiden Uterushörner wurden herausgeschnitten und die Embryonen in M2 Medium präpariert. Bei der Präparation wurde zunächst das muskulöse Uterusgewebe mit Hilfe zweier Pinzetten abgetrennt. Beim Entfernen der Desidua war darauf zu achten, daß sowohl der Ektoplazentarkonus intakt bleibt, als auch daß die den Embryo umgebenden extraembryonalen Membranen, das Amnion und die Allantois, unverletzt bleiben. Wurden sie perforiert, resultierte dies bereits bei Kurzzeitexperimenten von 6 h in einer stark herabgesetzten Lebensfähigkeit des Embryos und häufig zu morphologischen Veränderungen. Reicherts Membran, die die Allantois umgibt, wurde jedoch vorsichtig entfernt.

2.2.21.5 Gentransfer

Im folgenden werden die optimierten Protokolle für die Transfektion verschiedener Gewebetypen und verschiedener embryonaler Stadien während der Entwicklung des Hühnerembryos wiedergegeben. Es ist ebenfalls ein kurzer Abriss über die Elektroporation von Mäuseembryonen dargestellt.

2.2.21.5.1 *In Kultur*

Zur Transfektion von Embryonen im Gastrulationsstadium HH3-HH4 wurden diese wie im Kapitel (2.23.2) beschrieben für die Kultivierung in der New Kultur präpariert. Am besten eigneten sich Embryonen, die sich im frühen Stadium HH4 befanden, bei denen noch kein laterales Mesoderm aus dem Primitivstreifen eingewandert war. Ekto- und Endoderm liegen daher noch lose aufeinander. Die Platinelektroden wurden im Abstand von 8 mm auf angefeuchteten (PBS) Whatmann Filterpapieren auf die Vitellinmembran aufgesetzt. Die Pulsparameterwahl war wie folgt: **5 Pulse, 110 Volt, $\tau=50$ msec**. Die Konzentration der DNA Lösung (in PBS) betrug 3-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Die ausgezogenen Glaskapillaren wurden von hinten mit Gelladespitzen (Eppendorf) mit der DNA Lösung befüllt. Die Spitze der Kapillaren wurde zwecks der besseren Visualisierung schwarz angefärbt. Es wurden einige Nanoliter der Lösung zwischen das Endoderm und das Ektoderm in der Region anterior zum Knoten gespritzt, so daß sich das Endoderm sichtbar während der Injektion aufwölbte. Dies wurde auf der Anode zugewandten Seite des Embryos durchgeführt. Bei der Beteiligung von Knotengewebe kam es dabei zur Ausbildung von fast komplett halbseitig transfizierten Embryonen (siehe 3.1). Nach Abschluß der Elektroporation wurden die Elektroden wieder von den Filterpapieren entfernt und der Embryo wurde circa für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde überprüft, ob das Gewebe der *area opaca* rund um die Filterpapiere abstarb. War dies der Fall, so wurde der intakte Teil der *area opaca* erneut durch trockene Filterpapiere an der Vitellinmembran fixiert, um zu verhindern, daß der Embryo entweder abrutschte oder sich in der Mitte zwischen den Filterpapieren zusammenzog. (siehe auch Abb.9)

2.2.21.5.2 *Im Ei*

Für die Transfektion von Embryonen von Stadium HH9-HH12 hat sich ein Ansatz bestehend aus einer etwa 4 mm langen Platinelektrode, die bis auf die 2 mm an der Spitze mit Nagellack elektrisch isoliert war und einem flammengeschärften Wolframdraht ($\sim 40\mu\text{m}$ Spitzendurchmesser) bewährt. Der Wolframdraht wurde mit der Kathode und der Platindraht mit der Anode verbunden. Die Pulsparameterwahl war wie folgt: **3 Pulse, 8 Volt, $\tau=25$ msec**

Die Platinelektrode wurde längs der Körperachse des Embryos positioniert (siehe Abb.7), wobei darauf geachtet wurde, daß der nicht isolierte Teil des Platindrahtes in der Region des Transfektionsgebietes zu liegen kam. Die DNA Lösung ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Tyrodes), ange-

färbt mit 0.1% Fast Grün, wurde durch eine ausgezogene Glaskapillare ins Lumen des Neuralrohres bzw. in einzelne Gehirnvesikel injiziert. An dieselbe Stelle wurde anschließend auch die Wolframelektrode eingestochen.

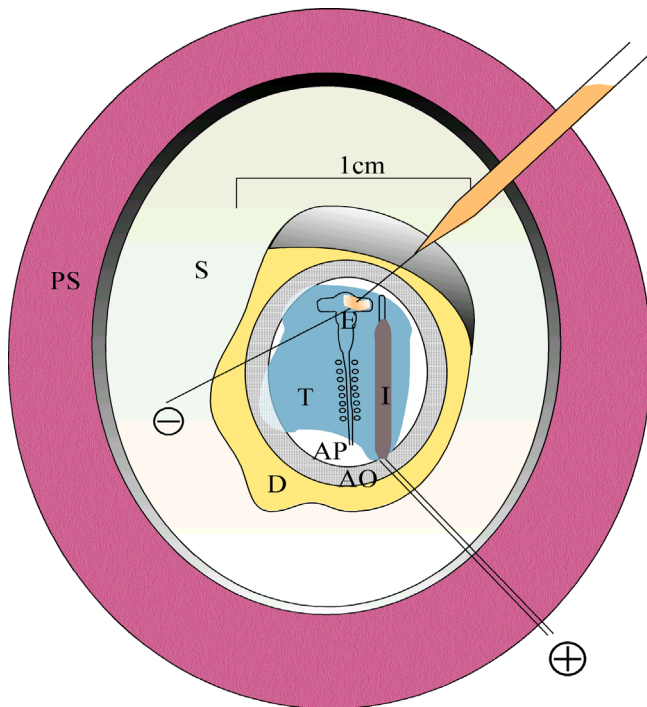


Abb.7: Elektroporation im Ei. Das Ei liegt dabei in einem Plastilinbett (PS, rote Schraffur). Dorsal wurde das Ei mit einer Schere geöffnet. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. (S) Eischale, (D) Dotter, (T) unterspritzte Tinte, (I) Isolation der Elektroden, (E) Embryo, (AP) *area pellucida*, (AO) *area opaca*.

Zum besseren Verständnis ist diese Abbildung in Zusammenhang mit den Abbildungen im Ergebnisteil zu betrachten (Abb.17, Kapitel 3.1.5).

Der Abstand beider Elektroden betrug 1-2 mm. Die während der Pulse entstehenden, durch elektrolytische Prozesse hervorgerufenen Gasblasen im Neuralrohr schienen den Embryo in seiner weiteren Entwicklung nicht zu beeinträchtigen. Nach Verschließen des Eies mit Klebeband wurden die Embryonen bis zu 48 h bei 38°C inkubiert. Die Überlebensrate nach 24 h betrug typischerweise in etwa 80%. Das Absterben der Embryonen kann hervorgerufen werden durch bakterielle Infektionen (daher der Antibiotika Zusatz), Antrocknen der Vitellinmembran und Schädigung der extraembryonalen Blutversorgung durch den elektrischen Puls. Die Aufnahme der DNA ins Gewebe erfolgte nahe an der Kathode, aber auf derjenigen embryonalen Seite, die der Anode ausgesetzt war.

2.2.21.5.3 In Explantaten

Explantate wurden aus der Neuralplatte von HH4 Embryonen gewonnen. Die Embryonen wurden dazu von der Vitellinmembran vorsichtig mit zwei Pinzetten abgezogen und in einer mit PBS gefüllten 3.5 cm Petrischale mit Hilfe von Insektennadeln auf einem Silikon-

bett aufgespannt. Das Endoderm im Bereich der Neuralplatte konnte dabei durch vorsichtiges Beiseiteschieben mit geschärften Wolframnadeln entfernt werden. Dieser Prozeß konnte durch die Verwendung von Dispase (0.2% in PBS) erleichtert werden. Die Elektroporation erfolgte zwischen parallelen Nylonnetzen, die von kleinen Plexiglaspylonen aufrecht gehalten wurden (Abb.14). Die Nylonnetze hatten die Aufgabe, die bei der Elektrolyse entstehenden H₂ und O₂ Blasen von den Gewebeteilen fernzuhalten, um ihre Zerstörung durch die Oberflächenspannung zu verhindern. Die ausgeschnittenen Neuralplattenexplantate wurden dabei in einen PBS Tropfen (20µl) zwischen den Netzen überführt, der das entsprechende Expressionsplasmid (1µg/µl) enthält.

Es wurde wiederum ein asymmetrischer Elektodenaufbau gewählt, wobei die Anode diesmal mit der punktförmigen Elektrode verbunden wurde. (Erläuterungen siehe Ergebnisteil und Diskussion). In diesem Fall bestanden jedoch beide Elektroden aus Platin.

Die Pulsparameterwahl war wie folgt: **3 Pulse, 75 Volt, $\tau=50\text{msec}$, Abstand der Elektroden 3 mm**

Nach der Poration wurden die Explantate kurz in Kollagenkulturmedium gespült, in die Kollagenmatrix eingebettet und in einem CO₂ Inkubator bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert.

Der Transfer der Explantate erfolgte in 2 µl Pipetten (Eppendorf). Ein Anhaften der Explantate an der Wand der Pipettenspitze konnte durch vorheriges Aufsaugen von FCS in die Pipettenspitze verhindert.

Stabilere und größere Explantate, wie etwa Flügelknospen wurden leicht abgewandelt behandelt. Sie wurden ebenfalls in einem PBS Tropfen elektroporiert, wobei die Wahl der Pulsparameter dieselbe war wie für Neuralplattenexplantate. Allerdings wurden keine Nylonnetze verwendet und die DNA wurde in konzentrierter Form (5µg/µl) in die Flügelknospe direkt injiziert. Die Kultivierung dieser großen Gewebeteile erfolgte freischwimmend im Kollagenkulturmedium dem 10% Hühnerserum zugesetzt wurde.

2.2.21.5.4 In Mäuseembryonen

Die freipräparierten Mäuseembryonen, Stadium 8.5-9.5 dpc wurden ebenfalls in einem PBS Tropfen elektroporiert (siehe Ergebnisteil 1.6). Der Flüssigkeitsspiegel wurde dabei soweit abgesenkt, daß der Embryo mit seinen extraembryonalen Hüllen auf dem Boden der 3.5 cm Petrischale auflag. Der Elektodenaufbau bestand aus zwei parallele Plati-

nelektroden im **Abstand** von **8 mm**. Die Pulsparameterwahl war wie folgt: **3 Pulse, 35 Volt, $\tau=50$ msec**.

Die Injektion der DNA ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) erfolgte ins Mesenchym unterhalb der Neuralfaltens. Es war unbedingt darauf zu achten, kein FCS aus der Präparationslösung in den PBS Tropfen zu übertragen, da dies die Transfektionseffizienz drastisch reduzierte. Der Transfer der Mäuseembryonen geschah in Plastik Pasteurpipetten (COPAM). Direkte Injektionen in den schlagenden Ventrikel sollten ebenfalls vermieden werden, da dies die Morphologie des Herzens negativ beeinflusste. Die folgende Abbildung 8 ist als Ergänzung zu den dargestellten Abbildungen zur Elektroporation von Mäuseembryonen im Ergebnisteil (Kapitel 3.6) gedacht.

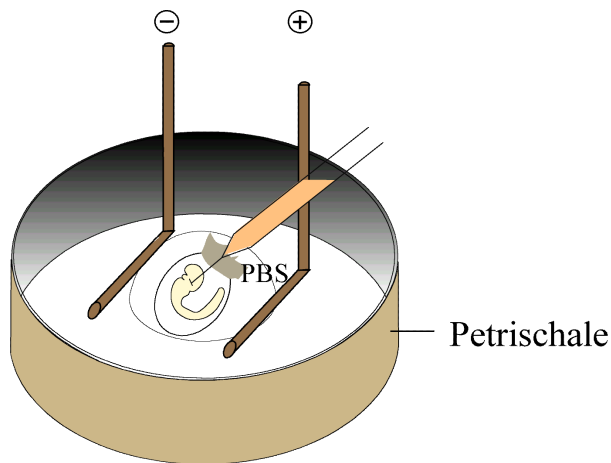


Abb.8: Elektroporation von 8.5-9.5 Mäuseembryonen erfolgt in einer Petrischale in einem PBS Tropfen wobei parallele Elektroden verwendet werden.

2.2.22 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Experimente wurden mit embryonalen Hühner- und Mausfibroblasten sowie einer Affen-nierenzelllinie Cos7 durchgeführt. Die Zellen wurden unter Standard-Zellkulturbedin-gungen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

2.2.22.1 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und im Nährmedium [DMEM (Seromed) mit 1000 mg/l Glucose (Gibco BRL), 10% inaktiviertes fötales Kälberserum (Gibco/BRL), 2% Hühnerserum (Sigma), 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL), 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (Gibco BRL)] aufgenommen und für 5 Min bei 1000 rpm (170 xg) in einer Labofuge GL (Heraeus) zentrifugiert. Das Hüh-nerserum wurde dabei nur bei embryonalen Hühnerfibroblasten verwendet. Das Pellet

wurde in 5 ml Medium resuspendiert, in eine 5.3 cm Zellkulturschale (Greiner) überführt und diese bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturschrank (Heraeus BBD 6220) inkubiert. Sobald die Zellen eine konfluente Einzelzellschicht bildeten, wurden sie gesplittet.

2.2.22.2 Splitten von Zellen

Von konfluent bewachsenen Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt und zweimal durch je 4 ml PBS ersetzt. Anschließend wurde das PBS durch 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL, 0.5 g/l Trypsin, 0.2 g/l EDTA) ausgetauscht und für etwa 3 Min bei 37°C bis zum vollständigen Ablösen der Zellen von der Kulturschale inkubiert. Die Proteolyse der Zellen wurde durch Zugabe von 4 ml Medium abgestoppt und die abgelösten Zellen pelletiert (3 Min bei 1000 rpm, 170 xg, in einer Labofuge GL, Heraeus). Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und die Suspension auf neue Zellkulturschalen so aufgeteilt, daß die Zellen im Vergleich zur Ausgangskultur drei- bis zehnfach verdünnt wurden.

2.2.22.3 Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Zellen wurden diese nach Ablösen von der Zellkulturschale bei -70 Grad eingefroren. Das zentrifugierte Zellpellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen. Jeweils 500 µl wurden 1/1 mit 500µl Medium versetzt, das 20% DMSO enthielt und in Kryoröhrchen bei -20°C für 2 h eingefroren. Über Nacht wurden sie auf -80°C Grad tiefgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.22.4 Transfektion von Zellen

Die Fibroblasten und Cos7 Zellen wurden auf 5.3 cm Platten bis zu einer Dichte von etwa 50% bis 80% kultiviert. In einem Eppendorfgefäß wurden 88 µl serumfreies DMEM Medium (Gibco BRL) mit 12 µl des FuGene Reagenzes (Roche) versetzt. Nach 5 Min wurde diese Mischung tropfenweise zu 4 µl zu der zu transfizierenden DNA-Lösung (1 µg/µl) hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach weiteren 15 Min wurde die hergestellte Mischung tropfenweise in das Medium der Zellkulturschale zugefügt und diese weiter inkubiert. Gleichzeitige Transfektion mit zwei Plasmiden wurde mit der Calciumphosphat Transfektion erreicht (Graham und van der Eb, 1973). Bei der Transfektion wurde 36 µl 2M CaCl₂ mit 20 µg DNA in H₂O und 264 µl Wasser versetzt. In einem zweiten Gefierröhrchen (NUNC, 1 ml) wurde 300 µl 2x HEPES Puffer

vorgelegt. Die Calciumphosphat enthaltende Lösung wurde tropfenweise zu dem HEPES Puffer pipettiert, während gleichzeitig Luft durch den Puffer mittels einer Pipettierhilfe geblasen wurde (Dauer circa 2 Min). Es bildete sich ein feines Präzipitat, das in das Medium der Zellkulturschale gegeben wurde.

2.2.22.5 Kultivierung der transfizierten Zellen auf Objektträgern

Etwa 7 h nach der Transfektion wurden die embryonalen Fibroblasten von den Petrischalen abgelöst (siehe 2.22.2) und auf Objektträgern, die aufgeklebte kleine Kammern enthielten (Lab-Tek) ausplattiert. Die Objektträger wurden zuvor für 1 h mit einer 0.1%igen Gelatine-Lösung beschichtet.

2.2.23 HERSTELLEN VON GEFRIERSCHNITTEN

Vor dem Einfrieren der Embryonen in einer Kryomatrix wurden sie über Nacht in einer 30% Sucrose Lösung (PBS) gelagert. Das Durchdringen des Gewebes mit Sucrose als Gefrierschutzmittel bewirkte, daß die Zellen während des Einfrierens nicht durch sich bildende Eiskristalle zerstört wurden.

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 10 µm dicke Schnitte angefertigt, die vom Messer mit einem Objektträger (Superfrost) aufgenommen wurde. Verwendet werden können auch mit Gelatine und Chromalaun behandelte Objektträger. Die Schnitte wurden 30 Min. bei 37°C auf einer Wärmeplatte getrocknet und dann in einem mit Klebeband versiegelten Objektträgerkasten trocken bei -20°C aufbewahrt.

2.2.24 HISTOCHEMIE

2.2.24.1 Immunfärbung von Gefrierschnitten

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte mehrmals für jeweils 10 Min. in PBS gewaschen und dann für 1 h in 20% FCS in PBT (Blockierungslösung) überführt.

Daraufhin wurden sie über Nacht mit dem monoklonalen Anti-MSX Antikörper (Hybridomabank) in einer Verdünnung von 1:100 in 20% FCS in PBT bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal mit PBT und zweimal mit 20% FCS in PBT für je 20 Min gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus, Alexa 564, MoBiTec) in einer Verdünnung von 1:2000 in 20% FCS in PBT für zwei Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde fünfmal in PBT für je 30 Min. gewaschen. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hilfe von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, 1 µg/ml in PBT). Abschließend wurden die Schnitte in Mo-wiol eingedeckelt und im Lichtmikroskop mit Nomarski-Interferenzkontrast betrachtet.

2.2.24.2 Nachweis von β -Galaktosidase (X-Gal-Färbung)

Embryonen des gewünschten Alters wurden in 1x PBS präpariert und bei 4°C in Fixierlösung für 30 Min fixiert. Anschließend wurden die Embryonen 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 1/2 h inkubiert

FIXIERLÖSUNG

Formaldehyd, 1%
Glutaraldehyd, 0.2%
NP-40, 0.02%
in 1x PBS

X-GAL-FÄRBELOESUNG:

X-Gal, 1 mg/ml
K₃Fe(CN)₆, 5 mM
K₄Fe(CN)₆, 5 mM

Nach erfolgter β -Galaktosidase-Färbung wurden die Embryonen in PBS gewaschen gegebenenfalls ü.N. in 4% PFA in PBS fixiert und anschließend in einer ansteigenden Glycerin/PBS-Reihe (30%, 50%, 80%) eingelegt.

2.2.25 SIMULATIONEN MIT DEM PROGRAMM ANSYS

Die Brechnung der Feldstärkeverteilung bei der Elektroporation von Embryonen in einem homogenen bzw. inhomogenen Feld wurde mit dem Program ANSYS (Release

5.7) durchgeführt, ein Programm zur Lösung von Differentialgleichungen das nach der "Finite Elemente Methode" (FEM) arbeitet.

Da das System sehr komplex ist wurden folgende Vereinfachungen vorgenommen:

1. Berechnungen wurden elektrostatisch im "steady current state" durchgeführt, d.h. in den Maxwellgleichungen wurde die zeitliche Ableitung des Feldes gleich Null gesetzt. Dies war notwendig, um das E-Feld als Gradient eines Potentials darstellen zu können.
2. Es wurde nur mit dem Imaginärteil der Dielektrizität gerechnet.
3. Leitfähigkeit des Embryos wurde abgeschätzt, zudem ändert sich die Leitfähigkeit während des elektrischen Pulses.
4. Die chemischen Potentiale der Elektroden wurden vernachlässigt.

Die Werte wurden für folgende Parameter berechnet:

Embryodicke	200 μm
Embryolänge	8 mm
Embryobreite	7 mm
Abstand der Elektroden	8 mm
Elektrodendurchmesser	600 μm
Pulshöhe	110 Volt
Resistivität Embryo	1,3 Ohm m (Lokhande et al., 1996)
Resistivität Elektroden	0,107 10^{-7} Ohm m

3. ERGEBNISSE

"The behaviour of a cell in an embryo depends on the extent to which it listens to its mother or its neighbourhood. The size and the nature of the noise, the way in which it is heard and the response are unpredictable and can only be discovered by experimentation" (Jonathan Bard, 1997)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gentransfer in verschiedene Entwicklungsstadien des Hühnerembryos mittels der Elektroporationsmethode untersucht. Die Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten technischen Teil wird der experimentelle Einsatz dieser neuen Transfektionsmöglichkeit unter verschiedenen embryonalen Kulturbedingungen untersucht. Im zweiten Abschnitt hingegen wird der Effekt der Überexpression des Proteins *Geminin* auf die Musterbildungsprozesse während der Anlage der Neuralplatte analysiert. Grundsätzlich kann man drei experimentelle Systeme unterscheiden, in denen die Elektroporation bei frühen Hühnerembryonen angewendet werden kann:

1. Elektroporation von kultivierten Embryonen während der Gastrulation im Primitivstreifenstadium. Dies entspricht dem Stadium HH3-4. Diese Embryonen werden dazu aus der natürlichen Umgebung des Eies entfernt und können mit Hilfe einer speziellen Kulturmethode, der New Kultur (New, 1955), in einem 37°C Brutschrank für etwa 36 Stunden inkubiert werden.
2. Elektroporation von Embryonen im Ei, die im folgenden als *in ovo* Elektroporation bezeichnet wird. Sie wird angewendet bei der Transfektion älterer Entwicklungsstadien (ab HH10), die auf eine ausreichende Blutversorgung und auf die Bereitstellung von Nährstoffen aus dem Dotter angewiesen sind.
3. Elektroporation von Explantaten, die aus verschiedenen Bereichen des Embryos gewonnen werden und die in einem *in vitro* Kultursystem, der Kollagenkultur, kultiviert werden können (Lumsden und Davis, 1983).

Für alle drei Vorgehensweisen wurde ein Protokoll entwickelt, das im Abschnitt 2.21.5 in Material und Methoden zu finden ist. Da im ersten Teil der Arbeit die Etablierung und Adaptation einer Methode dargestellt wird, finden sich in diesem Abschnitt recht detaillierte Angaben darüber, wie bei der Durchführung der Experimente verfahren wurde.

Zur Etablierung der Transfektion in elektrischen Feldern wurden Plasmide elektroporiert, die die kodierende Sequenz des bakteriellen Enzyms β -Galaktosidase (LacZ-Gen) bzw. der fluoreszierenden Proteine RFP (rot fluoreszierendes Protein) und GFP (grün fluoreszierendes Protein) enthielten. Bei der sog. LacZ Färbung wird das zunächst farblose chromogene Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) durch dieses Enzym gespalten und bildet einen unlöslichen blauen (Indigo) Niederschlag. Um das Schicksal einzelner Zellen im lebenden Embryo verfolgen zu können, bietet sich als *in vivo* Marker die Verwendung des grün fluoreszierenden Proteins GFP besonders an, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Chalfie et al., 1994).

3.1 Elektroporation

3.1.1 ELEKTROPORATION JUNGER HÜHNEREMBRYONEN

Um der Frage nachzugehen, wie frühe Musterbildungsprozesse in der Neuralplatte gesteuert werden, wurde die von Muramatsu entwickelte Methode der *in ovo* Elektroporation für das System der New Kultur adaptiert und modifiziert (Muramatsu et al., 1997). Die wichtigsten Parameter, die die Elektroporationseffizienz beeinflussen, nämlich Temperatur, Pulsdauer, -länge, -zahl und Pulshöhe sowie die DNA Konzentration wurden variiert und in ihren Auswirkungen analysiert.

Die Elektroporation wurde bei Raumtemperatur (22°C) ausgeführt, nachdem die Embryokulturen in einem 37°C Inkubator bis Stadium HH 3-4 (für die Zuordnung einzelner Stadien zu bestimmten Entwicklungsabschnitten siehe Einleitung) inkubiert worden waren. Ein weiteres Absenken der Temperatur hätte zwar zur Folge gehabt, daß die induzierten Membranporen infolge der trägeren Fluktuationen der Lipidmoleküle länger offen bleiben, wurde jedoch aus praktischen Erwägungen nicht in Betracht gezogen. Bereits der Temperatursprung auf Raumtemperatur in Verbindung mit der Arretierung des Zellzyklus und dem osmotischen Schock, ausgelöst durch den elektrischen Puls, haben zur Folge, daß die normale Entwicklung etwa nach 2-3 h wieder aufgenommen wurde. Der osmotische Schock kommt dabei durch die unspezifische Aufnahme von Ionen aus dem umgebenden Milieu über die induzierten Poren zustande. Beobachtungen von Toneguzzo, daß linearisierte DNA zu einem erhöhten Genexpressionslevel führt, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Toneguzzo et al., 1986). Linearisierung und damit stabile Integration ins Genom ist jedoch die Voraussetzung für lang persistierende Genexpression. Dieser Prozeß ist essentiell für die Herstellung transgener Tiere und stabiler Zelllinien jedoch die Voraussetzung für lang persistierende Genexpression. Dieser Prozeß ist essentiell für die Herstellung transgener Tiere und stabiler Zelllinien.

Der schematische Aufbau der Elektroporationsanordnung für die Transfektion von Embryonen im Primitivstreifenstadium ist in Abbildung 9 (A-C) dargestellt. Die Elektrode bestand aus zwei parallelen Platindrähten von 0.5 mm Durchmesser, die einen Abstand von 8 mm besaßen und durch einen Mikromanipulator (Eppendorf) gesteuert werden konnten.

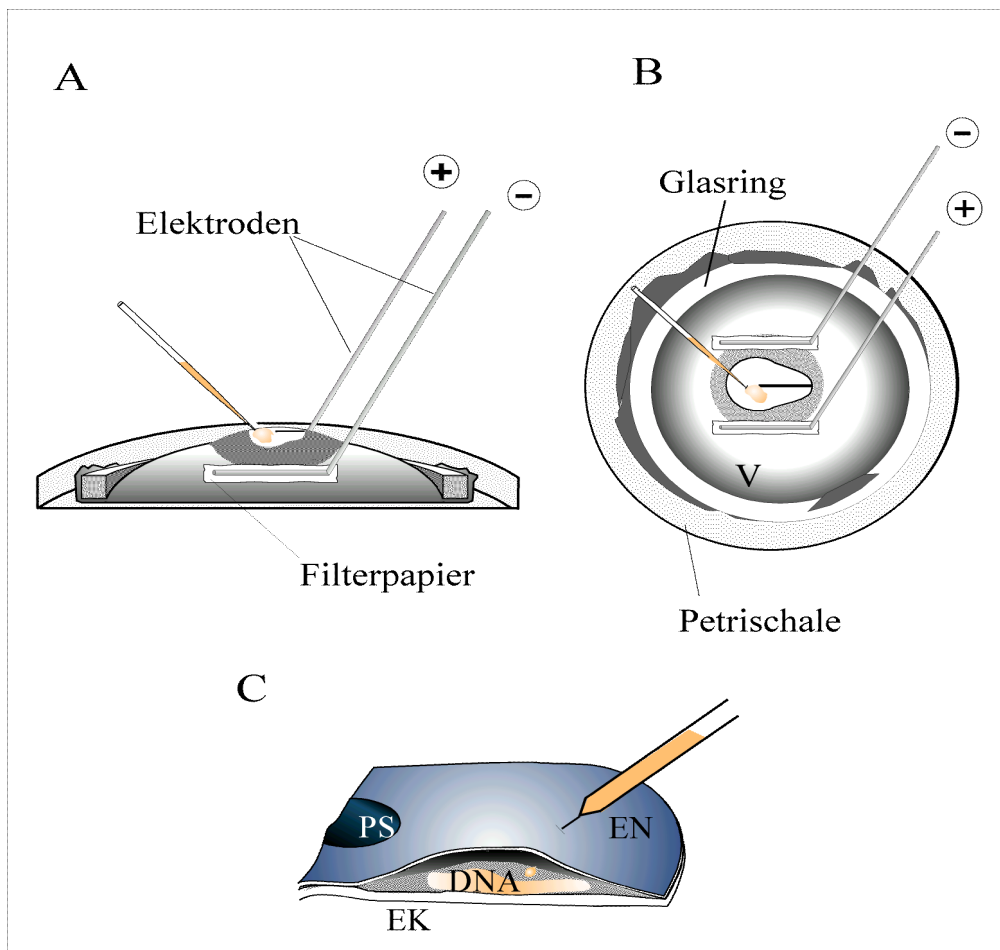


Abb.9: (A/B) Versuchsaufbau für Elektroporation in New Kultur. (A) Schematischer Querschnitt (B) Aufsicht. Elektroden, bestehend aus Platin liegen auf mit PBS angefeuchteten Whatmann-Filterpapieren. (C) Anlegen von DNA gefüllten Taschen im Bereich der Neuralplatte zwischen Endoderm und Ektoderm. (C) kann als Ausschnittsvergrößerung aus (B) betrachtet werden. (V) Vitellinmembran, (PS) Primitivstreifen, (EK) Ektoderm, (EN) Endoderm.

Die Verwendung von goldbeschichteten Drähten (BTX) hatte sich nicht bewährt, da es zur Ablösung der Goldlegierung und Ablagerung von organischen Schichten an den Elektroden kam. Die Injektion einer konzentrierten DNA Lösung ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) erfolgte zwischen Endoderm und Ektoderm im Bereich der prospektiven Neuralplatte. Es wurden circa 80-150 nl injiziert, wodurch sich das Endoderm während der Injektion sichtbar aufwölbte und Taschen bildete (Abb.9 C). Diese Taschenbildung begünstigte die Aufnahme der DNA, da in diesem Fall die konzentrierte Lösung sich nicht über den gesamten Embryo verteilen und sich dadurch nicht verdünnen konnte. Die Bildung dieser Taschen

war nur während des frühen Primitivstreifenstadiums möglich, solange ektodermale und endodermale Zellschichten noch nicht durch Mesoderm, das aus dem Knoten und dem Primitivstreifen einwandert, getrennt sind und noch relativ lose aufeinanderliegen. Sobald jedoch prächordales Mesoderm und vor allem paraxiales Mesoderm einzuwandern und sich zwischen Ekto- und Endoderm zu schieben beginnt, bildet sich ein sehr stabiles Mesenchym aus, in dem keine Taschen mehr angelegt werden können. Im Verlauf der Inkubation nach der Elektroporation kam es häufig vor, daß sich das Endoderm zunächst von den Injektionsstellen zurückzog. Allerdings wurden diese Löcher rasch durch proliferierende endodermale Zellen wieder verschlossen. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, die Injektionskapillare möglichst flach anzusetzen, um problemlos zwischen die Zellschichten injizieren zu können. Auf die Vitellinmembran wurden parallel zur Längsachse des Embryos im Abstand von 8 mm mit PBS benetzte Filterpapiere (Whatman), von 1mm Breite und 3 mm Länge, aufgelegt, um zu vermeiden, daß die Vitellinmembran an den Elektroden durch die während des Pulses entstehende Wärme koaguliert und mit den Elektroden verklebt. Die Wahl eines Elektrodenabstandes von 8 mm war insofern angebracht, als hierdurch die Elektroden am Rande der *area opaca* bzw. auf der Vitellinmembran zu liegen kamen und dadurch weit vom eigentlichen embryonalen Gewebe entfernt waren. Die anliegende Spannung wurde in Schritten von 20 Volt, ausgehend von 20, bis auf 200 Volt erhöht, wobei die Pulsdauer (50 msec) konstant gehalten und jeweils 5 Pulse gesetzt wurden. Eine systematische Variation der Spannung (siehe Abb.10) ergab, daß DNA bereits in geringem Maße bei 20 Volt aufgenommen wurde (Abb.10 A). Höhere Pulsstärken führten dabei sowohl zu einem besseren Transfektionsergebnis als auch zu einer proportionalen Zunahme von embryonalen Mißbildungen und Zellschäden (siehe Abb.10 F). Als guter Kompromiß zwischen der Gefahr einer Schädigung der Zellen und dem Transfektionsergebnis erwies sich folgende Parameterwahl: **5 Pulse mit 110 Volt und 50 msec Dauer.**

Die Elektrolyse während des Spannungspulses führte neben der Wasserstoffentwicklung an der Kathode und der Sauerstoffbildung an der Anode auch zur Freisetzung von toxischen Sauerstoff-Radikalen. Um Schäden am Embryo zu vermeiden, wurden die Elektroden vorsichtig wieder entfernt und das überschüssige PBS mit einer Mikropipette abgenommen. Die an die Filterpapiere angrenzende *area opaca* entwickelte sich trotz dieser Maßnahmen in den meisten Fällen nicht weiter und starb ab. Um ein Abrutschen des Embryos von der Vitellinmembran oder ein Zusammenziehen des Embryos zu ver-

hindern, wurde die *area opaca* erneut durch trockene Filterpapiere auf der Vitellinmembran fixiert.

		Voltzahl								
		n = 5								
Feldstärke (V/cm)		20	40	60	80	100	120	140	160	180
		25	50	75	100	125	150	175	200	225
Transfektions effizienz		-	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++
Ausmaß der Zellschädigung		-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++

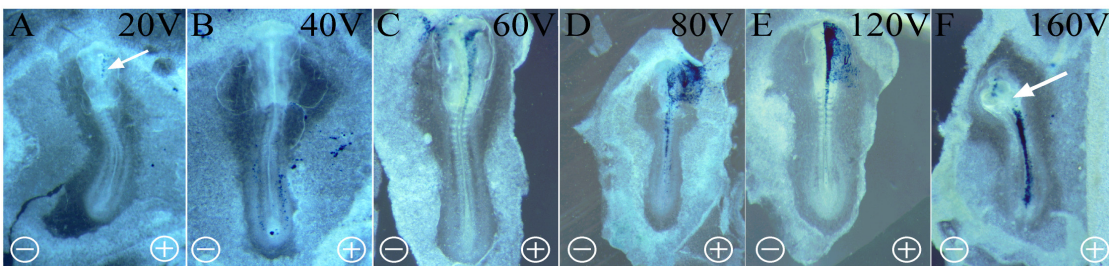


Abb.10: Zusammenfassende halbquantitative Darstellung der Transfektionseffizienz und der damit einhergehenden Zellschädigung in Abhängigkeit von der angelegten Voltzahl. Nicht transgene Embryonen sind mit einem "-" gekennzeichnet. Eine geringe Anzahl transgener Zellen sind mit einem "+", viele bzw. sehr viele Zellen mit einem "++" bzw. "+++" symbolisiert. In (A-F) sind ausgewählte Embryonen dargestellt, die mit den angegebenen Spannungen transfiziert wurden. Man beachte die fast vollständige unilaterale Transfektion auf der Anodenseite des Embryos. Bei dem in (F) abgebildeten Embryo sind die anterioren Kopfstrukturen (Pfeil) aufgrund des hohen Spannungspulses mißgebildet

Es hat sich gezeigt, daß bei der Verwendung einer parallelen Elektrodenanordnung die beiden Hälften des Embryos, abhängig von ihrer Lage zu den Elektroden, unterschiedlich kompetent waren, DNA aufzunehmen (siehe Abb.11 A).

Die embryonalen Zellen auf der Anodenseite des Embryos nahmen offenbar bevorzugt DNA auf, da diese aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen dort durch den Puls elektrophoretisch hingezogen wurde. Wurden dabei Zellen im Bereich des Hensen'schen Knoten transfiziert, kam es zur Ausbildung eines halbseitig transgenen Embryos (siehe Abb.11 A-D), da dadurch sowohl craniale wie auch caudale axiale Strukturen durch die später stattfindende Regression des Knotens betroffen wurden. Am ausgeprägtesten bestand diese Asymmetrie im Neuralrohr, wohingegen mesodermale und endoder-

male Zellen in geringerem Ausmaß diese Präferenz zeigten. Außerdem war auffallend, daß die unilaterale Transfektion in anterioren Bereichen des Embryos häufig stärker ausgeprägt war als in posterioren Strukturen (siehe Abb.11 A). Ausnahmen von diesem Prinzip der unilateralen Transfektion zeigten sich regelmäßig vor allem in lateralen embryonalen und extraembryonalen Bereichen (siehe Abb.11 A, Pfeil), wenngleich in relativ geringem Ausmaß. Vermutlich kommt dieses Ergebnis dadurch zustande, daß sich die DNA Lösung bei der Injektion sehr weit lateral ausbreitete und dabei nahe an die Elektroden herankam. Zellen, die direkt an den Elektroden lagen, wurden durch das elektrische Feld in ihrer Integrität am stärksten beeinträchtigt. Dadurch nehmen offenbar auch an der Anode liegende Zellen DNA auf, obwohl diese elektrophoretisch weggezogen wird. Darauf deutet auch die Beobachtung hin, daß nahe der Elektroden sich häufig besonders viele transgene Zellen befanden. Bemerkenswert ist, daß das Neuralrohr exakt halbseitig transfiziert wurde, obwohl im Stadium HH4 kein Lumen vorhanden war in das DNA transfiziert werden konnte.

Eine effiziente Transfektion konnte in allen drei Zellschichten dem Ekto-, dem Meso- und dem Endoderm nachgewiesen werden. Allerdings ließ sich beobachten, daß die meisten transgenen Zellen im Ektoderm und dort wiederum bevorzugt im Neuroektoderm angesiedelt waren (siehe Abb.11 A-E). Die Aktivität des für die weiteren Experimente verwendeten CMV Promotors scheint daher keinerlei Kompetenzphänomenen zu unterliegen. Der Expressionslevel eines überexprimierten Proteins kann sowohl durch die Kopienzahl des Expressionsvektors wie auch durch die Effizienz der verwendeten Promotoren beeinflusst werden. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf den Effekt verschiedener Promotoren. Mit Hilfe der LacZ Färbung läßt sich allerdings keine Aussage über den Expressionslevel treffen, da es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt.

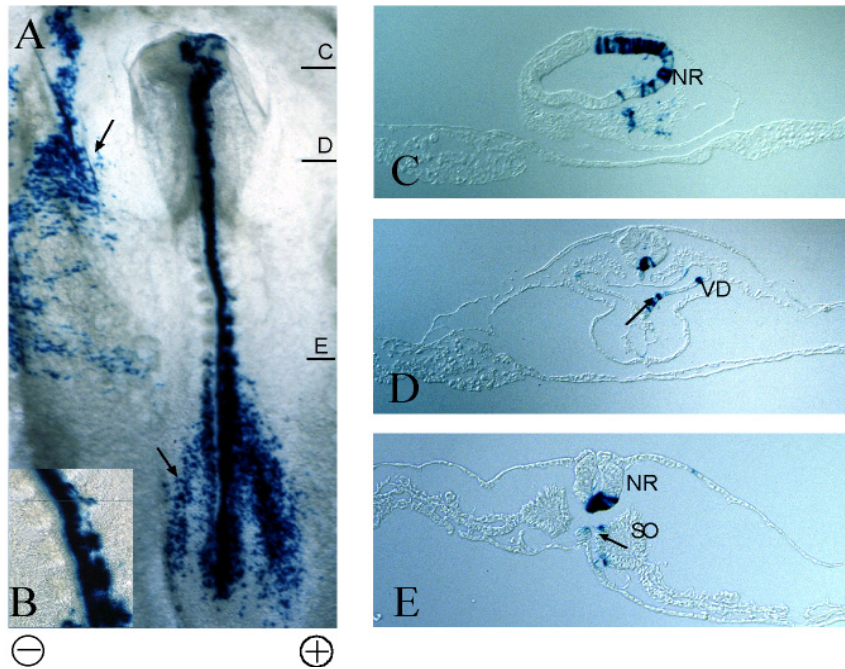


Abb.11: Transfektion junger (HH4) Embryonen mit einem Expressionsvektor, der das bakteriellen Enzym β -Galaktosidase (LacZ) enthält. **(A)** HH10 Embryo nach 12h Inkubation mit unilateraler β -Gal Expression im Neuralrohr. Die Elektroporation erfolgte dabei im Stadium HH4. Die Lage der Kathode bzw. Anode relativ zum Embryo ist dabei durch ein + bzw. - gekennzeichnet. Die Pfeile deuten auf laterale Areale im Embryo hin, die eine Ausnahme von der ansonsten unilateralen Transfektion darstellen. **(B)** Ausschnittvergrößerung im Somitenbereich zeigt eine deutliche LacZ Expression in den Somiten. β -Gal Aktivität kann im Ektoderm, Mesoderm und im Endoderm nachgewiesen werden. **(C-E)** Querschnitte in verschiedenen Positionen entlang der anterior-posterioren Achse. Die Ebene der abgebildeten histologischen Schnitte ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. (NR) Neuralrohr; (VD) Vorderdarm; (SO) Somiten.

In vergleichenden Studien zeigte sich, daß sowohl der Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV) IE1 Gens (Boshart et al., 1985), der Promotor des Affen SV40 Virus (Keller und Alwine, 1985) wie auch der von Suemori beschriebene Hybridpromotor Miw (Suemori et al., 1990) gleichermaßen stark aktiv waren (siehe Abb.12 A-C). Letzterer besteht aus dem Promotor des Hühner β -Actin Gens und mehreren LTRs ("long terminal repeats") des Rous Sarcoma Virus (RSV) Enhancers.

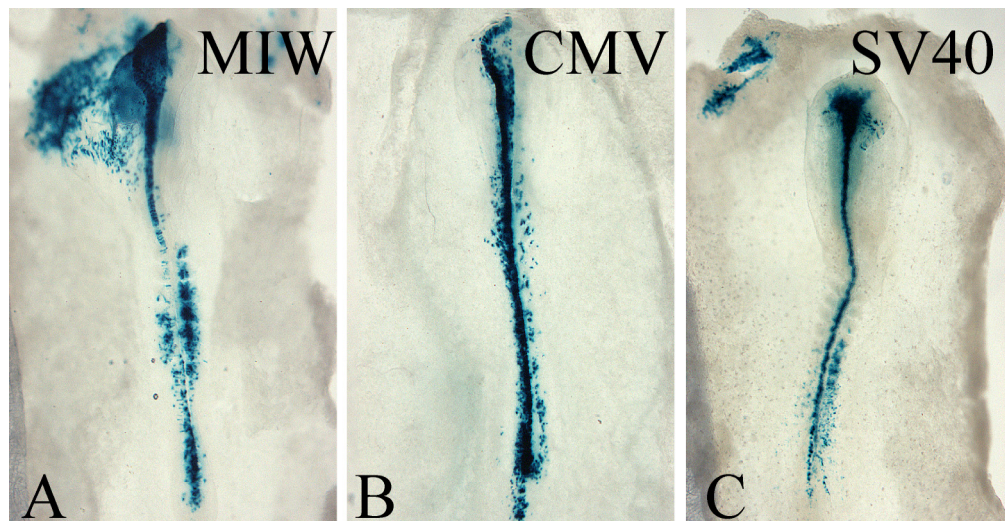


Abb.12: Vergleich der Promotoren MIW (A), CMV (B) und SV40 (C). Es wurden drei Plasmide transfiziert, die durchwegs β -Galaktosidase unter der Kontrolle der jeweiligen Promotoren enthielten. Man erkennt, daß alle drei Promotoren in gleichem Ausmaß die Expression eines Transgens in elektroporierten Embryonen vermitteln können.

Zeitabhängige Analysen haben gezeigt, daß die RNA des transfizierten β -Gal Gens bereits nach 45 Minuten mit Hilfe der *In-situ* Methode nachgewiesen werden konnte (Abb.13 A). Die histochemische Detektion des entsprechenden Proteins gelang bereits nach einer Stunde. Die RNA durch das überexprimierte Transgen aktivierter Gene konnte nach etwa 2 Stunden detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

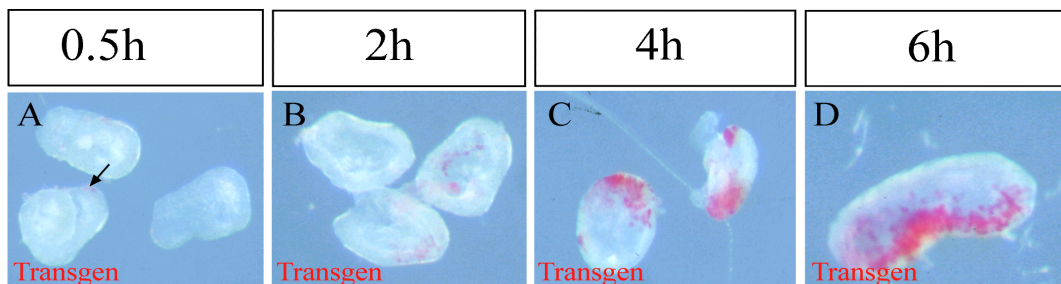


Abb.13: Zeitabhängige Detektion eines elektroporierten Transgens mit Hilfe der *In-situ* Analyse. Elektroporiert wurden Neuralplattenexplantate. Die Stundenangaben stehen für die Inkubationszeiten nach der Transfektion. Man erkennt, daß eine schwache Transgenexpression bereits eine halbe Stunde nach der Elektroporation nachgewiesen werden konnte (A, Pfeil). Gefärbt wurde konstant für eine halbe Stunde (jeweils n=3), um das Ausmaß der Genexpression quantifizieren zu können. Es ist deutlich ersichtlich, daß bereits nach 4 Stunden eine starke Expression erzielt werden konnte. Bei der roten Färbung handelt es sich um Fast Red, einem Substrat der alkalinen Phosphatase.

Um transgene Zellen *in vivo* zu detektieren, wurden Plasmide transfiziert, die entweder die kodierende Sequenz des GFPs aus dem Vektor pTracerTM-CMV2 (Invitrogen; Pras-

her et al., 1992) bzw. des modifizierten GFPs aus dem Vektor pIRES-EGFP enthielten, das eine wesentlich stärkere Fluoreszenz aufweist (Clontech; Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996; Haas et al., 1996).

Die Helligkeit der wahrgenommenen Fluoreszenz korreliert jedoch nicht direkt mit der Stärke der GFP Expression, sondern ist lediglich abhängig von der Anregungs- und Emissionswellenlänge des Moleküls (Liu et al., 1999). Allerdings war charakteristisch, daß größere Zellen vor allem im Neuralrohr des Embryos stärker fluoreszierten als kleinere embryonale Zellen, die häufig in der Peripherie des Embryos angesiedelt waren, oder extraembryonale Zellen.

GFP konnte erst 4-6 Stunden nach der Elektroporation im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, da in etwa 60.000 Moleküle pro Zelle benötigt werden, um das emittierte Licht visuell zu detektieren. Dies entspricht einer intrazellulären cytoplasmatischen GFP Konzentration von ungefähr 1 micro Mol (Nilswender et al., 1995). Im Gegensatz dazu reichen bereits 5 β -Galaktosidase Moleküle pro Zelle zur histochemischen Detektion aus (Murray und Walker, 1989). Die Intensität der Fluoreszenz nahm über die folgenden Stunden hinweg zu und erreichte ihren maximalen Level nach 72 Stunden. Danach schwächte sich die Fluoreszenz leicht aber kontinuierlich ab.

Im Stadium HH3-HH4 kommt es während der Gastrulation im Hühnerembryo zu ausgeprägten Zellmigrationen, wobei Zellen aus lateralen Bereichen des Epiblasten in der Mitte konvergieren und in den Primitivstreifen einwandern, ein Prozess, der als Ingression bezeichnet wird (Vakaet 1970, 1984). Gleichzeitig erfolgt eine craniale und caudale Streckung des Primitivstreifens durch Zellmigrationen in beide Richtungen. Eine zusammenfassende Darstellung der "fatemap", die das prospektive Schicksal der Zellen im Epiblast im Stadium HH4 widerspiegelt, wird in Abbildung 15 B (Kapitel 3) gegeben.

Auf Grund dieser ausgeprägten Zellbewegungen war es schwierig, das Ausmaß der Transfektion auf einen bestimmten Zelltyp bzw. eine definierte Zellpopulation in diesem frühen Entwicklungsstadium zu beschränken. Lediglich durch Anordnung der Elektroden und damit durch die Ausbildung eines lokal begrenzten elektrischen Feldes ließ sich das Ausmaß der Transfektion beeinflussen. Dies wird in den folgenden Kapiteln ausführlich dargestellt. Es wurden außerdem mehrere Versuche unternommen, die Viskosität der DNA Lösung zu verändern.

Um die DNA-Lösung lokalisiert applizieren zu können, wurde ihre Viskosität durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) bis zu einem Volumenverhältnis von 50% (w/v)

bzw. durch Versetzen mit Rattenschwanzkollagen erhöht. Die Kollagenlösung polymerisiert bei 37°C innerhalb von 15 Minuten zu einem sehr festen aber weitmaschigen Netzwerk, durch das Substanzen leicht herausdiffundieren können. Es wurde eine Kollagenlösung hergestellt, die 1 µg/µl an DNA enthielt. Sie konnte gezielt auf den Embryo aufgebracht werden. In beiden Fällen zeigte sich jedoch, daß die Embryonen aufgrund der festen Konsistenz der aufgetragenen Tropfen in ihrer normalen Entwicklung beeinträchtigt waren und nur wenige transgene Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Prozesse, die die Organogenese betreffen, können in der New Kultur nicht untersucht werden, da der Embryo in seinem späteren entwicklungsbiologischen Potential in diesem System relativ stark restringiert ist und eine normale Entwicklung nur bis Stadium HH12 stattfindet. Eine notwendige weitere Ausbreitung der *area opaca*, die für die weitere Entwicklung und die Ausbildung der extraembryonalen Blutversorgung essentiell ist, kann infolge der Begrenzung durch den Glasring nicht stattfinden. Darüberhinaus ist die Rotation des Embryos auf die linke Seite zwischen Stadium HH12 und HH13 durch die starke Aufspannung der Vitellinmembran sterisch blockiert. Einen experimentellen Eingriff in die Musterbildungsprozesse während der Organogenese mit Hilfe der Elektroporation ist somit nur im Ei möglich (siehe Kapitel 5).

Resumé:

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch die Kombination der Inkubationsmethode nach New und der Elektroporation als Transfektionsmethode der Wahl ektopische Genexpression in allen Keimblättern des Embryos in einer Zeitspanne von etwa zwei Stunden erzielt werden kann. Aufgrund der dielektrischen Eigenschaften der Zellen und der elektrophoretischen Mobilität der DNA Moleküle läßt sich eine ausgeprägte Präferenz zur Ausbildung halbseitig transgener Embryonen feststellen. Diejenige embryonale Seite, die dem Einfluß der Anode ausgesetzt wird, nimmt dabei wesentlich besser DNA auf als die kontralaterale Hälfte. Diese kann jedoch als interne wildtypische Kontrolle dienen. Eine genaue lokalisierte Transfektion definierter embryonaler Bereiche ist mit Hilfe dieses experimentellen Designs in eingeschränkter Weise möglich.

3.1.2 ELEKTROPORATION VON EXPLANTATEN

Eine Möglichkeit, Gene lokal in einzelnen Strukturen bzw. Keimblättern zu überexprimieren, bietet die Elektroporation von Explantaten. Hierbei wurden mit Hilfe von in der Flamme geschärften Wolframnadeln rechteckige Stücke von 500 μm Kantenlänge aus der Neuralplatte in HH4 Embryonen herausgeschnitten und in eine PBS Lösung überführt, die das entsprechende Expressionskonstrukt enthielt ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Um Schäden am Gewebestück durch die bei der Elektrolyse auftretenden H_2 und O_2 Blasen zu vermeiden, wurde der DNA Tropfen mit dem Explantat zwischen zwei engmaschige Nylonnetze (70 μm Maschenweite) überführt, die die entstehenden Gasblasen nach oben ablenkten (siehe Abb. 11 A/B). Geriet ein Gewebestück in Berührung mit einer Gasblase, wurde es an die Oberfläche des Tropfens gerissen und dort infolge der herrschenden Oberflächenspannung zerstört. Die Netze waren 1 cm lang, 0.5 cm hoch und hatten einen Abstand von drei Millimetern. Sie wurden an beiden Enden durch Stützen aus Polyethylen aufrecht gehalten. Im Gegensatz zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Elektroporation in New Kultur wurden bei der Elektroporation von Explantaten nicht zwei parallele Platindrähte verwendet. Stattdessen wurde der mit der Kathode verbundene Platindraht punktförmig außerhalb des Netzes auf den Boden der Petrischale aufgesetzt. Die Anode wurde wie bei der Elektroporation von jungen HH4 Embryonen mit einem etwa 5 mm langen Platindraht verbunden. Die elektrischen Feldlinien laufen dabei nicht wie bei der Verwendung zweier gleicher Elektroden parallel zueinander, sondern konvergieren in diesem Fall auf einen Punkt (siehe Einleitung). Es bildet sich dabei ein sogenanntes inhomogenes Feld aus. Da die Dichte, d.h. der Abstand der elektrischen Feldlinien voneinander, ausschlaggebend für die Stärke des elektromagnetischen Feldes ist, bildet sich an der Anode ein wesentlich stärkeres Feld aus als auf der Kathodenseite des Embryos bzw. Explantates. Die anliegende Spannung fällt dabei über einen relativ kleinen Bereich sehr stark ab. Diese Tatsache begünstigt die Bildung von transienten Membranporen, da die Ladungen auf der Zelloberfläche stärker voneinander getrennt werden und infolgedessen es zur Entstehung von größeren Anziehungs- und Abstoßungskräften kommt. Diese Porenbildung bewirkt, daß Ionen aus dem Zytoplasma entlang ihres Konzentrationsgradienten in die umgebende extrazelluläre Matrix und das Medium herausdiffundieren können. Während der Elektroporation erhöht sich daher die Leitfähigkeit des Gewebes bzw. sein Widerstand nimmt ab, was eine Zunahme der angelegten Spannung um bis zu 10% bewirkt.

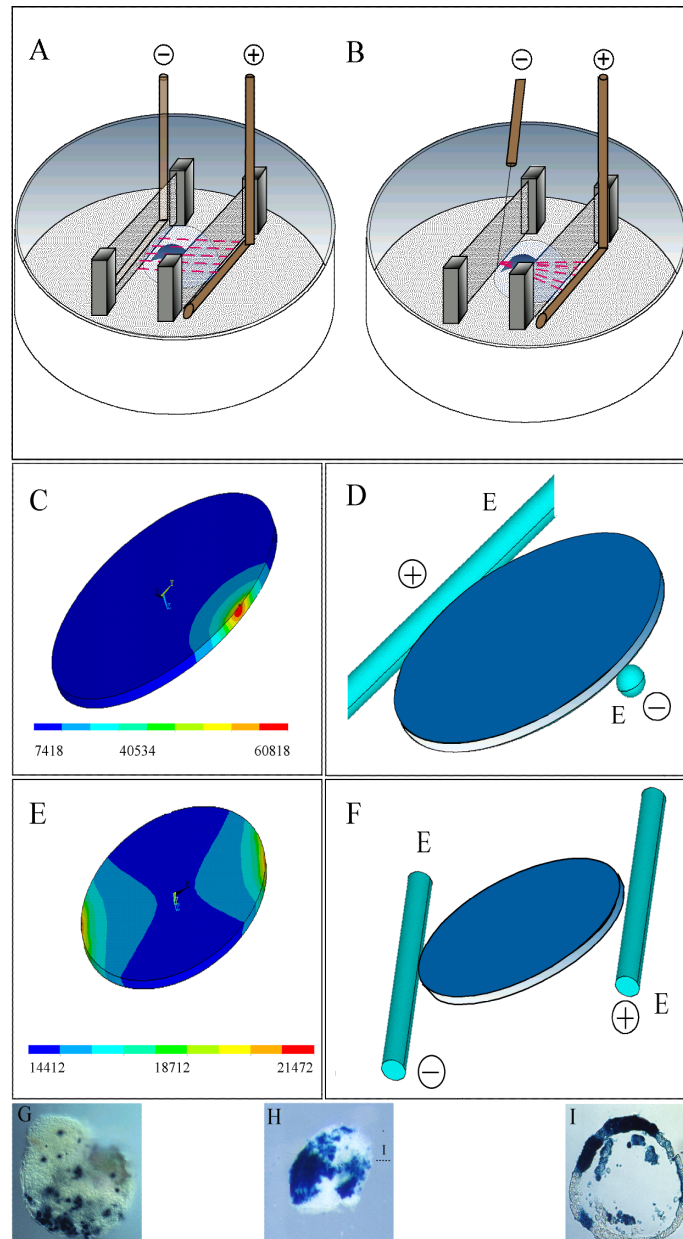


Abb.14: Schematischer Aufbau der Elektroporationsanordnung für Explantate. Durch die roten Linien in (A/B) wird der Verlauf der Feldlinien angedeutet. In (C) und (E) wurde die elektrische Feldverteilung für ein homogenes und ein inhomogenes Feld nach dem Finite Elemente Modell berechnet. Die jeweilige Elektrodenanordnung ist in (D) bzw. (F) dargestellt. Mit Hilfe der Farbskala in (C) und (E) ist aufgrund einiger vereinfachender Annahmen (Material und Methoden) eine lediglich qualitative nicht jedoch quantitative Interpretation der errechneten Werte möglich. Der Embryo wurde in den Berechnungen als flache Scheibe symbolisiert. (C) Explantat nach Elektroporation mit paralleler Elektrodenanordnung. In (D) wird der Unterschied nach der Verwendung einer asymmetrischen Elektrodenanordnung deutlich. (E) zeigt einen Querschnitt durch das Explantat in (D).

Es hat sich gezeigt, daß in einem inhomogenen Feld die Elektroporation von Explantaten wesentlich effektiver als eine Anordnung ist, die nur aus zwei parallelen Elektroden besteht. Im letzteren Fall waren die transgenen Zellen relativ dünn über den gesamten Be-

reich des Explantates verstreut (n=8) (Abb.14 C). Bei Verwendung einer asymmetrischen Anordnung waren jedoch die transgenen Zellen zu einem hohen Prozentsatz auf der Anodenseite des Explantates angeordnet, so daß 30-50% der Zellen des Explantates transgen waren (n=15) (Abb.14 D). Es wurden **3 Spannungspulse** von je **70V**, **50 msec** Pulsdauer appliziert. Eine gleichzeitige Elektroporation von mehreren Gewebestücken war dabei möglich. Die effektive Feldverteilung wurde dabei nach dem *Infinite Elemente Modell* mit dem Programm ANSYS berechnet (Abb.14 F/H). Man erkennt, daß bei der Verwendung eines inhomogenen Feldes, wie es zwischen zwei unterschiedlichen Elektroden entsteht, die relative Feldstärke an der punktförmigen Elektrode um den Faktor 10 höher ist als an der stabförmigen.

Daher hat dort das Feld den größten Effekt auf den Zellverband. Man erkennt aber auch, daß dieser Bereich der größten Feldstärke nur in einem engen Areal wirksam ist. Dies erklärt die Beobachtung, daß die Elektroporation um so effektiver war, je näher sich das Explantat an der punktförmigen Elektrode befand. Zwischen parallelen Elektroden kommt es erwartungsgemäß zu einer symmetrischen Feldverteilung, wobei die maximal erreichten Feldstärken um den Faktor 3 geringer ausfallen als bei einem vergleichbaren inhomogenen Feld.

Nach jeweils zwei Elektroporationen wurde die DNA Lösung ausgewechselt, um Schäden bei der durch die Elektrolyse freiwerdenden Radikale am Explantat zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, daß die Elektroporationskammer als Ganzes möglichst trocken blieb, weil sich sonst der Flüssigkeitstropfen kapillar entlang des Netzes ausbreitete und dadurch Gefahr bestand, daß das Explantat mit der Flüssigkeitsoberfläche in Berührung kam und zerstört wurde.

Die Konsistenz und damit die mechanische Belastbarkeit der Explantate in frühen Entwicklungsstadien war abhängig von ihrer Herkunft aus den jeweiligen Keimblättern. Dies hatte starken Einfluß auf die experimentellen Möglichkeiten.

Da die Neuralplatte während ihrer Entwicklung ein relativ robustes Epithel mit zahlreichen Zellkontakten ausbildet, eignete sich diese im Gegensatz zu dem wesentlich fragileren Endoderm weit besser für Überexpressionsstudien. Sofort nach der Exzision des Explantates begann sich das Gewebe von den Rändern her auf Grund der dabei auftretenden Konstriktionskräfte einzurollen, wobei die ventrale Seite innen zu liegen kam. Nach einer Inkubationszeit von 12 h hatte sich das anfangs flache Gewebestück zu einer Hohlkugel umgeformt (Abb.14 E). Eine gezielte Elektroporation von Endodermexplantaten

aus HH4 Embryonen erwies als technisch nicht durchführbar, da die Integrität dieses Epithels nicht gewahrt werden konnte. Sobald sich in späteren Entwicklungsstadien ein festes Mesenchym ausgebildet hatte und das Gewebe dadurch erheblich weniger empfindlich auf mechanische Beanspruchung reagierte, war man bei Herstellung der Explantate nicht mehr auf das Neuroepithel beschränkt. Elektroporierte Extremitätenknospen, aus HH22 Embryonen isoliert, zeigten etwa nach 12 h Inkubation eine massive Expression des Transgens. Die Musterbildungsprozesse innerhalb der Knospe waren davon unbeeinflusst und die Struktur behielt ihre dorso-ventralen und anterior-posterioren Achsenverhältnisse bei, wie durch die unveränderte endogene Expression von slug und DLX5 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für große Explantate wurden diese jedoch ohne Verwendung der Netze in PBS elektroporiert, wobei eine konzentrierte DNA Lösung ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) direkt ins Gewebe injiziert wurde.

Nach der Elektroporation wurden die Explantate in einer Kollagenlösung (siehe Material und Methoden 2.2.21.1) für 12 Stunden kultiviert (Lumsden und Davis, 1983).

Alternativ wurde mit Hilfe zweierlei Ansätze versucht, Explantate direkt in der Kollagenlösung zu elektroporieren, um die mechanische Beanspruchung von fragilem Gewebe zu minimieren:

a) In Analogie zu einem DNA/PBS Tropfen war es möglich, die DNA direkt der Kollagenlösung zuzusetzen. Die Endkonzentration der DNA betrug in diesem Fall ebenfalls $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Elektroden wurden direkt an den flüssigen Kollagentropfen angelegt. Die Blasenbildung während der Elektrolyse war in diesem Fall für das Gewebe nicht so kritisch, weil sich die Blasen in dem eher viskosen Medium nicht so gut ausbreiten konnten. Allerdings konnten mit diesem Ansatz keine sehr guten Transfektionseffizienzen erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

b) Eine zweite Möglichkeit bestand in der direkten Zugabe von DNA zu dem Explantat in der Kollagenlösung. Dazu wurde das Explantat zunächst einmal in den Kollagentropfen überführt, die Elektroden neben dem Kollagen aufgesetzt und mit Hilfe einer Mikrokapillare eine hochprozentige DNA Lösung ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durch das Kollagen injiziert. Suboptimal erwies sich jedoch, daß das Kollagen sehr leicht die Mikrokapillare verstopft und daß das Explantat durch den Druck der Injektion leicht beschädigt wurde.

Resumé:

Zusammenfassend läßt sich anmerken, daß durch die Elektroporation von Explantaten die Problematik der lokalisierten Transfektion einzelner Bereiche junger Embryonen dahingehend umgangen werden kann, als durch die Auswahl einzelner explantierbarer Strukturen eine Eingrenzung des Transfektionsausmaßes automatisch erreicht wird. Die Herstellung einer großer Anzahl von Explantaten ist arbeitstechnisch unproblematisch, so daß zahlreiche verschiedene Expressionskonstrukte getestet werden können.

Eine ähnliche Elektrodenanordnung für die Elektroporation von ganzen Embryonen hatte sich nicht bewährt, da die punktförmige Elektrode direkt auf dem Embryo aufgesetzt werden mußte und es dadurch zu einer starken Schädigung des Gewebes an der Einstichstelle kam. Eine Vergrößerung des Elektrodenabstandes hätte jedoch die geschilderten Vorzüge einer asymmetrischen Elektrodenanordnung zumindest teilweise aufgehoben, da sich der überwiegende Anteil der transgenen Zellen stets in unmittelbarer Nähe der punktförmigen Elektrode befand. Bei Vergrößerung des Elektrodenabstandes liegt diese jedoch zumeist am Rande der *area opaca* und damit im extraembryonalen Bereich.

3.1.3 RE-TRANSPLANTATION VON ELEKTROPORIERTEN EXPLANTATEN

Die Kombination der Elektroporation von Explantaten und ihr anschließender Retransfer in Empfängerembryonen erlaubte es, das Schicksal des transfizierten Gewebes im Kontext des sich entwickelnden Embryos zu untersuchen. In den meisten Fällen (~70%) heilte das Transplantat ohne größere Schwierigkeiten ein. Durch den Retransfer unterlagen daher die transgenen Zellen Musterbildungsprozessen, die in der artifiziellen Umgebung der Kollagenkultur nicht gegeben waren. Am leichtesten waren Bereiche aus der sich bildenden Neuralplatte im Stadium HH4 zu isolieren, da diese bereits ein stabiles Plattenepithel ausgebildet hatte. Zunächst wurde aus der Neuralplatte eines Donorembryos ein Gewebestück von etwa einem halben Millimeter Kantenlänge mit Hilfe von in der Flamme geschärften Wolframnadeln isoliert. Die Gewebestücke werden wie im vorherigen Kapitel beschrieben elektroporiert und anschließend in einen Empfängerembryo gleichen Alters transplantiert. Sofort nach der Elektroporation wurden die Ränder des eingerollten Explantates abgeschnitten, um ein möglichst planares Transplantat zu erhalten. Dies begünstigte die Heilungschancen. Nach ein bis zwei Stunden Inkubation sind die Transplantate bereits vollständig eingeheilt. Es ist darauf zu achten, homotopisch zu operieren, da sich

die einzelnen Bereiche der Neuralplatte stark in ihrem zellulären Schicksal unterscheiden (Abb.15 B). In dem in Abb. 15 C dargestellten Embryo wurde heterotopisch transplantiert, d.h. das Transplantat entstammte zwar aus der Neuralplattenregion eines Donorembryos, wurde jedoch im Empfängerembryo an eine weiter lateral gelegene Region verpflanzt. Dadurch kam es unter den Einfluß von Faktoren, die das Oberflächenektoderm spezifizieren, wie DLX5, MSX1 und BMP4. Infolgedessen kam es zu einer Respezifikation von Neuroektoderm zu Oberflächenektoderm (siehe auch Schnitt in Abb.15 E). Man kann dies auch an morphologischen Kriterien erkennen. Das Transplantat besitzt dieselbe dünne Epithelstruktur, die für das Oberflächenektoderm charakteristisch ist.

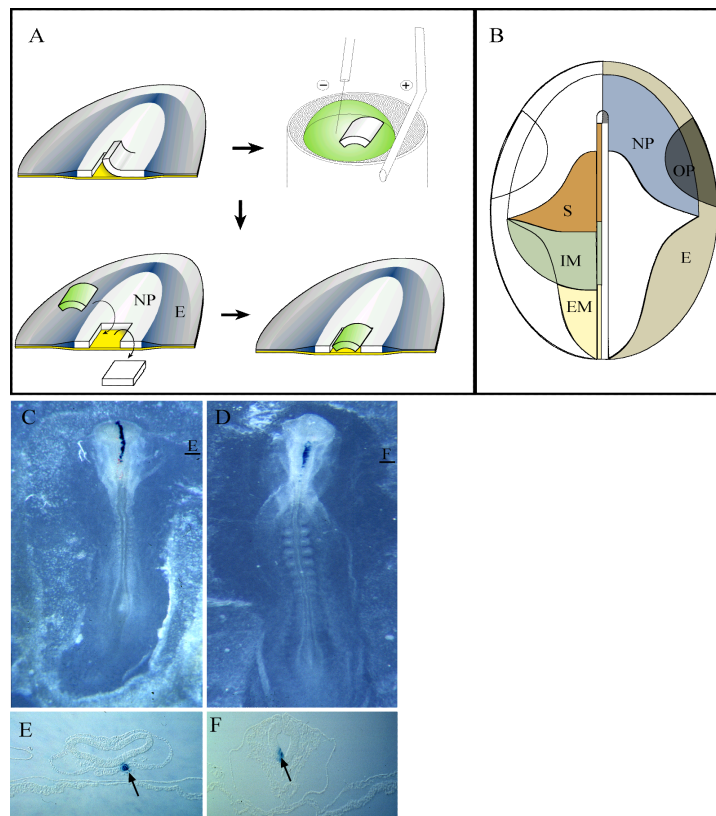


Abb.15: (A) Schema der Elektroporation und des Retransfer von Explantaten. (B) Anlageplan des Ektoderms und des Primitivstreifens im Stadium HH4 (Bortier und Vakaet, 1992). (C-D) Embryonen nach erfolgreichem Retransfer der Explantate. (D) zeigt eine ventrale Ansicht des Embryos. Lokalisierung der transgenen Zellen im Oberflächenektoderm (C) bzw. im ventralen Neuralrohr (D). Die Ebene der abgebildeten histologischen Schnitte ist durch einen schwarzen Balken angedeutet. (NP) Neuralplatte, (OP) otische Plakode, (E) Ektoderm, (S) Somiten, (IM) intermediäres Mesoderm, (EM) extraembryonales Mesoderm

Resumé:

Durch die Replantation elektroporierter Explantate unterliegt ihre veränderte Genexpression den Einflüssen von embryonalen Musterbildungsprozessen.

3.1.4 MIKROELEKTROPORATION MIT GLASKAPILLAREN

Die Elektroporationsmethode mit Glaskapillaren wurde erstmals für den Einsatz in *ovo* beschrieben (Atkins et al., 1999). Durch den Einsatz von Mikroglaskapillaren ist es möglich, sehr gezielt verschiedene Bereiche des Embryos zu transfizieren, die kein Lumen besitzen, in das DNA injiziert werden kann. Die Glaskapillare bestand aus Borosilikatglas. Sie wurde in einer heißen Flamme dünn ausgezogen und in einer Mikroschmiede (Bachhofer) geschliffen. Der Innendurchmesser an ihrer Spitze betrug nicht mehr als 200-250 µm. Ihre Ränder wurden in der Flamme abgerundet, um den Embryo nicht zu verletzen. In die Kapillare wurde bis etwa einen Millimeter vor der Spitze ein Wolframdraht (A-M Systems, 100 µm Durchmesser) geschoben, der auf seiner gesamten Länge mit Ausnahme des vordersten Millimeters durch eine dünne Teflonschicht elektrisch isoliert war. Die Kapillare wurde von hinten mit Hilfe von Gelladespitzen (Eppendorf) mit einer Lösung des Expressionkonstruktes in PBS (5µg/µl) befüllt und war durch einen Mikromanipulator dreidimensional beweglich. Der Flüssigkeitslevel in der Kapillare wurde durch eine ölgefülltes Schlauchsystem kontrolliert.

Die Elektroporation der Embryonen, die vorher vorsichtig von der Vitellinmembran abgezogen wurden, erfolgte auf kleinen leicht geneigten Nylonnetzen, die auf Plexiglasfüßen ruhten. Der in der Glaskapillare liegende Wolframdraht wurde mit der Kathode verbunden, während die Anode in Form eines Platindrahtes unter das Netz geschoben wurde. Bevor die Glaskapillare auf den Embryo aufgesetzt wurde, wurde aus der Öffnung etwas DNA auf den Embryo aufgebracht. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks erfolgte ein Ansaugen des embryonalen Gewebes, das dadurch die Öffnung der Kapillare vollständig verschloß (Abb.16 A). Es wurden 3 Pulse appliziert, wobei die angelegte Spannung 10 Volt betrug und der Abstand der Elektroden in etwa 2-3 mm maß. Anschließend wurden die Embryonen wieder auf die Vitellinmembran in einer New Kultur retransferiert. Da die DNA Lösung nur mit den obersten Zellschichten in Kontakt kam, ist das Ausmaß der Transfektion auf die Dicke von 1-2 Zellagen begrenzt. Diese

Einschränkung war jedoch für die Elektroporation von jungen HH4 Embryonen nur von geringer Bedeutung, da der Embryo in diesem Stadium ohnehin nur 3-4 Zelllagen dick war. Zählungen haben ergeben, daß bei einem Kapillarendurchmesser von 300 µm auf diese Weise bis zu 600 Zellen transfiziert werden können, die in einem annähernd kreisförmigen Areal angeordnet sind (Atkins et al., 1999). Da bei HH4 Embryonen im Verlauf der weiteren Entwicklung und Differenzierung noch in erheblichem Ausmaß Zellmigrationen sowie Konvergenz- und Extensionsbewegungen ablaufen, geraten auch die transfizierten Zellen unter den Einfluß dieser musterbildenden Prozesse und werden über einen größeren Bereich des Embryos verteilt.

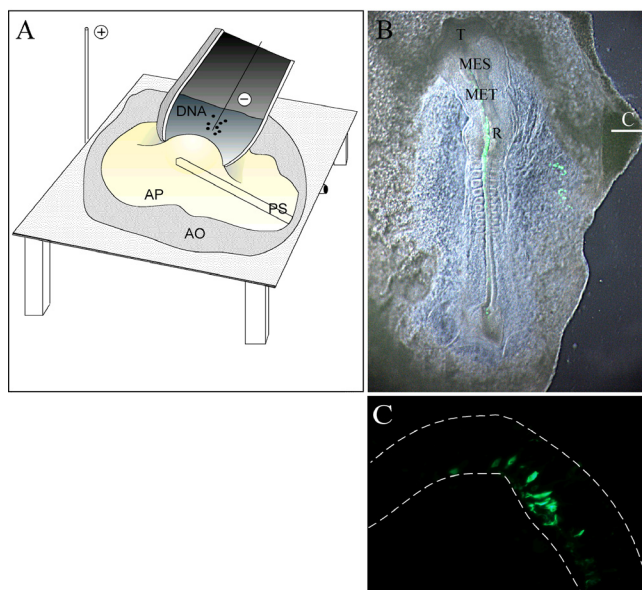


Abb.16: Elektroporation mit Hilfe von Mikro-Glaskapillaren (A). Embryonen wurden auf feinen Nylonnetzen elektroporiert, wobei die Kathode unter dem Embryo zu liegen kommt. (A) Glaskapillare gefüllt mit DNA Lösung (5µg/µl). (B) Überlagerte Hellfeldaufnahme eines Embryos nach ü. N. Inkubation. (C) Querschnitt (Gefrierschnitt) durch das Neuralrohr auf Höhe der angedeuteten Linie zeigt GFP exprimierende Zellen. (T) Telencephalon, (Mes) Mesencephalon, (Met) Metencephalon, (R) Rhombencephalon, (AP) *Area pellucida*, (AO) *Area opaca*, (PS) Primitivstreifen.

In einem Querschnitt (Abb.16 C) im Bereich des Rhombencephalons ist zu erkennen, daß die GFP exprimierenden Zellen auf der Lumenseite des Neuralrohrs lokalisiert sind. Dies erklärt sich durch den Prozeß der Auffaltung und dem Einrollen der Neuralplatte zum Neuralrohr während der Neurulation (Couly und Le Douarin, 1987). Der zentrale/mediale Teil begrenzt dabei das prospektive Lumen des Neuralrohres, da die äußeren Ränder der Neuralplatte sich auffalten und dorsal fusionieren. Ventrale Bereiche der Neuralplatte liegen nach Abschluß der Neurulation daher außen, wohingegen dorsale Zellen das Lumen des Neuralrohres umschließen. Da die Mikrokapillare von dorsal auf die Neuralplatte aufgesetzt wurde, sind die transfizierten Zellen medial im Neuroepithel lokalisiert.

Resumé:

Die Elektroporation mit Glaskapillaren wurde erfolgreich auch für jüngere Embryonen adaptiert. Mit dieser Methode können gezielt einzelne Strukturen von jüngeren

Embryonen transfiziert werden. Sie ist daher der klassischen im Kapitel 1 vorgestellten Methode vorzuziehen, wenn eine großflächige Transfektion des Embryos vermieden werden soll. Die hier vorgestellten Resultate erheben nicht den Anspruch auf Vollständigkeit. Diese Methode kann sicherlich durch sorgfältiges Austesten verschiedener Parameter vor allem für die Elektroporation von jüngeren Embryonen noch weiterentwickelt werden.

3.1.5 IN OVO ELEKTROPORATION

Durch die Kultivierung manipulierter Embryonen im Ei bleiben die natürlichen optimalen Entwicklungsbedingungen bezüglich der Nährstoffversorgung, der Feuchtigkeit und dem Milieu gewährleistet. Um auf die ab Stadium HH12 ablaufende Organogenese oder die Differenzierungsvorgänge der auswandernden Neuralleistenzellen Einfluß zu nehmen, bietet sich daher die *in ovo* Elektroporation an. Diese Methode, von Muramatsu 1997 erstmals beschrieben (Muramatsu et al., 1997), wurde seitdem von verschiedenen Autorengruppen extensiv eingesetzt, um Induktionsvorgänge bei der Etablierung des Mittelhirnorganisators (Matsunaga et al., 2000), bei der Augenbildung (Koshiba-Takeuchi et al., 2000) und beim Ablauf der dorso-ventralen Musterbildung im Neuralrohr (Briscoe et al., 2000) mit Hilfe dieses neuen experimentellen Ansatzes zu untersuchen.

Bei der *in ovo* Elektroporation kann man prinzipiell zwischen drei experimentellen Vorgehensweisen unterscheiden. Einerseits ist eine Positionierung der Elektroden oberhalb und unterhalb des Embryos möglich, eine Anordnung, die sich zur Transfektion von endodermalem Gewebe anbietet. Zum anderen können die Elektroden von dorsal kommend links und rechts neben das Neuralrohr plaziert werden, wobei sowohl zwei parallele Platindrähte in Analogie zur Elektroporation von jungen Embryonen zum Einsatz kommen können, als auch ein Aufbau verwendet werden kann, der aus einer langen Platinelektrode und einem spitzen Wolframdraht besteht. Werden zwei parallele Platindrähte verwendet, sind die Drähte bis auf den ersten Millimeter durch Nagellack elektrisch zu isolieren, wodurch nur ein kleiner definierter Bereich des Embryos dem elektrischen Feld ausgesetzt wird. Ältere Embryonen, HH9-12 reagierten erheblich empfindlicher auf elektrische Felder und der damit einhergehenden Zellschädigung sowie auf die Hitzeentwicklung. Dies manifestierte sich in einer höheren Mortalitätsrate bei der Verwendung von nicht isolierten Elektroden. Reihentests mit unterschiedlichen Span-

nungen haben ergeben, daß bereits bei Spannungen um 50 Volt, bei einem Elektrodenabstand von 8 mm und 3 Pulsen, wobei τ 50 msec betrug, die Überlebensrate nach einer Inkubationzeit von 24 h auf unter 10% absank (n=20). Im Vergleich dazu sind Mißbildungen und erhöhte Sterblichkeitsraten bei jungen Embryonen in der New Kultur erst bei angelegten Spannungen um 200 Volt und darüber zu beobachten. Die Hitzeentwicklung an den Elektroden führte zu einer Koagulation der Blutgefäße des peripheren extraembryonalen Blutgefäßsystems, das sich ab Stadium HH9 in verstärktem Maße auszubilden beginnt. Geschieht dies entlang der gesamten anterior-posterioren Achse, ist eine ausreichende Blutversorgung des Embryos nicht mehr gewährleistet, wodurch dieser nach kurzer Zeit abzusterben beginnt. Da in *ovo* Elektroporationen zwischen Stadium HH9 und HH12 ausgeführt wurden, galt es, diesem Sachverhalt in erhöhtem Maße Rechnung zu tragen. Ab Stadium HH12 fangen überdies die Myofibrillen des Herzmuskelschlauchs an, sich rhythmisch zu kontrahieren, und das Herz beginnt zu schlagen. Wurde der Herzbereich einem elektrischen Puls ausgesetzt, kam es zu einer Störung der Erregungsleitung und zum Aussetzen des Herzschlages. Das Herz nahm auch nach einer längeren Erholungsphase seine Aktivität häufig nicht wieder auf. Im Stadium HH9 ist die Neurulation bereits weit fortgeschritten und das Neuralrohr ist zumindestens im anterioren Bereich bis auf den Neuroporus bereits überall geschlossen. Die Unterteilung in die drei primären Gehirnvesikel Pros- Mes- und Myelencephalon ist im Stadium HH12 abgeschlossen und durch Konstriktionen des Neuroepithels gut erkennbar. Das zentrale Nervensystem umschließt daher ein Lumen, in das sehr gut DNA injiziert werden kann. Dadurch wird eine starke Verdünnung durch Diffusionsprozesse verhindert. Die DNA wurde dabei nach Applikation eines elektrischen Feldes infolge ihrer negativen elektrischen Ladung selektiv von der Seite des Neuroepithels aufgenommen, die näher an der Anode lag. Dadurch konnte die kontralaterale Hälfte des Neuralrohres als interne Kontrolle herangezogen werden (siehe Abb.17 H). Waren dorsale Abschnitte des Neuralrohres von der Transfektion betroffen, so exprimierten vor allem Neuralleistenzellen das Transgen, die ab Stadium HH10 aus diesem Bereich auszuwandern beginnen. Sie entwickeln sich zu diversen Strukturen wie z.B. dem peripheren Nervensystem, den Melanozyten, sowie zu kraniofazialen Knochen- und Knorpelzellen (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999; Le Douarin und Kalcheim, 1986). In Abb.17 C) sind in einer dorsalen Ansicht eines HH12 Embryos deutlich Ströme von

GFP exprimierenden Neuralleisten zu erkennen, die entlang der Rhombomergrenzen auszuwandern beginnen.

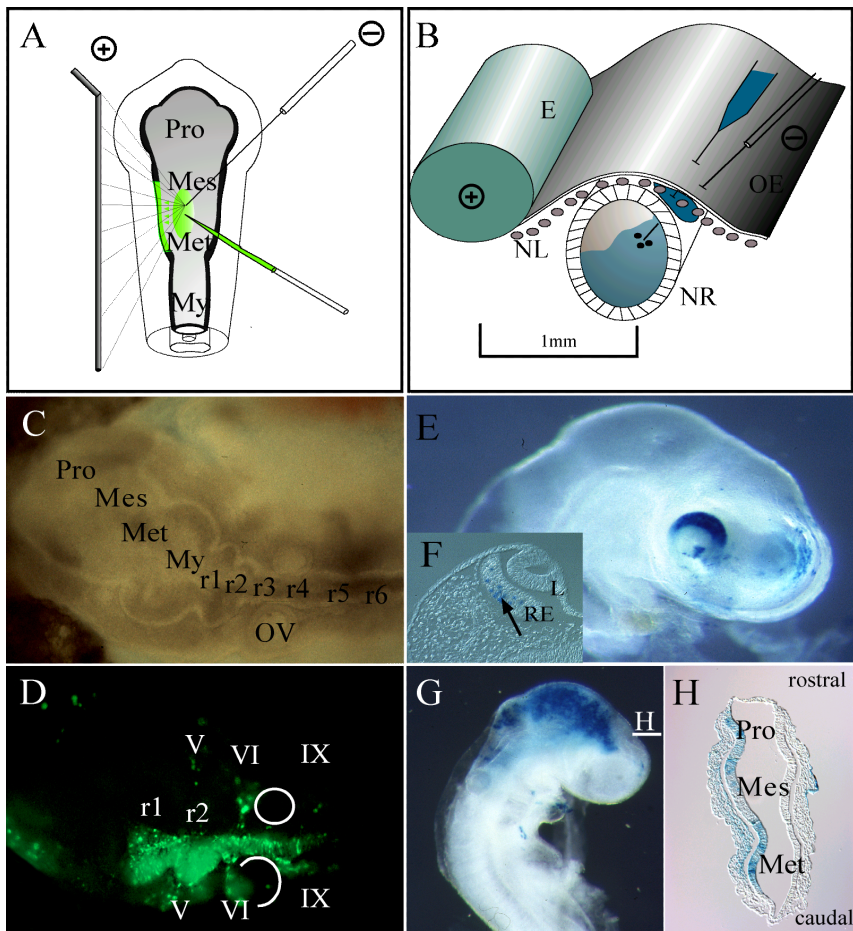


Abb.17: Darstellung des Versuchsaufbaus für die Elektroporation in ovo (A/B). In (B) ist ein schematischer Querschnitt im elektroporierten Bereich dargestellt. (C/D) Dorsale Aufsicht auf einen Embryo (HH13), (C) zeigt dabei eine Hellfeldaufnahme, während in (D) im Fluoreszenzlicht die GFP exprimierenden Neuralleistenzellen zu sehen sind, die entlang der Rhombomergrenzen auszuwandern beginnen. (E) Embryo bei dem spezifisch die Augenanlage in HH12 transfiziert wurde. Die Galaktosidase exprimierenden Zellen sind in der Retina lokalisiert (F, Pfeil). (G) zeigt einen Embryo im Stadium HH13-14 nach Elektroporation von CMV- β -Gal. Die Lage des Querschnittes in (H) ist durch einen weißen Balken angedeutet. (r1-6): Rhombomere, (V, VI, IX) Lage des V. (*N. trigeminus*), VI. (*N. abducens*) und IX. (*N. glosso-pharyngeus*) Kranialnervens, (OV) olfaktorisches Vesikel, (Met) Metencephalon, (Mes) Mesencephalon, (NL) Neuralleistenzellen, (OE) Oberflächenektoderm, (NR) Neuralrohr, (E) Elektrode. (MES) Mesencephalon, (Pro) Proencephalon

Neben einer symmetrischen Anordnung der Elektroden wurde auch ein asymmetrischer Aufbau, bestehend aus einer langen Platinelektrode, die längs zur Körperachse positioniert wurde, und einem in der Flamme geschärften Wolframdraht, erprobt. Dabei wurde die Polarität so gewählt, daß der Wolframdraht die Kathode und der Platindraht die Anode darstellte (siehe Abb.17 A/B). Die Spitze des Wolframdrahtes (40 μ m Durchmesser)

wurde an derselben Stelle mit Hilfe eines Mikromanipulators in das Lumen des Neuralrohres eingeführt, an der vorher die Injektion der DNA Lösung ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) erfolgt war. Der Abstand beider Elektroden betrug lediglich 1-2 mm, und es wurden **3 Pulse** von jeweils **25 msec Dauer** und einer Amplitude von **8 Volt** gesetzt ($n=30$). Infolge der Elektrolyse war nach der Poration das Lumen des Neuralrohres mit Gasblasen gefüllt, was den Embryo jedoch in seiner Entwicklung nicht zu beeinträchtigen schien. Der Vorteil dieser Elektrodenanordnung bestand in der sehr lokalisierten Applikation eines elektrischen Feldes, ohne den Rest des Embryos in seiner Entwicklung zu beeinflussen. So war es beispielsweise möglich, die Augenanlage, die in Vertebraten aus dem diencephalischen Bereich des Vorderhirnes entsteht, zu transfizieren (Abb.17 E). Sie entsteht durch Evagination des Augenbechers, einer Struktur, die sich aus dem Neuroektoderm entwickelt und sich später zur neuronalen Retina und dem Pigmentepithel ausdifferenziert (Couly und Le Douarin, 1988). Dieser Augenbecher induziert wiederum im darüberliegenden Oberflächenektoderm eine Verdickung, die sich abschnürt und zur Linse entwickelt. Durch geschickte Anordnung der langen und der punktförmigen Elektrode, lassen sich daneben auch sehr gezielt einzelne Somiten und laterales Mesoderm transfizieren (Momose et al., 1999).

Die Transfektion von Endoderm dient zur Untersuchung von Musterbildungsprozessen bei der Induktion und Differenzierung endodermaler Derivate, wie der Pankreas- und Leberanlage, die sich aus Ausstülpungen des Vorderdarmes ableiten. Hierbei wurde die DNA Lösung ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) von dorsal kommend durch den Embryo hindurch in die Subgerminalhöhle bzw. in die Region des Darmportals injiziert, in die endodermale Zellen einzuwandern und das Darmrohr zu bilden beginnen ($n=7$). Die Anode kam quer zur Längsachse des Embryos zu liegen, während die Kathode in den Dotter unterhalb des Embryos geschoben wurde. Infolge der dorsal liegenden Anode wurde die DNA durch den Puls elektrophoretisch nach oben gezogen und dadurch von den endodermalen Zellen aufgenommen. Abb.18 (B) zeigt dabei einen Embryo, in dem der Ösophagus spezifisch transfiziert worden ist.

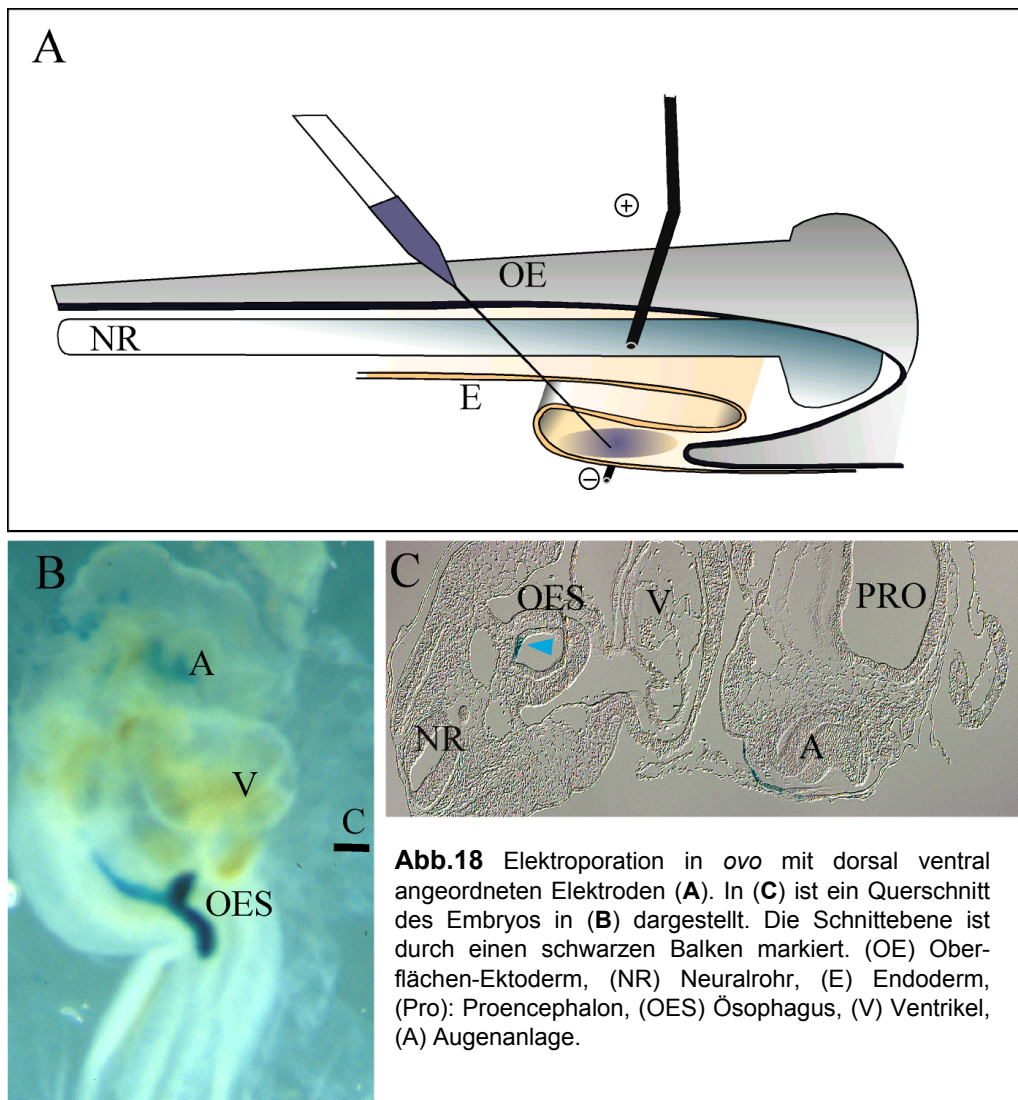


Abb.18 Elektroporation in ovo mit dorsal ventral angeordneten Elektroden (A). In (C) ist ein Querschnitt des Embryos in (B) dargestellt. Die Schnittebene ist durch einen schwarzen Balken markiert. (OE) Oberflächen-Ektoderm, (NR) Neuralrohr, (E) Endoderm, (Pro): Proencephalon, (OES) Ösophagus, (V) Ventrikel, (A) Augenanlage.

Resumé:

Die Elektroporation von Embryonen im Ei stellt eine geeignete und leicht durchführbare Methode dar, um zielgerichtet mit Hilfe von Genüberexpressionsstudien in die Signalkaskaden einzugreifen, die die Musterbildungsprozesse während der Organogenese beeinflussen. Durch Einsatz eines asymmetrischen Elektrodenaufbaus können dabei gezielt einzelne Strukturen, wie Extremitätenanlagen, Gehirnvesikel oder die Augenanlage transfiziert werden.

3.1.6 ELEKTROPORATION VON MÄUSEMBRYONEN

Transiente Genüberexpressions-Experimente in Mäuseembryonen bieten sich zur Komplementierung der genetischen Manipulationsmöglichkeiten in diesem Modellorganismus an.

Es wurden Embryonen zwischen den embryonalen Stadien 8.5 und 9.5 dpc verwendet. Bei der Präparation der Embryonen (siehe 2.2.21.4) mußte die Integrität der extraembryonalen Membranen, bestehend aus Amnion und Allantois, intakt bleiben. Im Stadium 8.5 dpc sind die Neuralfalten des Embryos noch nicht geschlossen (siehe Abb.19 A), wodurch kein natürliches Lumen vorhanden ist, in das DNA injiziert werden konnte. Die Elektroporation erfolgte auf dem Boden einer 3.5 cm Petrischale zwischen zwei parallelen Platinelektroden, von jeweils 8 mm Länge und einem mittleren Abstand von ebenfalls 8 mm. Zwischen den beiden Elektroden befand sich ein Tropfen (40µl) PBS, in den der Embryo mitsamt den extraembryonalen Membranen mit Hilfe einer Plastik-Pasteurpipette (COPAM) transferiert wurde. Es mußte darauf geachtet werden, kein FCS (fetales Kälberserum) mit zu überführen, da dies aufgrund seiner hohen Proteinkonzentration die Elektroporationseffizienz stark herabsetzte. Anschließend wurde der Flüssigkeitsspiegel vorsichtig abgesenkt, um ein Verrutschen des Embryos zu vermeiden. Eine konzentrierte Lösung des Expressionsplamides (5µg/µl) wurde unterhalb der Neuralplatte ins Mesenchym injiziert. Dabei konnte ebenfalls die Bildung von Blasen im Gewebe (wie in der New Kultur) beobachtet werden. Die Inkubation der Embryonen erfolgte in inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), dem 10 mmolar Glukose zugesetzt wurde, bei 37°C für 6 h in einem CO₂ Inkubator (6% CO₂, Heraeus BBD 6220).

In über 90% der analysierten elektroporierten (n=100) Embryonen war die Expression des Transgens auf das Mesenchym beschränkt, welches das ZNS umgab (siehe Abb.19 C/D). Nur in Ausnahmefällen konnte in geringem Umfang Genexpression im Neuroepithel erzielt werden. Während der 6 stündigen Inkubationszeit kam es zu keiner morphologisch erkennbaren Weiterentwicklung des Embryos, insbesondere zu keiner Rotation oder Neubildung von Somiten. Als Kriterium für Vitalität wurde vorhandener starker Herzschlag herangezogen. Ektopischer Gentransfer konnte auch in älteren Mäuseembryonen ab Stadium 9.5 erzielt werden, jedoch war die Kultivierung technisch erheblich anspruchsvoller. Sie erforderte die Begasung mit Gasgemischen von erhöhtem Sauerstoffpartialdruck (10% für Tag 9.5 Embryonen bzw. 20 % für Tag 10.5) sowie den

Einsatz eines Kultursystems, in dem das Medium mit den Embryonen ständig in Bewegung gehalten wird, um eine ausreichende Sauerstoffsättigung zu gewährleisten.

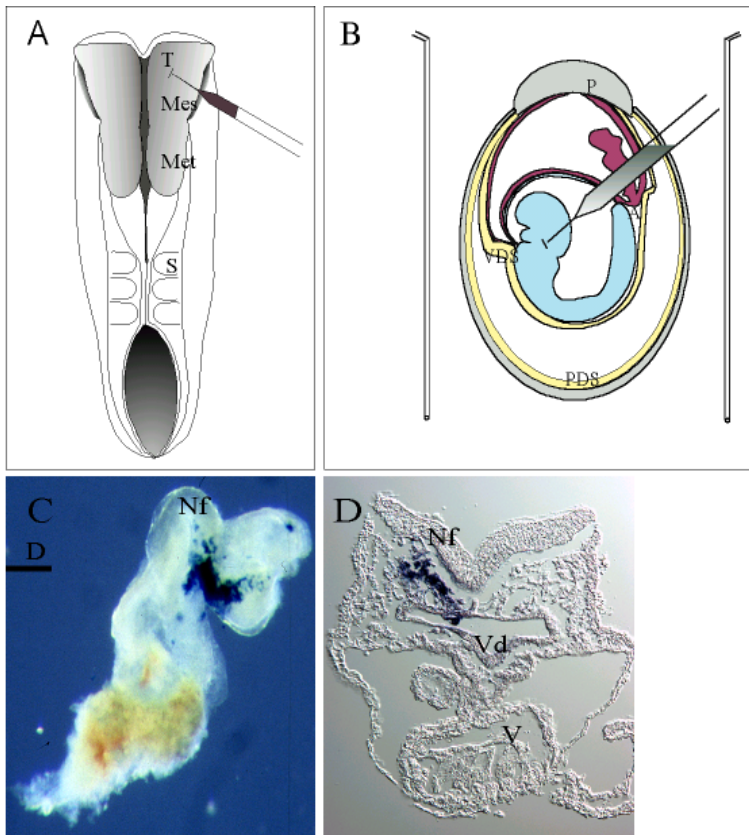


Abb.19: Elektroporation von Stadium 8.5 Mausembryos (A/B). In (A) ist eine schematische Ansicht eines 8.5 Embryos ohne extraembryonale Hüllen dargestellt. Die Ebene des histologischen Schnittes in (D) ist durch eine schwarze Linie angedeutet. Ventrale Ansicht des Embryos nach Elektroporation in (C) zeigt β -Gal Expression unterhalb der Neuralfalten. (T) Telencephalon; (Mes) Mesencephalon, (Met) Metencephalon, (P) Ektoplazentarkonus, (VDS) visceraler Dottersack, PDS: parietaler Dottersack, (A) Amnion, (Nf) Neuralfalte, (Vd) Darmkanal, (V) Ventrikel

Resumé:

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Elektroporation eine einfach zu handhabende und effiziente Methode ist, Genüberexpressionsexperimente auch in Mausembryonen durchzuführen. Allerdings beschränkt sich die ektopische Genexpression zumindest für in frühen Stadien elektroporierte Embryonen hauptsächlich auf das Mesenchym.

3.1.7 ELEKTROPORATION VON VEKTOREN MIT ZWEI TRANSKRIPTIONS-EINHEITEN (PROMOTOREN)

Um Elektroporation als Methode der Wahl zur Transfektion von Wirbeltierembryonen etablieren zu können, sollten die transgenen Zellen vor allem zwei Kriterien erfüllen: Zum einen muß durch Expression eines Markergens wie GFP oder RFP eine visuelle Erkennung im lebenden Gewebe gewährleistet sein, um eventuelle Veränderungen, etwa im Bereich von Zellmigrationen, durch Zeitrafferaufnahmen dokumentieren zu können. Zum anderen ist es wünschenswert, daß die transfizierten Zellen neben dem Markergen auch das für die entsprechende Studie relevante Genkonstrukt konstitutiv exprimieren. Es sollte daher eine vollständige Überlappung beider Genexpressionen in allen transgenen Zellen gegeben sein. Um eine derartige Co-Expression zweier Gene in einer Zelle zu erzielen, gibt es drei prinzipielle Ansatzmöglichkeiten. Man kann unterscheiden zwischen dem äquimolaren Mischen zweier Plasmide (siehe nächstes Kapitel) und der Verwendung von Vektoren mit mehreren Transkriptionseinheiten. Darüberhinaus gibt es die Möglichkeit, Vektoren einzusetzen, bei deren Transkription eine bicistronische mRNA gebildet wird. Bei einer bicistronischen mRNA werden im Gegensatz zu einer monocistronischen RNA zwei verschiedene Proteine von einer mRNA kodiert. Ein Vektor mit zwei Transkriptionseinheiten, wie der CMVTM-PTracer (Invitrogen) enthält zwei starke Promotoren, in diesem Fall den viralen Promotor des frühen E1 Gens aus dem humanen CMV-Virus, sowie der Promotor des humanen Elongationsfaktors α (EF1 α), die die Transkription zweier Gene unabhängig voneinander steuern können. Jede Transkriptionseinheit besitzt ihr eigenes Polyadenylierungssignal, SV40 Poly A bzw. das BGH (bovines Wachstumshormon) Poly A Signal, das den Transkriptionsabbruch durch die RNA Polymerase II steuert. In dem in Abb.20 dargestellten Experiment steht die Transkription von BMP4 unter der Kontrolle des CMV Promotor, während die Expression von GFP durch den EF1 α Promotor kontrolliert wird. Die Detektion der BMP4 RNA erfolgte mit Hilfe der *In-situ* Analyse, wohingegen der Nachweis von GFP durch Verwendung eines polyklonalen GFP Antikörper (Clontech) gelang. In den überlagerten Fluoreszenz Aufnahmen ist deutlich ersichtlich, daß beide Gene zwar in demselben embryonalen Bereich nachgewiesen werden können, eine Co-Expression in einer Zelle jedoch ausgeschlossen zu sein scheint. Dieses Phänomen scheint nicht vom Zelltyp abhängig zu sein, da benachbarte Zellen, die sich in ihrer jeweiligen Genexpression unterscheiden, im Ekto-, Meso- sowie Endoderm gefunden

werden können. Es ist auffällig, daß in etwa 2/3 der transgenen Zellen GFP exprimiert wird, während dies im Falle von BMP4 nur in etwa einem Drittel der Zellen der Fall ist (Abb.20 A/B).

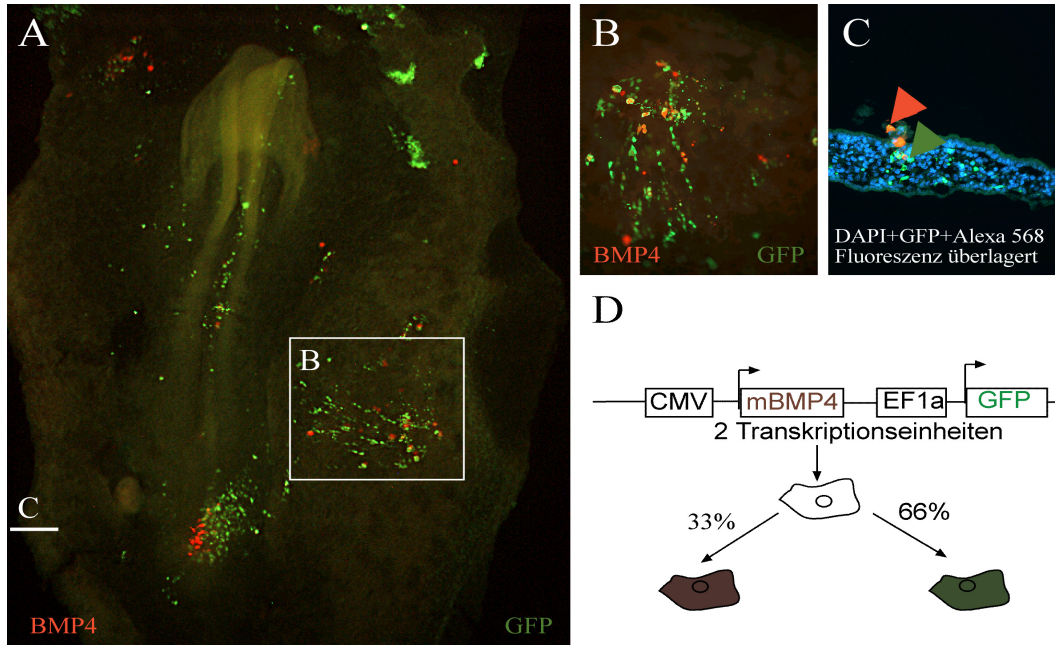


Abb.20: Elektroporation des P-Tracer Vektors mit CMV-BMP4 und EF1a-GFP (A/B). (B) gibt eine Ausschnittsvergrößerung aus (A) wieder. In beiden Bildern erfolgte eine Überlagerung grüner und roter Fluoreszenzen. Die Ebene des histologischen Schnittes in (C) ist durch einen weißen Balken angedeutet. In (C) wurden blaue, rote und grüne Fluoreszenzen überlagert. Rote Zellen (Fast Red Fluoreszenz) zeigen BMP4 Expression (roter Pfeil). In grünen Zellen (grüner Pfeil) erfolgte ein indirekter Nachweis des GFP-Proteins durch einen polyklonalen GFP-Antikörper, und einem Fluoreszenz (488nm) markierten sekundären Antikörper. Man erkennt, daß etwa 2/3 der Zellen GFP exprimieren (B).

Als Alternative zur Verwendung von Vektoren mit zwei Promotoren bietet sich der Einsatz bicistronischer Konstrukte an, die eine sog. IRES-Sequenz besitzen. Dies ist eine interne Ribosomenbindestelle, die eine Reinitiation der Translation unabhängig von der Kappenstruktur am 5' Ende erlaubt. Bei der Translationsinitiation an diesen Sequenzabschnitten, die sich u.a. in Genen verschiedener Viren wie dem Encephalomyocarditis Virus (EMCV) und dem Hepatitis C Virus finden, sind sowohl andere Untereinheiten eukaryotischer Initiationsfaktoren (eIFs) als auch nichtkanonische Initiationsfaktoren involviert (Pestova et al., 2001). Der in diesen Experimenten verwendete Vektor (pIRES-EGFP, Clontech) besaß einen CMV Promotor/Enhancer sowie eine durch Punktmutationen partiell inaktivierte EMCV-IRES-Sequenz (Rees et al., 1996), die bewirken sollte, daß bevorzugt das Gen unter der Kontrolle des CMV Promotors transkribiert wird. Die durch die IRES-Sequenz vermittelte Transkription von GFP war jedoch nicht

stark genug, um innerhalb von 24 h nach einer Transfektion zu einer ausreichenden Akkumulation von GFP zu führen. Zellkulturdaten haben ergeben, daß nach einer Transfektion in Fibroblasten erst nach 72 h GFP Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Xunlei Xhiou, persönliche Mitteilung).

Resumé:

Aus den dargestellten Zusammenhängen ergibt sich, daß durch den Einsatz von Vektoren mit zwei Transkriptionseinheiten zwar beide transkribierten Gene in überlappenden Domänen in den elektroporierten Embryonen nachgewiesen werden konnten, jedoch auf zellulärem Level keine Co-Expression erreichbar war.

3.1.8 CO-ELEKTROPORATION ZWEIER PLASMIDE

Durch Injektion *in vitro* transkribierter RNA und auch DNA (Koster und Fraser, 2001) kann man im Zebrafisch (*Danio rerio*) und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) ektopisch Proteinexpression erzielen. Dabei können mehrere RNA Populationen gleichzeitig injiziert werden. Gewöhnlich werden das zu untersuchende Gen und das als Marker dienende GFP im Verhältnis 1/1 gemischt (~2ng mRNA von jedem Gen), wodurch in beinahe 100% der Fälle eine überlappende Genexpression erzielt wird. In Analogie wurden Plasmide, die β -Galaktosidase, GFP und RFP unter Kontrolle des CMV Promotors enthielten, in einem äquimolaren Verhältnis bzw. im Verhältnis 5/1 im Falle von RFP und GFP gemischt (siehe Abb.21 A-F). Bei RFP handelt es sich um das rot fluoreszierende Protein der indopazifischen Seeanemone *Discosoma striata* (Matz et al., 1999), das ein Emissionsmaximum von 583 nm besitzt und bei dem ebenfalls wie bei GFP eine Codonoptimierung für effiziente Transkription in Säugerzellen vorgenommen wurde (Haas et al., 1996). Werden RFP und β -Galaktosidase im Verhältnis 1/1 gemischt, so kommt es zu einer effizienten Translation beider Proteine in weitgehend identischen Domänen innerhalb des Embryos (Abb.21 A/B). Ob jedoch auf zellulärem Level beide Proteine stets co-translatiert werden, konnte nicht absolut sicher ermittelt werden, da die Bilder sich nicht völlig zur Deckung bringen lassen. Es wurden lediglich in einem quadratischen Areal von 1 cm Kantenlänge mit Hilfe des Computerprogramms "Analysis" (Olympus) die Zahl der Zellen (n=200) ermittelt, die RFP bzw. LacZ exprimierten. Nach der Detektion der LacZ Färbung konnte durch Anregung mit UV-Licht festgestellt werden, daß in etwa 30% der RFP exprimierenden Zellen keine LacZ Färbung nachweisbar war (roter Pfeil Abb.21 A). In gleicher Weise konnten in einem ähnlichen Prozentsatz LacZ positive Zellen nachgewiesen werden, in denen keine RFP Expression

erkennbar war (blauer Pfeil Abb.21 B). Daher kann davon ausgegangen werden, daß in 70% der Zellen beide Proteine gleichzeitig translatiert werden. Wurden die beiden fluoreszierenden Proteine GFP und RFP in äquimolarem Verhältnis gemischt, konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden. Eine Co-Expression beider Proteine würde nach Überlagerung der Fluoreszenzen als gelb aufleuchtende Zellen erkennbar sein. Stattdessen ähnelt das Ergebnis der Situation nach Elektroporation des P-Tracer™-Vektors in der Hinsicht, daß RFP und GFP exprimierende Zellen benachbart zueinander liegen. Eine Co-Expression beider Gene in etwa 50% der Zellen konnte erst durch ein Mischungsverhältnis von RFP zu GFP von 5/1 erzielt werden (Abb.21 F).

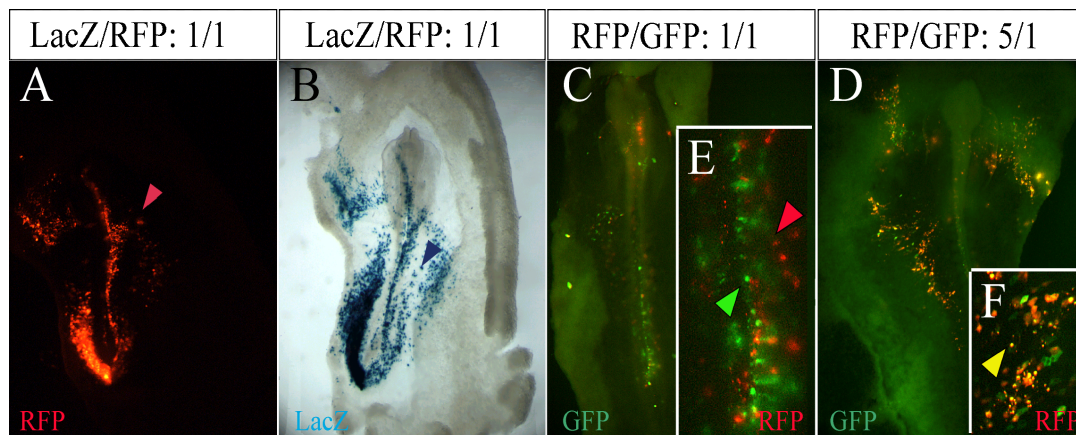


Abb.21: Co-Elektroporation von RFP/LacZ (A/B) bzw. GFP und RFP (C/D). In (A) und (B) ist jeweils derselbe Embryo abgebildet im Fluoreszenzlicht bzw. im Hellfeld. (E) und (F) stellen jeweils Ausschnittsvergrößerungen der transgenen Bereiche der Embryonen in (C) und (D) dar. Es ist deutlich, daß bei einem Mischungsverhältnis von 5/1 (RFP/GFP) wesentlich mehr Zellen beide Proteine co-exprimieren. Rote Pfeile weisen auf Zellen hin, die nur RFP, blauer Pfeil auf Zellen, die nur β -Gal und grüner Pfeil auf Zellen die nur GFP exprimieren. Zellen, die eine Co-Expression von RFP und GFP aufweisen, sind durch einen gelben Pfeil markiert. In (C/D) wurden die Fluoreszenzaufnahmen überlagert, Zellen, die Co-Expression aufweisen, erscheinen daher gelb.

Resumé:

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch Elektroporation eines Plasmidgemisches, im Mischungsverhältnis 5/1, in bis zu 70% der Zellen eine Co-Expression und Translation zweier Gene erreicht werden kann.

3.1.9 ANALYSE ELEKTROPORierter EMBRYONEN

Die Effekte eines überexprimierten Genes auf andere Proteine können in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Entweder kann es zu einer transkriptionellen Aktivierung anderer Gene kommen oder es ist im Falle eines als Repressor fungierenden Proteins, wie etwa *engrailed*, eine Inaktivierung nachgeschalteter Gene zu beobachten. Als drittes besteht die Möglichkeit, daß das überexprimierte Protein keinen Einfluß auf die untersuchten Proteine hat. Alle drei Varianten lassen sich auf dem mRNA Level durch Verwendung der Ganzkörper *In-situ* Analyse verifizieren. Durch gleichzeitige Hybridisierung mit unterschiedlich markierten antisinn RNA Sonden lassen sich das überexprimierte Transgen und das untersuchte putative Zielgen durch zwei unterschiedliche Farbreaktionen, rot bzw. blau, gleichzeitig darstellen (siehe Abb.22 A/B). Als Alternative kann das Transgen auch auf der Ebene der Proteinexpression durch die Konstruktion von Fusionsproteinen oder die Verwendung der entsprechenden Antikörper detektiert werden. Für N- bzw. C-terminale Fusionen können dabei entweder Reportgene wie β -Galaktosidase oder fluoreszierende Proteine wie RFP bzw. GFP oder kurze Oligopeptidsequenzen wie Poly-Histidin oder das Myc Epitop herangezogen werden. Diese Reporterkonstrukte sind auch durch die entsprechenden Antikörper nachzuweisen. Um sicherzustellen, daß aktivierte Zielgene auch translatiert werden, ist es ratsam, diese ebenfalls durch spezifische Antikörper zu detektieren.

Im Laufe der Experimente zeigte es sich jedoch, daß das Kriterium, ob die *In-situ* Proben von einer Plasmid Matrize oder einem PCR Fragment erzeugt wurden, entscheidenden Einfluß auf das Versuchsergebnis hatte. Es gelang der Beweis, daß DIG markierte Proben, die von einer Plasmidmatrize (Blueskript) erzeugt wurden, zu falsch positiven Resultaten in der Ganzkörper *In-situ* Analyse führten. Dies soll anhand des folgenden Beispiels erläutert werden:

Die Embryonen in Abb.22 (A-D) wurden mit *Slug*, einem Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der sowohl von wandernden wie auch von nicht-wandernden Neuralleistenzellen exprimiert wird (Nieto et al., 1994), transfiziert. Als zu analysierendes Zielgen für eine durch *Slug* vermittelte Aktivierung wurde *Cadherin-6b*, ein Zelladhäsionsprotein, das im dorsalen Neuralrohr vor dem Auswandern der Neuralleistenzellen exprimiert wird und epithelial- mesenchymale Übergangsprozesse steuert (Nakagawa und Takeichi, 1995), exemplarisch ausgewählt. Wurde eine *Cadherin-6b* Probe verwendet, die von einer

Plasmid Matrize generiert wurde, so scheinen alle für *Slug* transgenen Zellen (Abb. 22 A) ebenfalls positiv für *Cadherin-6b* zu sein: (Abb.22 B). Überdies ist in vielen Fällen auch die endogene *Cadherin-6b* Expression erkennbar (Pfeil). Dieses Ergebnis konnte auch im Einzel-*In-situ*-Experiment reproduziert werden, was die Entstehung dieses Artefakts als methodischen Fehler der Doppel-*In-situ*-Analyse ausschließt. Durch Amplifikation der jeweiligen cDNA mit spezifischen Primern, wobei der 3' gelegene Primer die spezifischen Promotorsequenzen der T3 bzw. der T7 Polymerase enthält, konnten jedoch PCR Fragmente generiert werden, die als Matrize für die *in vitro* Transkription dienten. In Abb.22 A-C kann man erkennen, daß in Abhängigkeit von der Probe widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Während man in (B) davon ausgehen könnte, *Slug* würde zu einer universellen Aktivierung von *Cadherin-6B* in allen Zelltypen führen, kann man in (C) deutlich sehen, daß keine der transgenen *Slug* exprimierenden Zellen dieses Zielgen aktiviert. Ursache für die Erzeugung dieser falsch positiven Signale waren transkribierte Plasmidsequenzen des Expressionsvektors, insbesondere des Ampicillin Gens. Wurden mit CMV-*Slug* bzw. CMV-GFP elektroporierte Embryonen mit einer durch die Polymerase T3 erzeugten Probe eines "leeren" Blueskrip Vektors ohne Insert hybridisiert, konnte in allen transfizierten Zellen ektopische "Aktivierung" von Ampicillin nachgewiesen werden (Abb.22 D/F).

Durch die Polymerase T7 generierte Proben waren jedoch nicht in der Lage (Abb.22 H) transkribierte Plasmidsequenzen nachzuweisen. Dies hängt mit der spezifischen Lage der T3 und T7 Promotoren insbesondere bezüglich der Orientierung des Ampicillin Gens im Blueskript Vektor zusammen. Die T3 Polymerase erzeugt sinn, die T7 Polymerase jedoch antisinn Transkripte des Ampicillin Genes. Diese Resultate konnten durch Ampicillin Proben, die von PCR Fragmenten gewonnen wurde, verifiziert werden. Allerdings kann bis jetzt nicht ausgeschlossen werden, daß weitere transkribierte Plasmidsequenzen für die Erzeugung falsch positiver Signale verantwortlich sein können.

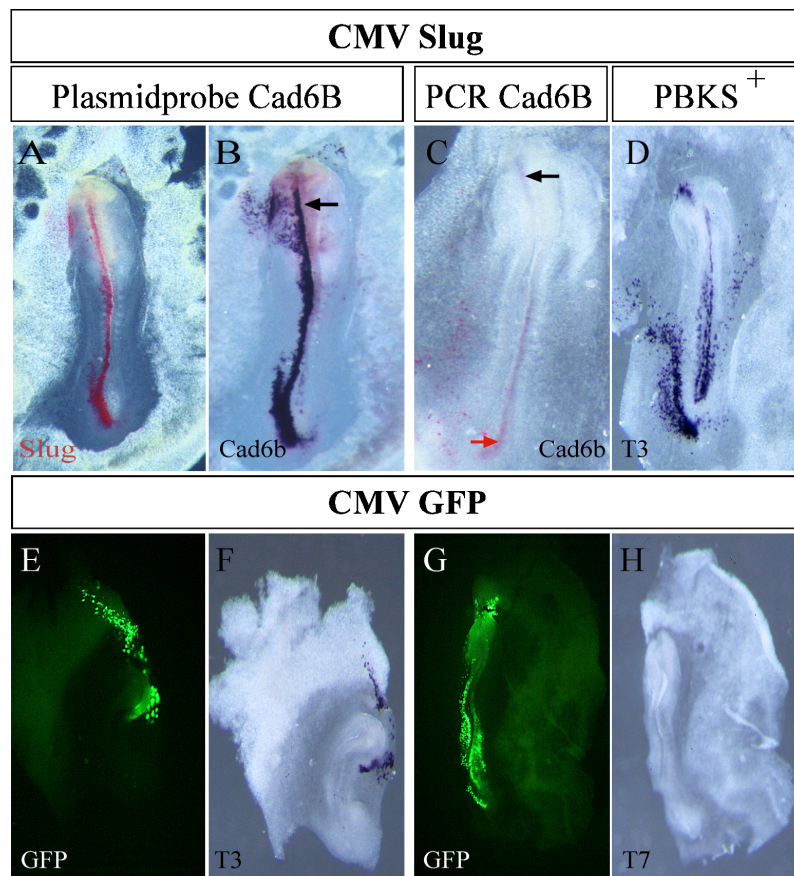


Abb.22: Vergleichende Analyse der *In-situ* Ergebnisse bei der Verwendung von RNA Proben, die von einem Plasmid transkribiert wurden (**A/B**) bzw. von einem PCR Fragment, das nur die Cad-6b cDNA und den T7 Promotor enthält (**C**). Die Embryonen in (**A-D**) wurden mit einem CMV-Slug Expressionsvektor, die Embryonen in (**E-H**) mit einem CMV-GFP Expressionsvektor transfiziert. Die Signaldetektion erfolgte in (**D/F** und **H**) mit Dig markierten Proben, die vom Blueskript Vektor transkribiert wurden.

Resumé:

Als Zusammenfassung bleibt festzuhalten, daß nur durch Proben, die von PCR Produkten transkribiert werden, sich die tatsächliche transkriptionelle Aktivierung überexprimierter Transgene feststellen lassen.

3.1.10 DETEKTION TRANSKRIBIERTER PLASMIDSEQUENZEN

3.1.10.1 In elektroporierten Embryonen

Der Nachweis, daß in elektroporierten Embryonen neben der transfizierten cDNA noch weitere Plasmidsequenzen transkribiert werden, gelang mit Hilfe der RT-PCR Reaktion. Hierbei wurde RNA, die aus transgenen Bereichen des Embryos gewonnen wurde, durch das Enzym reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Vor dem Umschreiben wurde die isolierte RNA für 2 Stunden mit DNase behandelt, um Kontaminationen durch eventuell vorhandene Vektor DNA auszuschließen.

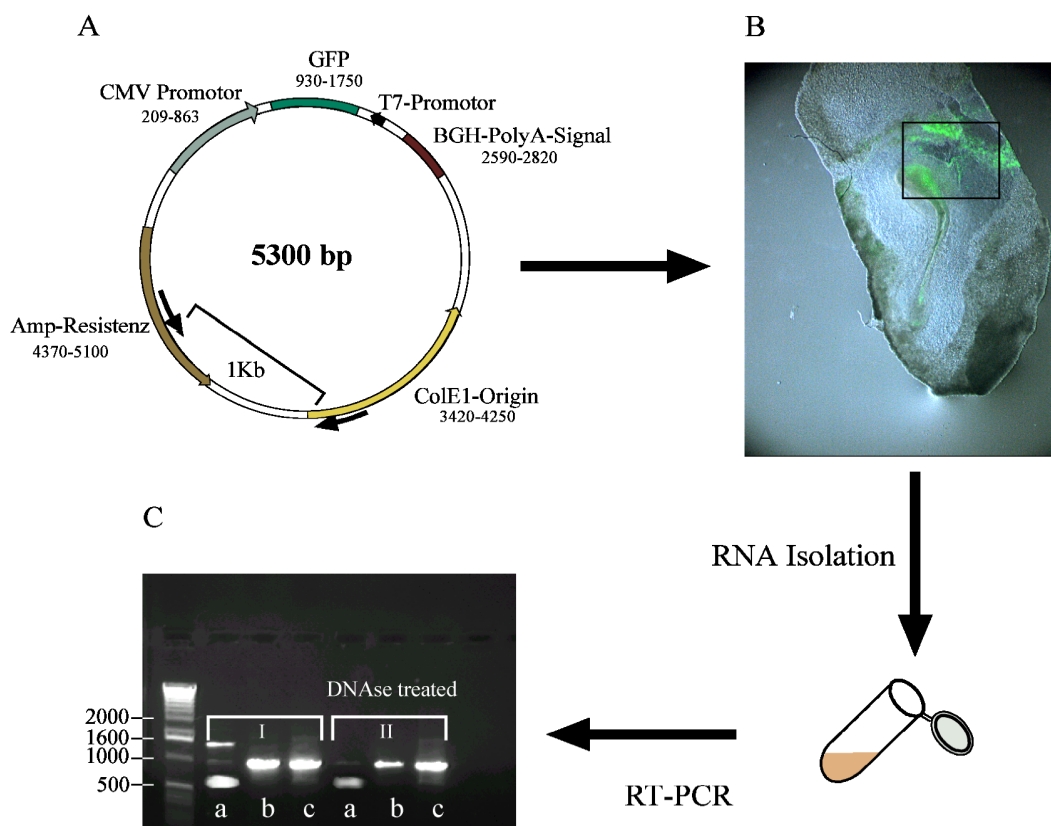


Abb. 23: (A) Karte des GFP Expressionsvektors. Die Pfeile geben die Position der Primer an, die für die Amplifikation der Ampicillin RNA verwendet wurden. (B) Transfizierter Embryo. Die Region, die zur Isolation der RNA verwendet wurde, ist durch ein Rechteck markiert. (C) Elektrophoretisch aufgetrennte RT-PCR Fragmente. (a) GAPDH Kontrolle, (b) amplifizierte Plasmidsequenzen, (c) Plasmidkontrolle, bei der dieselben Primer wie in (b) verwendet wurden. In (II) wurde die RNA vor dem Umschreiben in cDNA mit DNase behandelt, um eventuelle DNA Verunreinigungen auszuschließen.

Die gemeinsame Amplifizierung des Ampicillin Fragmentes zusammen mit Vektorsequenzen erfolgte in einer anschließenden PCR-Reaktion durch spezifische Primer, deren relative Lage in Abb.23 A angedeutet ist. Die erhaltenen PCR Fragmente wurden

elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb.23 C). Es ist klar ersichtlich, daß sowohl in der nicht mit DNase behandelten Probenfraktion (I) als auch in derjenigen mit DNase Behandlung (II) eine charakteristische Bande vorhanden ist (Spur b). In (II) ist die Amplifizierung etwas schwächer ausgeprägt, da die für eine optimale DNase Aktivität erforderliche Konzentration an Mg^{++} Ionen bis zu 5-10 mM beträgt, ein Wert, der zu hoch für eine effektive PCR-Reaktion ist.

Resumé:

Es läßt sich schlußfolgern, daß es in elektroporierten Embryonen neben der CMV vermittelten Transkription der jeweiligen cDNA noch zur Transkription weiterer Plasmidsequenzen kommt.

3.1.10.2 In-situ Proben

Verunreinigungen durch Ampicillin und Vektor RNA konnte auch in den *in vitro* synthetisierten *In-situ* Proben nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Northern Blottes, wobei als Proben jeweils P^{32} markierte Ampicillin bzw. *Geminin* cDNA diente (Abb.24 A/B). Die Verwendung der RT-PCR Reaktion zum Nachweis von Ampicillin RNA ist in diesem Falle aufgrund ihrer hohen Sensitivität wenig geeignet, da infolge der hohen Konzentration an Vektor DNA (1 μ g) ein quantitativer Abbau durch DNasen nicht möglich war (Ambion Inc. Technotes newsletter, Volume 8, Nr. 4). Daher konnte in den verwendeten RNA Proben stets noch Vektor DNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In der Transkriptionsreaktion wurden nicht markierte Ribonukleotide verwendet und die Transkripte wurden nach einem DNase Verdau, um die Plasmid DNA weitgehend zu entfernen, elektrophoretisch auf einem formamid-haltigen Gel aufgetrennt. In Abb.24 A/B ist jeweils derselbe Blot dargestellt, der zuerst mit einer Ampicillin Probe (A) und anschließend mit einer *Geminin* Probe hybridisiert wurde (B).

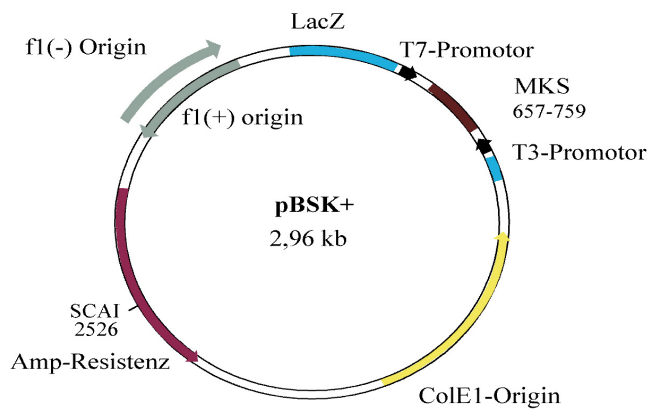
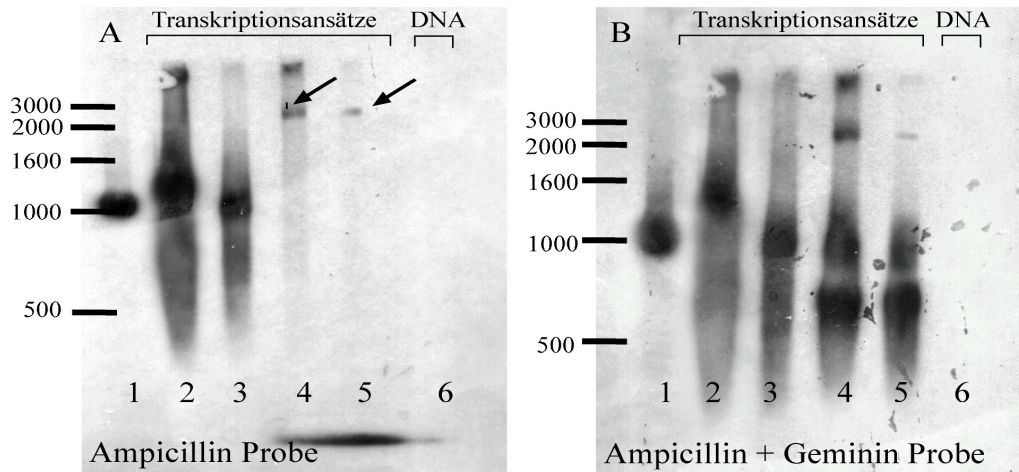


Abb. 24: Northern Blot Analyse *in vitro* transkribierter RNA Proben. In (B) handelt es sich um den gleichen Blot wie in (A), nur daß nach der Hybridisierung mit der Ampicillin Probe der Blot zusätzlich noch mit einer *Geminin* Probe hybridisiert wurde. Aufgetragen wurde in: Spur 1: 10 µg λ-DNA Marker; Spur 2: leerer pBSK⁺ transkribiert mit T7 Polymerase; Spur 3: leerer pBSK⁺ transkribiert mit T3 Polymerase; Spur 4/5: 2 Transkriptionsansätze (T7 Polymerase) von *Geminin* in pBSK⁺; Spur 6: pBSK⁺ DNA, (100 ng) linearisiert mit ScaI (schneidet in Ampicillin an Position in Blueskript). Von der in Spur 6 aufgetragenen DNA erfolgte die Transkription der Blueskript RNA Proben. Eine Vektorkarte von Blueskript mit der relativen Lage der T7 und T3 Promotoren ist in (C) dargestellt.

Da es sich um ein Plasmid (Blueskript) zur Herstellung einer *Geminin* RNA *In-situ* Probe handelte, wurde in einem anschließenden Hybridisierungsschritt überprüft, ob in den analysierten Proben auch tatsächlich *Geminin* RNA vorhanden war. In Spur 2 und 3 wurde Blueskript Vektor RNA aufgetragen, die mit Hilfe der T3 und T7 Polymerase erzeugt worden war. Die mit der T7 Polymerase hergestellte RNA, die ein antisinn Transkript des Ampicillin Gens enthält, hat eine Größe von etwa 1.6 kb, wohingegen die Transkription des restlichen Vektors durch die T3 Polymerase eine Transkriptlänge von ~1.2 kb ergibt. In Spur 3 und 4 sind jeweils zwei Transkriptionsreaktionen (hergestellt

mit der T3 Polymerase), in jeweils unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen (1/10 bzw. 1/70 des Transkriptionsansatzes). Es handelt sich in beiden Fällen um Transkripte des *Geminin* Gens (in Blueskript, linearisiert mit ClaI). Es sind zwei Banden (~2.6 kb und >3 kb) erkennbar (Pfeile), die in den *Geminin* Proben vorhandene Ampicillin Transkripte darstellen.

Resumé:

Aus diesem Ergebnis läßt sich schlußfolgern, daß es bei der Generierung von *In-situ* Proben linearisierter Plasmidmatrizen auch zu einer Transkription von Vektorsequenzen kommt.

3.2 Das Gen *Geminin*

3.2.1 SEQUENZDATEN

Das Gen *Geminin*, das von Hendrik Knötgen kloniert wurde, kodiert für ein Protein, das aus 223 Aminosäuren mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 24989 g/mol (25 kDa) bestand. Eine Analyse der Primärstruktur des Proteins ließ eine Coiled-Coil-Domäne (s.u.) und ein mögliches Kernexportsignal (NES) (s.u.) erkennen. Der Vergleich mit den Sequenzen der Datenbanken ergab eine Verwandtschaft der abgeleiteten Proteinsequenz des Gens *Geminin* zu Proteinen aus dem Frosch *Xenopus laevis*, dem Menschen, der Maus *Mus musculus* und der Fliege *Drosophila melanogaster* (Abb.25).

3. ERGEBNISSE

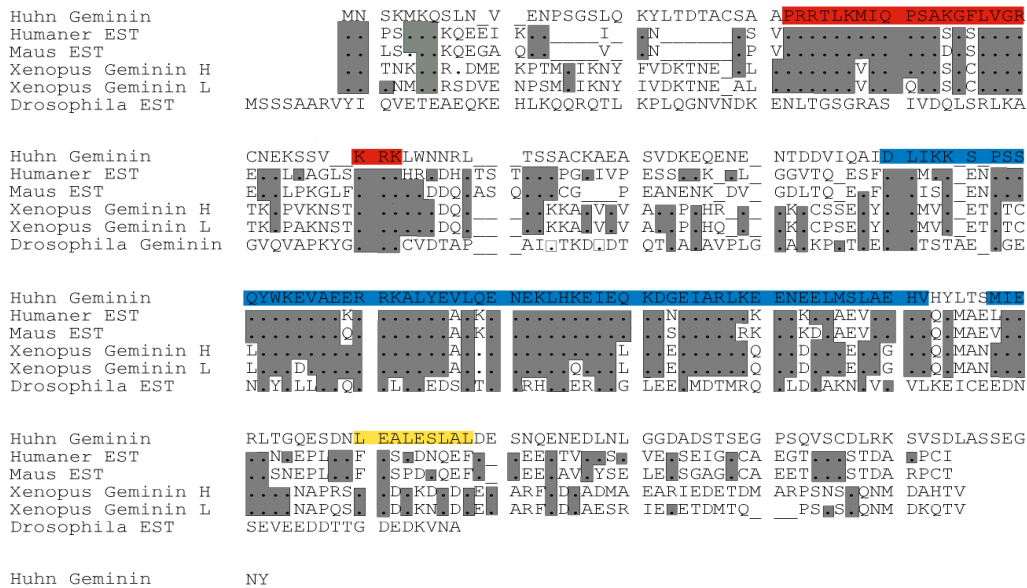


Abb. 25: Vergleich der Proteinsequenz von Geminin mit in den Datenbanken gefundenen Sequenzen aus dem Menschen, der Maus, dem Frosch und der Fliege. Identische Aminosäuren sind als grau unterlegte Bereiche und fehlende Aminosäuren als tiefgestellter Strich dargestellt. Die konservierten Bereiche sind mit rot (Domäne A) bzw. blau (Domäne B) unterlegt. Das mögliche Kernexportsignal (NES) ist gelb unterlegt.

Die Homologie von *Geminin* zu anderen Genen und sequenzierten Genfragmenten (ESTs, engl. expressed sequence tags) in den Datenbanken war relativ gering ausgeprägt (Abb. 25). *Geminin* war zu dem humanen EST (209 aa) (AF067855) und dem EST (206 aa) aus der Maus (AF068780) in nur 54% bzw. 50% der Aminosäuren identisch. Zu den Proteinen Geminin H (AF067856) und Geminin L (AF067881) aus dem Frosch *Xenopus laevis* war eine Identität von weniger als 50% vorhanden. Allerdings sind offensichtlich zwei Domänen des Proteins *Geminin* stärker konserviert (Abb.25, rot und blau markiert). Diese Domänen A und B (A: 29 aa in rot und B: 75 aa in blau) weisen eine höhere Homologie zu den anderen Proteinen auf. Die A-Domäne ist zum humanen EST zu 72%, zum EST der Maus zu 69%, zu Geminin H zu 62% und zu Geminin L zu 58% identisch. Zu dem verwandten Protein aus der Fliege zeigt sich allerdings nur eine geringe Übereinstimmung (10%). Die B-Domäne ist zum humanen EST zu 76%, zum EST der Maus zu 71%, zu Geminin H zu 73%, zu Geminin L zu 73% und zum EST der Fliege zu 32% identisch.

Durch die laufenden Sequenzierprojekte (Celera Datenbank) konnte *Geminin* in der Maus auf Chromosom 13 lokalisiert werden. Die Analyse der genomischen Organisation ergab einen Aufbau aus 7 Exons und 6 Introns.

Die Position des humanen Homologs ist durch physikalische Kartierungsmethoden wie der Radiations-Hybrid-Kartierung (RH) sowie durch die abgeschlossene Sequenzierung des menschlichen Erbgutes genauer bekannt. Es ist auf dem kurzen P-Arm des Chromosoms 6 in der Region 21.3-22.1 lokalisiert. Diese chromosomale Region zeichnet sich durch eine hohe Gendichte aus.

Der konservierte c-terminale Teil des Proteins *Geminin* (105. bis 149. aa) enthält ein sogenanntes „Coiled-coil“-Motiv (McLachlan und Stewart, 1975), das aus einer Wiederholung von sieben Aminosäureresten zusammengesetzt ist und jeweils an den Positionen eins und vier hydrophobe Reste beinhaltet. Diese hydrophoben Reste formen in einer α -Helix einen hydrophoben Streifen aus, der mit anderen Coiled-coil-Domänen in Wechselwirkung treten kann und häufig als Proteininteraktionsdomäne in Erscheinung tritt. Die Vorhersage der Coiled-coil-Domäne erfolgte mit Hilfe des Programms „Coils Prediction 2.2“ (Lupas et al., 1991).

Die Proteinsequenz von der 170. bis 178. aa des Proteins Geminins (LEALESLAL) enthält ein putatives Kernexportsignal (Görlich und Kutay, 1999), das der bekannten Konsensus-Sequenz (L-x₂₋₃-L-x₂₋₃-L-x-L) exakt entspricht (Bogerd et al., 1996). Dieses Kernexportsignal findet sich ebenso in Geminin H und Geminin L aus dem Frosch fehlt jedoch bei dem entsprechenden Gen aus Maus und Mensch.

3.2.2 EXPRESSION IN DER FRÜHEN HÜHNER- UND MAUSENTWICKLUNG

Transkripte von *Geminin* konnten bereits während der Gastrulation im Primitivstreifenstadium (HH4) im Ektoderm nachgewiesen werden (Abb.26 A). *Geminin* wurde in diesem Stadium entlang des Primitivstreifens, in der gesamten Neuralplatte (np) und in geringerem Ausmaß auch in dem peripheren Ektoderm, das später zur Epidermis differenziert, transkribiert. Im Kopffaltenstadium (HH6) blieb dieses Expressionsmuster erhalten, allerdings fand ein Abschalten der *Geminin* Expression in der Mitte des Embryos über dem Notochord statt (Abb.26 C, Pfeil). Während des Prozesses der Neuration (ab HH7) restringierte sich die Expression von *Geminin* auf die dorsalen Neuralfalten (Abb.26 D/F/G, Pfeil). Nach dem Schließen des Neuralrohrs (HH10) war *Geminin* Expression im dorsalen Neuralrohr und in den auswandernden Neuralleistenzellen vorhanden (Abb.26 D/F, Pfeil). In späteren Stadien ab HH11 wurde die Transkription von

Geminin im Huhn eingestellt.

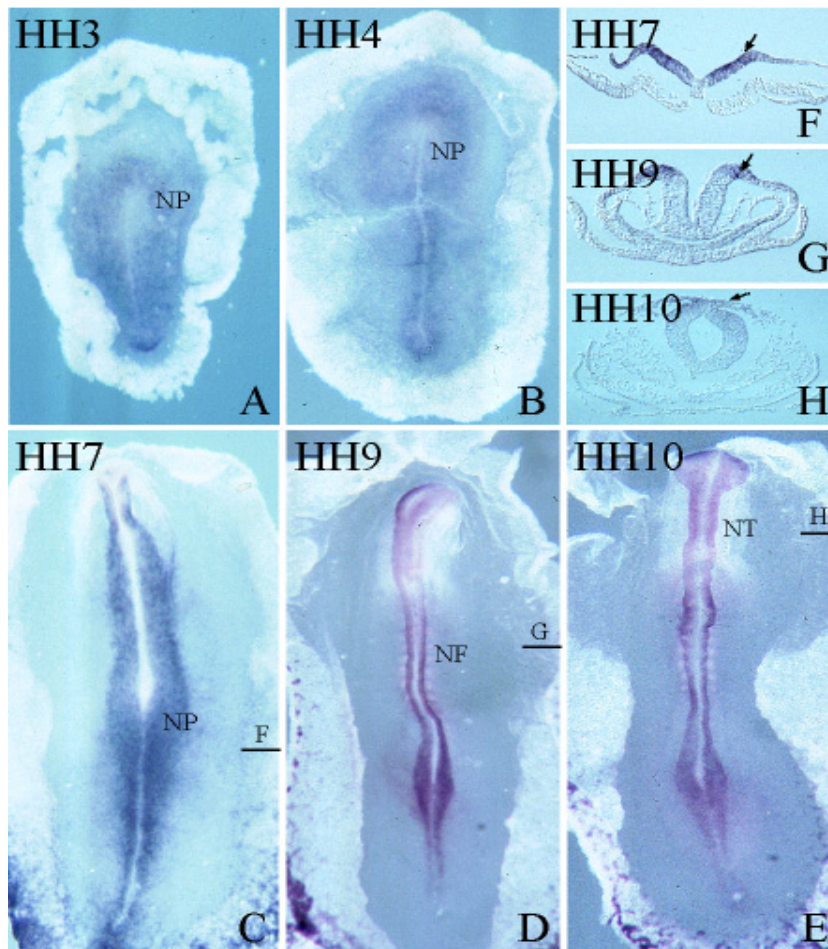


Abb.26: Expression des Gens *Geminin* im Hühnerembryo. (A/B) Im Primitivstreifenstadium und während der Ausbildung der Neuralplatte (HH3-HH4) konnte *Geminin* in einer breiten Domäne im Ektoderm und entlang des gesamten Primitivstreifens detektiert werden. (C) Im Kopffaltenstadium (HH7) werden *Geminin* Transkripte in der Neuralplatte und im angrenzenden Ektoderm gefunden. Das Ektoderm oberhalb des Notochords erscheint frei von Transkripten (Pfeil). (C) Zu Beginn der Neurulation (HH9) wird *Geminin* in den dorsalen Neuralfalten (Pfeil) und weiter posterior in der Neuralplatte exprimiert. (D/F) Nach Schluß des Neuralrohres im anterioren Bereich (HH10), wird *Geminin* RNA im dorsalen Neuralrohr und in den auswandernden Neuralleistenzellen (Pfeil) gefunden. Weiter posterior können Transkripte in den dorsalen Neuralfalten und noch weiter posterior in der Neuralplatte nachgewiesen werden (Neuralplatte (np); Neuralfalten (nf); Neuralrohr (nt)).

Die Expression des Maus Homologs von *Geminin* wurde zwischen den embryonalen Stadien E 8.5-E15.5 (dpc) analysiert. Die cDNA (AA014584) wurde als Image Klon vom UK HGMP Resource Center bezogen. In frühen Stadien während der Neurulation (E 8.5-9.5) zeigt *Geminin* eine weitgehend ubiquitäre schwache Expression (Abb.27 A/B). Ab Stadium E13.5 findet sich das Gen verstärkt in dorsalen Bereichen des sich entwickelnden Telencephalons (Abb.27 D-F) sowie in der kranio-fazialen Anlage und den distalen Bereichen der Extremitäten (Pfeile, C). Eine radioaktive *In-situ* Analyse an

Sagittalschnitten von E 15.5 Embryonen ergab eine starke Expression in der Subventrikularzone des Cortex (Abb.27 G) sowie weitere wesentlich schwächere Expressionsdomänen im Meckel'schen Knorpel, im Thymus, in der Thyroidea und in der Lunge (Daten nicht gezeigt). Die in der Literatur beschriebene Expression im gesamten zentralen Nervensystem (Kroll et al., 1998) konnte nicht bestätigt werden.

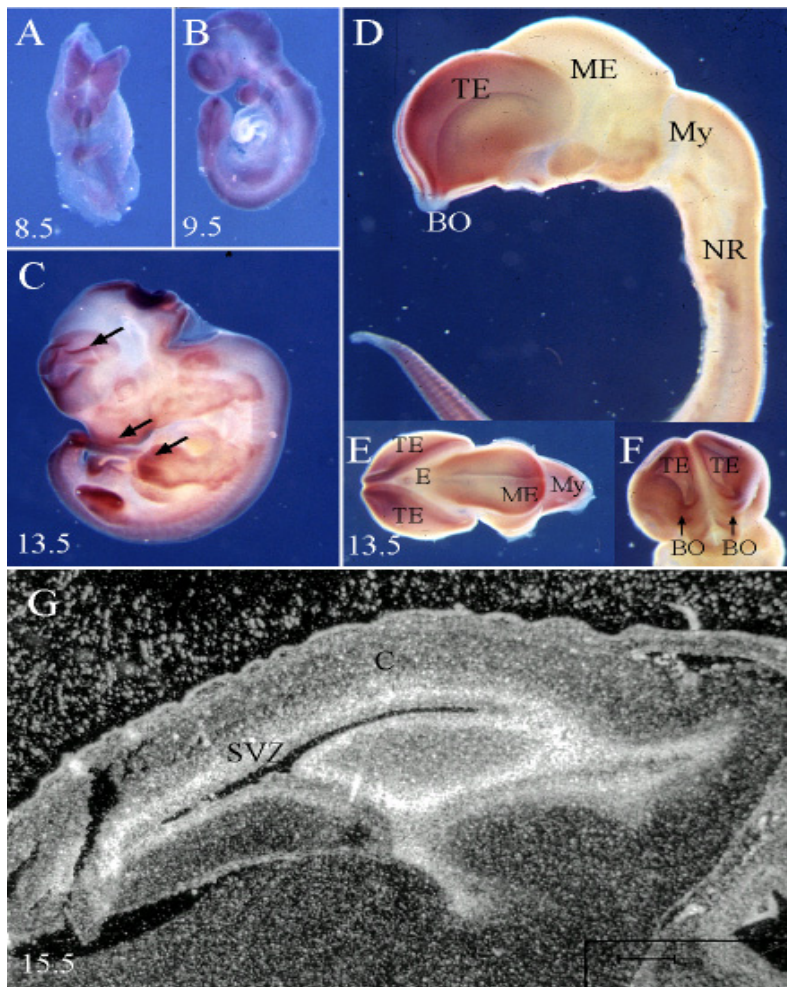


Abb. 27: Expression des Gens *Geminin* in der Maus. (A-F) Die zunächst ubiquitäre Expression (A/B) in frühen Stadien ist später auf Bereiche des Telencephalons, der Extremitäten und der kranio-fazialen Anlage restringiert (Pfeile in C). (D) zeigt eine laterale Ansicht auf das freipräparierte ZNS aus einem E 13.5 Embryo. (E) und (F) zeigen eine dorsale bzw. frontale Ansicht desselben Präparates. Querschnitt durch den dorsalen Cortexbereich eines E 15.5 Embryos. Eine radioaktive *In-situ* Analyse zeigt eine starke Expressionsdomäne in der Subventrikularzone (G). (TE) Telencephalon, (ME) Mesencephalon, (MY) Myelencephalon, (NR) Neuralrohr, (SVZ) Subventrikularzone, (C) Cortex, (BO) *Bulbus olfaktorius*

Resumé:

Im Hühnerembryo ist *Geminin* zunächst im Bereich der Neuralplatte und später in den dorsalen Neuralfalten nachweisbar. Die Expression ist auf das Ektoderm beschränkt. In der Maus zeigt *Geminin* in frühen Stadien eine recht ähnliche Expression. Allerdings finden sich *Geminin* Transkripte in der Maus noch in älteren Entwicklungsstadien als im Huhn. Ab Stadium 13.5 dpc ist in der Maus eine charakteristische Expressionsdomäne im Telencephalon in der Subventrikularzone zu finden.

3.2.3 ZELLULÄRE LOKALISATION VON GEMININ AUS HUHNER UND MAUS

Aus der zellulären Lokalisierung eines Proteins lassen sich häufig Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen. Um die zelluläre Lokalisation des überexprimierten Proteins *Geminin* zu überprüfen, wurden embryonale Hühnerfibroblasten in Zellkultur transfiziert und auf einem Objektträger kultiviert. Es erfolgte eine Gegenfärbung des Zellkerns mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI. Das am N-Terminus mit EGFP fusionierte *Geminin* aus Maus und Huhn, EGFP-HA-*Geminin*, wurde direkt durch die Fluoreszenz des grün-fluoreszierenden Proteins EGFPs nachgewiesen. Im Falle des Homologs aus dem Huhn wurde das GFP-Fusionsprotein zu über 90% der transfizierten Zellen im Zytoplasma detektiert (Abb.28 E-H). In den restlichen Zellen wurde das Protein neben dem Zytoplasma auch im Zellkern beobachtet. *Geminin* aus der Maus war dagegen in jeweils 50% der Fälle entweder nur im Zytoplasma oder in beiden Kompartimenten, im Kern und im Zytoplasma, nachzuweisen (Abb.28 A-D). Murines *Geminin* besitzt bei ansonsten struktureller Konservierung der A- und B-Domäne kein putatives Kernexportsignal (Abb.25) (Görlich and Kutay, 1999). Blockierung des Exportin Proteins CRM1 (Nishi et al., 1994; Fukuda et al., 1997) mit Leptomycin B (10ng/ml), einem Pilztoxin, führte zu überwiegenden Lokalisation des GFP-HA-Gem Proteins im Zellkern (Hendrik Knötgen, persönliche Mitteilung). Dies impliziert einen aktiven Transport des Fusionsproteins in den Nukleus, da es zu groß ($> M_r$ 30K) für passive Diffusionsprozesse ist (Görlich and Kutay, 1999).

Resumé:

Geminin aus dem Huhn zeigte eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation während murines *Geminin* in etwa 50% der Fälle neben dem Zytoplasma auch im Zellkern gefunden werden konnte.

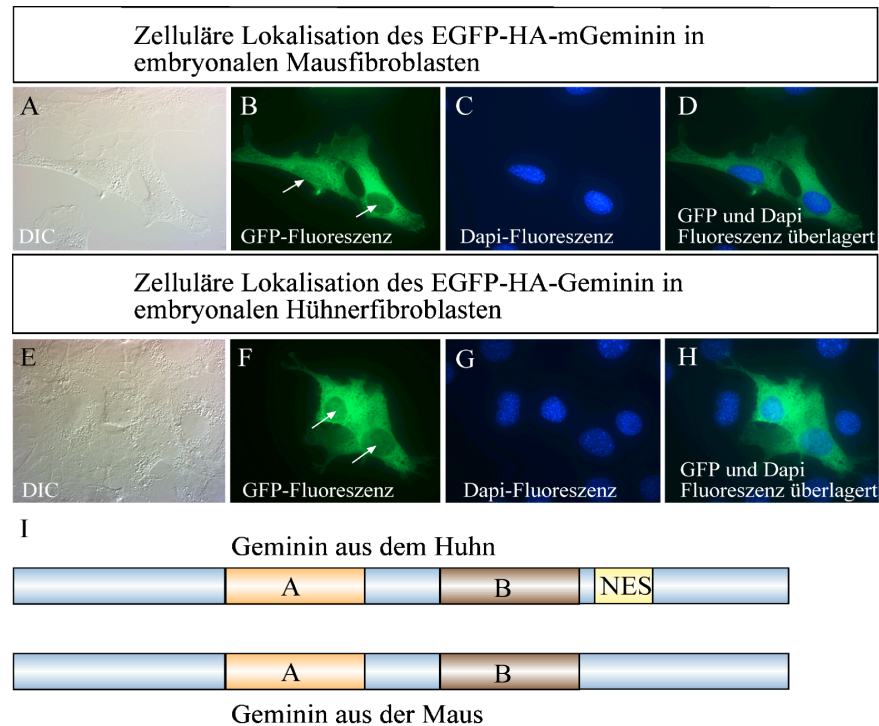


Abb. 28: Zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine EGFP-HA-Geminin und EGFP-HA-mGeminin nach Überexpression in embryonalen Huhn- bzw. Mausfibroblasten. (A/E) Abbildung einer embryonalen Maus- bzw. Hühnerfibroblastenzelle, die mit dem Vektor für die Überexpression des Fusionsproteins EGFP-HA-Geminin transfiziert wurde, im Interferenz- Kontrast. (B/F) Die Fluoreszenz des Fusionsproteins EGFP-HA-mGeminin ist in 50% der Fälle auf das Zytosol beschränkt, in den restlichen Fällen ist auch eine Lokalisation im Zellkern nachweisbar. In Hühnerfibroblasten ist EGFP zum überwiegenden Teil im Zytoplasma zu finden. (C/G) Die Zellkerne sind durch den Dapi-Farbstoff sichtbar gemacht. (D) Überlagerung der GFP- und Dapi-Fluoreszenzen der in A abgebildeten Zelle. (H) Überlagerung der Bilder in E F und G. (I) Darstellung der funktionellen Domänen von Geminin aus Huhn und Maus. (NES) nukleäres Exportsignal.

3.2.4 ÜBEREXPRESSION VON *GEMININ* IM HÜHNEREMBRYO

Um die Funktion des Gens *Geminin* während der frühen Musterbildung in der Neuralplatte *in vivo* zu analysieren und um ihm, wenn möglich, eine Rolle innerhalb bekannter Signaltransduktionswege zuzuweisen, wurde es mit Hilfe der Elektroporation im Hühnerembryo überexprimiert. Die Embryonen wurden im Primitivstreifenstadium HH3⁺ bis HH4 elektroporiert und darauf für weitere 12h bis 24h in Kultur genommen. Bei der anschließenden Analyse wurden die Embryonen mit Hilfe der *In-situ* Hybridisierung gleichzeitig auf die Expression des Transgens und auf die Expression eines Markergens hin untersucht. Dabei wurden für *Geminin* und das Fusionsprotein EGFP-HA-*Geminin* identische Ergebnisse erzielt. Es erfolgte keine Induktion des HMG-Transkriptionsfaktor SOX2 (Rex et al., 1997), der früh das neurale Ektoderm markiert, und des Pax-Transkriptionsfaktor Pax3 (Goulding et al., 1991). Darüberhinaus konnte keine Aktivierung des früh im nicht neuronalen Ektoderm und später im dorsalen Neuralrohr exprimierten TGF β -Faktors BMP4 (Schultheiss et al., 1995; Liem et al., 1995) nachgewiesen werden. Auch das Homeoboxprotein DLX5 wurde durch die Überexpression von *Geminin* nicht aktiviert (jeweils n=5, Daten nicht abgebildet). Die Überexpression von *Geminin* führte jedoch zur Induktion des Homeoboxgens MSX1 in jeder transfizierten Zelle (n=20, Abb.29 A/B/D). Erstaunlicherweise schienen alle Zellen zu dieser Reaktion unabhängig von ihrer Herkunft fähig zu sein. Die histologische Untersuchung der Embryonen ergab, daß beispielsweise MSX1 in allen ektodermalen Regionen durch Überexpression induziert werden konnte (Abb.29 D, ecto). Darüber hinaus konnte MSX1 auch in mesodermalen Strukturen wie dem Notochord und dem paraxialen Mesoderm sowie im endodermalen Gewebe des Embryos aktiviert werden (Abb.29 D, meso, endo). In der wildtypischen Situation ist MSX1 im Ektoderm und am Rand der Neuralplatte, zu keinem Zeitpunkt aber in endo- oder mesodermalen Zellen exprimiert (Streit und Stern, 1999 a). Die durch die Überexpression *Geminin* ausgelöste Aktivierung der MSX1 Transkription war zellautonom, da nur die transfizierten Zellen nicht aber die umliegenden Nachbarzellen auf das *Geminin* Protein reagierten (siehe Vergrößerung in Abb.29 A/B). Die Induktion des MSX1 Gens konnte jedoch nur auf dem RNA Level nachgewiesen werden, wohingegen eine Detektion des Proteins mit

Hilfe eines monoklonalen Antikörpers aus der Maus (Liem et al., 1995) nicht möglich war (Abb.29 E). In diesem Bild ist ein Querschnitt im Bereich des Neuralrohrs eines mit GFP-HA-*Geminin* elektroporierten Embryos (Abb.29 D) dargestellt. In diesem Stadium (HH10) ist MSX1 endogen im dorsalen Neuralrohr erkennbar (Pfeil). Zellen im ventralen Bereich des Neuralrohrs, die das Fusionsprotein exprimieren (GFP-Fluoreszenz), zeigen jedoch keine erkennbare MSX1 Protein Expression, was ja bei Überlagerung der Fluoreszenzbilder als gelbliche Fluoreszenz sichtbar wäre. Im Gegensatz zu RNA war das Protein in keinem der drei Keimblätter nachweisbar (n=3, Daten nicht gezeigt). Überexpression des murinen *Geminin* in Hühner- und Mäuseembryonen führte in keinem der getesteten Fälle (Maus n=10, Huhn n=5, Daten nicht gezeigt) zu einer Induktion von MSX weder auf RNA noch auf Proteinlevel. Dies läßt auf eine funktionelle Diversität in der Rolle von *Geminin* in verschiedenen Vertebraten schließen. Die Experimente zur funktionellen Charakterisierung von *Geminin* wurden in enger Kollaboration mit Dr. Hendrik Knötgen durchgeführt. Es wurde zunächst aufgrund der durch die Überexpression erzielten Ergebnisse vermutet, daß *Geminin* eine Rolle bei Induktion und Spezifikation der Neuralleistenzellen spielte, da es unter anderem die Neuralleisten spezifischen Markergene *Slug* und *Cadherin-6B* aktivierte. Gegen Ende der Studie wurde jedoch festgestellt, daß es sich bei den durch *Geminin* vermeintlich aktivierten Genen um falsch positive Ergebnisse handelte. Eine genauere Untersuchung dieser falsch positiven Signale ergab, daß sie durch die Analyse der Ganzkörper *In-situ* Hybridisierung zustande kamen. Durch sie wurden transkribierte Plasmidsequenzen in den elektroporierten Embryonen nachgewiesen (3. 1.10.1).

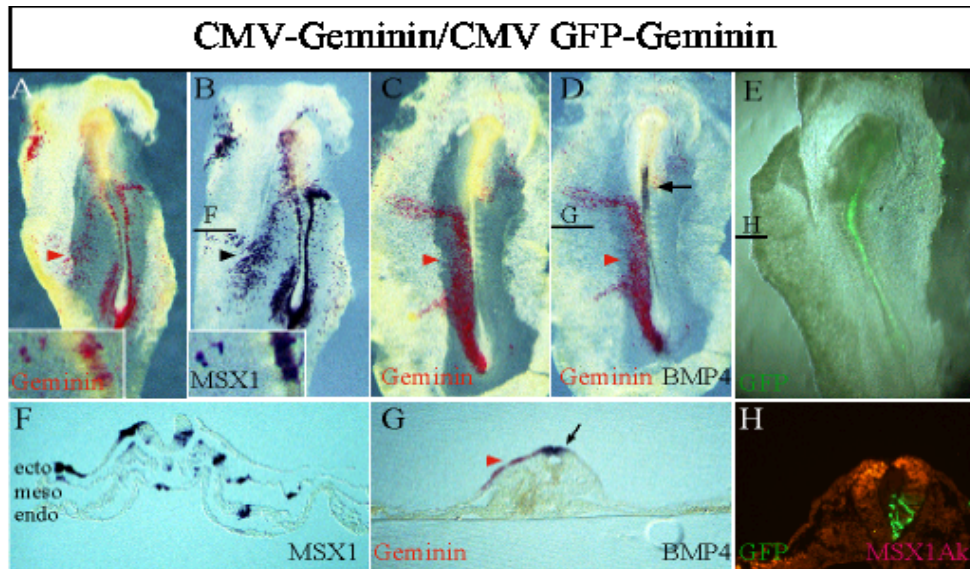


Abb.29: Überexpression des Gens *Geminin* in kultivierten Hühnerembryonen. Die detektierten Genprodukte sind unter jedem Embryo angegeben. Die Bilder (A-G) sind der Doktorarbeit von Hendrik Knötgen entnommen. Die Expression des Transgens *Geminin* ist rot angefärbt. Die blaue Färbung markiert die analysierte Expression des Markergens. In (E) und (H) ist die Fluoreszenz des Fusionsproteins GFP-HA-Geminin abgebildet. Die Schnittebene ist durch eine schwarze Linie angedeutet. Die Expression des Transgens *Geminin* bzw. des EGFP-HA-Geminins ist mit einem Pfeilkopf in rot bzw. grün markiert. Eine induzierte Markerexpression ist mit einem schwarzen Pfeilkopf gekennzeichnet. Jede Zelle, die *Geminin* exprimiert (A), exprimiert auch *MSX1* (B). *MSX1* wurde sowohl in ektodermalen (F, ecto), als auch in mesodermalen (F, meso) und endodermalen Zellen induziert (F, endo). Die Vergrößerungen in (A) und (B) zeigen, daß nur transfizierte Zellen diese Reaktion aufwiesen. Auch unmittelbar benachbarte Zellen exprimierten kein *MSX1*. Durch Verwendung des monoklonalen *MSX1* Antikörpers (H, rote Fluoreszenz) konnte gezeigt werden, daß Zellen die das GFP-HA-Geminin Fusionsprodukt exprimierten, zwar ebenfalls *MSX1* RNA aufwiesen (n=5, Daten nicht gezeigt), jedoch kein *MSX1* Protein exprimierten (n=3, H).

Resumé:

Als Fazit läßt sich aussagen, daß allein die Transkription von *MSX1* durch *Geminin* in allen drei Keimblättern aktiviert wurde. Ein Nachweis des entsprechenden *Geminin* Proteins mit einem monoklonalen *MSX1* Antikörper gelang jedoch nicht.

3.3 Überexpression von BMP4 und DLX5

Um die Rolle von DLX5 und BMP4 bei Musterbildungsprozessen, die zur Anlage der Neuralplatte führen, aufzuklären, wurden beide Gene mit Hilfe der Elektroporation während der Gastrulation des Hühnerembryos überexprimiert. Durch die Überexpression eines CMV-BMP4 Vektors konnte DLX5 (Abb.30 A/B n=8) sowie *Geminin* (Abb.30 E/F n=6) im Hühnerembryo nicht aktiviert werden. Es konnte jedoch bestätigt werden, daß ektopisches BMP4 Protein in der Lage ist, MSX1 Expression zu aktivieren (Abb.30 C/D). MSX1 Induktion erfolgte in allen transgenen Zellen, wobei die MSX1 Expression in autonomer Weise auf die transgenen Zellen beschränkt blieb (siehe Vergrößerungen Abb.30 C/D). Dies ist umso erstaunlicher, als daß es sich bei BMP4 um ein sekretiertes Protein handelt, von dem man annehmen sollte, daß es dazu in der Lage wäre. Daß durch Elektroporation überexprimiertes BMP4 jedoch durchaus Einfluß auf die Musterbildungsprozesse hat, erkennt man an den morphologischen Veränderungen der Somiten und seinem Einfluß auf die Bildung des Neuralrohres. An dem Querschnitt (Abb.30 H) ist die Dicke des Neuralrohres auf der BMP4 exprimierenden Seite deutlich reduziert. Die Somitenanlage ist auf dieser Seite ebenfalls wesentlich schwächer ausgeprägt, da es durch die BMP4 Expression zu einer Lateralisierung des Mesoderms kommt und mesodermale Zellen respezifiziert werden. Die Expression von Sox2 wurde von BMP4 (Abb.30 G, n=6) nicht beeinflusst. Dies stimmt insofern mit den Beobachtungen von Pera et al. überein: die Autoren konnten außer an den Rändern der Neuralplatte keinen Einfluß von BMP4 auf die Etablierung neuraler Identitäten feststellen (Pera et al., 1999). In BMP4 überexprimierenden Embryonen kann im Gegensatz zur Überexpression von *Geminin* MSX1 Protein ektopisch in Zellen nachgewiesen werden (Abb.30 J). Die endogene MSX1 Expression in den dorsalen Neuralfalten und im lateralen Plattenmesoderm ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. Ektopisch MSX1, sowie GFP exprimierende Zellen im paraxialen Mesoderm sind durch rote bzw. grüne Pfeile markiert. GFP und MSX1 sind nicht co-exprimiert, da der CMV-PTracer Vektor verwendet wurde und dadurch nur jeweils einer der beiden Promotoren CMV oder EF1 α (siehe auch 3.1.7) aktiv ist.

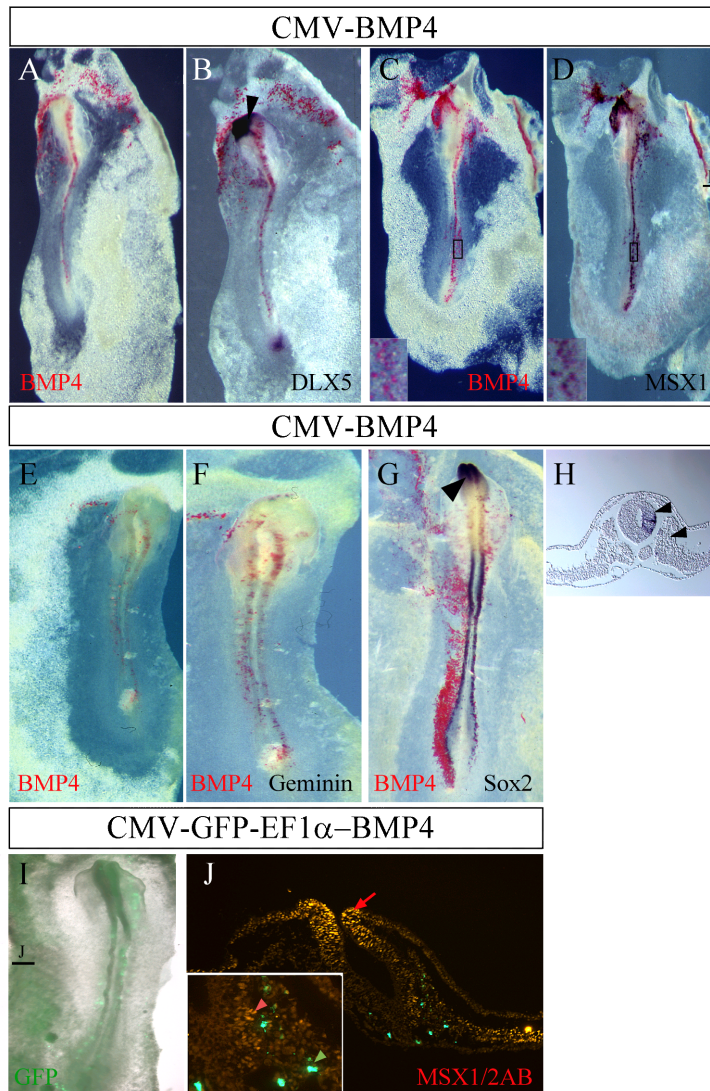


Abb.30: Elektroporation von BMP4 in frühen Hühnerembryonen. Es wurden die putativen Zielgene DLX5 (B), MSX1(D), *Geminin* (F) und Sox2 (G) auf Induktion oder Repression durch BMP4 hin untersucht. In (A-F) sind jeweils Doppel-In-situ Analysen dargestellt., wobei das Transgen jeweils in rot und das Markergen in blau angefärbt ist. (I-J) Embryonen wurden mit dem Konstrukt CMV-BMP4-EF1α-GFP elektroporiert. Die Detektion des MSX1 Proteins erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper und einem sekundären Antikörper aus dem Kaninchen, der eine Fluoreszenzgruppe trägt (568nm). Zellen, die ektopisch MSX1 bzw. GFP exprimieren, sind durch rote bzw. grüne Pfeilköpfe gekennzeichnet. Die Ebene der histologischen Schnitte ist durch eine schwarze Linie markiert. Endogene Genexpression ist durch einen schwarzen Pfeilkopf hervorgehoben.

Die Elektroporation des Homeoboxgens DLX5 induziert den TGFβ-Faktor BMP4 in allen transfizierten Zellen (Abb.31 A/B, n=4), war jedoch nicht in der Lage, *Geminin* (n=6) und Sox 2 (n=3) in ihrer Expression zu beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Eine zusammenfassende Darstellung der Überexpressionsexperimente findet sich in Abb.31.

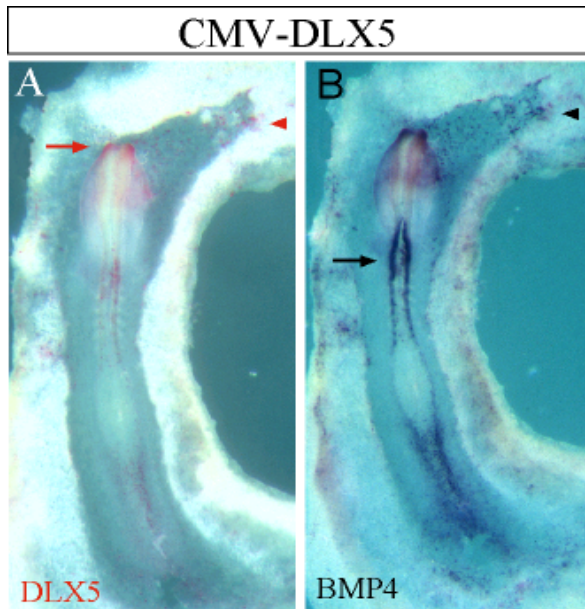


Abb. 31: Überexpression von CMV-DLX5. Die detektierten Genprodukte sind jeweils am unteren Bildrand angegeben. Die endogene DLX5 bzw. BMP4 Expression ist durch einen roten bzw. schwarzen Pfeil hervorgehoben, wohingegen ektopisch DLX5 exprimierende Zellen, die BMP4 co-exprimieren durch einen roten (A) bzw. schwarzen (B) Pfeilkopf gekennzeichnet sind.

Transgene	Expression der Markergene				
	DLX5	BMP4	Geminin	Msx1	Sox2
BMP4	-	n.d.	-	+	-
DLX5	n.d.	+	-	n.d.	-
Geminin	-	-	n.d.	+	-

Abb. 32: Zusammenfassung der Überexpressionsexperimente der durch den CMV Promotor angetriebenen Expression von BMP4, DLX5 sowie *Geminin* entsprechend der analysierten Markergene. Eine Induktion ist mit einem "+", keine Induktion mit einem "-" angedeutet

Resumé:

- 1) Durch Überexpression von BMP4 konnte lediglich ein Einfluß auf die Aktivierung von MSX1 nachgewiesen werden, wobei es auch zur Translation von Protein kam.
- 2) DLX5 wiederum führte zur ektopischen Expression von BMP4 RNA.

4. DISKUSSION

„Experimente sind Fragen an die Natur. Es ist nicht genug, daß man verstehe, der Natur Daumenschrauben anzulegen; man muß auch verstehen können, wenn sie aussagt.“

Arthur Schopenhauer

"It cannot be that axioms established by argumentation suffice for the discovery of new works, since the subtlety of nature is greater many times over than the subtlety of arguments" Francis Bacon

Die Diskussion ist in Analogie zum Ergebnisteil in zwei Abschnitte untergliedert. Im ersten Teil werden die Vorzüge und Nachteile der verschiedenen experimentellen Elektroporationsansätze in Embryonen verschiedenen Alters gegenübergestellt sowie die Problematik der Analyse elektroporierter Embryonen erläutert. Im zweiten Abschnitt werden die Effekte der ektopischen Überexpression von *Geminin*, BMP4 und DLX5 auf die Musterbildung während der Formation der Neuralplatte diskutiert.

4.1 Elektroporation

4.1.1 ELEKTROPORATION VON KULTIVierten EMBRYONEN

Die Transfektion junger Embryonen im Stadium HH4 ist entscheidend für die Untersuchung, welche Bedeutung musterbildende Einflüsse einzelner Faktoren während der Gastrulation haben. Mit Hilfe der Elektroporation läßt sich in allen Keimblättern des Embryos in kurzer Zeit eine hohe Genexpression erzielen (siehe Abb.14 A-E). Diese Kombination aus hoher Transfektionseffizienz und der Gewährleistung einer starken Expression in einer kurzen Zeitspanne zeichnet diese Methode im Vergleich zu Lipofektion, Genkanone und der Infektion mit Retroviren aus. Die Effizienz der Trans-

fektion ist dabei der Höhe der angelegten Potentialdifferenz proportional. Bis zu jenem Schwellenwert, ab dem zellschädigende Einflüsse die Oberhand gewinnen, nimmt dabei die Transfektionseffizienz mit steigender Spannung zu (siehe Abb.10 A-F). Dies beruht auf der Tatsache, daß mit zunehmender Spannung sich sowohl die Zahl der Zellen erhöht, die unter den Einfluß des elektrischen Feldes geraten, als auch die Membranperturbationen dieser Zellen stärker ausgeprägt sind (siehe Einleitung).

Eine stabile langanhaltende und hohe Expression eines transgenen Proteins ist Voraussetzung, um seinen Einfluß auf die Musterbildung verfolgen zu können. Daher wurden drei verschiedene Promotoren, MIW, SV40 und CMV im Elektroporationssystem getestet (siehe Abb.12). Die viralen Promotoren SV40 und CMV kontrollieren im normalen Vermehrungszyklus der Viren die Expression essentieller Gene für ihre Replikation. Es werden daher extrem viele Kopien dieser Genprodukte hergestellt. Dies hat zur Folge, daß diese Promotoren in der Lage sind, sehr effizient Genexpression in eukaryontischen Zellen zu vermitteln. Im Promotor MIW sind überdies Teile des β -Aktin Promotors enthalten, der ebenfalls universell in fast allen Zelltypen aktiv ist.

Im Gegensatz zu der hier durchgeführten Studie gibt es in der Literatur jedoch auch Hinweise dafür, daß die Effektivität dieser Promotoren sowohl spezies- spezifisch wie auch vom Zelltyp abhängig zu sein scheint. Daher können quantitative Analysen zur Promotorstärke häufig nicht problemlos aus anderen experimentellen Systemen übernommen werden. Dies muß bei der Wahl der Promotoren für den Einsatz in anderen experimentellen Systemen berücksichtigt werden. Elektroporationsdaten am Hoden der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) ergaben beispielsweise, daß der SV40 Promotor und der Miw Promotor gleichermaßen stark aktiv waren (Sugihara et al., 2000), wohingegen eine Studie am Ovidukt von Hühnern (*Gallus domestica*) zeigte, daß der Miw Promotor wesentlich aktiver war als der SV40 Promotor (Ochiai et al., 1998). Die Autoren führten dies auf unterschiedliche Ausstattung an limitierenden Transkriptionsfaktoren zurück.

Die Verwendung des CMV Promotors, der als einer der stärksten Promotoren die Transkription von Genen in eukaryontischen Zellen vermitteln kann (Boshart et al., 1985), bietet sich aus praktischen Erwägungen an. Einschränkungen hinsichtlich des Zelltypes und des Alters der Embryonen konnten nicht beobachtet werden.

Eine gezielte Lokalisierung des Transfektionsbereiches erwies sich aufgrund der ausgeprägten Zellwanderungen während der frühen Morphogenese als schwierig (siehe Ergebnisse 1) und könnte allenfalls durch gewebe- und entwicklungsspezifische Promotoren erreicht werden (Nony et al., 1998; Itasaki et al., 1999). Allerdings ist die Zahl der analysierten und charakterisierten Promotorsequenzen im Huhn vorläufig gering und die Verwendung heterologer Promotoren aus Frosch und Maus unter Umständen mit Schwierigkeiten verbunden, da sich Promotorsequenzen hinsichtlich der Zahl und Art von Bindestellen regulatorisch wirkender Proteine unterscheiden können. Die Vorteile eines ubiquitär aktiven Transfektionensystems, das Proteinexpression auf hohem Level vermittelt, wird jedoch für die meisten Fragestellungen überwiegen.

Durch die Verwendung von GFP Expressionsvektoren können die transgenen Zellen bereits nach 4 Stunden im lebenden Embryo identifiziert werden, wobei nach 24 Stunden der maximale GFP Expressionslevel erzielt wird.

Die Frage, ob GFP Expression auf lebende Zellen toxisch wirkt, fand widersprüchliche Antworten (Alexander und Lee, 1997; Liu et al., 1999). Als sicher darf gelten, daß eine lange währende Anregung von GFP zur Bildung toxischer Radikale führen kann (Clontech, 1996). Die Tatsache, daß die Fluoreszenz in elektroporierten Embryonen nach 72 Stunden leicht rückläufig ist, kann zum Teil auf die Tatsache zurückgeführt werden, daß GFP exprimierende Zellen einen programmierten Zelltod durchlaufen könnten (Liu et al., 1999). Wahrscheinlicher ist jedoch, daß das Protein zum Teil degradiert und durch die andauernde Zellproliferation ausgedünnt wird.

Die Expression des Transgens hing ab von der Höhe der injizierten Plasmidkonzentration. Die Konzentration der injizierten DNA Lösungen betrug zwischen 1 und 5 µg/µl, wobei sich die injizierte DNA Menge in etwa auf 10-20 µl für HH4 Embryonen belief. Geringere DNA Konzentrationen brachten keine guten Transfektionsergebnisse (Daten nicht gezeigt). Diese Konzentration liegt um den Faktor 1000 höher als die üblicherweise zur Transfektion von Zellen in Zellkulturen verwendeten DNA Menge (~2 µg/ml). Vermutlich ist die Akzessibilität der Zellen durch die dichte extrazelluläre Matrix im Gewebeverband stark eingeschränkt, so daß eine hohe DNA Konzentration verwendet werden muß, um zu gewährleisten, daß DNA Stränge bis zur Zellmembran vordringen können. Eines der auffallendsten Ergebnisse bei der Elektroporation von jungen Embryonen ist die ausgeprägte unilaterale Transfektion (siehe Abb.11). Der überwiegende Anteil der trans-

genen Zellen liegt dabei auf der Seite des Embryos, der dem Einfluß der Anode ausgesetzt war. Dies könnte durch den kombinatorischen Effekt zweier Phänomene zustande kommen:

- 1. Die Elektrophorese der DNA Lösung in Richtung der Anode**
- 2. Die Depolarisation der Membran der Zellen auf der Anodenseite und der Hyperpolarisation auf der Kathodenseite.**

Die Stärke der Depolarisierung und damit das Erreichen der Durchbruchspannung (siehe Einleitung 3) ist ausschlaggebend für die Fähigkeit der Zellen DNA aufzunehmen. Depolarisierte Zellen nehmen offensichtlich wesentlich leichter DNA auf als hyperpolarisierte.

Charakteristisch war, daß in rostralen Arealen, insbesondere im Bereich des sich differenzierenden ZNS die unilaterale Transfektion stärker ausgeprägt war als im Vergleich zu caudalen. Für diesen Sachverhalt konnte noch keine plausible Erklärung gefunden werden. Die häufig auftretende Transfektion von lateral gelegenen transfizierten Zellen, die häufig auf der kontralateralen, also der Kathoden-Seite (siehe Abb.11) zu finden sind, kann vermutlich durch das starke elektrische Feld direkt an den Elektroden erklärt werden (Siehe Abb.14 E). Dadurch nehmen die Zellen trotz der Hyperpolarisation in geringem Maße DNA auf. Da die Feldstärke zur Mitte hin abnimmt, sind jedoch medial gelegene Zellen auf der Kathodenseite dazu offenbar nicht mehr in der Lage.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Elektroporation eine geeignete Methode ist, frühe Entwicklungsstadien des Hühnerembryos zu transfizieren und dadurch den Einfluß verschiedener Gene auf die Gastrulation zu untersuchen. Allerdings kann mit diesem Ansatz weder die ektopische Genexpression zielgerichtet (abgesehen von der embryonalen Seite) gesteuert werden, noch können Aussagen über spätere Effekte des überexprimierten Genes (über Stadium HH12 hinaus) gemacht werden.

4.1.2 ELEKTROPORATION UND RETRANSPLANTATION VON EXPLANTATEN

Durch die Elektroporation von Explantaten konnte die Problematik der lokal begrenzten Elektroporation umgangen werden, da die Lokalisierung durch die Explantatwahl erreicht wurde.

Bei der Transfektion von Explantaten aus der Neuralplatte hat sich asymmetrischer Aufbau der Elektroden bewährt, wobei die punktförmige Elektrode mit der Anode verbunden wurde. Das dadurch aufgebaute inhomogene Feld hat wesentlichen Einfluß auf die Transfektionseffizienz. Bei der Elektroporation in einem homogenen Feld waren die transgenen Zellen in geringer Dichte über das Explantat verstreut, während sie nach der Transfektion in einem inhomogenen Feld an einer Stelle lokalisiert waren (siehe Ergebnisse 2).

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, daß die Elektroporation der Explantate umso effektiver war, je geringer der Abstand zwischen dem Gewebestück und der punktförmigen Elektrode war. Betrachtet man den Verlauf der Äquipotentiallinien an einem punktförmigen Leiter (Abb.5) so wird deutlich, daß nahe am Leiter die Spannung in einem sehr kleinen Bereich stark abfällt. Dieser starke Spannungsabfall ist jedoch wiederum die Ursache für die Porenbildung in der Zellmembran.

Der Einsatz dieser punktförmigen Elektrode bei der Elektroporation von HH4 Embryonen in New Kultur hatte sich jedoch nicht bewährt, da hierbei die Anode direkt auf den noch dünnen, lediglich zweischichtigen Embryo aufgesetzt werden mußte, und es während der Pulse unvermeidlich zur Zerstörung des umliegenden Gewebes kam. Wird jedoch der Elektrodenabstand weiter gewählt, so blieb der Vorteil, den dieser asymmetrische Aufbau bot, nicht mehr gewahrt.

In der eingesetzten Kollagenkultur entwickelten sich die Gewebeexplantate isoliert vom übrigen embryonalen Kontext. Der Retransfer der elektroporierten Explantate in Empfängerembryonen war zwar arbeitstechnisch etwas aufwendiger, gewährleistete jedoch, daß die transfizierten Zellen des Explantates unter den musterbildenden Einfluß von Signalmolekülen aus den einzelnen Keimblättern des Embryos kamen (Gaiano und Fishell, 1998). Eine homotopische Transplantation ist dabei nicht unbedingt Voraussetzung, es sei denn die Explantate wurden mit Faktoren transfiziert, von denen vermutet wird, daß sie Segregation von Neuroektoderm und Oberflächenektoderm beeinflussen. Die Methode bietet sich vornehmlich an, um in Explantaten erzielte Resultate zu verifizieren.

Determinierung des Zellschicksals, der regionalen Identität und des Phänotyps der Zellen in dem sich entwickelnden ZNS, Prozesse, die durch Signale von Mesoderm und Endoderm gesteuert werden (Tanabe und Jessel, 1996), sind Beispiele, die mit Hilfe derartiger Retransplantationsexperimente adressiert werden könnten.

4.1.3 ELEKTROPORATION IM EI

Für die Transfektion älterer (HH10-HH12) Embryonen im Ei wurden neben einer parallelen Anordnung der Platinelektroden auch ein asymmetrischer Aufbau eingesetzt. Die Anwendung eines asymmetrischen Elektrodenaufbaus, bestehend aus einer spitzen Wolframelektrode (40 µm Durchmesser), die mit der Kathode verbunden und in das injizierte Gewebe eingestochen wird, wobei die Anode aus einem langen Platindraht besteht, der entlang der Längsachse des Embryos liegt, bietet mehrere Vorteile:

1. Isolierende Einflüsse anderer Gewebestrukturen auf die Zielzellpopulation wird vermieden, was wiederum erlaubt, die zu transfizierende Region stark einzuschränken.
2. Es können kleine DNA Mengen und geringe Flüssigkeitsvolumen injiziert werden. Eine Tatsache, die die Transfektion von Mesoderm erleichtert (Momose et al., 1999).
3. Da die Reichweite des elektrischen Feldes in Folge dieser Anordnung begrenzt wird, kommt es zu einer allgemeinen Verringerung der Cytotoxizität. Zum einen steigt bei dieser Methode die Überlebensrate der Embryonen an, zum anderen können auch Embryonen jüngerer Entwicklungsstadien *in ovo* elektroporiert werden.

Die Elektroporation *in ovo* bietet somit gegenüber der Elektroporation *in New Kultur* den Vorzug, spätere Musterbildungsprozesse während der Organogenese wie die Etablierung der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (Ye et al., 1999) und Differenzierungsvorgänge im Endoderm wie etwa die Induktion der Pankreasanlage zu untersuchen (Grapin-Botton et al., 2001).

Da das sich entwickelnde ZNS ein abgeschlossenes Lumen umschließt, bietet es sich als Ziel für Überexpressionsstudien besonders an (siehe Abb.17). Dadurch können sowohl Prozesse während der Ausbildung des visuellen Systems (Abb.17 G/H) in ihrer molekularen Natur adressiert als auch die Wanderungsbewegungen der Neuralleistenzellen untersucht und beeinflusst werden (Abb.17 C/D). Die gezielte Elektroporation von Endoderm durch dorso ventral angeordnete Elektroden wird durch die Tatsache er-

schwert, daß man keine direkte optische Kontrolle über den Injektionsort besitzt, da durch den Embryo hindurch injiziert wird.

.Durch die Elektroporation von replikations-kompetenten Retroviren könnten die Vorteile beider Expressionssysteme kombiniert werden. Zum einen könnte man Expression des Transgens in einem kurzen Zeitrahmen (~2h) nach der Transfektion erwarten, zum anderen würden sich die Viren vermehren und weitere Bereiche des Embryos transfizieren, so daß sich das Ausmaß der Transfektion erhöhen würde.

4.1.4 ELEKTROPORATION VON MÄUSEMBRYONEN

Die ektopische Überexpression von Genen während der Neurulation des Mäuseembryos (Stadium 8.5-9.5) erlaubt die Analyse der jeweiligen Genfunktion sowohl im wildtypischen -als auch aufgrund der zahlreichen Mauslinien mit Genverlustmutationen- im mutanten Kontext. Allerdings ist die Kultivierung der elektroporierten Embryonen technisch anspruchsvoller. Sie erfordert u.a. die Begasung mit speziellen Gasgemischen.

Das Schließen des Neuralrohres erfolgt in Mäusen erst in späteren embryologischen Stadien als bei vergleichbaren Hühnerembryonen. Im Stadium 8.5 d.p.c. bildet das Neuralrohr bei Mäusen noch kein Lumen aus, in das DNA Lösung injiziert werden kann, wohingegen das umgebende Mesenchym bei dieser Tierart bereits gut ausgebildet ist. Zusammen mit der zylinderförmigen und nicht flachen, scheibenförmigen Embryostruktur wie beim Huhn dürfte dies der Grund dafür sein, warum die Transfektion des Neuroepithels in der Maus wesentlich schwieriger zu bewerkstelligen und im Schnitt ineffektiver ist. Die Expression des Transgens konnte in etwa 90% der Fälle nur im Mesoderm beobachtet werden (Abb.19 C).

4.1.5 PROBLEMATIK DER CO-EXPRESSION ZWEIER PROTEINE IN EINER ZELLE

4.1.5.1 Vektor mit 2 Transkriptionseinheiten (Promotoren)

Co-Expression zweier ektopisch exprimierter Proteine in einer Zelle ist Voraussetzung, will man sowohl den Effekt eines Genes studieren als auch die transfizierten Zellen phänotypisch etwa durch Expression eines Markers wie GFP identifizieren.

Bei der Elektroporation des CMV2TM-PTracer Vektors, der den CMV- und den EF1 α -Promotor enthält, wurde festgestellt, daß die Expression der unter ihrer Kontrolle stehenden Proteine zwar in überlappenden Domänen stattfand, aber auf Einzelzellebene jeweils nur eines der beiden Gene in einer Zelle transkribiert und translatiert wurde (siehe Abb.20).

Diese Effekt könnte verschiedene Ursachen haben, die im folgenden erläutert werden:

1. Die Stilllegung eines Promotors durch limitierende Transkriptionsfaktoren, ein Prozeß der als "squelching" bekannt ist.
2. Die Inaktivierung eines Promotors durch das Tumorsuppressorprotein p53.
3. Das Durchlesen der RNA Polymerase II blockiert den zweiten Promotor.
4. Differentielle Methylierungseffekte.

4.1.5.1.1 Squelching

Die Tatsache, daß jeweils nur der CMV-Promotor oder der EF1 α -Promotor in den jeweiligen Zellen aktiv war, könnte auf dem sog. "squelching" Effekt beruhen. Eukaryontische Genregulation kann man als Wechselspiel zwischen aktivierenden und reprimierenden Einflüssen betrachten. Die Transaktivierung von Genen unterliegt einer multiplen Kontrolle und involviert typischerweise die Bindung von Transkriptionsfaktoren an regulatorische Stellen innerhalb des Promotors. Infolge limitierter Mengen an Komponenten des Transkriptionskomplexes kann die Expression von Genen, die der Kontrolle eines schwächeren Promotors unterliegen, verhindert werden. Transkriptionsfaktoren können mit verschiedenen Untereinheiten wie TFIIB oder TFIID (Pugh und Tjian, 1992) des Polymerase II Holoenzym interagieren. Da verschiedene Subtypen von TFIID existieren, die sowohl mit allgemeinen wie auch mit zelltyp-spezifischen

TAFs komplexiert sind, kann sowohl die gesamte TFIID abhängige Transkription oder nur ein Subset von Promotoren von "sqelching" betroffen sein (Cahill et al., 1994). Interessanterweise beeinflussen auch zahlreiche Viren die Anzahl der Co-Aktivatoren in einer Zelle und steuern dadurch ihre eigene Replikation (Martin et al., 1990; Moran, 1993). Der Effekt des "sqelching" scheint meistens auf episomale Zielgene beschränkt zu bleiben, wohingegen endogene Gene vermutlich aufgrund ihrer Einbettung in die Chromatinstruktur davon nicht betroffen zu sein scheinen (Natesan et al., 1997).

Da die elektroporierten Plasmide episomal im Zytoplasma vorliegen und nicht ins Genom integriert werden, könnten ihre Promotoren besonders anfällig für Sqelching Effekte sein. Unterschiede in der Sensitivität des CMV und des EF1 α Promotors könnten dafür verantwortlich sein, daß in zwei Dritteln der transgenen Zellen der EF1 α Promotor und in den übrigen der CMV Promotor aktiv ist (siehe Abb.20).

4.1.5.1.2 *Inaktivierung eines Promotors durch p53*

Eine Akkumulation des Tumorsupressorproteins p53 im Zellkern führt zur Arretierung des Zellzyklus in der G1 Phase und zur Apoptose (Hartwell und Kastan, 1994). Ausgelöst wird die p53 abhängige Signalkaskade durch eine Reihe genotoxischer Agentien, die zu Brüchen im DNA Strang führen (Nelson und Kastan, 1994), aber auch Hitzeschock und Hypoxie (Renzing und Lane, 1995) können diese Folge haben. Das Protein p53 wirkt zum einen als klassischer Transkriptionsaktivator, indem es als Tetramer (Jeffrey et al., 1995) an 4 tandemartig angeordnete 5 bp lange Konsensussequenzen im Promotorbereich bindet (Cho et al., 1994). Daneben reprimiert p53 Promotoren, die das identifizierte Sequenzmotiv GGA α CTGG enthalten (Shiio et al., 1992). Beispiele hierfür sind der Promotor des Retinoblastoma-Genes oder der SV40 Enhancers/Promotors (Jackson et al., 1993) als auch eine Reihe viraler Promotoren, wie CMV, RSV-LTR und HSV (Hall et al., 1996; Santhanam et al., 1991; Subler et al., 1992), die dieses Strukturmotiv allerdings nicht besitzen. Liu und Berk konnten zeigen, daß nur stimulierte, nicht jedoch basale Transkription von Promotoren unterbunden wird, die eine TATA Box enthalten (Liu und Berk, 1995).

Transfektion von Geweben sowie einzelnen Zellen durch Elektroporation bzw. Calciumphosphat führt zu einer temporären Streßsituation der Zellen und damit zu einer Aktivierung von p53 (Renzing und Lane, 1995). Unterschiedliche Transfektionseffizienzen und

ein variables Ausmaß der Genexpression in verschiedenen Zelltypen sind daher auf ein schwankendes Niveau der intrazellulären p53 Konzentration zurückzuführen (Allamane et al., 2001).

Die Beobachtung, daß bei der Transfektion des P-Tracer Vektors eine gleichzeitige Expression von BMP4 und GFP nicht erreicht wurde, könnte daher auf derartige durch p53 hervorgerufene Effekte zurückzuführen sein. Bei der Elektroporation werden Zellen ebenfalls einer temporären Streßsituation ausgesetzt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären p53 Signalkaskade. Es ist denkbar, daß der CMV und der EF1 α Promotor unterschiedlich sensitiv auf die zelluläre p53 Konzentration reagieren.

4.1.5.1.3 Durchlesen der RNA Polymerase blockiert den 2. Promotor

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die Transkription des elektroporierten Vektors nicht effektiv an den vorhandenen Polyadenylierungssignalen, BGH-PolyA bzw. SV40 PolyA abbricht. Die RNA Polymerase liest über diese Signale hinweg und fällt 1-2kb abwärts dieser Sequenzen von der Matrize ab.

Obwohl diese primären RNA Transkripte nur sehr kurzlebig sind, ist es vorstellbar, daß dies eine zusätzliche Möglichkeit darstellt, wodurch der EF1 α bzw. der CMV-Promotor im P-Tracer Vektor abgeschaltet wird. Diese Transkripte blockieren sterisch das erneute Binden der RNA Polymerase II an diesen Promotor. Transkriptionsinitiation von diesem zweiten Promotor wäre demnach nur in Zellen möglich, in denen die Aktivität des eines Promotors verringert wurde. Stochastisch wäre demnach zu erwarten, daß in jeweils 50% der Zellen einer der Promotoren aktiv ist.

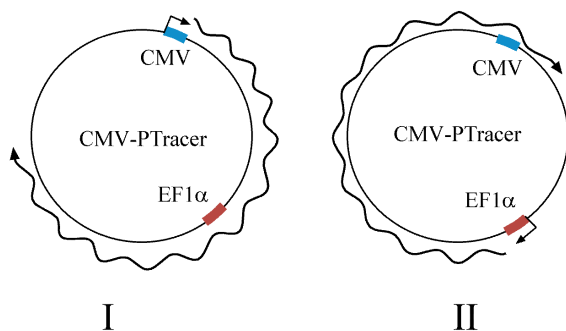


Abb.33: Die durch das Durchlesen der RNA Polymerase II erzeugten primären Transkripte blockieren den zweiten Promotor, wodurch das Enzym nicht mehr binden kann.

4.1.5.1.4 Differentielle Methylierung

Daneben könnte auch eine differentielle Methylierung von CpG Inseln im Promotorbereich für die selektive Abschaltung der durch die Promotoren CMV und EF1 α gesteuerten Transkription als epigenetischer Mechanismus in Betracht kommen (Baylin et al., 1998; Schmutte und Jones, 1998).

Auch andere Effekte der CMV vermittelten Transkription müssen beachtet werden. Da der CMV Promotor in manchen Fällen auch mit endogenen Promotoren um limitierende Faktoren des Transkriptionskomplexes konkurriert, kann die normalerweise transaktivierende Wirkung einzelner Proteine in eine transreprimierende Wirkung umgewandelt werden und dadurch Ergebnisse verfälschen (Reddy et al., 1995). Darüberhinaus kommt es durch die starke Transkription zu einer unphysiologisch hohen Konzentration des transfizierten Proteins, das gegebenenfalls toxisch auf die Zellen wirken kann. Daher sollte bei Überexpressionsexperimenten, vor allem wenn putative Transkriptions-aktivatoren auf ihre Funktion getestet werden, als Kontrolle ein schwächerer Promotor wie der ADH (Alkohol Dehydrogenase Promotor), der 100 mal schwächer als der kanonische CMV Vektor ist, verwendet werden (Lee et al., 1998).

4.1.5.2 Co-Elektroporation zweier Plasmide

Es wurden zwei CMV getriebene Expressionsvektoren, die entweder das bakterielle Enzym β -Galaktosidase bzw. RFP oder RFP und GFP enthielten, sowohl im äquimolaren Verhältnis als auch im Verhältnis 5/1 gemischt. Elektroporierte Embryonen wurden auf die Co-Expression beider Proteine hin untersucht (siehe Ergebnisse Abb. 19). Dabei zeigte sich, daß im Falle von RFP und GFP der Grad der Co-Expression beider Proteine in den Zellen zunahm, wenn eines der beiden Gene im Vergleich zum anderen unterrepräsentiert war (Mischungsverhältnis). Zwar verringerte sich in diesem Fall die Zahl der Zellen, die nur GFP exprimierten, jedoch nahm der Grad der Co-Expression beider Proteine zu. Für Anwendungen, in denen GFP als Marker eingesetzt wird, sollte daher das Verhältnis zwischen dem zu untersuchenden Gen und GFP etwa 5/1 oder sogar 10/1 betragen. Ein ähnliches Ergebnis bezüglich des äquimolaren Mischens zweier Plasmide für die *in ovo* Elektroporation ist auch in der Literatur erwähnt (Mathis et al., 2001). Wurden zwei Plasmide gemischt, die β -Galaktosidase bzw. RFP enthielten,

ergab sich ein ähnliches Bild. Ungefähr 40% der Zellen exprimierten nur eines der beiden Proteine (Abb.21 C/D).

Erschwert wird die quantitative Analyse jedoch durch die Tatsache, daß sich der Nachweis beider Proteine aufgrund unterschiedlicher methodischer Ansätze bezüglich der Sensitivität unterscheidet. Die Detektierung der vom LacZ Gen kodierten β -Galaktosidase erfolgt indirekt in einer enzymatischen Reaktion, wohingegen das RFP Protein durch sein rotes Emissionsspektrum direkt nachgewiesen werden kann. Da sich die enzymatische Reaktion zeitabhängig intensiviert, können dadurch auch sehr kleine Zellen, die in einem nur sehr geringen Ausmaß das Transgen exprimieren, als positiv eingestuft werden. Das geringe Niveau einer intrazellulären RFP Expression wäre in diesem Falle nicht nachweisbar. Daher ist es offenkundig, daß bei einem direkten Vergleich tendenziell mehr Zellen als positiv hinsichtlich einer β -Galaktosidase Expression gewertet werden als für RFP.

Als Alternative zur Co-Elektroporation zweier Plasmide bietet sich noch die Verwendung von IRES Sequenzen an, die es erlauben, zwei Proteine von einer mRNA zu translatieren.

Untersuchungen haben gezeigt, daß die Translationsinitiation an IRES Sequenzen häufig sehr ineffektiv ist und darüberhinaus von der Lage und Natur der einzelnen Cistrone abhängig ist (Hennecke et al., 2001). Zellulärer Stress infolge der Elektroporation sollte die Translationsinitiation an IRES-Sequenzen begünstigen, da gezeigt werden konnte, daß Translation von mRNAs, die eine Kappe besitzen, unter Aminosäuremangel und Zellstress unterbunden wird (Fernandez et al., 2001). Eine Verschiebung hinsichtlich präferentiell translaterter mRNAs geht einher mit einer verringerten Phosphorylierung des Kappen-Bindungsproteins eIF4E. Dieser Sachverhalt konnte jedoch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden. Aufgrund der beobachteten langen Zeitspanne (mindestens 36 Stunden) zwischen Transfektion und Expression durch IRES Sequenzen kontrollierter cDNAs erscheint zumindest der Einsatz von IRES-Vektoren, die eine partiell inaktivierte IRES Sequenz besitzen, für die Elektroporation von Wirbeltierembryonen bei Kurzzeitexperimenten wenig praktikabel.

4.1.6 ENTSTEHUNG FALSCH POSITIVER SIGNALE IN DER ISH ANALYSE

Eine vergleichende Auswertung der Ergebnisse bei der ISH Analyse elektroporierter Embryonen hat gezeigt, daß es bei der Verwendung von Dig *In-situ* Proben, die von einer auf dem Blueskript Vektor basierenden Matrize generiert wurden, zur Entstehung von falsch positiven Signalen kommt (siehe Abb.22). Die Ursache hierfür liegt zum einen in einer ineffizienten Termination der Transkription des elektroporierten Vektors durch die Polymerase II, zum anderen in der Existenz Dig markierter Vektor RNA in den *In-situ* Proben. Damit es in der ISH Analyse zur Entstehung eines Signals kommt, das nichts mit der tatsächlichen Expression des vermeintlich analysierten Proteins zu tun hat, müssen daher zwei Voraussetzungen erfüllt werden:

1. Die Existenz transkribierter Plasmidsequenzen zusätzlich zu derjenigen des überexprimierten Genes. Sie werden gebildet durch ineffiziente transkriptionelle Termination der RNA Polymerase II.
2. Das Vorhandensein von Dig markierter RNA, die durch die Transkription des Vektors bei der Generierung der *In-situ* Probe entsteht.

Prinzipiell kann jedoch durch die markierten Proben sowohl RNA als auch DNA nachgewiesen werden. Es ist daher vorstellbar, daß nicht RNA in den elektroporierten Embryonen nachgewiesen wird sondern der transfizierte Vektor selbst. In der folgenden Argumentation werden u.a. einige Sachverhalte erörtert, die gegen eine Detektion von Vektor DNA sprechen.

4.1.6.1 Polymerase II terminiert nicht effektiv am BGH Poly A Signal

Transkriptionelle Termination ist ein wichtiger Prozess, um die Genexpression zu verstärken und gewährleistet die Wiederverwendung der Polymerase II (Dieci und Sentenac, 1996; Dye und Proudfoot, 1999). Man kann die Termination unterteilen in die Abspaltung des wachsenden Transkriptes von der Polymerase, das unabhängig vom Polyadenylierungssignal ist, und in das vom Polyadenylierungssignal abhängige Abfallen der Polymerase vom DNA Strang (Dye und Proudfoot, 2001). Die Abspaltung des primären Transkriptes erfolgt zufallsabhängig 200-2000 Basenpaare abwärts vom Polyadenylierungssignal und wird von dort liegenden Sequenzabschnitten gesteuert (Tantravahi et al.,

1993; Birse et al., 1997). Anschließend erfolgt eine Spaltung und Prozessierung des primären Transkriptes am Polyadenylierungssignal, die das Anhängen eines Poly-A-Schwanzes 3' und das Hinzufügen einer Kappe am 5' Ende umfaßt. Dadurch wird die fertige mRNA stabilisiert, während der Rest der RNA durch Ribonukleasen degradiert wird. Zusätzlich ist eine co-transkriptionelle Kopplung zwischen Termination und Prozessierung gegeben, die unter anderem in dem für die Termination notwendigen Herausschneiden des letzten Introns besteht (Proudfoot, 2000; Cook, 1999).

Infolge des Durchlesens der RNA Polymerase über das Polyadenylierungssignal hinaus werden kontinuierlich Transkripte von Sequenzen des elektroporierten Vektors gebildet (siehe Abb.23). Das Ampicillin-Gen, das die Antibiotika-Resistenz der transgenen Bakterien vermittelt, liegt auf dem CMV-Expressionsplasmid in umgekehrter Orientierung ungefähr 1.5 kb abwärts vom Polyadenylierungssignal. Es werden offenbar ständig Gegenstrangsequenzen unter anderem dieses Gens produziert. Obwohl diese RNA Fragmente in der lebenden Zelle rasch wieder degradiert werden, sorgt die starke Aktivität des CMV Promotors dafür, daß zu jedem Zeitpunkt, wenn auch in geringem Ausmaß, antisinn Ampicillin RNA Transkripte sowie weitere transkribierte Vektorsequenzen vorliegen.

Daß durch die Dig markierten *In-situ* Sonden tatsächlich Vektor und Ampicillin Transkripte in elektroporierten Embryonen nachgewiesen werden können, belegt die Tatsache, daß bei Verwendung von Expressionsvektoren, die eine Kanamycin- anstelle einer Ampicillin-Resistenz tragen, keine positiven Zellen in der Ganzpräparat *In-situ* Analyse detektiert werden können.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch Sequenzbereiche zwischen dem BGH-Poly-A-Signal des Vektors und dem Ampicillin Gen für die Generierung der falsch positiven Signale verantwortlich sind. In dieser Region liegt auch der für die Replikation in *E. coli* notwendige ColE1 Ori in gleicher Orientierung wie das Ampicillin Gen (siehe Abb.34).

Da die verschiedenen Vektorgenerationen durch neue Kombination bewährter Elemente aus alten Vektoren erzeugt wurden, unterscheidet sich das Rückgrat dieser Vektoren auf Nukleotidebene nur marginal. So ergab eine Blast-Suche (Madden et al., 1996) in der Vector Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen) mit einer 36 bp Sequenz (KpnI-HindII Fragment aus der MCS von Blueskript) 13 Treffer (Raatikainen et al., 2000). Inwieweit noch andere Bereiche des verwendeten Expressionsvektors für die Ge-

nerierung falsch positiver Signal verantwortlich sind, läßt sich nur durch weiterführende Experimente wie etwa Ribonuklease-Protektions-Essays untersuchen.

4.1.6.2 Keine Detektion von DNA

Mehrere Argumente sprechen gegen eine Detektion von DNA durch die ISH Analyse:

1. Gegen eine Detektion von DNA spricht, daß nach der Isolierung von RNA aus transgenen Bereichen elektroporierter Embryonen auch nach einer extensiven DNase Behandlung durch die RT-PCR Reaktion Ampicillinsequenzen amplifiziert werden konnten (siehe Abb.23). Darüberhinaus ist es unwahrscheinlich, daß es durch die auf eine Anreicherung von RNA abgestimmten Puffersysteme der Isolationskits zu einer Extraktion von episomaler DNA aus dem Gewebe kommt.
2. Werden mit Hilfe der T3 und T7 Promotoren antisinn bzw. sinn Digoxigenin markierte Ampicillin RNA Transkripte hergestellt (Ampicillin wurde dabei in die MCS des PBSKII⁺ kloniert), führt die *In-situ* Analyse nur im Fall derjenigen Embryonen zu einem positiven Ergebnis, die mit der sinn Ampicillin Probe (T3 Promotor) hybridisiert wurden (siehe Abb.22 F). Würde hingegen Vektor-DNA detektiert werden, die ja als episomaler Doppelstrang in der Zelle vorliegt, wäre bei beiden Proben ein positives Signal zu erwarten.
3. Mit dem Vektor PBSKII⁺ (Blueskript) elektroporierte Embryonen zeigten ebenfalls nach Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Ampicillin Proben kein positives Signal. Dies unterstützt die These, daß RNA detektiert wird insofern, als dieser Vektor keinen Promotor besitzt, der in eukaryontischen Zellen aktiv ist und die Transkription des Vektors unterstützen würde. Würde DNA detektiert, so wäre in der ISH Analyse ebenfalls ein positives Signal zu erwarten.
4. Von den elektroporierten Zellen werden wenige Kopien des transfizierten Expressionsplasmides aufgenommen, wohingegen von der transkribierten RNA viele tausend Kopien im Cytoplasma vorliegen dürften. Es ist nicht anzunehmen, daß die Sensitivität der Ganzpräparat *In-situ* Methode ausreichend ist, um wenige DNA Moleküle in Form von DNA-RNA Hybriden nachzuweisen.

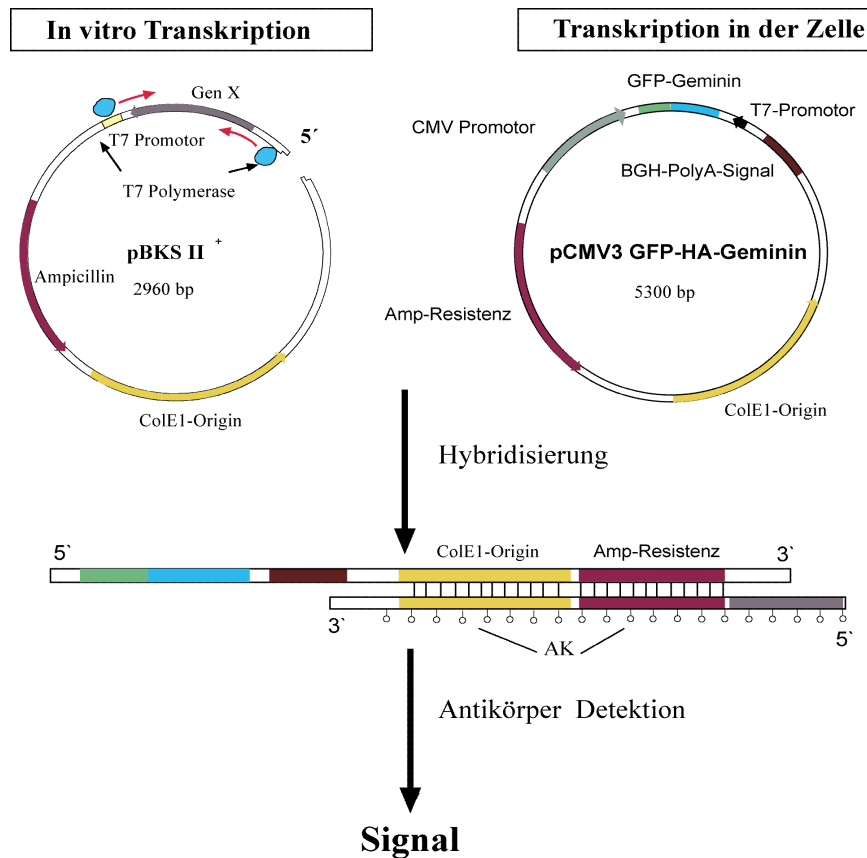


Abb.34: Vorgeschlagenes Modell zur Entstehung von falsch positiven Signalen durch die ISH Analyse. Während der Transkription der Vektormatrize kommt es in einem kleinen Prozentsatz zur Bildung von sinn Transkripten des Ampicillin Gens sowie weiterer Plasmidsequenzen, die mit der in den Embryonen vorhandenen antisinn Ampicillin RNA hybridisieren können. Infolge der Dig Markierung der Probe können diese dann durch Antikörper detektiert werden. (AK) Antikörper

4.1.6.3 Transkribierte Vektor DNA in In-situ Proben

Bei Fehlen des homologen Promotors initiieren T3 und T7 Polymerase in sehr geringem Ausmaß auch Transkription von den jeweils heterologen Promotoren, wobei die T7 Polymerase spezifischer ist (1%) als die T3 (3%) Polymerase (Klement et al., 1990; d'Allesio, 1987).

Es ist bekannt, daß an 3' Überhängen linearisierter Vektoren die DNA abhängige RNA Polymerase binden und die Transkription einleiten kann.

Um die dargestellten Zusammenhänge erklären zu können, muß man offensichtlich annehmen, daß die virale RNA Polymerase (SP6, T3 und T7) nicht nur bei 3' sondern wohl auch in geringem Ausmaß bei 5' Überhängen sowie glatten Enden der Matrize "umdreht"

und zurückläuft, wobei sie sowohl einen Sinnstrang der jeweiligen Probe als auch des Ampicillin Gens und weiterer Vektorsequenzen herstellt. Vermutlich geschieht dies dann, wenn der Überhang entweder selbst lang genug ist, um eine Haarnadelstruktur auszubilden, oder aber wenn die RNA-Polymerase das Ende erreicht und dabei die beiden DNA-Stränge voneinander trennt und so genügend einzelsträngige DNA vorliegt, die eine Haarnadelstruktur ausbilden kann. Diese fungiert dann wie ein Primer, der von der RNA Polymerase verlängert wird. Zwar wird zu einem geringen Prozentsatz die erzeugte Probe durch den synthetisierten Sinnstrang infolge der Ausbildung eines Duplexes unbrauchbar gemacht, aber offenbar fällt dies auf Grund der hohen RNA Mengen nicht ins Gewicht. Die in geringem Ausmaß synthetisierte sinn Ampicillin-Probe scheint jedoch auszureichen, um die in den Embryonen vorhandene antisinn Ampicillin RNA nachzuweisen. Es ist anzunehmen, daß diese illegale Bindung der T7 am 5' Ende der geschnittenen Matrize ein seltenes Ereignis ist, da T7 und T3 Polymerasen sehr spezifisch ihre nur 20 Nukleotide langen Promotoren erkennen, die sich lediglich in 4 Basen voneinander unterscheiden (Klement et al., 1990).

Als erschwerend für die Identifizierung falsch positiver Signale hat sich erwiesen, daß nur mit der T7 Polymerase erzeugte Proben Ampicillin RNA in den Embryonen detektieren können, da nur sie Digoxigenin markierte Ampicillin RNA in sinn Orientierung enthalten, die mit dem antisinn Transkript in den Embryonen hybridisieren kann. Wird die linearisierte Blueskript Matrize jedoch mit der T 3 Polymerase transkribiert, wird lediglich Digoxigenin markierte antisinn Ampicillin RNA gebildet. Diese Proben enthalten daher zwei markierte RNA Populationen, die sowohl die endogene Genexpression des jeweiligen Gens nachweisen, erkennbar als charakteristische Domäne, als auch in den transgenen Zellen das vermutliche Zielgen anschalten und die Ampicillin RNA detektieren (siehe Abb. 22 B).

Auch die transkribierte multiple Klonierungsstelle in Blueskript Vektoren und davon abgeleiteten Derivate können für die Generierung von artifiziellen Signalen in der ISH Analyse verantwortlich gemacht werden (Raatikainen et al., 2000; Blödorn et al., 1998; Millar et al., 1994). Im Gegensatz zu der Studie von Raatikainen konnte keine Korrelation zwischen der Orientierung der MKS (Multiple Klonierungsstelle), in PBKS⁺ und PBSK⁺ Vektoren und der Entstehung artifizieller Signale hergestellt werden (siehe Abb.35). Nur durch Proben, die von der Polymerase T3 von leerem PBSK⁺ Vektor hergestellt wurden, konnte lediglich in elektroporierten nicht jedoch in wildtypischen Embryonen ein Signal

detektiert werden. Eine ebenso erzeugte Probe ergab jedoch in Rattenembryonen kein Signal (Raatikainen et al., 2000). Überdies unterscheiden sich die zur Probenherstellung verwendeten Blueskript Vektoren in ihrer MCS Sequenz erheblich von dem eingesetzten Expressionvektor CMV2.

4.1.6.4 Apoptose als Ursache für falsch positive Signale

Es zeigte sich in Studien (Raatikainen et al., 2000), daß das positive ISH Signal von der Sequenz zwischen KPNI und HINDIII hervorgerufen wurde und mit Regionen, wie etwa der Urogenitalregion und dem Neuralrohr, die starke Apoptose-Aktivität zeigten (TUNEL Färbung, Conlon et al., 1995), co-lokalisiert war. Dieses Artefakt konnte nur in Rattenembryonen, nicht jedoch in Mausembryonen vergleichbaren Alters beobachtet werden und wurde nur durch T3 generierte Proben des KS⁺, nicht jedoch des SK⁺ Blueskript Vektors erzeugt. Dies beiden Vektorvarianten unterscheiden sich lediglich in der Orientierung ihrer multiplen Klonierungstelle in Bezug auf die relative Lage der T3 und T7 Promotoren.

Der überwiegende Anteil des während der Embryogenese auftretenden Zelltodes kann morphologisch als Apoptose indentifiziert werden (Vaux und Korsmeyer, 1999). Obwohl es während der finalen Fragmentation der Zellen zu apoptotischen Körpern zur Einstellung der Transkription und zur Aktivierung der RNAsen kommt (Bursch et al., 1990), werden während der Fragmentierung der DNA hohe mRNA Mengen gebildet (Kerkhoff and Ziff, 1995), die die Ursache für dieses artifizielle Signal sein dürften.

Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß Zelltod-assoziierte-Prozesse in elektroporierten Embryonen ebenfalls als Ursache für falsch positive Signale verantwortlich gemacht werden können, da zwischen Elektroporation und Fixation des Embryos mindestens 12 Stunden liegen, in denen absterbende Zellen bereits resorbiert worden sein dürften. Zellen, die mit GFP Fusionskonstrukten transfiziert wurden (und die positiv in der ISH Analyse waren), zeigten starke Fluoreszenz, was ebenfalls gegen Degradierungsprozesse spricht. Allerdings ist GFP sehr stabil (mindestens 24 h, Clontechniques, 1999) und könnte daher auch noch in absterbenden Zellen nachweisbar sein.

Analysier-tes Zielgen	Restrikti-ons-enzym	Vektor	RNA Polymera-se	In-Situ Analyse (PCR Matrize)	In-Situ Analyse (Plasmid Matrize)	Überex primier-tes Gen
DLX5	BamHI	PBSK ⁺	T7	negativ	positiv	Geminin
			T7	-	negativ	Slug
			T7	-	negativ	BMP4
MSX1	EcoRV	PBKS ⁺	T7	positiv	positiv	Geminin
			T7	negativ	positiv	Slug
			T7	positiv	positiv	BMP4
Sox2	XbaI	PBSK ⁻	T7	-	negativ	Geminin
Sox10	SacI	PBSK ⁻	T7	-	Partiell positiv	Geminin
				-	Partiell positiv	Slug
Cad-6B	SpeI	PBSK ⁻	T7	negativ	positiv	Geminin
			T7	negativ	positiv	Slug
Slug	BamHI	PBSK ⁻	T7	negativ	positiv	Geminin
Geminin	ClaI	PBKS ⁺	T7	negativ	positiv	Slug
Cad-7	BamHI	PBKS ⁺	T7	-	Partiell positiv	Geminin
				-	negativ	Slug
BMP4	BamHI	PBKS ⁺	T3	-	negativ	Geminin
				-	negativ	Slug
				-	positiv	DLX5
BMP2	HindIII	PBKS ⁺	T3	-	negativ	Geminin
Pax3	BamHI	PBKS ⁺	T3	-	negativ	Geminin
ID2	NcoI	pGEMT	Sp6	-	Partiell positiv	Geminin

Abb.35: Zusammenfassende Tabelle der elektroporierten Transgene und der analysierten Markergene. Es sind die Vektoren dargestellt, die als Matrize zur Probenherstellung dienen sowie die Restriktionsenzyme, die zur Linearisierung verwendet wurden. Die Ergebnisse, die mit Proben von PCR- und Plasmidmatrizen erzielt wurden, sind vergleichend gegenübergestellt.

4.1.6.5 Lösungsmöglichkeiten

Um die beschriebene Problematik zu umgehen, bieten sich 4 verschiedene Lösungsmöglichkeiten an:

1. Es werden nur Proben verwendet, die mit Hilfe der T3 RNA Polymerase synthetisiert wurden. Allerdings ist dieses Enzym ineffektiver als die T7 Polymerase.
2. Bei der Herstellung der Proben werden keine linearisierten Plasmide sondern PCR-Templates verwendet. Diese werden generiert, indem ein genspezifischer Vorwärts-Primer zusammen mit einem 3' gelegenen Primer eingesetzt wird, der die entsprechenden T3 oder T7 Promotorsequenzen enthält (Gandrillon et al., 1996).
3. Die cDNA der Probe wird mitsamt den T3 und T7 Promotorsequenzen mit Hilfe des Restriktionsenzym BSSHII aus dem Plasmid herausgeschnitten und isoliert. Dies ist

jedoch nur bei PBSKII⁺ Vektoren möglich.

4. Ein elektroporierter Vektor und das Plasmid, von dem die *In-situ* Proben hergestellt werden, müssen sich hinsichtlich ihrer Antibiotika Resistenz unterscheiden. In diesem Fall können die Proben von linearisierten Plasmiden hergestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung von Dig markierter Ampicillin RNA zu verhindern, könnte die Blockierung der Bindestellen durch kurze Oligonukleotidsequenzen sein. Artifizielle Bindung der Blueskript MCS Sequenz an Neurone in Gehirnschnitten von Schwein und Ratte konnte durch einen Blockierungsschritt mit 20 Nukleotiden langen Oligomersequenzen vor der eigentlichen Hybridisierung verhindert werden. (Blödorn et al., 1998). Allerdings wären in diesem Fall aufgrund der Größe des Ampicillin Genes (900 bp) die Zahl der zu testenden Oligonukleotidsequenzen sehr groß.

4.2 Geminin

4.2.1 SEQUENZDATEN.

Die Primärstruktur des Proteins *Geminin* aus dem Huhn, die aus der cDNA abgeleitet werden konnte, ist mit dem bereits charakterisierten Protein *Geminin* aus dem Frosch *Xenopus laevis* und mit Proteinen aus dem Menschen, der Maus und der Fliege *Drosophila melanogaster*, die in Datenbanken gefunden wurden, verwandt (Abb.25; Kroll et al., 1998; McGarry und Kirschner, 1998). Jedoch ist die Homologie mit etwa 50% für den Frosch, die Maus und den Menschen bzw. 19% für die Fliege vergleichsweise gering ausgeprägt. Es konnten lediglich im Frosch zwei *Geminin* Gene nachgewiesen werden. In den anderen Spezies ergaben Datenbanksuchen, daß abgesehen von partiell homologen Pseudogenen jeweils nur ein *Geminin* Gen vorhanden war.

4.2.2 EXPRESSIONSDATEN

Expression des Gens *Geminin* im Huhn konnte in der gesamten Neuralplatte bis in das nicht-neurale Ektoderm hinein und entlang des Primitivstreifens detektiert werden. Der Primitivstreifen selbst und damit die Mittellinie enthält jedoch keine *Geminin* Transkripte. Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird die Expression auf die dorsalen Neural-

falten, das dorsale Neuralrohr und die wandernden Neuralleistenzellen eingeschränkt (Abb. 26 C-E). Sobald das Notochord unter der anterioren Neuralplatte gebildet wird, wird die Expression von *Geminin* in dem benachbarten Teil der Neuralplatte eingestellt (Abb.26 C, Pfeil).

Ein Abschalten der *Geminin* Expression in der Mittellinie könnte durch den Faktor *Sonic hedgehog* erfolgen, der von den Notochordzellen sezerniert wird und für die Differenzierung und Spezifikation des neuralen Ektoderms in ventrale und dorsale Qualitäten verantwortlich ist (Roelink et al., 1995).

Wie der an der Entstehung der Neuralleistenzellen beteiligte Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* (Nieto et al., 1994) ist das Gen *Geminin* auch entlang des Primitivstreifens exprimiert (Abb.26 C). Am Primitivstreifen erfahren Zellen wie bei der Entwicklung der Neuralleistenzellen einen epithelialen-mesenchymalen Übergang, indem sie aus dem Epithel des Epiblasten bei der Einwanderung durch den Primitivstreifen in mesenchymale Zellen des Mesoderms übergehen (Schoenwolf, 1991). Aus diesem Grund könnte ähnlich wie *SLUG* auch *Geminin* allgemein in epithelialen-mesenchymalen Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen. Transkripte von *Geminin* finden sich bereits während der Gastrulation in einer weitgehend überlappenden Expressionsdomäne mit den Homeobox-genen *MSX1* und *DLX5*. Expression von *MSX1* und *DLX5* konnte bereits im Stadium HH3-HH4 am Rand der zukünftigen Neuralplatte nachgewiesen werden (Pera et al., 1999; Streit und Stern, 1999a). Während des Prozesses der Neurulation sind beide Gene in den dorsalen Neuralfalten co-exprimiert. Allerdings ist auffallend, daß die Expressionsdomäne von *Geminin* im Neuralplattenstadium viel breiter angelegt ist als die von *MSX1* und *DLX5*. Eine weitgehende Übereinstimmung mit der *MSX1* und *DLX5* wird erst mit der Einschränkung von *Geminin* auf den Rand der Neuralplatte nach dem Kopffaltenstadium erreicht. Ab dem Kopffaltenstadium aktivieren Zellen am Rand der Neuralplatte, die als Vorläufer der später im Stadium HH10 auswandernden Neuralleistenzellen anzusehen sind, das Zelladhäsionsprotein *Cadherin-6b* (Nakagawa und Takeichi, 1995). Als weiterer charakteristischer Marker des dorsalen Neuralrohres und der wandernden Neuralleistenzellen tritt ab dem 3-Somitenstadium erstmals der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor *SLUG* in Erscheinung (Nieto et al., 1994). Die Expressionsdomänen von *Geminin*, *Cadherin-6b* und *SLUG* zeichnen sich bereits zum Zeitpunkt ihres ersten Auftretens durch große Ähnlichkeit untereinander aus. Allerdings ist *Geminin* in den gesamten Neuralfalten bzw. dem gesamten Neuralrohr entlang der anterior-

posterioren Achse exprimiert, während *SLUG* Transkripte nur bis auf die Höhe des Mittelhirns zu finden sind.

Auch die für das Gen *Geminin* aus dem Frosch bekannten Daten weisen deutliche Abweichungen zu dem hier isolierten Gen auf. Nur die frühe Expression beider Genprodukte in der Neuralplatte weist gewisse Ähnlichkeiten auf (Abb.26; Kroll et al., 1998). Während der weiteren Entwicklung kommt es zu erheblichen Abweichungen der Expressionsdomänen voneinander. Nach Abschluß der Neurulation können *Geminin* Transkripte im Frosch sowohl ventral als auch dorsal im Neuralrohr, im anterioren Gehirn, in den Augen- und Gehörvesikeln, in der Nase und in Neuralleistenzellen im Kopf nachgewiesen werden (Kroll et al., 1998). Die Expression des in dieser Studie isolierten Homologs ist dagegen in dieser Entwicklungsphase auf das dorsale Neuralrohr und die auswandernden Neuralleistenzellen restringiert (Abb.26 D/G).

In der Maus ist *Geminin* während der Neurulation (8.5-9.5) ubiquitär exprimiert, wobei eine schwache Akkumulation der Transkripte in der Neuralplatte nachweisbar ist (Abb.27 A/B). Ab Tag 11.5 ist *Geminin* eine restriktive Expressionsdomäne im basalen telencephalischen Bereich in der Subventrikularzone exprimiert (Abb.27 G). In dieser mitotisch sehr aktiven Zone proliferieren Neuroblasten, die nach Abschluß der Mitose in die darüberliegende Mantelzone einzuwandern beginnen, wo Differenzierungsprozesse stattfinden (Porteus et al., 1994). Weitere Expressionsdomänen finden sich im olfaktorischen Bulbus, dem Meckel'schen Knorpel, in den Branchialbögen und den distalen Bereichen der Gliedmaßen (Abb.27 C, sowie nicht gezeigt).

4.2.3 ZELLULÄRE LOKALISATION

Die zelluläre Lokalisation der drei Proteine aus Frosch, Huhn und Maus ist durchaus unterschiedlich. In *Xenopus* ist *Geminin* ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während im Huhn *Geminin* vor allem im Zytosol und nur sehr selten neben dem Zytosol auch im Zellkern gefunden wurde. Die zelluläre Lokalisation des murinen Homologs unterscheidet sich insofern, als in etwa 50% der mit *Geminin* transfizierten Mausfibroblastenzellen das Gen neben dem Zytoplasma auch im Zellkern gefunden wurde (Abb.27). Der erhöhte Prozentsatz an nukleärer Lokalisation in der Maus deutet eventuell auf eine veränderte Funktion dieses Proteins im Vergleich zum Huhn hin.

4.2.4 ÜBEREXPRESSION VON GEMININ

Überexpression von *Geminin* aus dem Huhn führte zur Transkription von MSX1 RNA (siehe Ergebnisse Abb.29 B). Allerdings konnte keine Proteinexpression in den transgenen Zellen mit einem monoklonalen MSX1 Antikörper nachgewiesen werden (Abb.29 H). In humanen Zellen ist bekannt, daß es zu einer zyklischen Akkumulation von *Geminin* in der G2/S Phase und zu einer Degradation des Proteins in der Mitose kommt (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Eine Überexpression des Proteins in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führt wiederum zu einer Arretierung der Zellen in der M-Phase und in einem Teil der Zellen zur Induktion von Apoptose (Quinn et al., 2001). Vermutlich ist durch den hohen Überexpressionslevel eine ausreichende Proteindegradation nicht mehr gewährleistet. In der M-Phase erfolgt jedoch nur die Translation von mRNAs bei denen eine IRES-Sequenz vorhanden ist, während die Translation von mRNAs, die eine m⁷GpppN Kappe besitzen, unterbunden ist (Pyronnet und Sonenberg, 2001; Sharff und Robbins, 1966). Eine mögliche Konsequenz der Überexpression von *Geminin* könnte sein, daß es auch im Huhn zu einer Arretierung der Zellen in der M-Phase kommt, wodurch die Translation der MSX1 mRNA nicht gewährleistet wird. Weitere Experimente müssen dies klären.

Die Überexpression von *Geminin* führte nicht zu einer Aktivierung von BMP4. Zunächst ist BMP4 im nicht-neuralen Ektoderm um die Neuralplatte exprimiert (Liem et al., 1995; Schultheiss et al., 1995) und findet sich erst später im dorsalen Neuralrohr (Liem et al., 1995; 1997). Obwohl die Überexpression des Gens *Geminin* nicht zu einer Induktion der BMP4 Expression führte (Abb.27 D), induzierte sie das funktionell eng mit BMP4 verbundene Gen MSX1 (Streit und Stern, 1999a). Murines *Geminin* war weder in der Lage MSX1 in der Maus noch im Hühnerembryo und vice versa zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit der veränderten Expression und der leichten Abweichung hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation könnte es sein, daß diese Genfamilie in Huhn und Maus unterschiedliche Funktionen ausübt.

Die funktionellen Daten aus den Überexpressionsexperimenten unterscheiden sich auch bei den Genen der anderen Spezien signifikant. Während *Geminin* bei der Überexpression im Frosch neurale Identität (N-tubulin, Otx2, Pax6) etabliert (Kroll et al., 1998), zeigt es im *Huhn* keine neural-induzierenden Eigenschaften, wie das Ausbleiben des neuralen Markers *SOX2* nach der Überexpression belegt (3.2.4). In der Fruchtfliege *Drosophila*

melanogaster ist *Geminin* zellzyklusabhängig in mitotisch aktiven Zellen exprimiert und wird am Übergang zwischen Meta- und Anaphase degradiert (Quinn et al., 2001). Es zeigt wie das *Xenopus* Homolog bei Überexpression neuralinduzierende Fähigkeiten, unterbindet jedoch gleichzeitig auch die Mitose und induziert dadurch Apoptose. In allen 4 Proteinen aus Huhn, Frosch, Maus und Fliege sind eine N-terminale Domäne und eine C-terminale Domäne konserviert, die ein coiled-coil Proteininteraktionsmotiv besitzt. In der N-terminalen Domäne befindet sich darüberhinaus ein Destruktionsmotiv (RxALGVLxN), das einen Ubiquitin abhängigen Proteinabbau während der Mitose bewirkt (Kornitzer und Ciechanover, 2000). Diese beiden Domänen sind zumindest in der Fliege und im Frosch durch eine funktionelle Konservierung gekennzeichnet, wobei in *Xenopus* die Fähigkeit neurale Identitäten zu etablieren von den reprimierenden Einflüssen der C-terminalen Domäne auf den Zellzyklus getrennt werden kann. Ob *Geminin* auch im Huhn eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus hat, ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte zwar keine zyklische Expression während der Gastrulation des Hühnerembryos nachgewiesen werden, wie dies für die Proteine aus Frosch und Fliege der Fall ist (Quinn et al., 2001; Tada et al., 2001). Allerdings ist auffällig, daß *Geminin* in Regionen mit starker Zellproliferation wie den caudalen Bereichen des Primitivstreifens in HH4 Embryonen (Sanders et al., 1993) nicht exprimiert ist (siehe Ergebnisse Abb.24 C). In der Neuralplatte und in lateralen Bereichen des Primitivstreifens beginnen Zellen neuronale bzw. epidermale Differenzierungsprozesse zu durchlaufen, werden zu neuronalen sowie epidermalen Vorläuferzellen und verringern ihre mitotische Aktivität. Neuronale Differenzierung oder Neurogenese wird dabei von proneuralen und neurogenen Genen gesteuert. (Chitnis et al., 1996; Ma et al., 1996; Dubois et al., 1998) Es könnte daher sein, daß *Geminin* im Huhn ebenfalls sowohl eine Rolle in der Zellzyklusregulation als auch in Differenzierungsprozessen spielt. Eine derartige, in zwei Wirkungskomponenten trennbare Rolle, nämlich die Inhibition des Zellzyklus und die Induktion von Differenzierungsvorgängen wurde auch bei Inhibitoren (p21 und RB [Retinoblastom] Familie) der CDKs ("cyclin dependent kinases") nachgewiesen (Zhu and Skoultschi, 2001; Ohnuma et al., 1999). So induziert etwa die Überexpression von *tumorhead* in *Xenopus* zwar die Expression des frühen neuralen Markers *Sox2* (Mizuzeki et al., 1998) und eine Expansion der Neuralplatte, verhindert jedoch die Expression der späten Differenzierungsmarker *NeuroD* und *N-Tubulin* sowie der Neuralleistenmarker *Xtwist* und *Xslug* (Wu et al., 2001). Allein ektodermale Zellen werden dabei in einem

hyperproliferativen Zustand gehalten. Der neuralplattenspezifische Transkriptionsfaktor XBF-1 beeinflusst dosisabhängig sowohl die Zellproliferation als auch die Differenzierung innerhalb der Neuralplatte (Induktion von N-Tubulin), wobei er in hohen Dosen Zellteilungen induziert und in geringen Mengen bewirkt, daß die Zellen den Zellzyklus verlassen und differenzieren (Hardcastle und Papalopulu, 2000).

4.3 Überexpression von BMP4 und DLX5

4.3.1 ÜBEREXPRESSION VON BMP4

Die Implantation von BMP4-beladenen Kugeln (100µg/ml) führte im Hühnerembryo zwar zu einer Verengung der Neuralplatte (Knoetgen et al., 1999b), nicht aber zu einer Aktivierung von *Geminin* (Daten nicht gezeigt), so daß *Geminin* nicht unmittelbar in der Kaskade unter BMP4 zu stehen scheint. Möglicherweise sind allerdings weitere Signale in Kombination zu BMP4 nötig, um das Gen *Geminin* zu aktivieren. Die Tatsache, daß überexprimiertes BMP4 nur in autonomer Weise in den transgenen Zellen selbst die Induktion von MSX1 erlaubt (siehe Abb.30 D), könnte den Grund in der limitierten Diffusion des aktiven Proteins in der extrazellulären Matrix haben. Die Bindungsdomäne für Kollagen und Fibronectin könnte bewirken, daß vor allem limitierte Mengen an sekretiertem BMP4 effektiv im Extrazellularraum und an der Basalmembran festgehalten werden. Darüberhinaus haben Experimente, bei denen BMP4 Protein, absorbiert an Heparin Kugeln, in den Embryo transplantiert wurden, gezeigt, daß MSX1 nicht in einem Gradienten um die Kugel herum induziert wird (Hogan, 1998). Dies impliziert, daß ein bestimmter Schwellenwert in bezug auf die BMP4 Konzentration vorhanden sein muß, damit eine Zelle die Aktivierung der MSX1 Transkription zuläßt. Die MSX1 exprimierenden Zellen befanden sich dabei in einem Kreis mit maximal 15 Zeldurchmesser von der Quelle des Proteins. Infolge der mosaikartigen Expression des Transgens sind die BMP4 exprimierenden Zellen über eine weite Fläche verstreut, was den Aufbau einer entsprechend hohen extrazellulären BMP4 Konzentration erschweren dürfte.

Die Morphologie des Neuralrohres in Embryonen, in denen eine Überexpression des BMP4 Proteins erfolgte, ist phänotypisch verändert (Abb.30 H). Die Wand ist wesentlich dünner ausgeprägt und die Zellen weisen nicht die typische spindelförmige Gestalt neuro-epithelialer Zellen auf sondern erscheinen erheblich abgerundet. Dies ist ein charakteristisches Merkmal für Zellen, die den programmierten Zelltod, die Apoptose, durchlaufen. In der Tat konnte gezeigt werden, daß es in neuralem Gewebe, das die mit BMP4 Protein beladenen Kugeln umgibt, zu einer verminderten Zellproliferation von neuronalen Vorläuferzellen (verminderte BrdU Inkorporation) und zu einer verstärkten Apoptose (TUNEL Markierung) kommt (Hogan, 1998; Mabie et al., 1999; Furuta et al., 1997). Ein Mechanismus, durch den BMP4 die Neurogenese inhibiert, beruht dabei auf der Degeneration des Transkriptionsfaktors MASH1 (Shou et al., 1999). Vor der verminderten Zellproliferation und verstärkten Apoptose kommt es dabei zu einer Induktion von MSX1 Expression (Vainio et al., 1993; Kratochwil et al., 1996). Die Regulation durch BMP Faktoren ist jedoch komplex, da ebenfalls in verschiedenen Systemen gezeigt werden konnte, daß BMP4 einen positiven Einfluß auf die Neurogenese hat (Li et al., 1998; Schneider et al., 1999).

Allerdings scheint der Ablauf der neuronalen Induktion durch ektopisch exprimiertes BMP4 nicht beeinflusst zu werden. Dies zeigt der pan-neurale Marker SOX2 (HMG BOX Gen), der in seiner Expression nicht beeinflusst wurde (siehe Abb.30 G). Die Implantation von Heparin Kugeln, die mit rekombinanten BMP4 Protein beladen wurden, führten zwar zu einer Abschwächung der SOX2 Expression an den Rändern der Neuralplatte (Pera et al., 1999). Doch könnte es sich dabei um einen dosisabhängigen Effekt handeln, der bei einzelnen Zellen nicht zu beobachten war. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen überein, die nachweisen, daß nur die Übergangsregion zwischen epidermalen und neuralem Ektoderm in HH4 Embryonen sensitiv auf BMP4 Moleküle reagiert (Streit und Stern, 1999). Die Morphologie des Neuroektoderms scheint daher nur in den Stadien vor Abschluß der Neurulation negativ auf den musterbildenden Einfluß der TGF- β Moleküle zu reagieren, da es nach Abschluß der Neurulation selbst BMP4 in der Dachplatte exprimiert (Liem et al., 1995). In diesem Stadium stellt BMP4 einen wichtigen Faktor dar, der das Auswandern der Neuralleistenzellen beeinflusst und die dorsoventralen Differenzierungsprozesse zusammen mit dem ventralen Morphogen *sonic hedgehog* im Neuralrohr steuert.

Es ist auffallend, daß die morphologisch veränderten Strukturen häufig keine BMP4 Expression aufweisen, was entgegen den obigen Betrachtungen auf eine nicht zell-autonome Wirkung sekretierter BMP4 Moleküle hindeutet.

Neben dem deformierten Erscheinungsbild des Neuralrohres fielen mit BMP4 elektroporierte Embryonen durch das Fehlen dorsaler mesodermaler Strukturen insbesondere der Somiten auf (siehe Abb.30 H). In Abhängigkeit von der Höhe der BMP4 Konzentration wird im Frosch das Mesoderm zunehmend bis hin zur Bildung von Blutzellen ventralisiert (Dosch et al., 1999). Im Hühnerembryo führt die Exposition des somitischen Mesoderms mit BMP4 Molekülen konzentrationsabhängig zunächst zur Umwandlung der medialen Somitenanteile in laterale Anteile bis hin zur vollkommenen Respezifikation zum lateralen Plattenmesoderm (Tonegawa et al., 1997). Die beschriebenen morphologischen Veränderungen konnten jedoch nur in etwa 20 % der elektroporierten Embryonen beobachtet werden, was eine relativ strikte Beschränkung der zellulären Kompetenz auf BMP4 Signale zu reagieren bedeutet, in spatio und temporärer Hinsicht. Somitisches Mesoderm reagiert nur während der Differenzierung von Sklerotom und Dermatome auf BMP4 Signale (Tonegawa et al., 1997).

Zusammenfassend läßt sich daher sagen, daß die in der Literatur beschriebenen Effekte, die durch ektopisch appliziertes BMP4 Protein ausgelöst werden, durch die Überexpression mit Hilfe der Elektroporation bestätigt werden konnten.

4.3.2 ÜBEREXPRESSION VON DLX5

Das Homeoboxgen DLX5 und der TGF β Faktor BMP4 sind während der Gastrulation in den epidermalen Regionen, die die sich ausbildende Neuralplatte umgeben, co-exprimiert, was eine regulatorische Interaktion nahelegt. Ektopisch appliziertes BMP4 Protein ist in der Lage, die DLX5 positive epidermale Domäne in die Neuralplatte hinein auszudehnen, kann jedoch die DLX5 Expression nicht ektopisch induzieren (Pera et al., 1999). Überexprimiertes DLX5 Protein ist jedoch fähig, die Expression von BMP4 in den transgenen Zellen anzuschalten (siehe Abb.31 B). Dies deckt sich mit Daten, die zeigen, daß mit RCAS-DLX5 Virus transfizierte Zellen BMP4 exprimieren können

(Pera, E., persönliche Mitteilung). Die Induktion von BMP4 durch DLX5 war dabei nicht auf den Übergangsbereich zwischen neuralem und epidermalem Ektoderm beschränkt, sondern erfolgte in allen embryonalen und extraembryonalen Regionen. Offensichtlich gibt es erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Kompetenz der Zellen auf BMP4 bzw. DLX5 zu reagieren. Allerdings ist zu beachten, daß im Fall von BMP4 eine ansonsten wildtypische Zelle auf einen externen Stimulus reagiert, wohingegen bei der Überexpression eines Transkriptionsfaktors ihr intrinsisches Entwicklungsschicksal verändert wird. Ein ventralisierender Effekt von überexprimierten DLX5 konnte im Gegensatz zur Überexpression in *Xenopus*, wo es den gleichen Phänotyp hervorruft wie die Überexpression von BMP4 (Miyama et al., 1999), nicht beobachtet werden.

In der Maus scheint DLX5 durch BMP4 induzierbar zu sein und eine Rolle während der Osteoblasten Differenzierung zu spielen (Miyama et al., 1999).

DLX5 könnte daher auch im Huhn Teil einer positiven Rückkopplungsschleife sein, die zu einer Verstärkung der BMP4 Expression im Überlappungsbereich beider Gene führt.

5. AUSBLICK

5.1 Einsatz des Elektroporationssystems in der Entwicklungsbiologie

Um entwicklungsbiologisch relevante Fragestellungen adäquat adressieren zu können, bietet sich ein kombinatorischer Einsatz der Elektroporation in Hühner- und Mäuseembryonen an. Hühnerembryonen bieten den Vorteil, daß sie leicht zugänglich für die Elektroporation *in ovo* sind und daß sie nach dem Eingriff noch über einen langen Zeitraum hinweg inkubiert werden können. Dies ist ausschlaggebend, wenn man den Einfluß des transfizierten Gens auf die terminale Differenzierung bestimmter Organe und Strukturen untersuchen möchte. Im Gegensatz dazu ist die Embryokultur von Mäuseembryonen technisch anspruchsvoll, nur über einen begrenzten Zeitraum hinweg (1-3 Tage) und nur in einem engen entwicklungsbiologischen Zeitrahmen möglich (E7-12). Einen Ausweg dürfte die von Tabata et al. 2001 entwickelte Methode der *in utero* Elektroporation bieten, die erlaubt, das Schicksal transgener Zellen auch nach der Geburt zu verfolgen (Tabata et al., 2001). In dieser Studie haben die Autoren „Lineage tracing“ Studien durchgeführt, indem sie in einer Population von Stamm- oder Vorläuferzellen GFP bzw. β -Galaktosidase unter Kontrolle eines starken Promotors wie CMV oder SV40 konstitutiv exprimiert haben, um die Migration der Neuronen im Cortex der Maus zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, daß der CMV Promotor in ausdifferenzierten Neuronen abgeschaltet wird, wohingegen der EF1 α Promotor weiterhin aktiv war. Durch eine derartig zeitabhängige Analyse ist genau zu ermitteln, wann eine transfizierte Zellpopulation diesen Promotor abschaltet. Dadurch läßt sich eine Aussage hinsichtlich des Zeitpunktes und der Bedingungen treffen, unter denen ein bestimmter Zelltyp Differenzierungsprozesse durchläuft. Elektroporation scheint eine sehr geeignete Methode zu sein, um eine detaillierte Analyse von Promotor und Enhancer Strukturen im Hühner Embryo durchzuführen. Bei Enhancern handelt es sich um kurze Sequenzabschnitte von 300-500 bp Länge, die Bindungs-

stellen für Transkriptionsaktivatoren als auch für Repressormoleküle beinhalten. Sie sind daher das Ziel positiver und negativer Regulationsmechanismen und bewirken das lokalisierte Anschalten von Genen in charakteristischen Expressionsmustern (Small et al., 1992; Ip et al., 1992). Durch Fusion von Reportergenen wie β -Galaktosidase oder GFP mit Enhancer- oder Promotorstrukturen wird die normale Expression der entsprechenden Gene rekapituliert und man ist in der Lage, sehr schnell durch Deletions- und Mutationsstudien die für eine korrekte Expression notwendigen regulativen Sequenzen zu isolieren. Obwohl transgene Mäuse sich für die detaillierte Analyse von embryologischen Enhancern anbieten, hat der zeit- und arbeitsintensive Aufwand dazu geführt, daß es nur wenige genaue derartige Studien gibt (Rhodes et al., 1994; Popperl et al., 1995).

Transiente Expressionsstudien zur Promotoranalyse wurden sowohl im Zebrafish *Danio rerio* als auch im Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt (Watabe et al., 1995), in denen Fusionskonstrukte in frühe Teilungsstadien per Mikroinjection eingeführt wurden. Erschwert wurden diese Analysen durch die mosaikartige Inkorporation der DNA aufgrund der zahlreichen Zellteilungen, die zwischen der Befruchtung und der Etablierung der verschiedenen Organanlagen liegen. Der Vorteil des Elektroporationssystems im Huhn liegt darin, daß zu einem definierten Zeitpunkt die Reporterstrukturen in der jeweiligen Organstruktur, wie die der prächordalen Anlage oder etwa einem Keimblatt, analysiert werden können (Spieler D., persön. Mitteilung). Zwar kommt es ebenso nur zu einer mosaikartigen Expression, da die DNA aufgrund der ausgeprägten extrazellulären Matrix nicht alle Zellen erreichen kann, die aber nicht so stark ins Gewicht fällt, da bis zu 80 % der Zellen in einer gegebenen Region transgen sind. Durch die Isolierung von Mutationen in RFP, die bewirken, daß sich das emittierte Fluoreszenzspektrum zeitabhängig von grün über rot ändert, ist es möglich geworden die Dynamik der Promotoraktivierung bzw. Inaktivierung im lebenden Embryo zu verfolgen (Terskikh et al., 2000)

Neben dem Hühnerembryo wurde auch die Seescheide *Ciona intestinalis*, die als Modellsystem für die frühe Chordaten Entwicklung gilt (Garstang, 1928), zur Analyse cis-regulatorischer Sequenzen durch Elektroporation herangezogen (Corbo et al., 1997, Locascio et al., 1999). Im Embryonalstadium besitzen diese im adulten Stadium sessilen Filtrierer eine kaulquappen-ähnliche Larve, die ein sensorisches Vesikel, ein Notochord und ein dorsales Neuralrohr besitzt. Sie besteht lediglich aus etwa 1000 Zellen, deren Abstammung genau bekannt ist. Dies und die Tatsache, daß ihr relativ kleines kompaktes Genom von 1.8×10^8 Basenpaaren fast komplett sequenziert ist, macht es relativ einfach, spezifi-

sche Gene und die assoziierten regulatorischen Regionen zu isolieren. Mehrere hundert befruchtete dechorionierte Eier können sehr einfach gleichzeitig in einer Küvette elektroporiert werden und nahezu 100% der überlebenden Embryonen zeigen ektopische Genexpression.

Mit Hilfe der bekannten Genetik der Maus ist es möglich, durch Überexpression in transgenen Tieren die räumliche und zeitliche Funktion bestimmter Gene zu entschlüsseln und ihre Position in der Hierarchie zu ermitteln. Durch sog. Rettungs- oder "rescue" Experimente, in denen man das intakte Gen in der jeweiligen Mutante überexprimiert, erhält man im Embryo Bereiche, in der die wildtypische Situation wieder hergestellt ist. Somit bekommt man einen Hinweis, ob dieses Gen notwendig und essentiell für die Ausprägung eines bestimmten Merkmals oder für die Differenzierung einer Struktur ist. Entsprechend kann man testen, ob die Funktion orthologer Gene aus anderen Arten konserviert ist, oder ob in der Hierrarchie untergeordnete Gene in der Lage sind, Mutationen in übergeordneten Genen zu kompensieren. Eine Einordnung einzelner Gene in eine zusammenhängende Genkaskade, die die wechselseitigen Interaktionen widerspiegelt, ist somit möglich. Eine große Anzahl von Genen, wie etwa Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sind in der frühen Embryogenese essentiell. Ihre Ausschaltung führt häufig zu einem früh embryonal letalen Phänotyp (Morasso et al., 1999). Um die Funktion dieser Gene während der zu einem späteren Zeitpunkt einsetzenden Differenzierungsvorgänge zu untersuchen, ist es notwendig, ihre Funktion zu einem definierten Zeitpunkt in der Embryogenese zu inaktivieren. Man erreicht dies durch Verwendung des Cre-loxP Systems, bei dem in transgenen Tieren das jeweilige Gen von zwei LoxP Kassetten flankiert wird. Werden diese Mäuse mit sog. Cre-Linien gekreuzt, die das Enzym Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors exprimieren, kommt es zu einem Rekombinationsereignis und damit zu einer Genverlustmutation dieses Genes nur in der jeweiligen Struktur, wohingegen der restliche Embryo die Wildtypsituation beibehält (Marquardt et al., 2001). Die Herstellung derartiger konditionaler Genverlust-Mutanten ist jedoch sehr zeitaufwendig. Durch Elektroporation dominant negativ wirkender Konstrukte ist es möglich, die Auswirkungen einer konditionalen Genverlustmutation in einzelnen Geweben zu untersuchen. Darüberhinaus kann man durch Einsatz des *in ovo* Systems präzise Vorhersagen über den mutmaßlichen Phänotyp einer entsprechenden „knockout“ Maus ohne die jeweilige Genfunktion treffen.

Als ein großer Vorteil der Elektroporation hat sich erwiesen, daß mit ihrer Hilfe Gene in

spezifischen Bereichen des Gehirns überexprimiert werden können. Da diese Methode auf einem physikalischen Phänomen beruht, können praktisch alle Zelltypen in einem injizierten Bereich transfiziert werden. Epithelien stellen eine natürliche Barriere für die Ausbreitung der DNA im Gewebe dar. Der positive Aspekt hierbei ist, daß durch Injektion in ein von einem Epithel ausgekleidetem Lumen, wie etwa dem Neuralrohr oder dem Darm, lokalisiert eine hohe DNA Konzentration erreicht wird. Dies wirkt sich begünstigend auf die Transfektionseffizienz aus. Die hohe Packungsdichte der Zellen in Verbindung mit den zahlreichen Zell-Zell Kontakten wie „tight junctions“, Desmosomen und der extrazellulären Matrix verhindern dabei die Diffusion der DNA in das umliegende Mesenchym und damit deren Verdünnung. Die Verteilung der transgenen Zellen ist daher auf ein bis zwei Zellschichten begrenzt. Für die Überexpression von Genen in dickem mesenchymalen Gewebe bietet sich dagegen nach wie vor die Verwendung von replikationskompetenten sowie defekten Retroviren wie dem „avian subtype A“ Retrovirus oder der auf dem RSV (Rous Sarcoma Virus) basierenden Rcas Vektorgruppe (replication competent ALSV LTR with splice acceptor and subgroup A env gene) an (Mikawa et al., 1992; Mima et al., 1995). Zwischen der Infektion der Viren und der Expression des jeweiligen Transgens liegen Zeitspannen von bis zu 18 Stunden. Für die Untersuchung vieler extrem schnell ablaufender Entwicklungsprozesse während der frühen Embryogenese ist dies jedoch zu langsam. Darüber hinaus ist unklar, in welchem Ausmaß der virale LTR Promotor des Rcas Virus in frühen (HH3-HH4) Hühnerembryonen überhaupt aktiv ist. Die Herstellung eines Virusstamms mit hohem Titer (10^8 Virenpartikel/ml) ist zudem eine zeit- und arbeitsintensive Tätigkeit, die außerdem sicherheitstechnisch nicht unproblematisch ist, da einige der verwendeten Retroviren auch in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren (Iba et al., 2000). Sollen Zellen mit zwei oder drei Genen gleichzeitig infiziert werden, so ergibt sich bei der Verwendung von Retroviren das Phänomen der Interferenz. Mit einem Retrovirus infizierte Zellen exprimieren virale Hüllproteine (*v-env* Gene) auf ihrer Zelloberfläche und verhindern dadurch Zweitinfektionen mit demselben Virustyp (Iba et al., 2000). Diese Problematik kann durch den Einsatz verschiedener Virenstämme umgangen werden, die sich hinsichtlich ihrer viralen Hüllproteine unterscheiden, oder aber durch Kombination mit Elektroporation. Yasuda et al. konnten zeigen, daß nach Elektroporation replikationskompetenter GFP-RCAS Viren bereits nach 4 Stunden Genexpressin nachweisbar waren und daß sich der GFP positive Bereich durch Vermehrung der Viren im Verlauf mehrerer Tage vergrößerte (Yasuda et al., 2000). Zukünftige An-

wendungsgebiete der Elektroporation im Bereich der Entwicklungsbiologie umfassen die Transfektion von mRNA, von neutralisierenden Antikörpern und antisense Oligonukleotiden bzw. Morpholinos (Kos et al., 2001) um auf transkriptionellem Level molekularbiologische Abläufe während der Zellspezifizierung, Zellinteraktion und Organogenese zu untersuchen.

Analyse von Mutationen in entwicklungsbiologisch interessanten Genen war im Huhn bislang kaum möglich, da es technisch sehr anspruchsvoll ist, die Oozyte mit mutagenen Substanzen wie EMS zu behandeln. Darüberhinaus dauert es mehrere Monate bis das Huhn geschlechtsreif wird. Biotechnologisch gesehen ist die Erzeugung von transgenen Hühnern bedeutsam, da diese als lebende Pharmaziefabriken in ihren Eiern große Mengen an relevanten Substanzen, wie Antikörpern, Vorläufern von Impfstoffen usw. produzieren könnten. Da eine direkte Mikroinjektion in den Pro-Nukleus, wie sie sonst bei Herstellung transgener Nutztiere wie Schweine und Rinder angewandt wird, aufgrund des hohen Eiweißgehaltes nicht möglich ist, gelang es durch Elektroporation von primordialen Keimzellen transgene Hühner zu erzeugen (Hong et al., 1998).

5.2 EINSATZ VERSCHIEDENER TRANSFEKTIONSMETHODEN FÜR DIE SOMATISCHE GENTHERAPIE

Am effizientesten hinsichtlich somatischer Gentherapie sind auf rekombinanten Viren basierende Methoden, um Zellen zu transfizieren. Diese Art des Gentransfers wird in ungefähr 75 % der Gentherapieansätze verwendet. Mit Hilfe biophysikalischer Methoden wie Lipofektion oder Elektroporation ist zwar eine vergleichbar hohe Genexpression zu erzielen, aber das Ausmaß des Gentransfers ist nach wie vor begrenzt.

Am weitesten verbreitet als Ansatz für die Behandlung erblich bedingter Krankheiten wie Duchenne Muskeldystrophie oder Cystischer Fibrose sind daher auf Adenoviren beruhende Systeme. Diese Viren vereinen eine hohe Transfektionseffizienz mit der Fähigkeit, zahlreiche unterschiedliche Zelltypen unabhängig von deren proliferativem Status zu infizieren. In diesem Punkt sind sie den ebenfalls verwendeten Retroviren überlegen, die nur sich teilende Zellen infizieren können. Allerdings kann es zu starken Immunreaktionen gegen die viralen Hüllproteine im Körper des Patienten kommen, bis hin zum Tod durch einen immunologischen Schock (Lehrmann et al. 1999)

Diese Viren schleusen ihre RNA ins Erbgut ein, wo sie sich nach Umschreiben in cDNA

durch das virale Enzym reverse Transkriptase unspezifisch über Rekombination integrieren. Das virale Erbgut wird bei der Zellteilung mitrepliziert, wodurch auch alle Tochterzellen den entsprechenden Faktor produzieren. Die virale DNA kann jedoch nur in den Zellkern gelangen, wenn die Kernmembran beim Übergang von der G zur S Phase des Zellzyklus bei sich mitotisch teilenden Zellen degradiert wird. Da die Integration der viralen DNA dem Zufallsprinzip unterliegt, kann man nicht steuern, ob das Transgen unter den Einfluß eines starken oder schwachen Promotors kommt, was zu einer großen Schwankungsbreite des Genexpressionslevels führt. Im ungünstigsten Fall kann es durch das Integrationsereignis zur Ausschaltung oder Mißregulation zellulärer Genfunktionen kommen, was zu einer Erhöhung des Krebsrisikos beitragen dürfte. Um die unzureichende Zellspezifität der Retroviren zu umgehen, wird versucht, ihre membran-ständigen Andockproteine derart zu modifizieren, so daß sie nur noch mit zelltypspezifischen Rezeptoren interagieren können.

Um postmitotische Neurone oder Muskelzellen zu transfizieren, gibt es Bestrebungen, den Aidserreger HIV oder das Herpesvirus 1/2 zum Gentransport einzusetzen. Aus den oben genannten Mankos viraler Genterapie ist es wünschenswert andere Methoden zur Therapie von Tumoren und Erbkrankheiten zu finden.

Ansätze zur sogenannten Elektrochemotherapie in der Onkologie verlaufen sehr vielversprechend. Der Antitumor-Effekt hydrophiler Zytostatika wie Bleomycin wird durch Elektropermeabilisierung drastisch erhöht (Heller et al., 1998). In gleicher Weise können etwa Selbstmord oder Apoptose induzierende Gene oder Substanzen, die eine Immunantwort fördern, selektiv in Tumore eingebracht werden (Crystal, 1995; Vile, 1996). Zwar wird DNA auch nach einfacher intramuskulärer oder intraarterieller Injektion von Zellen aufgenommen, aber es hat sich gezeigt, daß eine hohe interindividuelle Variabilität bezüglich des Ausmaßes der Genexpression vorhanden ist. Dies dürfte eine klinische Anwendung vorläufig erschweren. Überdies ist der Level der Proteinexpression zu gering, als daß auf diese Weise eine effektive Behandlung erblich bedingter Krankheiten möglich ist. Durch Kombination mit Elektroporation können jedoch diese Schwierigkeiten umgangen und eine hohe Proteinexpression bis zu 9 Monaten erreicht werden (Mir et al., 1999).

6. ANHANG

6.1 Publikation

Gilbert Bernier, Wolfgang Vukovich, Lorenz Neidhardt, Bernhard G. Herrmann und Peter Gruss. Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium. *Development* **128**, 3987-3994

6.2 Zusammenfassung

Die Änderung des entwicklungsbiologischen Potentials einer Zelle und damit auch die Veränderung ihres Schicksals während der Embryogenese des Vertebratenembryos kann durch gezielte Überexpression morphoregulatorisch wirkender Proteine erreicht werden. Neben viralen Gentransfersystemen bieten sich aufgrund ihrer leichten Handhabung verschiedene auf physikalischen Prinzipien basierende Methoden, wie Lipofektion, Beschuß mit Mikropartikeln sowie die Elektroporation zur Einführung nackter DNA in Gewebestrukturen des Embryos an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze etabliert und verfeinert, um mit Hilfe der Elektroporation Gene in verschiedenen Stadien des Hühnerembryos, angefangen vom Beginn der Gastrulation bis hin zum Abschluß der Neurulation überzuexprimieren. Zur Analyse der veränderten Genexpressionsprofile wurde ein abgeändertes Verfahren der *In-situ*-Hybridisierung, basierend auf PCR generierten Matrizen entwickelt. Durch die Möglichkeit, ektopisch transiente Genexpressionen auch in frühen murinen Entwicklungsstadien zu erzielen, bietet sich nun die Perspektive, dies zusammen mit der in der Maus etablierten genetischen Manipulationsmöglichkeiten, wie Genverlustmutationen, als kombinatorischen Ansatz zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Vorgänge einzusetzen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Musterbildungsprozessen während der Ausbildung der Neuralplatte im Hühnerembryo. Es wurde mit Hilfe von Überexpressionsstudien die Rolle von *Geminin*, *BMP4* und *DLX5* in den Musterbildungsprozessen, die zur Anlage der Neuralplatte und zur Segregation von neuronalen und epidermalen Identitäten im Ektoderm führen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß ektopisch exprimiertes *BMP4*, ein *TGF- β* Faktor in der Lage ist, in allen drei Keimblättern den epidermalen Marker *MSX1* auf transkriptioneller und translationeller Ebene anzuschalten. Die Überexpression von *Geminin* führte zur Transkription des Homeoboxgens *MSX1* jedoch nicht zu der Umsetzung der *MSX1* RNA in eine funktionelle Peptidsequenz. Das durch den epidermalen Marker *BMP4* induzierbare Homeoboxgen *DLX5* ist in der Lage, die Expression von *BMP4* ektopisch in allen transgenen Zellen zu induzieren und könnte daher Teil einer positiven Rückkopplungsschleife sein. Alle drei untersuchten Faktoren führen zur Expression von Genen, die an der Grenze zwischen neuralem und epidermalen Ektoderm aktiv sind und tragen insofern zur Etablierung epidermaler, nicht jedoch neuraler Identitäten bei.

6.2 Summary

The change of the developmental potential and therefore fate of cells during vertebrate embryogenesis can be achieved by overexpression of morphoregulatory acting proteins. Besides a variety of gene transfer systems, which use different viral derived strategies for infection of eucaryotic cells, physical methods for introducing naked DNA into mammalian tissues have gained wide interest and practical applications. They include lipofection, microparticle bombardment and electroporation. In the first part of this thesis a series of different experimental setups were established in order to overexpress genes during gastrulation and neurulation stages of the developing chicken embryo. For the analysis of the altered gene expression profiles a modified method of the In-situ-hybridization analysis was developed using PCR generated templates for the labeling reaction. It was also possible to transfect young mouse embryos (8.5-9.5 dpc) and culture them in vitro. This offers the perspective of the combinatorial use of transient transfection techniques and classical knock-out strategies to design experiments for elucidating signal transduction cascades during developmentally regulated morphogenetic processes.

In the second part of this thesis the roles of the recently isolated protein *Geminin* as well as the homeobox protein *DLX5* and the TGF- β factor *BMP4* during induction of the neural plate and the establishment of epidermal identities were analyzed in gene overexpression experiments. It could be proved that ectopic expressed *BMP4* is capable of inducing the homeobox gene *MSX1* both on the transcriptional and the translational level, whereas *Geminin* only leads to transcription but not translation of the *MSX1* gene. The *BMP4* inducible gene *DLX5* could turn on *BMP4* expression and may be part of a positive feedback loop. Ectopic expression of all three factors therefore lead to induction of genes, which are involved in processes setting up the border between neural and non-neural ectoderm and support the establishment of epidermal identities.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BBR	Boehringer-Blockierungs-Reagenz
BGH	Rinder Wachstumshormon (engl. bovine growth hormon)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
DIG	Digoxigenin
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMEM	Zellkulturnährmedium (Dulbeccos modified eagle medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat
dpc	days post coitum, Tage nach der Plug-Bildung bei Mäusen, Kriterium der Altersbestimmung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EK	Einteilung der frühen Entwicklungsstadien des Hühnerembryos nach Eyal-Giladi und Kochav, 1976.
EST	Sequenzierter Abschnitt einer cDNA (engl. expressed sequence tag)
FCS	fetales Kälberserum
G	Guanin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HH	Stadien der Entwicklung des Hühnerembryos (Hamburger und Hamilton, 1951)
HMG	DNA-bindende Proteindomäne (engl. high mobility group)
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LB	Bakterienmedium (Luria Broth)
MAB	Maleinsäurepuffer
MCS	Multiple Klonierungsstelle in Vektoren (engl. multiple cloning site)
Min	Minute(n)

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Knoten (engl. node), die anteriore Spitze des Primitivstreifens
NBT-BCIP	Nitroblautetrazolium mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
NES	Kernexportsignal (engl. nuclear export signal)
nf	Neuralfalten
np	Neuralplatte
nt	Neuralrohr (engl. neural tube)
NTMT	Natriumchlorid-Tris-Magnesium-Tween-Puffer
OD 600	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PBT	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung mit Tween
PC	Pannett-Compton-Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
PNK	Polynukleotidkinase
pp	prächordale Platte
ps	Primitivstreifen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfat)
sec	Sekunden
T	Thymin
T3	RNA-Polymerase
T7	RNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (engl.: units)
UV	Ultraviolett
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem
μF	Elektrische Kapazität in 10 ⁻⁶ Faraday

6.4 Danksagung

Insbesondere möchte ich von ganzem Herzen Herrn Prof. Dr. Michael Kessel danken, daß er mir die Möglichkeit gab, in seinem gut ausgestatteten Labor zu arbeiten, für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und auch, daß er mir die Gelegenheit gab, an dem sehr instruktivem und horizontweiterndem Praktikum in Woodshole teilzunehmen. Er hat sich selber nichts von der Faszination nehmen lassen, die von der Arbeit mit sich entwickelnden Embryonen ausgeht, was oft dazu führte, daß er stundenlang, seinen Mitarbeitern im fensterlosen Hühnerraum mit Rat und Tat zu Seite stand und dabei meist selbnoch die besten Resultate zustande brachte. Die Arbeitsatmosphäre war stets locker und entspannt und wurde durch so manchen Ausflug in die biologische Feldforschung aufgemuntert, wie zum Beispiel ein Wochenende nach Spiekeroog, wo wir uns der Embryologie der Sandflöhe, Sturmseeschwalben und manch einer Robbe gewidmet haben.

Wiebke Behrens hat mich sowohl in die geheimnisvolle Welt der Herstellung von Embryokulturen eingeführt, begleitet von den sirenenhaften Klängen von NDR4, und hat sich auch als guter Geist in der Fabrikation von Schnitten aller Art. Dabei war sie stets zu einer anekdotenhaften Erzählung von ihren Katzen zu begeistern. Lars verdanke ich tiefere Einblicke in eine abgeklärte metaphysische Weltansicht, in das weltumspannende Imperium nordfriesischer Brautradition und die Erkenntnis, daß man auch eine 1 km lange Wegstrecke konsequent bei jedem Wetter mit dem Auto zurücklegen kann.. Herrn PD. Dr. Ahmed Mansouri gab mir manch wertvollen Tipp bei ausweglos scheinenden Experimenten, leistete einem bei Laboraufenthalten am Wochenende Gesellschaft und war stets für eine Mittagspizza zu motivieren. Außerdem sorgte er als alte Naschkatze dafür, daß meine Zähne vor übermäßigem Lochfraß durch Schokolade verschont wurden. Dieter Treichert, danke ich für die überlebenswichtigen Tipps in allen Techniken molekularbiologischen Arbeitens und hoffe, daß er demnächst seine gesammelten Erkenntnisse in einem Laborratgeber veröffentlicht. Die Durchführung zahlreicher Experimente gelang nur durch die Zusammenarbeit mit Hendrik Knötgen, dem ich auch die Möglichkeit der Fortführung des *Geminin* Projekts verdanke. Das flüssige Lesen dieser Arbeit wäre ohne die penible Korrekturlesearbeit von Dr. Ulrike Teichmann nicht möglich, die nicht müde wurde, auf fehlende Kommas, falsche wissenschaftliche Zusammenhänge und Ausdrucksschwächen hinzuweisen. Ohne die exzellenten Fähigkeiten von Bernhard Wolfrum hätte die Simulation elektrischer Felder in Embryonen nie gelingen können. Hans Peter Geithe und Sigurd

Hille danke ich für das unermüdliche Sequenzieren meiner zahlreichen Proben und Ralf Altschäffel für das Entwickeln ungezählter Filme. Den Graphikexperten der Reprostelle zolle ich Respekt im Umgang mit den ungeahnten Möglichkeiten der diversen Graphikprogramme.

Jens Poetsch, Britta Roman, Stefan Pabst, Julia Trautsch, Esther Krebs, Mark Göttmann, Sonja Hoffmann, Uli Reinhardt und Derek Spieler danke ich für ungezählte Kneipenbesuche, Kletterexkursionen, Spieleabende, Caipirinha Verkostungen und einfach dafür, daß sie da waren.

Meiner Schwester danke ich vor allem für den moralischen Beistand während der ganzen Zeit.

Großer Dank gebührt natürlich meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht haben, und mir über die Höhen und Tiefen dieser Jahre mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Acampora, D., Merlo, G.R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M.P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A. and Levi, G. 1999. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* **126**, 3795-3809

Allamane, S., Ratel, D., Jourdes, P., Berger, F., Benabid, A.L. and Wion, D. 2001. p53 status and gene transfer experiments using CMV enhancer/promotor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **280**, 45-47

Alexander, L., Lee, H., Rosenzweig, M., Jung, J.H. and Desrosiers, R.C. 1997. *BioTechniques* **23**(1), 64-66

Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350-5354

Andreason, G.L. and Evans, G.A. 1989. Optimization of electroporation for transfection in mammalian cells. *Anal. Biochem.* **180**, 269-275

Atkins, R.L., Wang, D. and Burke, R. 1999. Localized electroporation: a method for targeting expression of genes in avian embryos. *BioTechniques* **27**, 94-100

Auer, D., Brandner, G. and Bodemer, W. 1976. Dielectric breakdown of the red blood cell membrane and uptake of SV40 DNA and mammalian RNA. *Naturwissenschaften* **63**(8), 391

Baldino, F., Chesselet, M.F. and Lewis, M.E. 1989. High-resolution in situ hybridization histo-chemistry. *Methods in Enzymology* **168**, 761 - 777

Barembsum, M., Moreno, T. A., LaBonne, C.J.S. and Bronner-Fraser, M. 2000. Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. *Nature Cell Biol.* **2**, 219-225

Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino P.M. and Issa, J.P. 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72**, 141-196

Bei, M. and Maas, R. 1998. FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* **125**, 4325-4333

- Biehs, B., Francois, V. and Bier, E. 1996. The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes & Dev.* **10**, 2922-2934
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* **7**, 1513-1523
- Birse, C.E., Lee, B.A., Hansen, K. and Proudfoot, N.J. 1997. Transcriptional termination signals for RNA polymerase II in fission yeast. *EMBO J.* **16**, 3633-3643
- Blödorn, B., Brück, W., Rieckmann, P., Felgenhauer, K. and Mäder, M. 1998. A method for preventing artifactual binding of cRNA probes to neurons caused by *In-situ* hybridization. *Anal. Biochem.* **255**, 95-100
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J. and Cullen, B.R. 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type I rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4207-4214
- Bortier, H. and Vakaet, C.C. 1992. Fate mapping the neural plate and the intraembryonic mesoblast in the upper layer of the chicken blastoderm with xenografting and time lapse videography. *Development Supplement*, 93-97
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B. and Schaffner, W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of the human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E.M. 1996. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessel, T.M. and Ericson, J. 2000. A Homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-445
- Bronner-Fraser, M. 1986. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* **115**, 44-55.
- Bursch, W., Kleine, L. and Tenniswood, M. 1990. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell. Biol.* **68**, 1071-1074
- Buss, J.E., Der, C.J. and Solski, P.A. 1988. The 6 amino-terminal aminoacids of p60 src are sufficient to cause myristilation of p21-ras. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3960-3963
- Cahill, M.A., Ernst, W.H., Janknecht, R. and Nordheim, A. 1994. Regulatory squelching. *FEBS Letters* **344**, 105-108.
- Chalfie, M., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805

Chaney, W.G., Howard, D.R., Pollard, J.W., Sallustio, S. and Stanley, P. 1986. High-frequency transfection of CHO cells using polybrene. *Somatic Cell. Mol. Genet.* **12**, 237-244

Chitnis, A. and Kintner, C. 1996. Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition regulates the pattern of primary neurons in *Xenopus*. *Development* **122**, 2295-2301

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. 1994. Crystal structure of p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346-355

Clontech. 1996. Living Color GFP application notes. Clontech Lab, Palo Alto, CA

Cohen, S. M. , Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. and Jackle, H. 1989. Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**, 432-434

Cokol, M., Nair, R., and Rost, B. 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports* **1**, 311-415

Conlon , R.A., Reaume, A.G. and Rossant, J. 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545

Corbo, J.C., Levine, M. and Zeller, W.R. 1997. Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promotor region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* **124**, 589-602

Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173** (1), 33-38

Coster, H.G.L. 1965. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of „punch trough“, *Biophys. J.* **5**, 669-686

Cook, P.R. 1999. The organization of replication and transcription. *Science* **284**, 1790-1795

Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail chick chimeras II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol.* **120**, 198-214

Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. 1988. The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development* **103**, 100-113

Crane, J.S. and Pohl, H.A. J. 1972. Theoretical models of cellular dielectrophoresis. *J. of Theoretical Biology* **37** (1), 15-41

Crysta, L.R.G. 1995. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* **270**, 404-410

d'Alessio, J. 1987. *Focus* **9** (1), 11-12

- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y. and Davies, D.R. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-373
- Depew, M.J., Liu, J.K., Lomg, J.E., Presley, R., Meneses, J.J., Pedersen, R.A. and Rubenstein, J.L. 1999. Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* **126**, 3831-3846
- Dickinson, M.E., Selleck, M.A.J., McMahon, A.P. and Bronner-Fraser, M. 1995. Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* **121**, 2099-2106
- Di Gregorio, A. and Levine, M. 1998. Ascidian embryogenesis and the origins of the chordate body plan. *Current Opinion in Genetics and Development*. **8**, 457-463
- Dieci, G. and Sentenac, A. 1996. Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III. *Cell* **84**, 245-252
- Dietrich, S., Schubert, F.R. and Lumsden, A. 1997. Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. *Development* **124**, 3895-3908
- Diffley, J.F.X. 2001. Building the perfect switch. *Current Biology* **11**, R 367-370
- Dobrinski, P. 1993. Physik für Ingenieure. Gunter Krakau Anselm Vogel Verlag, Stuttgart
- Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C. and Niehrs, C. 1997. BMP4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* **124**, 2325-2334
- Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L. and Vincent, A. 1998. XCoE2, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **8**, 199-209
- Dye, M.J. and Proudfoot, N.J. 1999. Terminal exon definition occurs cotranslationally and promotes termination of RNA polymerase II. *Mol. Cell.* **3**, 371-378
- Dye, M.J. and Proudfoot, N.J. 2001. Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA Polymerase II. *Cell* **105**, 669-681
- Eide, F.F., Eisenberg, S.R. and Sanders, T.A. 2000. Electroporation mediated gene transfer in free swimming embryonic *Xenopus laevis*. *FEBS Letters* **486**, 29-32
- Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P. and Campell, J.L. Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: a biochemical analysis. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3263-3277
- Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H. and Blum, M. 1997. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP4. *Mech. Dev.* **63**, 39-50
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13

- Fernandez, J., Yaman, I., Mishra, R., Merrick, W.C., Snider, M.D., Lamers, W.H. and Hatzoglou, M. 2001. Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12285-91
- Foung, S.K.H. and Perkins, S. 1998. Electric field induced cell fusion and human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* **116**, 117-122
- Fukuda, K., Sakamoto, N., Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Iba, H. and Yasugi, S. 2000. Application of efficient and specific gene transfer systems and organ culture techniques for the elucidation of mechanisms of epithelial mesenchymal interaction in the developing gut. *Develop. Growth Differ.* **42**, 207-211
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-311
- Furuta, Y., Piston, D.W. and Hagan, B.L. 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* **124**, 2203-2212
- Gaiano, N. and Fishell, G. 1998. Transplantation as a tool to study progenitors within the vertebrate nervous system. (Review). *Journal of Neurobiology* **36**(2), 152-161
- Gandrillon, O., Solari, F., Legrand, C., Jurdic, P. and Samarut, J. 1996. A rapid and convenient method to prepare DIG-labelled RNA probes for use in non-radioactive in-situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes* **10**, 51-55
- Garstang, W. 1928. The morphology of the tunicata and its bearings on the phylogeny of the chordata. *Q.J. Microsc. Sci.* **72**, 51-187
- Gilbert, S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th Edition. Sinauer Associates, Inc, Massachusetts
- Gohlke, P. 1959. Über die Zeugung der Geschöpfe. Die Lehrschriften des Aristoteles, herausgegeben, übertragen und in ihrer Entstehung erläutert. Ferdinand Schöningh, Paderborn
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R. and Gruss P. 1991. Pax3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO Journal* **10**, 1135-1147
- Görlich, D. and Kutay, U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 607-660
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. 1972. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467
- Grapin-Botton, A., Majithia, A.R. and Melton, D.A. 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes & Development* **15**, 444-454

- Gray, A. M. and Mason, A. J. 1990. Requirements for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328-1330
- Greger, I.H. and Proudfoot, N.J. 1998. Poly(A) signals control both transcriptional termination and initiation between the tandem Gal10 and Gal7 genes of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 4771-4779
- Günzburg, W.H. 1997. Gentransfer in Säugetierzellen, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Haas, J., Park, E.C. and Seed, B. 1996 Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6** (3), 315-324
- Hall, P.A., Meek, D. and Lane, D.P. 1996. p53-integrating the complexity. *J. Pathol.* **180**, 1-5
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49-92.
- Hamilton, W.A. and Sale, J.A.H. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochem Biophys. Acta* **148**, 789-800
- Hammonds, R. G., Schwall, R., Dudley, A., Berkemeier, L., Lai, C., Lee, J., Cunningham, N., Reddi, A. H., Wood, W. I. and Mason, A.J. 1991. Bone-inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol. Endocrin.* **5**, 149-155
- Hansen, C.S., Marion, C.D., Steele, K., George, S. and Smith, W.C. 1997. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development* **124**, 483-492
- Hardcastle, Z. and Papalopulu, N. 2000. Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27^{XIC1} and imparting a neural fate. *Development* **127**, 1303-1314
- Harrison, R.L., Byrne, B.J. and Tung, L. 1998. Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Letters* **435**, 1-5
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828
- Hazama, M., Aono, A., Ueno, N. and Fujisawa, Y. 1995. Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem. & Biophys. Res. Com.* **209**, 859-866
- Heller, R. and Grasso, R.J. 1990. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion in vivo. *Biochem. Biophys. Acta.* **1024**, 185-188
- Heller, R., Jaroszeski, M.J., Reintgen, D.S., Puleo, C. A., DeConti, R.C., Gilbert, R.A. and Glass, L. F. 1998. *Cancer* **83**, 148-157

- Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., Nicolau, C. 1996. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Letters* **389** (3), 225-228
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G. and Melton, D.A. 1994. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 238-295
- Hennecke, M., Kwissa, M., Metzger, K., Oumard, A., Kroger, A., Schirmbeck, R. and Reimann, J.H.H. 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Research* **29**, 3327-3334
- Hibino, M.M., Shigemori, H., Itoh, K., Nagayama, K. and Kinoshita, Jr. 1991. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* **59**, 209-220
- Hibino, M.M., Itoh, K. and Kinoshita, Jr. 1993. Time course of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* **64**, 1789-1800
- Hong, Y.H., Moon, Y.K., Jeong, D.K. and Han, J.Y. 1998. Improved transfection efficiency of chicken primordial germ cells for the production of transgenic poultry. *Transgenic Research* **7**, 247-252
- Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Emond, P.M. and Harland, R.M. 1998. The Xenopus dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol. Cell.* **1**, 673-683
- Hui, S.W., Stoicheva, N. and Zhao, Y.L. 1996. High efficiency loading, transfection and fusion of cells by electroporation in two phase polymer systems. *Biophys. J.* **71**, 1123-1130
- Iba, H. 2000. Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors. *Develop. Growth Differ.* **42**, 213-218
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E. and Levine, M. 1992. The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development.* **6**, 1728-39
- Isaac, A., Sargent, M.G. and Cooke, J. 1997. Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301-1304
- Itasaki, N., Bel-Vialar, S. and Krumlauf, R. 1999. Shocking developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nature Cell Biology* **1**, 203-207
- Jackson, P., Bos, E. and Braithwaite, A.W. 1993. Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancers/promoters. *Oncogene* **8**, 589-597
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. 1995. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267**, 1498-1502

- Jiang, R., Lan, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P. and Gridley, T. 1998. The slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice. *Developmental Biology* **198**, 277-285.
- Keller, J.M. and Alwine, J.C. 1985. Analysis of an activatable promotor: sequences in the simian virus 40 late promotor required for T-antigen-mediated transactivation. *Molecular and Cellular Biology* **5(8)**, 1859-69
- Kerkhoff, E. and Ziff, E.B. 1995. Deregulated messenger RNA expression during T cell apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4857-4863
- Klement, J.F., Moorefield, M.B., Jorgensen E., Brown, J.E., Risman, S. and McAllister, W.T. 1990. Discrimination between bacteriophage T3 and T7 promoters by the T3 and T7 RNA polymerases depends primarily upon a three base-pair region located 10-12 base-pairs upstream from the start site. *J. Mol. Biol.* **215**, 21-29
- Klenchin, V.A., Sukharev, S.I.S.M., Sreov, L.V. Chernomordik and Chizmadzhev, Y.A. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* **60**, 804-811
- Knoetgen, H., Viebahn, C. and Kessel, M. 1999b. Head induction in the chick by primitive endoderm of mammalian, but not avian origin. *Development* **126**, 815-825
- Koch-Brandt, C. 1993. *Gentransfer*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kornitzer, D. and Ciechanover, A. 2000. Modes of regulation of ubiquitin mediated protein degradation. *Journal of Cellular Physiology* **182**, 1-11
- Kos, R.R., Johnson, R.L. and Erickson, C.A. 2001. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* **128** (8), 1467-79
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Houperker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K. and Ogura, T. 2000. Tbx5 and the retinotectum projection. *Science* **287**, 134-137
- Koster, R.W. and Fraser, S.E. 2001. Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Developmental Biology* **233** (2), 329-46
- Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J. and Grosschedl, R. 1996. Lef1 expression is activated by BMP4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes & Development*. **10**, 1382-1394
- Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M. and Kirschner, M.W. 1998. Geminin a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development* **125**, 3247-3258
- Kraus, K. 1932. Bakterien im elektrischen Kraftfeld. *Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg.* **124**, 64-70

- Krieg, P. A. and Melton, D. A. 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research* **12**, 7057-7070
- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. 1998. Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for the two-signal model. *Development* **125**, 2403-2414
- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. 1999. Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 81-112
- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yanopoulos, G.D. and Harland, R.M. 1993. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-718
- Le Douarin, N.M. and Teillet, M.A. 1973. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchyme derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev. Biol.* **41**, 162-184
- Le Douarin, N.M. and Kalcheim, C. 1986. Requirement of a neural tube signal for the differentiation of neural crest cells into dorsal root ganglia. *Developmental Biology* **116** (2), 451-466
- Lee, T., Bradley, M.E. and Walowitz, J.L. 1998. Influence of promotor potency on the transcriptional effects of YY1, SRF, and Msx-1 in transient transfection analysis. *Nucleic Acids Research* **26** (13), 3215-3220
- Lee, K.V., Dietrich, P. and Jessel, T.M. 2000. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* **403**, 734-740
- Lehrmann, S. 1999. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* **401**, 517-518
- Li, W., Cogswell, C.A. and LoTurco, J.J. 1998. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J. Neurosci.* **18**, 8853-8862
- Liem, Jr., K.F., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T.M. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979
- Liem, Jr., K.F., Tremml, G. and Jessell, T.M. 1997. A role for the roof plate and its resident TGF β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-138
- Lin, Y.C., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. and Green, M.R. 1991. Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* **353**, 569-571
- Liszewski, K. 1998. Nonviral strategies for gene therapy. *Genetic Engineering News* **1**
- Liu, X. and Berk, A.J. 1995. Reversal of in vitro p53 squelching by both TFIIB and TFIID. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6474-6478

- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H. and Ke, N.J. 1999. Is green fluorescent protein toxic to the living cell. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **260**, 712-717
- Lo, D.C., Mc Allister, K. and Katz, L.C. 1994. Neuronal transfection in brain slices using particle mediated gene transfer. *Neuron*.**13**, 1263-1268
- Locascio, A., Aniello, F., Amoroso, A., Manzanares, M., Krumlauf, R. and Branno, M. 1999. Patterning the ascidian nervous system: structure, expression and transgenic analysis of the CIHOX3 gene. *Development* **126**, 4737-4748
- Lokhande, M.P., Arbad, B.R., Landge, M.G. and Mehrotar, S.C. 1996. Dielectric properties of albumin and yolk of avian eggs. *Indian journal of Biochem. and Biophys.* **33**, 156-158
- Louvi, A. and Wassef, M. 2000. Ectopic engrailed 1 expression in the dorsal midline causes cell death, abnormal differentiation of circumventricular organs and errors in axonal pathfinding. *Development* **127**, 4061-4071
- Lumsden, A.G. and Davis, A.M. 1983. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* **306**, 786-788
- Ma, O., Kintner, C. and Anderson, D.J. 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal differentiation gene. *Cell* **87**, 43-52
- Mabie, P.C., Mehler, M.F. and Kessler, J.A. 1999. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J. Neurosci.* **19**, 7077-7088
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. and Zhang, J. 1996. Applications of network Blast server. *Methods Enzymol.* **266**, 131-141
- Madine, M. and Laskey, R. 2001. Geminin bans replication license. *Nature Cell Biology* **3**, 1-3
- Manak, J.R. and Scott, M.P. 1994. A class act: conservation of homeodomain protein functions (Review). *Development Supplement*, 61-77
- Marazzi, G., Wang, Y. and Sassoon, D. 1997. Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4 mediated programmed cell death pathway. *Dev. Biol.* **186**, 127-138
- Martin, K.J., Lillie, J.W. and Green, M.R. 1990. *Genes & Development.* **4**, 2376-2382
- Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 597-641
- Mathis, L., Kulesa, P.M. and Fraser, S.E. 2001. FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression. *Nature Cell Biology* **3**, 559-566

- Matsunaga, E., Araki, I. and Nakamura, H. 2000. Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax6. *Development* **127**, 2357-2365
- Matz, M.V., Tradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.C., Markelov, M.L. and Lukyanov, S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnol.* **17**, 969-73
- Mikawa, T., Cohen Gould, L. and Fischmann, D.A. 1992. Conal analysis of cardiac morphogenesis in the chicken embryo using a replication defective retrovirus III. Polyclonal origin of adjacent ventricular myocytes. *Dev. Dyn.* **193**, 11-23
- Millar, M.R., Sharpe, R.M., Maguire, S.M., Gaughan, J., West, A.P. and Saunders P.T.K. 1994. Localization of mRNAs by in-Situ hybridization to the residual body at stages IX-X of the cycle of the rat seminiferous epithelium: fact or artefact? *Int. J. Androl.* **17**, 149-160
- Mima, T., Ueno, H., Fischmann, D.A., Williams, L.T. and Mikawa, T. 1995. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 467-471
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. and Scherman, S. 1999. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 4262-4267
- Mitrani, E., Ziv, T., Thomsen, G., Shimoni, Y., Melton, D.A. and Bril, A. 1990. Activin can induce the formation of axial structures and is expressed in the hypoblast of the chick. *Cell* **63**, 495-501
- Miyama, K., Yamada, G., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Miyado, K., Sakai, M., Ueno, N. and Shibuya, H. 1999. A BMP inducible gene, DLX5, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Developmental Biology* **208**, 123-133
- Moran, E. 1993. DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle (review) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 63-70
- Mizuzeki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S. and Sasai, Y. 1998. Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development* **125**, 579-587
- Morasso, M.L., Markova, N.G. and Sargent, T.D. 1996. Regulation of epidermal differentiation by a distal-less homeodomain gene. *J. Cell. Biol.* **135**, 1879-1887
- Morasso, M.I., Grinberg, A., Robinson, G., Sargent, T.D. and Mahon, K.A. 1999. Placental failure in mice lacking the homeobox gene DLX3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 162-167
- Mouneimne, Y., Pierre-Francois, T., Barhoumi, R. and Nicolau, C. 1991. Electroinsertion of xeno proteins into red blood cell membrane yields a long lived protein carrier in circulation. *Biochem. Biophys. Acta* **1066**, 83-89

- Moury, J.D. and Jacobson, A.G. 1990. The origins of neural crest cells in the axolotl. *Dev. Biol.* **141**, 243-253
- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. and Okumura, J. 1997. Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochemical and biophysical research communications.* **230**, 376-380
- Muramatsu, T., Shibata, O., Ryoki, S., Ohmori, Y. and Okumura, J. 1997. Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 45-49
- Murray, E.J. and Walker, J.M. 1989. Gene expression in vivo. *Methods in Molecular Biology*, Volume 7, Humana Press. Inc. Clifton, N.J.
- Mussauer, H., Sukhorukov, V.L., Haase, A. and Zimmermann, U. 1999. Resistivity of red blood cells against high-intensity, short duration electric field pulses induced by chelating agents. *J. Membr. Biol.* **170**, 121-133
- Nakagawa, S. and Takeichi, M. 1998. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* **121**, 1321-1332
- Needham, J. 1959. *A History of Embryology*. Cambridge: Cambridge University Press
- Nelson, W.G. and Kastan, M.B. 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1815-1823
- 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
- New, D.A.T. 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J. Embryol. Exp. Morph.* **3**, 320-331
- Nieto, M.A., Sargent M.G., Wilkinson, D.G. and Cooke, J. 1994. Control of cell behaviour during vertebrate development by slug, a zinc finger gene. *Science* **264**, 835-839
- Nilswender, K.D., Blackman, S.M., Rohde, L., Magnuson M.A. and Piston D.W. 1995. Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cell: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *Journal of Microscopy* **180**, 109-116
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1994. Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 6320-6324

- Nishi, T., Kimio, Y., Yanashiro, S., Takeshima, H., Sato, K., Hamada, K., Kitamura, I., Yoshimura, T., Saya, H., Kuratsu, J. and Ushio, Y. 1996. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res.* **56**, 1050-1055
- Nguyen, V.Q., Co, C., Irie, K. and Li, J.J. 2000. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr. Biol.* **10**, 195-205
- Nony, P., Hannon, R., Gould, H. and Felsenfeld, G. 1998. Alternate promoters and developmental modulation of expression of the chicken Gata-2 gene in hematopoietic progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry* **273** (49), 32910-32919
- Ochiai, H., Park, H.M., Nakamura, A., Sasaki, R., Okumura, J. and Muramatsu, T. 1998. Synthesis of human erythropoietin in vivo in the oviduct of laying hens by localized in vivo gene transfer using electroporation. *Poultry Sci.* **77**, 299-302
- Oh, S.K. and Sarno, P. 1993. Gene regulation: initiation by internal ribosome binding. *Current Opinion Genet. Develop.* **3**, 295-300
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C.E. and Harris, W.A. 1999. p27XICI, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* **99**, 499-510
- Oppenheimer, J.M. 1936. Structures developed in amphibians by implantation of living fish organizer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34**, 461-463
- Palumbo, G., Caruso, M., Crescenzi, E., Tecce, M.F., Roberti, G. and Colasanti, A. 1996. Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* **36**, 41-46
- Pannett, C.A. and Compton, A. 1924. The cultivation of tissues in saline embryonic juice. *Lancet* **205**, 381-384
- Paul, J., Canatella, Joan. F., Karr, John A. and Prausnitz, R. 2001. Quantitative study of electroporation mediated molecular uptake and cell viability. *Biophysical Journal* **80**, 755-764
- Pecorino, L.T. and Lo, D.C. 1992. Having a blast with gene transfer. *Curr. Biol.* **2**, 30-32
- Pera, E., Stein, S. and Kessel, M. 1999. Ectodermal patterning in the avian embryo: epidermis versus neural plate. *Development* **126**, 63-73
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. and Hellen, C.U. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes (Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7029-36
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E.M. 1996. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP4. *Cell* **86**, 589-598

- Popperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S.K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R.S. and Krumlauf, R. 1995. Segmental expression of Hoxb1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* **81**, 1031-1042
- Porschke, D., Meier, M.J. and Ronnenberg, J. 1984. Interactions of nucleic acids double helices induced by electric field pulses. *Biophys. Chem.* **20**, 225-235
- Porteus, M.H., Bulfone, A., Liu, J.K., Puellas, L., Lo, L.C. and Rubenstein, J.L. 1994. DLX-2, MASH-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J. Neurosci.* **14**, 6370-6383
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111** (2), 229-233
- Price, M., Lemaistre, M., Pischetola, M., Di Lauro, R. and Duboule, D. 1991. A mouse gene related to distal-less shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* **351**, 748-751
- Proudfoot, N.J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends. Biochem. Sci.* **14**, 105-110
- Pugh, B.F. and Tjian, R. 1992. Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex (Review). *J. Biol. Chem.* **267**, 679-682
- Ptashne, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work (Review). *Nature* **335**, 683-689
- Ptashne, M. and Grann, A.A.F. 1990. Activators and targets (Review). *Nature* **346**, 329-331
- Pyronnet, S. and Sonnenberg, N. 2001. Cell cycle dependent translational control (Review). *Curr.Opinion Genet.& Development* **11**,13-18
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J. and Richardson, H. 2001. The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication in anaphase and in neurogenesis. *Genes & Development* **15**, 2741-2754
- Raatikainen-Ahokas, A.M., Immonen, Tiina M., Rossi, P.O., Sainio, K.M.H. and Sariola, H.V. 2000. An artifactual In-situ hybridization signal associated with apoptosis in rat embryo. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **48** (7), 955-961
- Reddy, J.C., Hosono, S. and Licht, J.D. 1995. The transcriptional effect of WT1 is modulated by the choice of expression vectors. *J. Biol. Chem.* **270**, 29976-29982
- Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. and Lee, M.G. 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* **20**, 102-110

- Remy, J.S., Sirlin, C., Vierling, P. and Behr, J. 1994. Gene transfer with a series of lipophilic DNA binding molecules. *Bioconjug-Chem.* **5** (6), 647-654
- Renzing, J. and Lane, D.P. 1995. p53 dependent growth arrest following calcium phosphate mediated transfection of murine fibroblasts. *Oncogene* **10** (9), 1865-1868
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P.M., Sharpe, P.T. and Scotting, P.J. 1997. Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev. Dyn.* **209**, 323-332
- Rhodes, S.J., Di Matthia, G.E. and Rosenfeld, M.G. 1994. Transcriptional mechanisms of anterior pituitary cell differentiation. *Curr. Op. Genet. Dev.* **4**, 709-717
- Robinson, G.W. and Mahon, K. A. 1994. Differential and overlapping expression domains of Dlx-2 and Dlx-3 suggest distinct roles for distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech. Dev.* **48**, 199-215
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe Y., Chang, D.T., Beachy, P.A. and Jessel, T.M. 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the aminoterminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-55
- Rols, M.P. and Teissie, J. 1990b. Electroporation of mammalian cells. *Biophys. J.* **58**, 1089-1098.
- Rols, M.P., Coulet, D. and Teissie, J. 1992. Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur. J. Biochem.* **206**, 115-121
- Rols, M.P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S. and Teissie, J. 1998. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature Biotechnology* **16**, 168-171
- 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**, 487-91
- Sale, J.A.H. and Hamilton, W. A. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochem. Biophys. Acta* **148**, 781-788
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**, 104-108
- Sanker, K. 1991. "Mosaik work" and "assimilating effects" in embryogenesis: Wilhelm Roux's conclusions after disabeling frog blastomeres. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **200**, 237-239

- Sankers, K. 1992. Shaking a concept: Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 265-267
- Sanders, E., Varedi, M. and French, A.S. 1993. Cell proliferation in the gastrulating chick embryo: a study using BrdU incorporation and PCNA localization. *Development* **118**, 389-399
- Santhanam, U., Ray, A. and Sehgal, P.B. 1991. Repression of the interleukin 6 promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7605-7609
- Sasai, Y. and De Robertis, E.M. 1997. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Developmental Biology* **182**, 5-20
- Sato, T., Araki, I. and Nakamura, H. 2001. Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* **128**, 2461-2469
- Schaffner, W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2163-2167
- Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. and Rohrer, H. 1999. Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* **24**, 861-870
- Schlunegger, M.P. and Grutter, M.G. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* **358**, 430-434
- Schmutte, C. and Jones, P.A. 1998. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol. Chem.* **379**, 377-88
- Schultheiss, T.M., Burch, J.B. and Lassar, A.B. 1997. A role for morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **11**, 451-462
- Schwartz, M., Eberhart, J., Mastick, G.S. and Krull, C.E. 2001. Sparking New Frontiers: Using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Developmental Biology* **233**, 13-21
- Selleck, M.A.J. and Bronner-Fraser, M. 1995. Origin of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* **121**, 525-538
- Sersa, G., Cemazar, M., Semrov, D. and Miklavcic, D. 1996b. Changing electrode orientation improves the efficiency of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **39**, 61-66
- Sharff, M.D. and Robbins, E. 1966. Polyribosome disaggregation during metaphase. *Science* **151**, 992-995
- Shiio, Y., Yamamoto, T. and Yamaguchi, N. 1992. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5206-5210

- Shou, J., Rim, P. and Calof, A.L. 1999. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat. Neurosci.* **2**, 339-345
- Small, S., Blair, A. and Levine, M. 1992. Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *Embo J.* **11**, 4047-4057
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- Sporn, M.B. and Roberts, A.B. 1992. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J. Cell. Biol.* **119**, 1017-1021
- Stock, D.W., Ellies, D. L., Zhao, Z., Ekker, M., Ruddle, F.H. and Weiss, K. M. 1996. The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10858-10863
- Streit, A. and Stern, C.D. 1998. Mesoderm and Somite patterning during node regression: differential roles of *noggin* and *chordin*. *Mechanism of Development* **85**, 85-96
- Streit, A., Lee, K.J., Woo, L., Roberts, C., Jessell, T. and Stern, C.D. 1998. *Chordin* regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* **125**, 507-519
- Streit, A. and Stern, C.D. 1999a. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mechanisms of Development* **82**, 51-66
- Suemori, H., Kadokawa, Y., Goto, K., Araki, I., Kondoh, H. and Nakatsuji, N. 1990. A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryos and ubiquitous beta-galactosidase expression. *Cell Differ. Dev.* **29**, 181-186
- Sugihara, K., Park, H.M. and Muramatsu, T. 2000. Foreign gene expression by in vivo gene electroporation in the quail testis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.* **125**, 47-52
- Sugiyama, S., Funahashi, J. and Nakamura, H. 2000. Antagonizing activity of chick *Grg4* against tectum-organizing activity. *Developmental Biology* **221**, 168-180
- Suzuki, A., Kaneko, E., Maeda, J. and Ueno, N. 1997. Mesoderm induction by BMP4- and -7 heterodimers. *Biochem. & Biophys. Res. Com.* **232**, 153-156
- Subler, M. A., Martin, D.W. and Deb, S. 1992. Inhibition of viral and cellular promoters by human wildtype p53. *J. Virol.* **66**, 4757-4762
- Sukharev, S.I., Klenchin, S.M., Sreov, L.V., Chernomordik, V.A. and Chizmadzhev, Y.A. 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys. J.* **63**, 1320-1327
- Sukhorukov, V.L., Mussauer, H. and Zimmermann, U. 1998. The effect of electrical deformation forces on the electropermeabilisation of erythrocyte membrane in low and high conductivity media. *J. Membrane Biol.* **163**, 235-45

Summerbell, D. and Lewis, J.H. 1975. Time, place and positional value in chick limb morphogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **33**, 621-643

Susil, R., Semrov, D. and Miklavcic, D. 1998. Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electr. Magnetobiol.* **17**, 391-399

Tabata, H. and Nakajima, K. 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience Vol* **103**, No 4, 865-872

Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. 2001. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nature Cell Biol.* **3**, 107-113

Tanabe, Y. and Jessel, T.M. 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115-1123

Tanford, C. 1970. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **21**, 1-152

Tantravahi, J., Alvira, M. and Falck-Pedersen, E. 1993. Charakterization of the mouse β^{maj} -globin transcription termination region: a spacing sequence is required between the poly(A) signal sequence and multiple downstream termination elements. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 578-587

Tasaki, N., Bel-Vialar, S. and Krumlauf, R. 1999. 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nature Cell Biol.* **1**, 203-207.

Teissie, J.; Knutson, V.P., Tsong, T.Y. and Lane, M.D. 1982. Electric pulse induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. *Science* **216**, 537-538

Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weismann, I. and Siebert, P. 2000. Fluorescent timer: protein that changes color with time. *Science* **290**, 1585-1588

Titomirov, A.V., Sukharev, S. and Kistanov, E. 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **1088**, 131-134

Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N. and Takahashi, Y. 1997. Mesodermal subdivision along the mediolaterallateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP4. *Development* **124**, 1975-1984

Toneguzzo, F., Hayday, A.C. and Keating, A. 1986. Electric field mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell. Biol.* **6**, 703-706

Tsong, T.Y. 1990. Electric modulation of membrane proteins: enforced conformational oscillation and cellular energy and signal transductions. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 83-106

- Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* **60**, 297-306
- Vainio, S., Karavanova, I., Jowett, A. and Thesleff, I. 1993. Identification of BMP4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **75**, 45-58
- Van Baer, K.E. 1828. *Entwicklungsgeschichte der Tiere. Beobachtungen und Reflexionen.* Bornträger Königsberg.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. 1999. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254
- Vile, R.C. 1996. Gene therapy for cancer- in the dock, blown off course or full speed ahead? *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 283-286
- Waddington, C.H. 1933. Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. *J. exp. Biol.* **10**, 38-46
- Watabe, T., Kim, S., Candia, A., Rothbacher, U., Hashimoto, C., Inoue, K. and Cho, K.W. 1995. Molecular mechanisms of Spemann's organizer formation. conserved growth factor synergy between *Xenopus* and mouse. *Genes & Dev.* **9**, 3038-3050
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. 1993. *Rekombinierte DNA*, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Wilkinson, D.G. 1992. *In Situ Hybridisation: a Practical Approach.* London: Oxford University Press
- Winterbourne, D.J., Thomas, S., Hermon-Taylor, J., Hussain, I. and Johnstone, A.P. 1988. Electrically shock mediated transfection of cells. *Biochem. J.* **251**, 427-434
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. and Dutta, A. 2000. Inhibition of eukaryotic DNA replication by Geminin binding to Cdt1. *Science* **290**, 2309-2312
- Wolf, H., Rols, M.P., Bold, E., Neumann, E. and Teissie, J. 1994. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* **66**, 524-31
- Wolff, J.A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer in mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-1468
- Wilkinson, D. G. 1992. *In Situ Hybridisation: a Practical Approach.* London: Oxford University Press.
- Wolpert, L. 1995. Evolution of the cell theory. *Phil. Trans Roy. Soc. Lon. B* **349**, 227-233
- Wolpert, L. 1998. *Principles of Development.* Current Biology LTD, Oxford University Press
- Wong, T.K and Neumann, E. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 584-587

- Wu, C.F., Nakamura, H., Chan, A.P.Y., Zhou, Y.H., Cao, T., Kuang, J., Gong, S.G., He, G. and Laurence, D.E. 2001. Tumorhead, a *Xenopus* gene product that inhibits neural differentiation through regulation of proliferation. *Development* **128**, 3381-3393
- Yang, L., Zhang, H., Hu, G., Wang, H., Abate-Shen, C. and Shen, M.M. 1998. An early phase of embryonic *dlx5* expression defines the rostral boundary of the neural plate. *The Journal of Neuroscience* **18**, 8322-8330
- Yasuda, K., Momose, T. and Takahashi, Y. 2000. Application of microelectroporation for studies of chick embryogenesis. *Develop. Growth Diff.* **42**, 203-206
- Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.W., Busslinger, M. and Rosenthal, A. 2001. Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Development* **129**, 3817-3822
- Ying, S.Y. 1989. Inhibins, activins and follistatins. *J. Ster. Bioch.* **33**, 705-713
- Zhang, H., Hu, G., Wang, H., Sciavolino, P., Iler, N., Shen, M.M. and Abate-Shen, C. 1997. Heterodimerization of MSX and DLX homeoproteins results in functional antagonism. *Mol. Cell Biology* **17**, 2920-2932
- Zhang, L., Lingna, Li., Hofmann, G.A. and Hoffmann, R.M. 1996. Depth targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 633-636
- Zhu, L. and Skoultschi, A.I. 2001. Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 91-97
- Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M. and Harland, R.M. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenic protein 4. *Cell* **86**, 599-606
- Zimmermann, U., Schulz, J. and Pilwat, G. 1973. Transcellular ion flow in *E. Coli* B. and electrical sizing of bacteria. *Biophys. J.* **13**, 1005-10013
- Zimmermann, U., Friedrich, U., Mussauer, H., Gessner, P., Hämel, K. and Sukhorukov, V.L. 1999. Elektromanipulations of mammalian cells: Fundamentals and applications. *IEEE Trans. Plasma Science*

LEBENS LAUF

NAME: Wolfgang Andres Vukovich

GEBURTSDATUM: 11.09.72

GEBURTSORT: Wien

NATIONALITÄT: Österreich

AUSBILDUNG: **Gymnasium:** (1983-1992) Albrecht Altdorfer Gymnasium Regensburg

Biologiestudium an der Universität Regensburg (1992-1998)

Auslandsstudium im Rahmen eines DAAD Stipendiums an der Medical School der Washington University in St Louis, Missouri, USA (1995-1996)

Diplomarbeit (1996-1997): Molekulare Charakterisierung des Neurodegenerationsgens *bizarre* in *Drosophila melanogaster* am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. Schneuwly)

3 monatiger **Forschungsaufenthalt** am Marine Science Department der Otago University in Dunedin, Neuseeland (1997)

7 wöchiges Praktikum "Embryology" (Leiter: Scott F. Fraser, Caltech) am Marine Biological Laboratory in Woods Hole, Massachusetts, USA (1999)