Funktionsanalyse der Entwicklungskontrollgene *Irx2* und *Mash1* in der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

May-Britt Becker

aus Köln

Göttingen 2002

Diese Arbeit wurde am

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,

Karl-Friedrich-Bonhoefer-Institut

Abteilung: Molekulare Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. Peter Gruss

durchgeführt.

D7

Referent: Professor Dr. P. Gruss

Korreferent: Professor Dr. U. Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung **1**

II. Ergebnisse **16**

II.1. Strukturanalyse des Irx2-Gens 16

II.1.1. Sequenzanalyse der Irx2-cDNA 16

II.1.2. Irx2-Proteinsequenzanalyse 22

II.1.3. Das Irx2-Antiserum 26

II.1.4. Identifikation des genomischen Klon des Irx2-Gens 28

II.1.4.1 Durchmustern einer genomischen Phagenbank 29

II.1.4.2 Sequenzanalyse des genomischen Irx2-Klons 30

II.1.5. Chromosomale Lokalisation 32

II.2 Erstellung und Analyse der Irx2-Verlustmutante 34

II.2.1 Entwicklung und Durchführung der Schritte zur Klonierung der Irx2-Rekombinationskassette 35

II.2.2 Gentransfer in ES-Zellen 37

II.2.3 Morula-Aggregation von ES-Zellen 38

II.2.4 Analyse der Mauskolonie von ES-Zellklon 69 41

II.2.5 Untersuchung der Mauskolonie von ES-Zellklon 184 43

II.2.6 Phänotypanalyse der Mauslinie Irx2-184 44

II.2.6.1 Analyse des Verpaarungsmusters von Irx2-Mutanten 44

2.6.2 Morphologische Untersuchung 51

2.6.3 Humane Lokalisation von Irx2 und das Cri-du-chat Syndrom 54

II.2.7 Entwicklung der mehrfachen Selektion in ES-Zellen und Erstellung der Doppelmutante Irx1/Irx2 56

II.3 Expressionsanalyse des Irx2-Gens 58

II.3.1 Übersicht über die Irx2-Expression 58

II.3.2 Spezifizierung der Expression von Irx2 während der Larynxentwicklung 65

II.3.3 Expression von Irx2 während der Organogenese am Beispiel der Lungenentwicklung 67

II.4 Analyse der Mash1-Mutante 74

III. Diskussion 84

IV. Material und Methoden 104

IV.1. Organismen 104

IV.1.1 Mäuse und Embryonen 104

IV.1.2 Bakterien 104

IV.1.3 ES-Zellen 104

IV.2 Materialien 105

IV.2.1 Chemikalien 105

IV.2.2 Radiochemikalien 105

IV.2.3 Verbrauchsmaterial 105

IV.2.4 Enzyme 105

IV.2.5 Reaktionssets (“Kits”) 105

IV.2.6 Membranen 106

IV.2.7 DNA-Bibliotheken 106

IV.2.8 Vektoren 106

IV.2.9 Größenmarker 106

IV.2.10 Oligopeptide 107

IV.2.11 Filme 107

IV.2.12 Photoarbeiten und Sequenzbearbeitung 107

IV.2.13 *in-situ*-Hybridisierungssonden 108

IV.2.14 Medien, Nährböden, Standard-Lösungen 108

IV.3 Methoden 109

IV.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 110

IV.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 111

IV.3.3 Agarose-Gelelektrophorese 111

IV.3.4 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIA-quick Gel Extraction Kit 112

IV.3.5 Restriktionsspaltung von DNA 112

IV.3.6 Aufreinigung von DNA-Lösungen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion 113

IV.3.7 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen 113

IV.3.8 Isopropanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen 114

IV.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten 114

IV.3.10. "blunt end"-Klonierung 114

IV.3.11 Transformation von Bakterien 115

IV.3.12 Sequenzierung ("Cycle sequencing") 116

IV.3.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 117

IV.3.14 Southern-Blot-Analyse 118

IV.3.15 Radioaktive Markierung von DNA- und RNA-Blots 119

IV.3.16 Durchmustern einer cDNA- oder genomischen Maus-DNA-Bibliothek nach rekombinanten Bakteriophagen und deren Isolierung 121

IV.3.17 Präparation genomischer Maus-DNA 124

IV.3.18 Arbeiten mit RNA 124

IV.3.19 Northern Blot 126

IV.3.20 Radioaktive mRNA-*in-situ*-Hybridisierung an Schnitten 128

IV.3.21 mRNA-*in-situ*-Hybridisierung an ganzen Embryonen (*"whole-mount"*-Hybridisierungstechnik) 133

IV.3.22 Nachweis von *ß-Galaktosidase* (*X-Gal*-Färbung) 139

IV.3.23 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen 140

IV.3.24 Maus-*FISH*-Analyse der transgenen ES-Zellen 143

IV.3.25 Herstellung von Maus-Chimären aus ES-Zellen durch Morulaaggregation 144

IV.3.26 Zellbiologische Methoden 147

IV.3.27 Herstellung von Antisera (*Irx1*-Antikörper) 148

IV.3.28 Western-Blot 150

IV.3.29 Immunhistochemie 153

IV.3.30 Histologische Methoden 154

V. Glossar, Abkürzungen und Symbole 155

VI. Zusammenfassung 161

VII. Literaturverzeichnis **163**

VIII. Danksagung **180**

IX. Publikationen **182**

X. Lebenslauf **184**

I. EINLEITUNG

Tiere entwickeln sich in der Regel aus einer befruchteten Eizelle, aus der die embryonalen Zellen hervorgehen, die nach vielen Mitosen die zelluläre Grundlage des Organismus bilden. In einer erstaunlichen Meisterleistung der Selbstorganisation bilden sich diese Zellen zu einem vollständigen Organismus. Der grundlegende Aufbau ist im Prinzip dabei gleich, nicht aber das Ergebnis: Menschen, Mäuse oder Fliegen repräsentieren die unterschiedlichsten Ausprägungen ihrer Baupläne. Angesichts des breiten Spektrums morphologischer Gestaltungsmöglichkeiten ist der Befund überraschend, dass es eine molekulare Verwandtschaft der Entwicklung gibt. Verschiedene Gruppen von interagierenden Faktoren, wie z. B die homeotischen Gene agieren sowohl in den Wirbellosen wie auch in den Wirbeltieren als Regulatoren des Körperaufbaus. Es ist zu erwarten, dass neben diesem System, das z.B. Positionen in der Längsachse festlegt, sich auch weitere genetische Kontrollnetze im Laufe der Jahre wenig verändert haben. Die Entdeckung dieser universellen molekularen Architektur ist die Grundlage für die Suche nach orthologen Genen in anderen Tierarten. Dabei ist die Vergleichbarkeit der Nukleotidsequenzen die Grundlage für die Entdeckung von funktionellen Übereinstimmungen wie auch von tierspezifischen Besonderheiten das Ziel der Untersuchung.

Heute sind nahezu alle Gene des Menschen und der Maus sequenziert. Interessant ist, dass das Genom der Maus rund 2,6 Milliarden Basenpaare umfaßt und damit nur etwa 300 Millionen Basenpaare kleiner ist als das menschliche Erbgut. Die neue Herausforderung besteht nun im Verständnis der molekularen Mechanismen, welche die selektive Aktivität dieser Gene steuern. Wahrscheinlich werden alle Gene im Laufe des Lebens eines Organismus zumindest einmal transkribiert, dabei ist die räumliche und zeitliche Verteilung der Genaktivität von entscheidender Bedeutung.

I.1. GENREGULATION UND TRANSKRIPTIONSKONTROLLE

Alle Zellen eines Embryos entstammen der befruchteten Eizelle. Daraus folgt, dass sie alle - bis auf wenige Ausnahmen - das gleiche Genom wie die totipotente Zygote enthalten, und dennoch entwickeln sich unterschiedliche Zelltypen. Insofern geht es zentral um die Frage, welche Gene unterschiedliche Zellschicksale bedingen können.

Die Entwicklung, die Morphologie, die Physiologie und auch der Metabolismus einer Zelle hängen im Wesentlichen von den zelleigenen Proteinen ab. Sie bilden die Struktur- und Funktionselemente der Zelle und bestimmen damit ihre möglichen Fähigkeiten. Gewebespezifische Proteine sorgen für die spezifische funktionelle Ausgestaltung einer Zelle, während die "Haushaltsproteinen" (housekeeping proteins) für die Lebenserhaltung der Zelle unverzichtbar sind, da sie alle biochemischen Reaktionswege zur Erzeugung der zelleigenen Energie, der DNA-Erneuerung und des Zellzyklus ermöglichen. Obwohl die Haushaltsgene qualitativ und quantitativ je nach Zelle variieren, spielen sie in der Entwicklung der Organismen nur eine untergeordnete Rolle. Es sind vielmehr die gewebespezifischen Proteine, welche die Zellunterschiede in den Vielzellern vermitteln. Die Zelle verfügt über verschiedene Mechanismen, die Bildung von Proteinen zu kontrollieren. Die Expression eines Gens wird durch die koordinierte Wirkung der regulatorischen Transkriptionsfaktoren gesteuert. Dabei entscheidet häufig nicht ein Transkriptionsfaktor allein über den Aktivitätsstatus eines Gens, sondern das spezifische Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Die Kontrolle der Genexpression und Proteinsynthese erfolgt jedoch nicht allein auf der Ebene der Transkription. Die Konformation der DNA kann ebenfalls zur Regulation beitragen. Die Bedeutung des sterischen Effekts für die Expression der genetischen Information ist darin begründet, dass die Transkriptions-maschinerie nur starten kann, wenn sie Zugang zur DNA hat (Cavalli, 1998).

Festzuhalten bleibt, dass für die Entwicklung eines Organismus die Steuerung der differentiellen Genexpression grundlegend ist. Für die Analyse der Embryonalentwicklung sind daher die Gene der Transkriptionsfaktoren von besonderem Interesse, denn sie bewirken den spezifischen Wechsel von Genaktivitätsmustern.

I.2. IDENTIFIZIERUNG VON ENTWICKLUNGSKONTROLLGENEN

Die Identifizierung von Entwicklungsgenen ist ein zentrales Anliegen der Entwicklungsbiologie. Anhand von Phänotyp-Analysen natürlicher Mutanten und der Lokalisation der dazugehörigen genetischen Veränderung wurden die ersten Entwicklungskontrollgene identifiziert. Zu ihnen gehört die Homeodomänen-Genfamilie (Gehring, 1985)(Gehring, 1994). Diese Familie umfaßt eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer ähnlichen DNA-bindenden Domäne, die Homeodomäne. Sie enthält das Helix-Schleife-Helix-Motiv, das für viele DNA-bindenden Faktoren charakteristisch ist. Kodiert wird diese Domäne von einer ca. 180 bp langen Nukleotidsequenz, der sog. Homeobox. Viele Mitglieder dieser Gen-Familie spielen eine wichtige Rolle im Prozeß der Embryonalentwicklung. Ursprünglich sind die Homeoboxgene bei der Fruchtfliege *D. melanogaster* entdeckt worden, bei der sie wesentlich an der Steuerung der Musterbildung beteiligt sind. Die Bezeichnung "Homeobox" leitet sich daraus ab, dass Mutationen in einigen dieser Gene zu sog. homeotischen Veränderungen führen. Bei diesen Mutationen wird ein ganzer Körperabschnitt durch einen anderen ersetzt. So werden bei der natürlich vorkommenden Fliegenmutante *Antennapedia* (McGinnis, 1985; McGinnis et al., 1984), anstelle der Antennen im Kopfsegment Extremitäten ausgebildet.

In *Drosophila* ist gezeigt worden, dass Kluster (eine festgelegte Abfolge von Genen) von homeotischen Genen an der Festlegung der Segmentidentitäten beteiligt sind. Ähnliche Gengruppen sind inzwischen bei vielen anderen Tieren entdeckt worden. Bei den Wirbeltieren werden sie als Hox-Kluster bezeichnet. Im Genom der Maus gibt es vier Kluster von Hoxgenen, die vermutlich durch mehrfache Verdopplung aus einer ursprünglichen Gengruppe hervorgegangen sind. Gene, die so durch Divergenz und Verdoppelung innerhalb einer Spezies entstehen, werden als paraloge Gene bezeichnet.

Die hohe Konservierung von Sequenzen, Genen und ihren Funktionsorten erlaubt es, im Rahmen von Evo-Devo-Studien (evolution und development) Vorhersagen und Arbeitshypothesen für mögliche funktionelle Zusammenhänge aufzustellen, immer beachtend, dass diese Vorhersagbarkeit Grenzen hat. Der Fund und Vergleich der Hox-Kluster in vielen Tierarten ist daher sehr bedeutend gewesen. Denn neben den strukturellen Ähnlichkeiten in der Nukleotidsequenz, der Ausrichtung der Proteine als

DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, zeigen sie eine äußerst erstaunliche Übereinstimmung in ihrer Funktion. In den so verschiedenen Tieren wie der Fruchtfliege als Vertreterin der Invertebraten und der Maus, der Wirbeltiervertreterin, scheint es ein gemeinsames Prinzip in der Entwicklung zu geben. Darüber hinaus wird sogar ein im starken Maße vergleichbares Repertoire an Genen in der Embryonalentwicklung genutzt. Die Homeoboxgene stellen damit ein beeindruckendes Beispiel für die weitverbreitete Konservierung von Entwicklungsgenen dar. In allen bisher untersuchten Arten spielen sie als Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle in der regionalen Spezifizierung (McGinnis and Krumlauf, 1992; Weisblat, 1994).

I.3. ENTDECKUNG EINER NEUEN GENFAMILIE: DIE IROQUOIS-GENE.

Die Suche nach dieser Genfamilie beginnt mit den interessanten Ergebnissen, die in der Analyse der neuralen Entwicklung in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gewonnen wurden (Dambly-Chaudière and Leynes, 1992; Leyns et al., 1996). Entdeckt wurde die *Iroquois*-Mutante anhand des sichtbaren Verlust aller lateralen Sinnesborsten auf dem Notum ("Rücken der Fliege"), auf dem nur ein mittlerer Streifen an Sinneshaaren zurück blieb. Dieses Erscheinungsbild erinnerte an die Haartracht des Indianerstammes der Iroquesen und so erhielt der Lokus der vorliegenden Mutation seinen Namen. Der *Iroquois*-Komplex (*Iro*-C) besteht aus drei Genen - *araucan*, *caupolican* und *mirror* (Gómez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997). Phantasievoll ist auch die Namensgebung für die einzelenen Gene: *Araucan* ist der Name eines Indianerstammes in Südamerika, dessen Anführer *Caupolican* hieß.

Die *Iroquois*-Gene sind Mitglieder einer konservierten Genfamilie von Homeodomänen-kodierenden Transkriptionsfaktoren (Gómez-Skarmeta et al., 1996), die in der embryonalen Musterbildung und Regionalisierung eine wesentliche Rolle spielen (Gómez-Skarmeta et al., 1998). Auf die molekulare Charakterisierung der Fliegengene folgte die Suche nach orthologen Vertretern insbesondere in der Maus und in weiteren Vertebraten.

Von den *Iroquois homeobox- (Irx-)* Genen sind bisher sechs Familienmitglieder in der Maus beschrieben worden - *Irx1, Irx2, Irx3, Irx4, Irx5* und *Irx6* (Bosse et al., 1997; Bosse et al., 2000; Peters et al., 2000; Cohen et al., 2000; Bruneau et al., 2000).

Innerhalb der *Iroquois*-Genfamilie zeichnet sich die Homeodomäne dadurch aus, dass ihre einzelnen Aminosäurebausteine während der Evolution äußerst konserviert beibehalten worden sind. Diese evolutive Identität begründet die Zusammenfassung der *Iroquois*-Gene zu einer Familie innerhalb der großen Gruppe der Transkriptionsfaktoren. Außerdem besitzen ausschließlich die Mitglieder der *Iroquois*-Genfamilie die "*Iro*-Box" – eine weitere konservierte Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist.

Der Fund konservierter *Iroquois*-spezifischer Domänen weist auf eine wichtige funktionelle Bedeutung dieser Gene hin und läßt erwarten, dass auch in weiteren Wirbeltieren orthologe Gene existieren, so wie es beispielsweise sechs humane *Irx*-Gene gibt (Lewis et al., 1999; Bruneau et al., 2000). Aus der Analyse des humanen *Irx2*-Gens liegen erste funktionelle Hinweise vor, die auf eine Beteiligung in der Entstehung von humanem Brustkrebs hinweisen (Lewis et al., 1999).

Weitere Analysen in Vertebraten wurden in *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* und in Zebrafisch *(Danio rerio)* durchgeführt. Bisher bekannt sind fünf orthologe *Irx*-Gene aus *Xenopus laevis* (Bellefroid et al., 1998; Gómez-Skarmeta et al., 1998). Im Huhn wurden bisher *cIrx2* (Goriely et al., 1999), *cIrx3* (Funayama et al., 1999) und *cIrx4* (Bao et al., 1999) identifiziert, sowie mehrere *Irx*-Gene in Zebrafisch, deren Zuordnung noch weiter analysiert werden muß (Tan et al., 1999).

Die Entdeckung der *Iroquois*-Familie in den verschiedensten Tierarten ermöglicht es nun, Hinweisen auf funktionale Übereinstimmungen bei gleichzeitiger Berücksichtigung der gruppenspezifischen Besonderheiten nachzugehen.

I.3.1 FUNKTIONEN DER IROQUOIS-GENE IN DER ENTWICKLUNG VON FLIEGEN

Iro wurde genetisch als die *Tp(3,3)iro*^{1}-Mutante beschrieben. Die rezessive Mutation führt zur Abwesenehit der *achaete-scute- (as-sc-)* exprimierenden proneuralen Zellgruppen und damit zum Fehlen der lateralen sensorischen Borsten auf dem Notum (Dambly-Chaudière and Leynes, 1992; Leyns et al., 1996). Diese Borsten und Haare auf der Körperoberfläche der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind mechanosensorische Sinnesorgane, die Berührungen sowie Luftwiderstände wahrnehmen. Bevor der Mechanorezeptor gebildet werden kann, muß zuvor der Ort der Entstehung definiert sein. Es zeigte sich, dass seine genaue Position exakt festgelegt ist.

In der Imaginalscheibe der Mutante ist das "Vormuster" (prepattern) der Genexpression gestört. Dieses bewirkt auch eine Störung der zeitlich aufeinander folgenden Aktivitäten der proneuralen Gene und des *Notch-Delta*-Signalweges (Posakony, 1994; Simpson, 1997), die im Wildtyp die Entstehung des sensorischen Organs aus der Vorläuferzelle (SOM; sensomotoric mother cell) ermöglicht hätten.

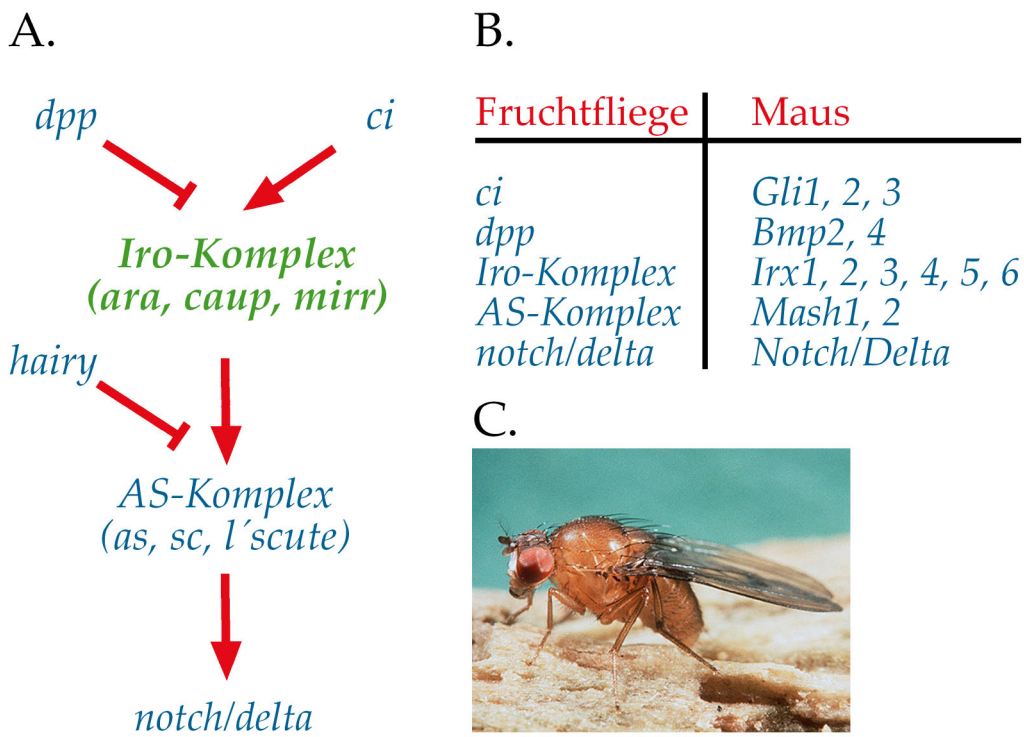


Abb.1: Genetische Regulation der Sinnesborsten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

A. Darstellung der aktivierenden und reprimierenden genetischen Interaktionen während der Bildung der Sinnesborstenzellen der Fruchtfliege.

B. Alle essentiellen Gene dieser funktionellen Kaskade haben orthologe Verwandte im Genom der Vertebraten.

C. Die Identifizierung der *Iroquois*-Genfamilie begann mit *Drosophila melanogaster.*

Neben der Spezifizierung der Positionen der Sinnesborsten auf dem Notum der Fliege, agieren die *Iroquois* Gene bei der Einteilung von Kompartimenten auf den Augen- und Flügel-Imaginalscheiben. In der Augen-Imaginalscheibe setzen die *Iroquois*-Gene die vom Organisator induzierte Unterteilung in dorsal und ventral um.

Als Leitmotiv der *Iroquois*-Aktivität könnte gelten, dass diese Gene große Regionen im Embryo in Untereinheiten unterteilen und anschließend für entsprechend unterschiedliche Genaktivitätsmuster sorgen (Cavodeassi et al., 2001).

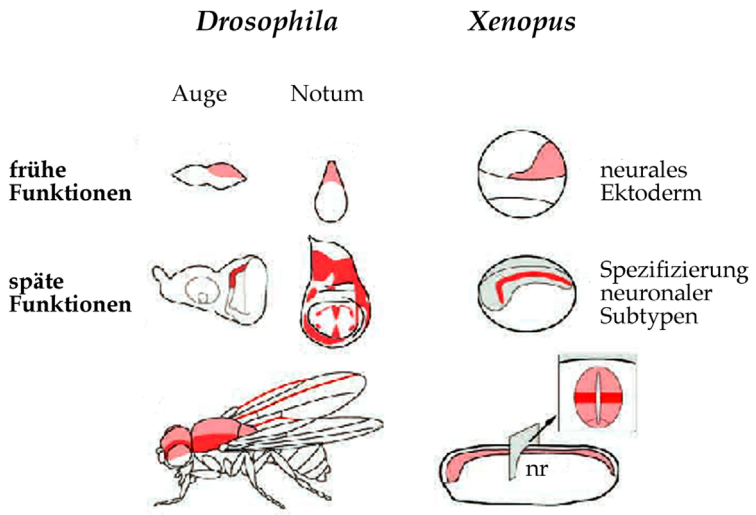


Abb. 2: Vergleich von frühen und späten Funktionen der *Iroquois*-Gene in *D. melanogaster* und *Xenopus* (entnommen aus (Cavodeassi et al., 2001)

Die frühe Funktion besteht in der Spezifizieung großer Regionen wie Auge, Notum oder Neuralektoderm. Die späte Funktion bewirkt die Ausbildung an muster-bildenden Elementen, wie z.B. die Haarsinneszellen, die Flügel oder die neuronalen Untergruppen im Neuralrohr (nr).

I.3.2. FUNKTIONEN DER IROQUOIS-GENE IN VERTEBRATEN

Die Ergebnisse der Funktionsstudien in *Xenopus* weisen den *Iroquois*-Genen eine besondere, wenn auch redundante Funktion während der Neurogenese zu (Bellefroid et al., 1998; Gómez-Skarmeta et al., 1998). Die frühe Funktion liegt in der Spezifizierung des prospektiven Ektoderms während der Gastrulation. Die Förderung der neuralen Entwicklung findet auf molekularer Ebene in einer gegenseitigen Repression von *Xiro* und *Bmp4* statt. *Xiro* kann die mesoderm-induzierende Funktion des *bone morphogenetic protein 4* (*Bmp4*) verhindern. In einer späteren Phase der Entwicklung beschränkt sich die *Xiro* Genaktivität auf spezifische Einzelbereiche, in denen die Entwicklung einer bestimmten Subgruppe an Neuronen induziert wird (Gómez-Skarmeta et al., 2001).

Erste Hinweise zeigen, dass das Hühnergen *cIrx4* eine wichtige Rolle während der Herzentwicklung spielt und *cIrx3* in der Coelombildung von Bedeutung ist (Bao et al., 1999; Funayama et al., 1999).

I.3.3. BISHER BEKANNTE IROQUOIS-FUNKTIONEN IN DER MAUS

Die Maus nimmt wie jedes Tier ihren Anfang in einer Zelle – der befruchteten Eizelle. Nach erfolgter Befruchtung benötigt der Mausembryo 19 Tage bis zur Geburt. Dabei weicht die frühe Phase der Entwicklung der Amnioten stark von der anderer Wirbeltiere ab, denn die Entwicklung im Mutterleib stellt spezifische Erfordernisse an das Überleben des Embryos. Die Eier sind sekundär dotteram und der Embryo bezieht die Nahrung von der Mutter über die Plazenta. Dies bedeutet, dass die Embryonen zwangsläufig sehr früh mit der Mutter Kontakt aufnehmen, um ihre Versorgung sicherzustellen (Tam and Behringer, 1997; Hogan et al., 1994). Dieser Kontakt wird durch die Blastozystenimplantation hergestellt. Anschließend setzt bei E6,5 (=embryonales Stadium 6,5 Tage nach der Befruchtung) die Gastrulation ein, deren gezielte Zellwanderungen die Entstehung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm ermöglichen.

In der *Irx1*-Verlustmutante sind diese frühen embryonalen Vorgänge gestört (Zülch, 2001). Die Gastrulation ist so stark beeinträchtigt, dass anstelle der verschiedenen mesodermalen Zellen ausschließlich extraembryonales Mesoderm gebildet wird. Dieser Fehler führt zum Tod der Mutanten noch während der Gastrulation.

Von allen Mitgliedern der murinen *Iroquois*-Genfamilie ist bisher neben der eben erwähnten Funktion des *Irx1*-Gens nur bekannt, dass der Verlust der *Irx4* Funktion zu veränderten Genexpressionsmuster weiterer Gene im Herzventrikel führt (Bruneau et al., 2000).

Alle *Iroquois*-Gene in der Maus zeigen ein hoch spezifisches wie auch dynamisches Genaktivitätsmuster im sich entwickelnden Nervensystem. Neben diesen mit *Drosophila* vergleichbaren neuralen Aktivitätsbereichen liegen im embryonalen Mesoderm und in den Herzanlagen neue Domänen möglicher Funktionen.

I.4. DIE SPEZIFISCHE FUNKTION EINES GENS KANN IN DER MAUS UNTERSUCHT WERDEN.

Die Funktion eines Gens kann auf gentechnologischem Wege mit Hilfe der Gewinn- und Verlustmutanten in der Maus untersucht werden.

Gewinnmutanten werden so konstruiert, dass sie einen Überschuss des Genprodukts ("gain-of-function") enthalten bzw. Aktivität an zusätzlichen Stellen zeigen. Die Überexpression von Zielgenen erzeugt ektopische Genaktivitäten, deren Auswirkungen anhand morphologischer Auffälligkeiten analysiert werden können. Diese Methode eignet sich gut, um Veränderung in den Genaktivitätsmustern zellulärer Zielgene zu zeigen. Die Untersuchung der Funktion eröffnet den Blick auf die Reaktionen des Gesamtorganismus, bei der die zufällige Integration des Zielgens in das Genom zu bedenken ist. Durch die Integration könnten unbekannte Gene gestört werden bzw. die inserierte DNA unter fremde Kontrolle geraten. Der Vergleich einer großen Anzahl von Tieren erlaubt korrekte Schlußfolgerungen, da Gemeinsamkeiten im Phänotyp, die bei verschiedenen Integrationsereignissen entstanden sind, auf die eingeführte Veränderung zurückzuführen sind.

Bei Verlustmutanten dagegen wird das zu untersuchende Gen ausgeschaltet ("loss-of-function, knock-out"). Zu unterscheiden sind die gezielte und die zufallsgenerierte Mutagenese. Bei der zufälligen Mutagenese inseriert die Genkassette in völlig unbekannte Genloci. Danach ist sie über ihre Markergene nachweisbar. Zusätzlich kann sie den offenen Leserahmen des getroffenen Gens unterbrechen und somit seine Funktion stören. Anhand des Phänotyps kann dann die entwicklungsbiologische Relevanz des "getroffenen" Gens ermittelt werden. Der Erfolg dieser Methode gründet sich auf die Anzahl der untersuchten Tiere und die gewählten Suchmasken, d.h. das Auswahlverfahren, mittels dessen mögliche positive Kandidaten anhand von Genexpressions-mustern des Markergens und des resultierenden Pänotyps identifiziert werden können.

Die Methode der gezielten Geninaktivierung über homologe Rekombination liefert die direkteste und beste Funktionsanalyse. *In vitro* werden funktionell wichtige Bereiche des jeweiligen Gens entfernt und durch Markergene ersetzt. Diese veränderten DNA-Bereiche werden mittels homologer Rekombination in das Genom von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Diese ES-Zellen werden mit Wildtyp-

Stammzellen aggregiert, in eine Leihmutter eingebracht und bilden einen kompletten neuen Embryo. Im positiven Fall bilden die veränderten Stammzellen Keimbahnzellen, so dass der transgene Embryo später auch transgene Nachkommen hat. Dies ist die Grundlage für den Aufbau einer Mauskolonie und somit auch der funktionellen Analyse. Der resultierende Phänotyp gibt Aufschluß über die Funktion des untersuchten Gens (Mansouri, 2000; Mansouri, 2001).

I.5. DIE MAUS IST DAS BESTE MODELL FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER GRUNDLAGEN HUMANER KRANKHEITEN.

Die Forschung an humanen Krankheiten versucht die grundlegenden Auslöser zu identifizieren. Problematisch ist, dass ausschließlich die Folge-symptomatik bei den betroffenen Patienten zur Untersuchung verfügbar ist. Zudem steht die Hilfe für die Patienten absolut im Vordergrund der Behandlung und nicht die maximal mögliche wissenschaftlich Analyse. Für die dauerhafte Heilung bzw. maßgeschneiderte Behandlung ist natürlich die Entschlüsselung der auslösenden Ursachen essentiell. Die derzeit besten Möglichkeiten bestehen in der Forschung an Zellkultursystemen und Tiermodellen. Zellkultursysteme ermöglichen den direkten Zugriff auf klare, unidirektionale Fragen und Antworten. Dieses System gibt allerdings keine Auskunft über die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Gesamtorganismus. Die Forschung an Tiermodellen gibt auf diese Fragen Antwort. Hier ist es nämlich möglich, organismusübergreifende Fragestellungen zu betrachten. Ein gutes Beispiel ist die Untersuchung von Diabetis. Nach Identifizierung des Mausgens, das für die Bildung der *Insulin*-produzierenden Zellen in der Bauchspeicheldrüse verantwotlich ist, konnte mittels gezielter, homologer Rekombination dieses Gens - *Pax4* - zerstört werden. Die resultierende Maus-Verlustmutante ist die Grundlage für die weitere Forschung an Diabetis (St. Onge et al., 1997; Sosa-Pineda et al., 1997).

Entscheidend ist die exzellente Vergleichbarkeit von physiologischen Vorgängen zwischen Maus und Mensch, die es ermöglichen, die Grundlagen von humanen Krankheiten zu studieren. So können alle säugerspezifischen Fragen, wie auch die genomische Prägung, untersucht werden.

EINE BESONDERHEITEN IN DER SÄUGERENTWICKLUNG IST DIE GENOMISCHE PRÄGUNG VON CHROMOSOMEN

Die Untersuchungen von Gregor Mendel konnten von der Hypothese ausgehen, dass jedes Gen zweimal vorhanden ist, und zwar eines von der Mutter und eines vom Vater. Bei der Merkmalsausprägung spielt die Herkunft keine Rolle. Doch die Natur hält Überraschungen bereit. Es kann zum Beispiel ausschließlich das maternale vererbte Allel aktiv sein, während das paternale Allel des entsprechenden Genes inaktiv ist. Dieser Effekt wird als genomische Prägung bezeichnet (Greally and John, 2000). Generell steht dieser Mechanismus im Gegensatz zum Verhalten der großen Mehrheit der Gene, bei denen beide Allele unabhängig von ihrer Herkunft aktiviert werden können.

Das erste Anzeichen für die Existenz des Mechanismus der Markierung der Gameten entstand in Transplantationsexperimenten an Mäusen in den frühen 80er Jahren. Die Kerne befruchteter Eizellen wurden entfernt und durch zwei haploide Kerne aus Spermien oder Eizellen ersetzt. Somit entstanden Embryos, die einen diploiden Chromosomensatz besitzen, der jedoch nicht zu gleichen Teilen von Vater und Mutter abstammt, sondern rein androgynetisch (vom Vater) bzw. rein gynogenetisch (von der Mutter) ist. Trotz des diploiden Chromosomensatzes konnten die Embryonen nicht überleben. Im Gegensatz zu dem beschriebenen, fast 100jährigen Dogmas Mendels zeigen diese Experimente, dass mütterliche und väterliche Chromosomen nicht stets funktionell identisch sind. Die Herkunft der Chromosomen kann für die Entwicklung des Embryos ebenso wichtig sein wie ihre Anzahl.

Bis zum heutigen Tag konnten durch die Analyse uniparentaler Disomien über 50 Gene mit genomischer Prägung identifiziert werden (Harwell, http// :www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting). Insofern drängen sich zwei Fragen in den Vordergrund, die sowohl theoretisch wie auch experimentell zu klären sind: Wie kann eine stabile, aber nicht irreversible Inaktivierung eines Lokus erreicht werden? Aus welchem Grund ist dieser Mechanismus entstanden?

Zunächst ist es wichtig zu betonen, dass die Markierung der Chromosomen reversibel sein muß, denn ein maternal vererbtes Chromosom muß sich z.B. im Aktivitätsstatus in den geprägten Genen ändern, wenn es in der nächsten Generation durch die männliche Keimbahn geht. Ist dieser Wechsel (Switch) gestört, kann zum Beispiel das humane

Prader Willi- und Angelmann-Syndrom entstehen. Da schon sehr kleine Deletionen diese "Switch"-Syndrome auslösen können, wird vermutet, dass es bestimmte gamentenspezifische DNA-Bereiche gibt, die die Prägung initiieren können.

Die DNA in den Chromosomen tritt in unterschiedlichen Zuständen auf. Im Heterochromatin ist sie eng aufgedrillt und nicht zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie. Begünstigt wird diese Form durch einen hohen Methylierungsgrad der DNA sowie die Deacetylierung der Histone im Heterochromatin. In der frühen Entwicklung, das heißt in den primordialen Keimzellen der Maus, in ihren embryonalen Stammzellen und auch in den Zellen der Blastozyste sind keine Methylierungen an der DNA festzustellen. Erst im Moment der beginnenden Differenzierung scheint die selektive DNA-Methylierung das Genom in aktive und inaktive Bereiche zu unterteilen. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass ein hoher Grad an Methylierung nicht mit einer Inaktivierung gleichzusetzten ist. Die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms ist zum Beispiel unabhängig von DNA-Methylierungen. Ein unterschiedlicher Methylierungszustand beider Chromosomen stellt folglich nicht die Ursache, aber dennoch eine häufige Begleiterscheinung zum Auftreten von genomischer Prägung dar. Die Methylierung bei den Säugern findet am fünften Kohlenstoff-Atom des Cytosins innerhalb von CpG-Dinukleotiden statt.

Eine veränderte Prägung kann zu verschiedenen Krankheiten führen. Beispiele sind das Fragile X-Syndrom, das phänotypisch einen variablen Schweregrad an geistiger Beeinträchtigung zeigt wie verschiedene Formen von Autismus. Vererbt wird das Fragile X-Syndrom ausschließlich von der Mutter. Die genetische Grundlage ist eine zunehmende Veränderung im *FFMR1*-Gen. Es enthält eine Wiederholung von CGG-Trinukleotiden im 5´-Bereich des Gens. Mit zunehmender Länge der Wiederholung steigt ebenfalls die Schwere der Krankheit. Entsprechend der Länge der Wiederholungen tritt eine zunehmende Anzahl an aberranten *de novo*-Methylierungen von DNA und Deacetylierugen von Histone auf, was zur Stilllegung des *FMR1*-Gens führt.

Vor zwanzig Jahren wurden erstmalig derartige Erbgänge mit genomischer Prägung beschrieben. Seit den neunziger Jahren mehren sich die Hinweise auf ihre genetischen und biochemischen Grundlagen. Seit einigen Jahren entstehen Hypothesen, die bisher jedoch nur Teilaspekte des Phänomens erklären können. Die biologische Grundlage der genomischen Prägung ist weiterhin umstritten. Immerhin haben Untersuchungen der

letzten Jahre gezeigt, dass dieser Effekt erstmals mit der Entwicklung der Säuger aufgetreten ist. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die genomische Prägung nach der Trennung der Protortheria von den therischen Säugern entstanden ist, also vor ca. 150 Millionen Jahren. Das Gen für den Wachstumsfaktor *Igf2* ist beispielsweise im Opossum, in der Maus und im Menschen monoallelisch aktiv, wohingegen die Mitglieder der eierlegenden Monotremata, wie das Schnabeltier Platypus keine genomische Prägung an diesem Lokus zeigen (Killian et al., 2001). Die Mehrzahl der genetischen Untersuchungen unterstützen die "Theria Hypothese". Sie hält eine frühe Trennung der Monotremata von den Marsupialia und Theria für wahrscheinlich (Marshall, 1979).

Die Frage nach dem Nutzen der Entwicklung von genomischer Prägung ist noch nicht abschließend geklärt. Entstanden ist sie parallel zu der intra-uterinen Entwicklung der Säuger. Diese evolutive Neuerung in der Gruppe der Säuger bedingt eine enge Verbindung zwischen Mutter und Kind in Hinsicht auf die Versorgung. Grundlage vieler Hypothesen ist die unterschiedliche Beteiligung der Eltern an der Aufzucht bzw., genetisch gesprochen, an der Weitergabe des eigenen Genpools in die nächste Generation. Dabei wird ein Kampf der Geschlechtern um die mütterlichen Ressourcen (battle of sex, sexual tug-a-war) postuliert (Moore, 1991). Einer alternativen Hypothese (" Ovarian time bomb hypothesis" = Ovarien Zeitbomben Hypothese) liegt die Annahme zugrunde, dass es wichtig ist, das Risiko einer spontanen parthenogenetischen Entwicklung zu minimieren, da sie das Leben der Mutter gefährdet. Weitere Ideen beziehen sich auf die Verhinderung der Integration parasitärer DNA ins Genom und der Erleichterung meiotischer Prozesse (Killian and al., 2001).

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die detaillierte Expressionsanalyse des *Irx2*-Gens in der Maus, die Gewinnung des genomischen Klons und die Erstellung der *Irx2*-defizienten Mutante. Damit umfaßt diese Arbeit die Identifizierung und Untersuchung der *Irx2*-Genstruktur sowie des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters durch RNA *in-situ*-Analysen. Die gezielte Mutagenese des *Irx2*-Gens durch homologe Rekombination bildet die Grundlage der Funktionsanalyse. Im Tiereich ist die *Iroquois*-Genfamilie zentral an neuralen Spezifizierungsprozessen beteiligt. Damit gehört *Irx2* nicht nur in die Gruppe der Transkriptionsfaktoren, sondern auch zu der Familie von

essentiellen Entwicklungskontrollgenen. Ebenfalls zu den wichtigen Kontrollgenen gehört *Mash1*. Die Analyse der *Mash1*-Verlustmutante ist von großem Interesse wie auch die mögliche genetische Interaktion zwischen *Irx2* und *Mash1*. Alle Fragen zur speziellen Funktion des murinen *Irx2*-Gens werden mit Hinblick auf die evolutive Abstammung untersucht, um konservierte Aspekte zu identifizieren und neue Aufgaben aufzudecken.

II. ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der funktionellen Relevanz des *Irx2*-Gens in der Maus. Meine Arbeit baut auf den Ergebnissen meiner Diplomarbeit auf, in der ich die Identifizierung sowie die ersten Schritte der *Iroquois homeoboxgene* 2 (*Irx2)* Analyse beschrieben habe (Becker, 1997). Die detaillierte Beschreibung der Genexpressionsbereiche des *Irx2*-Gens ermöglicht die Auswahl der zu untersuchenden Organen, sowie der entscheidenen Entwicklungsstadien. Um die Funktion zu studieren, wird die gezielte Verlustmutante mittels homologer Rekombination hergestellt. Dazu ist es notwendig, die genomische Organisation des *Irx2*-Gens zu ermitteln. Anhand der Nullmutante läßt sich die Funktion des *Irx2*-Gens während der Entwicklung der Maus entschlüsseln.

II.1. STRUKTURANALYSE DES *IRX2*-GENS

Die Analyse der vollständigen kodierenden Sequenz wie auch der genomischen Organisation des *Irx2*-Gens ist von grundlegender Bedeutung für die Funktionsuntersuchung.

II.1.1. SEQUENZANALYSE DER IRX2-CDNA

Um die vorhandene *Irx2*-cDNA-Sequenz (Becker, 1997) zu vervollständigen, wurde eine E10,5-Maus-cDNA-Bibliothek (Stratagene) mit ca. 200.000 Phagen ausplattiert. Die Phagenbank deckt das 6-fache des Mausgenoms ab. Mit einer Mischung aus einer weit 5´ gelegenen (Sonde 5´) und einer längeren *Irx2*-spezifischen Sonde (Sonde 31), die

die Intensität des Nachweissignals verstärkt, wurde nach *Irx2*-positiven Klonen in der Phagenbank gesucht. Durch Hybridisierung mit hoher Stringenz und anschließender Subklonierung der hybridisierenden Fragmente konnten 3 Klone isoliert werden, die die vorhandenen Sequenz am 5´-Ende verlängerten. Die gewonnene Klone wurde aus den Phagenvektoren in Plasmidvektoren (pBSKS) umkloniert, denn nur Plasmidvektoren können in Bakterien vervielfältigt und verändert werden. Zudem enthalten sie die notwendigen Startsequenzen für die anstehenden Sequenzierungen. Die vollständige kodierende Sequenz des *Irx2*-Gens umfaßt 1422 bp und ist in der folgenden Abbildung dargestellt (im folgenden *Irx2-13* genannt):

```
     GAATTCGGGCGCGCGGCTGCGCCCACCGGCTCCGCGCTGCCGCTACCGCCGCCCCGCCGA
   1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60

     TCCTCCAGCCCCGCGCCCAGCCTAGCGCCCACCAGCCCAGCCTGCTCCGGCCCGCGGCCT
  61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120

     CGGTGCGCCCCGGCCGGGCGTGGATGGAGGGCGCCGCGCGCGCTGCCCGCTGCTCCGTGT
 121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180

     GACGCGGGCCCCGCGCCCCGCGCCCACCATGTCCTACCCGCAGGGCTACCTGTACCAAGC
 181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
                                M  S  Y  P  Q  G  Y  L  Y  Q  A  -

     GCCCGGCTCGCTGGCGCTCTACTCGTGCCCCGCGTACGGCGCGTCCGCGCTGGCGGCGCC
 241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
      P  G  S  L  A  L  Y  S  C  P  A  Y  G  A  S  A  L  A  A  P  -

     GCGCAGCGAGGAGCTGGCGCGTTCGGCGTCGGGCTCCGCGTTCAGCCCGTACCCCGGCTC
 301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
      R  S  E  E  L  A  R  S  A  S  G  S  A  F  S  P  Y  P  G  S  -

     GGCGGCCTTCACAGCGCAGGCGGCAACCGGCTTCTGCAGCCCGCTGCAGTACTCGGCGGA
 361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
      A  A  F  T  A  Q  A  A  T  G  F  C  S  P  L  Q  Y  S  A  D  -

     CGCCGCCGCCGCCGCGGCTGCCGGCTTCCCGTCCTACGTGGGCTCGCCATACGACACGCA
 421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
      A  A  A  A  A  A  A  G  F  P  S  Y  V  G  S  P  Y  D  T  H  -

     CACCACCGGAATGACTGGCGCCATCAGCTACCATCCATATGGCAGTGCGGCCTATCCATA
 481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
      T  T  G  M  T  G  A  I  S  Y  H  P  Y  G  S  A  A  Y  P  Y  -
```

```
     CCAGCTCAACGACCCCGCGTACCGTAAGAACGCTACGCGGGACGCCACTGCCACACTGAA
 541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
     Q  L  N  D  P  A  Y  R  K  N  A  T  R  D  A  T  A  T  L  K  -

     AGCCTGGCTCAACGAACACCGAAAGAACCCGTACCCCACCAAGGGAGAGAAGATCATGCT
 601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
     A  W  L  N  E  H  R  K  N  P  Y  P  T  K  G  E  K  I  M  L  -

     GGCCATCATCACCAAGATGACCCTCACGCAGGTCTCCACCTGGTTCGCCAACGCGCGCCG
 661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 720
     A  I  I  T  K  M  T  L  T  Q  V  S  T  W  F  A  N  A  R  R  -

     ACGTCTCAAGAAGGAGAACAAAATGACCTGGGCCCCAAGGAACAAAAGCGAGGATGAGGA
 721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 780
     R  L  K  K  E  N  K  M  T  W  A  P  R  N  K  S  E  D  E  D  -

     CGAGGACGAGGGAGATGCTTCCAGAAGCAAGGAGGAGAGTTCAGACAAGGCACAGGATGG
 781 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 840
     E  D  E  G  D  A  S  R  S  K  E  E  S  S  D  K  A  Q  D  G  -

     CACAGAGACCTCTGCGGAGGACGAAGGGATCAGTCTACACGTCGACTCGCTCACGGACCA
 841 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 900
     T  E  T  S  A  E  D  E  G  I  S  L  H  V  D  S  L  T  D  H  -

     CTCGTGCTCAGCGGAGTCAGATGGGGAAAAATTGCCCTGCCGCGCCGGGGATGCCTTGTG
 901 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 960
     S  C  S  A  E  S  D  G  E  K  L  P  C  R  A  G  D  A  L  C  -

     CGAATCAGGCTCAGAGTGTAAGGACAAGTTTGAGGACCTGGAGGACGAGGAGGACGAGGA
 961 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1020
     E  S  G  S  E  C  K  D  K  F  E  D  L  E  D  E  E  D  E  E  -

     AGACGAGTGCGAGCGGGACCTGGCGCCACCCAAGCCCGTAACCTCCTCGCCTCTCACCGG
1021 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1080
     D  E  C  E  R  D  L  A  P  P  K  P  V  T  S  S  P  L  T  G  -

     CGTGGAGGCACCCCTGCTGAGCCCGGCGCCCGAAGCCGCGCCGCGCGGTGGCAGCGGTGG
1081 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1140
     V  E  A  P  L  L  S  P  A  P  E  A  A  P  R  G  G  S  G  G  -

     CAAGACGCCCCTAGGCAGCCGGACGTCGCCAGGAGCGCCGCCGCCCGCCAGCAAACCCAA
1141 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1200
     K  T  P  L  G  S  R  T  S  P  G  A  P  P  P  A  S  K  P  K  -

     GCTGTGGTCGCTGGCCGAGATAGCCACGTCGGACCTCAAGCAACCAAGCTTGGGCCCGGG
1201 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1260
     L  W  S  L  A  E  I  A  T  S  D  L  K  Q  P  S  L  G  P  G  -

     TTGCGGGCCTCCGGGGCTGCCTGCTGCCGCCGCGCCTGCCTCGACTGGGGCCCCTCCGGG
1261 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1320
```

```
     C  G  P  P  G  L  P  A  A  A  A  P  A  S  T  G  A  P  P  G  -

     AGGCTCGCCCTACTCTGCTTCGCCCCTGCTGGGCCGCCACCTCTATTACACGTCCCCTTT
1321 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1380
     G  S  P  Y  S  A  S  P  L  L  G  R  H  L  Y  Y  T  S  P  F  -

     CTATGGCAACTACACAAACTACGGGAACTTAAACGCAGCGCTGCAAGGCCAGGGCCTTCT
1381 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1440
     Y  G  N  Y  T  N  Y  G  N  L  N  A  A  L  Q  G  Q  G  L  L  -

     GCGGTACAATACCGCGGCCTCCTCACCAGGCGAGACACTGCACGCCATGCCCAAGGCGGC
1441 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1500
     R  Y  N  T  A  A  S  S  P  G  E  T  L  H  A  M  P  K  A  A  -

     CAGCGACACGGGCAAGGCGGGCTCGCATTCACTGGAGTCCCACTACAGGCCTCCGGGCGG
1501 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1560
     S  D  T  G  K  A  G  S  H  S  L  E  S  H  Y  R  P  P  G  G  -

     CGGCTACGAGCCCAAGAAAGATACCAGTGAGGGCTGTGCAGTTGTTGGTGCAGGCGTCCA
1561 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1620
     G  Y  E  P  K  K  D  T  S  E  G  C  A  V  V  G  A  G  V  Q  -

     GACCTACCTATAGGAGGGCCAAGGTCAGCAGTGCAAGTAGGTGTCACAATTGCTTTGGAA
1621 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1680
     T  Y  L  *

     AAAAAAGTCAGGAGGCTATTCTCCCTTCCCAAGTTCATAAATACACAGATACAAACCCCA
1681 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1740


     GATGTGGAAACCCGGACCACATTTTGTGCCACTGTATAAGAAGATGCACAACTGCACTGG
1741 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1800


     CAACCCACAGACTTTAAGGACTGGACACACGTTGTTTGGGCATATGAGAACTTGTTGTCA
1801 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1860


     TAGTACAGCTTCCCTATGTTTGTGTGACTTTTGGAAACAATCTGTTTTTTCTCAGGATAT
1861 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1920


     CCTCATCACTTCATTGCCACGGTATATATTCTATAGGTGTGATAGGACTTGCTGTAAAAT
1921 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1980


     TTATTTGTAAAAAAAAATGTACACGGTAGAACTAACGTGATTGAAGAACTTGAGTCCTTC
1981 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2040


     AGAAGTGGAAACAAATTTGATATTTATTTTTATAATGATATAAAGCTTCTAGTAATTTAT
```

```
2041 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2100

     GCAAGTTGTATTGCAATGAAATCTAAAACTTTTGTAAATCCTTGACCGTAAGACATTATT
2101 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2160

     TGAACATTGCTGGTTATACAATCTTTGTTGGTTGTTTAACACGAATTC
2161 ---------+---------+---------+---------+-------- 2208
```

Abb. 3: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Transkript *Irx2-1*3

Das erste ATG liegt bei 209 bp, das zweite bei 491 bp. Als Stop-Kodon wird TAG bei 1631 bp genutzt. Die Homeobox erstreckt sich von 551 bp bis 720 bp und das Sequenzmotiv der *Iro*-Box liegt bei 1184 bp. Die Nukleotide TGTGAT kennzeichnen die K-Box an Position 1958 bp.

Im Northern-Blot hybridisieren zwei Fragmente mit einer *Irx2*-spezifischen Sonde (=13Sal). Dies bedeutet, dass von *Irx2* zwei alternativ gespleißte Formen existieren. Ihre Größen sind im Northern Blot 2,6 kb und 1,9 kb, wobei die analysierten cDNA-Klone mit 2,2 kb und 1,8 kb kleiner sind (Abb. 4). Der Größenunterschied zwischen dem Northern Blot und den Sequenzdaten beruhen auf dem Fehlen des poly-A-Schwanzes in den sequenzierten Klonen.

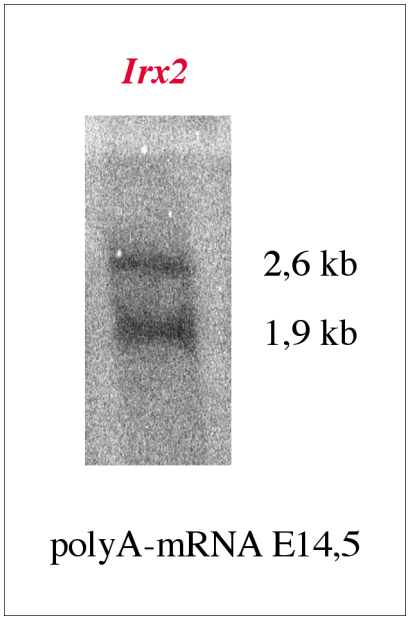


Abb. 4: Northern-Blot mit *mRNA* von Embryonen an Tag E14,5

Zwei Fragmente der *mRNA* hybridiseren mit der Sonde 13Sal. Sie entsprechen den Transkripten der Größen 2,6 kb und 1,9 kb.

Der Translationsstart (ATG) des längeren *Irx2*-Transkriptes liegt an der Position 209 bp. Dieses ATG ist eingebettet in der sog. Kozak-Konsensus-Sequenz (GCCGCCA/ GCCATG), die darauf hinweist, dass diese Position mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Translationsstart des Proteins entspricht (Abb. 5). Das alternativ genutzte ATG liegt bei 491 bp. Die Transkripte unterscheiden sich in der Proteinlänge und hinsichtlich verschiedener Wiederholungen von Stopsignalen im nicht-translatierten (UTR = untranslated region) 3´-Bereich.

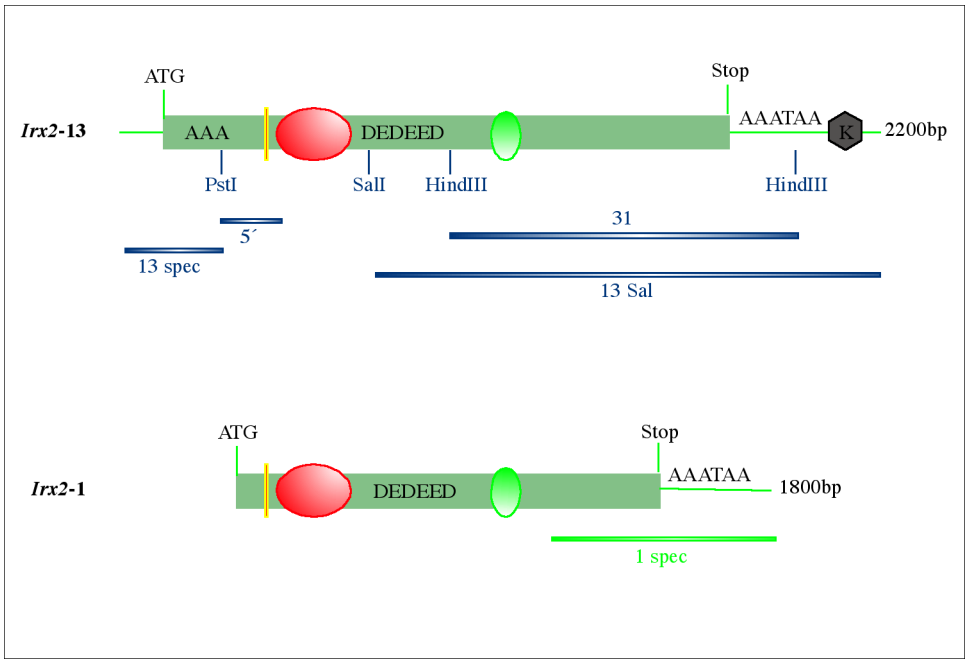


Abb. 5: Schematische Darstellung der beiden Transkripte, *Irx2-13* und *Irx2-1*.

Funktionell bedeutsamen Regionen sind: rot markiert ist die Homeobox, grün die *Iro*-Box und schwarz die K-Box. Im 5´-Bereich liegt in Transkript *Irx2-13* eine Wiederholung von Adenin (AAA) vor. DEDEED kennzeichnet eine saure Region. Die Sequenzen beider Transkripte enthalten Polyadenylierungsstellen. Angegeben sind verschiedenen Sonden, die in folgenden Experimenten verwendet werden.

Im Folgenden werde ich daher ausschließlich auf das längere Transkript, *Irx2-13,* eingehen. Das *Irx2*-Gen weist eine Homeobox (Gehring, 1994) auf, die sich von 551 bp bis 720 bp erstreckt. Ferner beinhaltet die kodierende *Irx2*-Sequenz bei 1184 bp bis 1224 bp im 3´-Bereich das Motiv der *Iro*-Box (Abb. 5) (Bürglin, 1997). Das erste Stop-Kodon

(TAG) liegt bei 1631 bp. Im 3´-UTR liegt eine K-Box mit der Sequenz TGTGAT bei 1958 bp.

II.1.2 IRX2-PROTEINSEQUENZANALYSE

Das *Irx2*-Gen kodiert wahrscheinlich für ein Protein aus 474 Aminosäuren (=aa) mit einem Molekulargewicht von 52 kDa. Die Iroquois-2 Proteine verschiedener Tiere zeigen einen sehr hohen Grad an Konservierung der Aminosäuresequenz, was auch außerhalb der Homeodomäne zu beobachten ist. So liegt bei dem Vergleich der kompletten Aminosäuresequenzen der Irx2-Proteine von Mensch, Maus und Frosch eine Aminosäureidentität von 79% vor (Abb. 6).

```
IRX2            MSYPQGYLYQ APGSLALYSC PAYGASALAA PRSEELARSA SGSAFSPYPG
hIRX2A          MSYPQGYLYQ PPGSLALYSC PAYGASALAA PRSEELARSS SGSAFSPYPG
Xiro2           MSYPQGYLYQ PPGSLALYSC PAYGASALAA PRSEELARSS SGSAFSPYPG

mIrx2           SAAFTAQAAT G.FCSPLQYS ADAAAAAAAG FPSYVGSPYD THTTGMTGAI
hIRX2A          SAAFTAQAAA TGFTSPLQYS TD....PATG FPSYMGSPYD AHTTGMTGAI
Xiro2           SAAFSAQAAT G.FSSPLQYS SD....PTG. FPSYMGSPYD AHAAGMTGAL

mIrx2           SYHPYGSAAY PYQLNDPAYR KNATRDATAT LKAWLNEHRK NPYPTKGEKI
hIRX2A          SYHPYGSPAY PYQLNDPAYR KNATRDATAT LKAWLQEHRK NPYPTKGEKI
Xiro2           SYHPYGSAAY PYQLNDPAYR KNATRDATAT LKAWLQEHRK NPYPTKGEKI

mIrx2           MLAIITKMTL TQVSTWFANA RRRLKKENKM TWAPRNKSED EDEDEGDASR
hIRX2A          MLAIITKMTL TQVSTWFANA RRRLKKENKM TWAPRNKSED EDDDDGDGAR
Xiro2           MLAIITKMTL TQVSTWFANA RRRLKKENKM TWAPRNKSDD EDDDEGDGER

mIrx2           SKEESSDKAQ DGTETSAEDE GISLHVDSLT DHSCSAESDG EKLPCRAGDA
hIRX2A          SKEESPDKIP ESNETSAEDE GISLQVDSLT DHSCSAESDG EKLPCRAGDP
Xiro2           VKEEQSEKAQ DSNETSAEDE GISLHVDSLT DHSCSADSDG EKLPCRAADH

mIrx2           LCESGSECKD KFEDLEDEED EEDECER... ........DL APPKPVTSSP
hIRX2A          LCESGSECKD KYEDIEEEEE DEDDDEEDIE EDDGGGGERD PPAKPATSSP
Xiro2           LCESGSESKE KYEDEEDDGD DEED...... ........RV LPVKPATSSP

mIrx2           LTGVEAPLLS PAPEAAPRGG SGGKTPLGSR TSPGAPPPAS KPKLWSLAEI
hIRX2A          LAAVEAPLLG HPHADAARSA S..KAALGGR ASPGPPTPAS KPKLWSLAEI
Xiro2           LTGVEAPILN RQQEGSPRNS N..KTNLDNG MSSSSQTPAS KPKLWSLAEI
```

```
mIrx2           ATSDLKQPSL GPGCGPPGLP AAAAPASTGA PPGGSPYSAS PLLGRHLYYT
hIRX2A          ATSDLKSQNL GQGCPP.... AALASATPAS APHSAAYSPS SLLGRHIYYT
Xiro2           ATSDHKHPNL GS........ .VLSSATSSS AAHNPSYPSS SLLGRHIYYT

mIrx2           SPFYGNYTNY GNLNAALQGQ GLLRYNTAAS SPGETLHAMP KAASDTGKAG
hIRX2A          SPFYSNYTNY GNFN.ALQSQ GILRYNSAAV ASNEGLSQTV LNASSVHKQS
Xiro2           SPFYSNYTNY GNFN.ALQSQ GILRYSSTAM TANEGLNQTV LSTSSMHKHT

mIrx2           SHSLESHYRP PGGGYEPKKD TSEG..CAVV GAGVQTYL
hIRX2A          SDSLKTITNQ LEQHYRPSSQ DSKKDPTEVC TVGVQPYL
Xiro2           SDSVRTASNQ LDQHYRPTNQ ESKKDPSEVC TVGVQPYL
```

Abb. 6: Vergleich der Irx2-Proteine von Maus (mIrx2), Mensch (hIRX2) und Frosch (Xiro2).

Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt sich eine Übereinstimmung von 79%. Die Homeodomäne (rot markiert) und die Iro-Domäne (grün markiert) sind 100% identisch.

Mittels der Berechnungen mit dem Chou-Fassmann-(CF) und dem Ganier-Osguthhorpe-Robson (GOR)-Algorhythmus (Chou and Fasman, 1978; Garnier et al., 1978) konnte eine potentielle Sekundärstrukturvorhersage für das Irx2-Protein getroffen werden (Becker, 1997). Aus diesen Berechnungen ergibt sich im Bereich der Homeodomäne eine Helix-Schleife-Helix-Struktur. Diese Helixstruktur stellt ein klassisches Motiv von Transkriptionsfaktoren dar und dient der spezifischen DNA-Bindung. Ferner läßt sich diese Homeodomäne in die Gruppierung der TALE-Familie von Homeoproteinen (Bürglin, 1997) einordnen. Grundlage dieser Einordnung ist eine leicht veränderte Homeodomäne, welche eine Verlängerung der Schleife zwischen der ersten und der zweiten Helix um die drei Aminosäuren Prolin-Tyrosin-Prolin (TALE steht für "three aminoacid loop extension") umfaßt. Damit hat die Homeodomäne eine Länge von 63 statt 60 Aminosäuren. Die Position 50 der Homeodomänen ist entscheidend an der DNA-Bindung beteiligt und wird zumeist von polaren Aminosäuren eingenommen (Treisman et al., 1989). Typischerweise haben alle Mitglieder der *Iroquois*-Proteinfamilie an der Aminosäureposition 53 der Homeodomäne ein Alanin. Die Position 50 entspricht der Position 53 in der Homeobox von TALE-Mitgliedern. Das

Vorhandensein einer ungeladenen Aminosäure an dieser Position spezifiziert die *Iroquois*-Gene zu einer eigenen Subfamilie innerhalb der Superfamilie der Homeobox-Gene. Das Irx2-Protein weist weiterhin einen Alanin-reichen Bereich (71 - 77 aa) und einige saure Aminosäurenbereiche im mittleren Teil (186 - 194 und 260 - 279 aa) auf. Im Bereich der *Iro*-Box sind potentielle β-Faltblattstrukturen auszumachen, die auf einem vermehrten Auftreten von Prolin begründet sind. Die *Iro*-Domäne zeigt ebenfalls eine sehr hohe Konservierung der Maus-*Irx*-Gene auch zu so evolutiv entfernten Vertretern wie der Fliege *D. melanogaster* und dem Wurm *C. elegans* (Bürglin, 1997).

Aminosäurevergleich der murinen Iroquois-Genfamilie:

```
      1                                                  50
Irx1  M......... .......... .......VEK RPGVLAAAAA AAAAASSGRP
Irx3  MSFPQLGY.. .......... QYIRPLYPPE RPGAAGGGGG GSSAGGRSGP
Irx2  MSYPQ.GYLY .......... .......... ......QAPG SLALYSC..P
Irx5  MSYPQ.GYLY .......... .......... ......QPSA SLALYSC..P
Irx4  MSYPQFGYPY SSAPQFLMTT NSLSTCCESG GRTLADSGPA ASAQAPVYCP
Irx6  MAFSPFGHPY GSTSQFLVSA SSSATCCETA PRSVSDVASA STSASTLCCT

      51                                                100
Irx1  ..GTAELGA. ..GAGAAAVT SVLGM.Y.AA AG.PYAGAPN YSAFLPYAAD
Irx3  GAGASELAA. .SGSLSNVLS SVYGAPYAAA AA.AAAAAQG YGAFLPYATE
Irx2  AYGASALAAP RSEELARSAS GSAFSPYPGS AAFTAQAATG FGSPLQYSAD
Irx5  AYSTSVISGP RTDELGRSSS GSAFSPYAGS TAFTA.PSPG YNSHLQYGAD
Irx4  VYESRLLATA RHELNSAAAL GVYGSPYGS. .......SQG YGNYVTYGSE
Irx6  PYDSRLLGSA RPEL..GAAL GIYGAPYAA. .......AQS YPGYLTYGPE

      101                                               150
Irx1  LSLF.SQMGS QYELKDNPGV .HPA.TFAA. .HTTPAYYPY GQFQY.....
Irx3  LPIF.PQLGA QYELKDSPGV QHPA.TAAAF PHPHPAFYPY GQYQF.....
Irx2  AAAA.AAAGF P.SYVGSPYD THTT.GMTGA ISYHPYGSAA YPYQL.....
Irx5  PAAA.AAAAF ..SYVGSPYD .HTP.GMAGS LGYHPYAAPL GSYPY.....
Irx4  ASAFY.SLN. SFESKDGTGS SHAGLPPTAA AAYYPYEPAL SQYPYDRYGT
Irx6  PPTLCGALNP QYEFKDAAGS FAPSL..TQP GAYYPYETTL GQYQYDRYGG

      151                                               200
Irx1  ...GDPGRPK NATRESTSTL KAWLNEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT
Irx3  ...GDPSRPK NATRESTSTL KAWLNEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT
Irx2  ...NDPAYRK NATRDATATL KAWLNEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT
Irx5  ...GDPAYRK NATRDATATL KAWLNEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT
Irx4  VD..SGTRRK NATRETTSTL KAWLQEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT
Irx6  VELSSAGRRK NATRESTSAL KAWLHEHRKN PYPTKGEKIM LAIITKMTLT

      201                                               250
Irx1  QVSTWFANAR RRLKKENKVT WGARSKDQED GALFGSDTEG DPEKAEDDEE
Irx3  QVSTWFANAR RRLKKENKMT WAPRSRTDEE GNAYGSEREE EDEE.EDEEE
Irx2  QVSTWFANAR RRLKKENKMT WAPRNKSEDE DEDEG.DASR SKEESSDKAQ
Irx5  QVSTWFANAR RRLKKENKMT WTPRNRSEDE EEEENIDLEK NDEDEPQKPE
Irx4  QVSTWFANAR RRLKKENKMT WPPRNKCADE KRPYGEGEEE EAGEEESREE
Irx6  QVSTWFANAR RRLKKENKMT WAPKNK.... .....GGEER KADSGEDSLG

      251                                               300
Irx1  I.DLE.SIDI DQIDERDG.. .....DQSNE DEE....... ..DKAEAPRA
Irx3  S.KRELEMEE EELAGRGGGH GGRGAGRRRR DEEIDL...E NLDSAAAGSE
Irx2  D.GTETSAED EGISLHVDSL TDHSCSAESD GEKLPCRAGD ALCESGSECK
Irx5  D.KGDLEGPE SG...GAEQK ATAGCE.RLQ GPLSP..AGK ETEGSLSDSD
```

```
Irx4   PLKSAKSEGH AGKDDKELEL SDLEDFDPLD AETSECELKT PFQSLDSGPE
Irx6   CLNGDTKDAT ASQEARGLRL SDLED...LE EEEEEEEAEE ..EAAVSAAR

        301                                                350
Irx1   RVPPPASARD QS...S.PLS AAETLKSQDS .......PLG LVK.......
Irx3   LTLAGAAHRN GDFGLG.PIS DCKTSDSDDS SEGLEDRPLS VLSLAPPPPP
Irx2   DKFEDLEDEE DEEDEC.ER. .DLAPPKPVT S..SPLTGVE APLLSPAPEA
Irx5   FKESSSEGRH DELPRP.PRA GESSPAGPAT ARLAEDAGPH YPASVPAPGP
Irx4   RIPASSDGPG TGKEASTTLR MPLGTAGGAV MDGDLERARN CLRSTVVVPD
Irx6   RL........ ADFQKST... QPLPAPCAAA QEGCLE.SRE C...GLGLPR

        351                                                400
Irx1   ....EVSEPG S..TRLLSPG AAAVGLQGAP HSKPKIWSLA ETATSPDGAP
Irx3   VARAPASPPS P..PSSLDPC APAPAPSSA. LQKPKIWSLA ETATSPDN.P
Irx2   APRG.....G SGGKTPLGSR TSPGAPP..P ASKPKLWSLA EIATSDLKQP
Irx5   HPSAGELPPG SGGSSVIHSP PPPPPPPPAV LAKPKLWSLA EIATSSDKVK
Irx4   SGAEGGPPAC EAKLTFAQAG APPNL..... ETKPRIWSLA HTATAAAATA
Irx6   FSFTEAPQSG EADFITAEPG GPTMILHYPS GHKPRIWSLA HTAAASAVES

        401                                                450
Irx1   KASPPPP..S SHASA...HG PPS..GSPLQ HPAFLPSHGL YTCHIGKFSN
Irx3   RRSPPGAGGS PPGAA...VA PPTLQLSPAA AAAAAAAHRL VSAPLGKFPA
Irx2   SLG....... ..PGC....G P......PGL PAAAAPASTG APPGGSPYSA
Irx5   DGG.GGSEGS PCPPC...PG PMGGQTLGGS RASPAPAPAR SPSAQCPFPG
Irx4   LSQT....EF PSC.MLKRQG PTGVSATTPA SSPAVTAPSG ALDRHQDSPV
Irx6   APSTPPRAQS PECHMIPRQ. PSSIRRLLVP RDSEGEEDSP AAKAFGNSTF

        451                                                500
Irx1   WT..NGA..F LA..QGSLLN MRSFLGVSAP HAAPHGPHLT APPPPQPPVQ
Irx3   WT..NRP..F PGPPAGPRPH PLSMLG.SAP Q......HLL GLPG......
Irx2   SPLLGRHLYY TSPFYGNYTN YGNLNAALQG QGLLRYNTAA SSPGETLHAM
Irx5   GTVLSRPLYY TAPFYPGYTN YGSFGHLHGH PGPGPSPTA. .GPGSHFNGL
Irx4   TSLRNWVDGV FHDPILRHST LN.QAWATAK GALLDPGPLG RNLGAGTNVL
Irx6   T.LQGLPLNC APYPRRREPE VRFQYPSGAE G~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~

        501                                                550
Irx1   VATGVLH.GE KASARSSPAL PE..RDLVTR PDSPPQQLKS PFQPVRDNSL
Irx3   .AAG..HPAA AAAAYARPAE PESGTDRCSA LEVEKKLLKT AFQPV...PR
Irx2   PKA.A...SD TGKAGSHSLE SHYR...PPG GGYEPKKDTS EGCAVVGAGV
Irx5   NQT.VLNRAD VLAKDPKMLR SQSQLDLCKD SPYELKKGMS DI~~~~~~~~
Irx4   TTPLACSFPP TVPQDVPPAG ASRELLATPK AGGKPFCT~~ ~~~~~~~~~~
Irx6   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~

        551             568
Irx1   APQE..GTPR ILAALPSA
Irx3   RPQNRLDAAL VLSALSSS
Irx2   QTYL~~~~~~ ~~~~~~~~
Irx5   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~
Irx4   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~
Irx6   ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~
```

Abb. 7: Aminosäurevergleich der sechs Iroquois-Proteine der Maus.

In der Homeodomäne weisen die Irx-Gene eine 90%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf (grün markiert). Dabei ist das Alanin an Position 53 der Homeodomäne (rot markiert), sowie die Verlängerung von drei Aminosäuren PYP (rot markiert) bemerkenswert. Die Proteine weisen weiterhin Bereiche auf mit hoher Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (blau markiert). Im aminoterminalen Bereich der Proteine befindet sich die konservierte Iro-Box (rot markiert). Es sind die Adenin-Wiederholungen (türkis markiert) und die YYPY-Aminosäuregruppe vor der Homeodomäne (gelb markiert) zu erwähnen.

II.1.3. DAS IRX2-ANTISERUM

Zur Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen das Irx2-Protein wurden Proteinfragmente in *E. coli* überexprimiert, die zur Immunisierung von Kaninchen benutzt werden sollten. Die Überexpression des gesamten Proteins erwies sich in Bakterien als nicht praktikabel, da es nur in sehr geringer Menge hergestellt werden konnte. Um diesem Umstand zu umgehen, wurden Oligopeptide zur Immunisierung benutzt.

Zwei Gesichtspunkte sind bei der Auswahl der Proteinbereiche zur Herstellung von Antikörpern zu bedenken. Wichtig sind zum einen die Spezifität des Antikörpers, der keine Kreuzreaktionen hervorrufen soll. Zum anderen ist darauf zu achten, dass der Antikörper nicht gegen ein falsches Protein in den Kaninchen gebildet wird. Denn werden nur Fragmente oder Oligopeptide genutzt, zum Beispiel um konservierte Proteinregionen auszusparen, dann kann es zu nicht nativen Faltungen des gebildeten Proteinfragments kommen. Eine veränderte Konformation kann die Bildung von Antikörpern zu Bereichen der Peptide bewirken, die im nativen Protein vielleicht nicht zugänglich sind.

Die Verwendung von Peptiden bietet den Vorteil, dass ausschließlich Proteinbereiche gewählt werden können, die eine geringe Übereinstimmung in ihrer Sequenz zu den andere Proteinen zum Beispiel der *Iroquois*-Familie aufweisen.

Es wurden zwei verschiedene Oligopeptide synthetisiert: M1: CKD KFE DLE DEE DEE D und M2: PGG GYE PKK DTS EGC entsprechend Sequenzen im carboxyterminalen Bereich des Irx2-Proteins, die weder die Homeo- noch die *Iro*-Domäne enthalten. Die Oligopeptide wurden synthetisiert, gereinigt und in Kaninchen injiziert. Über einen Monat wurden Blutproben aufgefangen, aufgereinigt und konzentriert, wobei später hauptsächlich das aufgereinigte Serum der letzten Blutung verwandt wurde. Zum Testen der Spezifität wurden COS-Zellen mit dem Plasmid CMV-*Irx2*-GFP transfiziert, so dass mittels GFP-Markierung die Effizienz der Transfektion ermittelt werden konnte (Abb. 8A). Die Spezifität des Antikörpers wurde auf Proteinextrakten getestet, der aus COS-Zellen isoliert wurde (Abb. 8B).

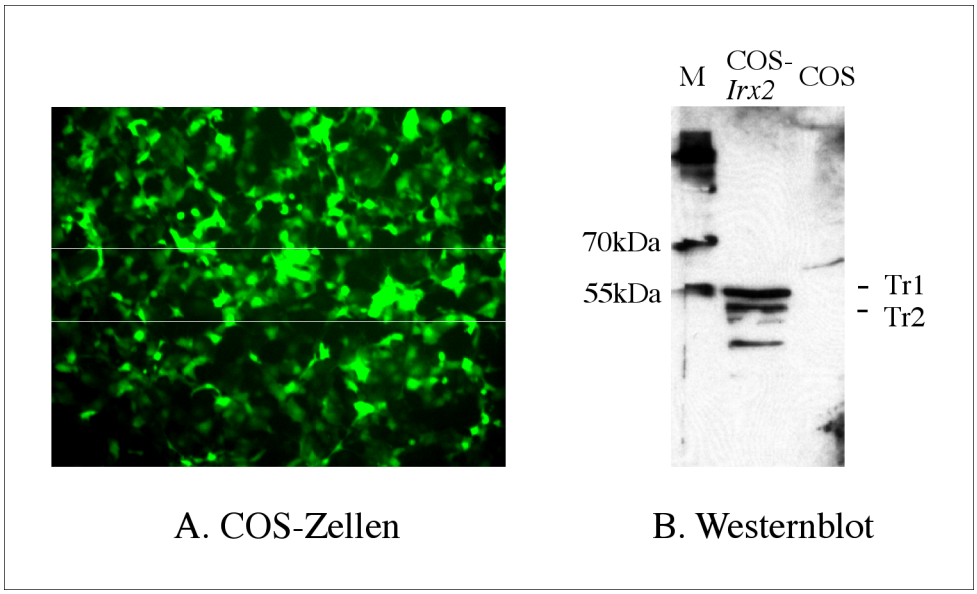


Abb. 8: Irx2-Antikörper

(A) GFP-Färbung von COS-Zellen, die CMV-Irx-GFP2 überexprimieren.

(B) Western-Blot aus Proteinextrakt aus transfizierten COS-Zellen. Der Irx2-Antikörper erkennt beide Irx2-Proteine (Tr1 und Tr2). Die schwächere dritte Bande entspricht einem Abbauprodukt oder einer unspezifischen Färbung.

Die Immunisierung führte zu einem funktionellen Antiserum mit guten Ergebnissen bei der Analyse von Western-Blots (Abb. 8). Bei der Verwendung des Serums in der Histologie, vorrangig bei der immunohistochemischenAnalyse von Gefrierschnitten, erwies sich der Antikörper jedoch nur als bedingt geeignet, da Hintergrundreaktionen auftraten (Daten nicht gezeigt).

II.1.4. IDENTIFIKATION DES GENOMISCHEN KLON DES IRX2-GENS

Für alle keimbahnrelevanten Manipulationen muß der genomische Bereich des entsprechenden Gens vorliegen. Dieser sollte kloniert sein, um ihn in weiteren Schritten manipulieren zu können. Somit stellt der genomische *Irx2*-Klon die Grundlage für die funktionelle Analyse. Der 13kb große Klon wurde aus einer genomischen Phagen-Bank isoliert, in einen Bakterienvektor umkloniert und mittels Restriktionskartierung analysiert und sequenziert.

II.1.4.1 DURCHMUSTERN EINER GENOMISCHEN PHAGENBANK

Verwendet wurde eine Phagenbank mit genomischer DNA des Stammes Ola 129Sv. Die DNA wurde aus der Leber isoliert und über Sau3a partiell verdaut und in den λ-Gem-Vektor über *XhoI* inseriert (Ola 129-λ Gem/tm-12 genomic bank). Das Durchmustern verläuft methodisch analog zur Suche nach cDNA-Fragmenten. Die Phagen wurden mit einer Mischung der beiden Sonden 5´ und 31 (Abb. 5) hybridisiert. Diese enthalten keine Homeobox, da ansonsten mit Kreuzreaktionen und falschpositiven Klonen gerechnet werden müßte. Nach vier Runden der wiederholten Suche bei zunehmender Verdünnung wurden 14 *Irx2*-positive Klone, 4.1 bis 4.14, ermittelt.

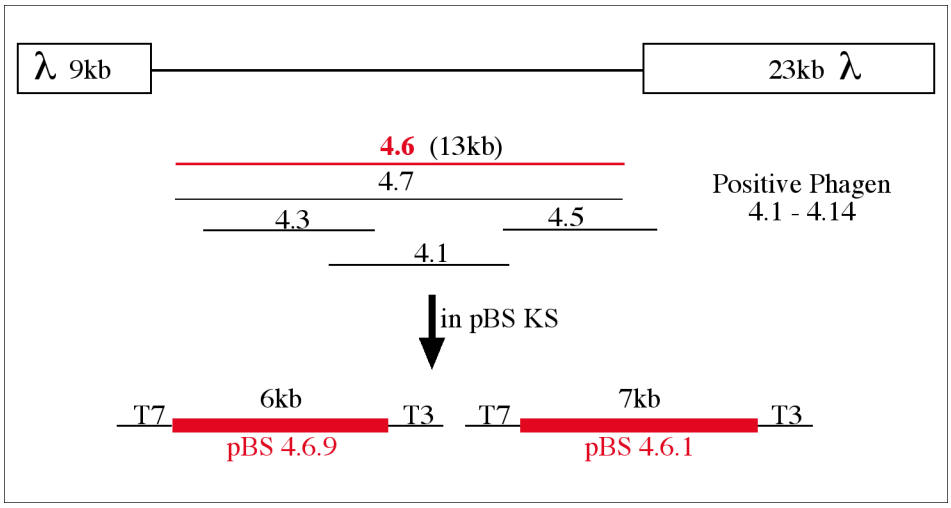


Abb. 9: Gewinnung des genomischen *Irx2*-Klons aus einer Phagen-Bibliothek.

Zwischen beiden Phagenarmen wurden DNA-Fragmente von einer durchschnittlichen Größe von 14 kb eingebaut. Grundlage aller folgenden Analysen ist der genomische Phagenklon 4.6 mit einer Größe von 13 kb. Er wurde mit EcoRI verdaut und in zwei Teilen in den Bakterienvektor pBSKS kloniert. Es entstehen die Subklone pBS 4.6.1 mit 7kb und pBS 4.6.9 mit 6kb.

Für alle weiteren Schritte wurde der Phagenklon 4.6 verwendet. Er wurde ausgewählt, da er das größte Insert enthielt, so wie die vollständige kodierende Sequenz. Desweiteren gab es einen zweiten Klon, 4.7, der identisch in Größe und Schnittmuster bei der Restriktionskartierung war. Es gibt bei Phagenbanken das Problem, dass chimäre Klone bei der Erstellung der Bank entstehen können. Chimäre Klone entstehen bei der Ligation der partiell verdauten DNA in die Phagenarme, d.h, dass in einem Phagenklon Sequenzen benachbart sein können, die es im Genom nicht sind. Dieses Risiko ist für 4.6

bzw. 4.7 minimiert, denn die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, dass zweimal ein identischer chimärer Klon entsteht.

Die Klonierung des genomischen *Irx2*-Bereichs war eine große Herausforderung. Wurde das 13kb große Insert des genomischen Klons 4.6 in einem Bakterienvektor inseriert, so führte das zum Absterben der Bakterien. Weder der Wechsel des Bakterienstammes noch des Vektors zeigten eine Verbesserung. Die Klonierung des Gesamtklons in zwei einzelnen Fragmenten war dagegen stabil. Hierfür wurde das Insert in zwei Teilen über *EcoRI* aus den Phagenarmen geschnitten, so dass die Subklone pBS 4.6.1 und pBS 4.6.9 entstanden, mit denen weitergearbeitet wurde. Die gelelektrophoretische Auftrennung der großen Fragmenten der Phagenarmen (23 kb und 9 kb) sowie der *Irx2-EcoRI*-Insertfragmente (7 kb und 6 kb) bedingt, dass ein geringprozentiges Gel (0,3 bis 0,6%) gewählt werden muß. Um den Verlust kleiner Fragmente auszuschließen, wurden Kontrollsequenzierungen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass der komplette Klon 4.6 in den Subklonen pBS 4.6.1 und pBS 4.6.9 enthalten ist.

II.1.4.2 SEQUENZANALYSE DES GENOMISCHEN IRX2-KLONS

Die Analyse des genomischen *Irx2*-Klons begann zunächst mit der Erstellung einer Restriktionskarte. Hierzu wurden sowohl die Phagen als auch die Subklone pBS 4.6.1 und pBS 4.6.9 jeweils mit 20 vorhandenen Restriktionsendonukleasen allein und in Kombination verdaut.

Die Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Southern Blot für eine Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden (5´, 31 und der kompletten cDNA) auf eine Membran transferiert. Nach der Zuordnung der verschiedenen Fragmente wurde eine Restriktionskarte erstellt. Diese Karte gibt den ersten Eindruck über die Organisation des *Irx2*-Lokus wieder.

Für die Sequenzierung der 13 kb wurden verschiedene Subklone angefertigt, sowie stets neue Sequenzierprimer definiert, die über die Grenzen der bekannten Sequenz hinausgingen. Einige Regionen des genomischen Klons ließen sich nur bedingt sequenzieren, was auf lange Wiederholungen von Nukleotiden (A, GT, CTTCC) oder Regionen mit einem GC-Gehalt von über 75% zurückzuführen ist. Verschiedenste Protokolle, die die Gelzusammensetzung und die Amplifikationsbedingungen vor der

Sequenzierung verändern, wurden getestet. Um ebenfalls die schwierigen Regionen zu sequenzieren, hat sich das "GPS-System" bestens bewährt. Mit Hilfe von Transposonsequenzen werden DNA-Stücke an verschiedenen Stellen inseriert, von denen aus mit besonderen Primern sequenziert werden kann. Statistisch gesehen wird in das zu sequenzierende Plasmid gleichmäßig inseriert, auch in Regionen, die für Sequenzierungen schwer zugänglich sind.

Durch die Bestimmung der Sequenz konnten die genaue Restriktionskarte erstellt und die Exon-Intron-Grenzen im genomischen Klon konkretisiert werden.

Der *Irx2*-Lokus ist in Intron-Exon-Bereiche organisiert, wobei fünf Exons vorliegen. Das erste Start-Kodon (ATG) liegt in Exon I (0 - 399 bp der cDNA-Sequenz), das zweite ATG in ExonII (400 - 550 bp), die Homeobox in Exon III (551 - 720 bp), die *Iro*-Box und das erste Stop-Kodon in ExonIV (882 - 1651 bp) und alle weiteren Stop-Kodons im letzten Exon Nr.V (1651-2208 bp) (Abb. 10).

Es liegen mehrere CpG-Inseln vor. Sie markieren in Säugergenen häufig das 5´Ende von Genen. Das WWWCPG Programm von Gardiner-Garden und Frommer definiert die CpG-Inseln. Es sind Regionen die auf einer Länge von mehr als 500bp mit einem hohen GC-Gehalt von größer 50% (p(G)+p(C) größer 0,5). Sie enthalten einen CpG-Gehalt von mindestens 0,6 des erwarteten Wertes. Ebenfalls 5´ des ersten Exons sind mehrere Wiederholungen von Typ RSINE2, L1P2.5 und Nukleotidrepeats anzutreffen.

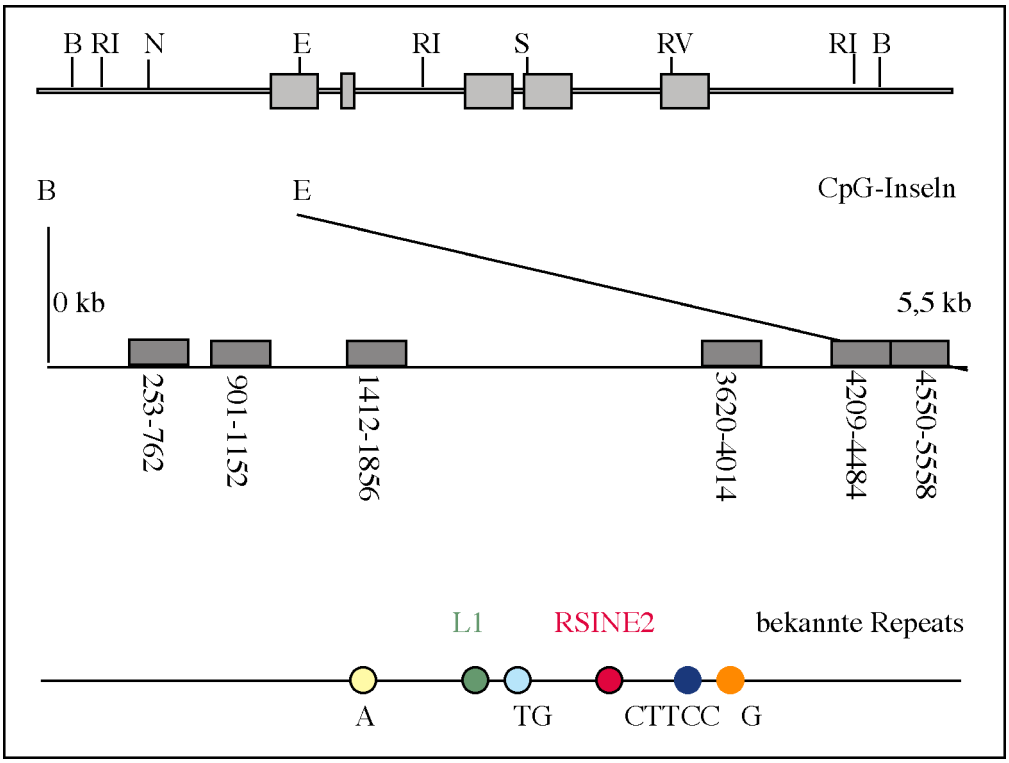


Abb. 10: Darstellung der genomischen Organisation des Irx2-Gens.

Der genomische *Irx2*-Klon ist in fünf Exons (hellgraue Kästen) organisiert, die über 5 kb verteilt sind. Ausgewählte Schnittstellen unterteilen den ca. 15 Kb großen Klon. B: BamHI, RI: EcoRI, N: NdeI, E: EagI, S: SalI, RV: EcoRV

In den ersten 5,5 kb liegen sechs CpG-Inseln (mit Angabe der bp) und ebenfalls sechs prominente Nukleotid-Wiederholungen. A, G stehen für Einzelnukleotid-Wiederholungen, TG und CTTCC verweisen auf die Wiederholung ihrer Sequenz und RSINE2 und L1 sind bekannte repetitive Elemente.

II.1.5 Chromosomale Lokalisation

Für die Durchführung der funktionellen Analyse ist die Kenntnis über die chromosomale Organisation von Bedeutung. Die *Iroquois*-Gene in *D. melanogaster* sind tandemartig (sog. Kluster) organisiert. Im Kluster kann es zu Wechselwirkungen der Gene untereinander kommen, so dass eine integrierte Rekombinationskassette unter die Kontrolle der benachbarten Gene gelangen kann. Es ist dann möglich, dass das Selektionsgen von anderen Mitgliedern der tandemartigen Organisation mitreguliert wird und damit die Selektion verfälscht wird beziehungsweise zusätzliche Phänotypen verursacht (Meyers et al., 1998).

Aus diesem Grund wurde die chromosomale Lokalisation des *Irx2*-Gens mittels *FISH in-situ*-Analyse bestimmt. Die Chromosomen von Maus-ES-Zellen wurden in der Mitose arretiert, um Metaphasen-Chromosomen zu erhalten. Diese wurden auf Objektträgern gespreizt und mit dem genomischen *Irx2*-Klon (Mischung aus pBS 4.6.9 und pBS 4.6.1) hybridisiert. Das Mausgen *Irx2* liegt auf Chromosom 13 (Abb. 11). Es stellte sich bei diesen Untersuchungen heraus, dass *Irx1* und *Irx2* sehr nah beieinander auf Chromosom 13 lokalisiert sind (A. Zülch, pers. Mitteilung), weshalb zusätzlich eine Abstandsmessung zwischen *Irx1* und *Irx2* mittels einer Fiber-*FISH*-Analyse durchgeführt wurde (mit freundlicher Unterstützung von W. Engel, Göttingen). Diese Analyse ergab einen Abstand zwischen *Irx1* und *Irx2* von lediglich 200 kb (Abb. 11). Aus einer Datenbankanalyse konnte ferner ein weiteres Mitglied der *Iroquois*-Genfamilie, *Irx4*, auf Chromosom 13 lokalisiert werden. Auch hier ist der Abstand zu den anderen Familienmitgliedern mit ca. 400 kb gering (http://www.ncbi.com).

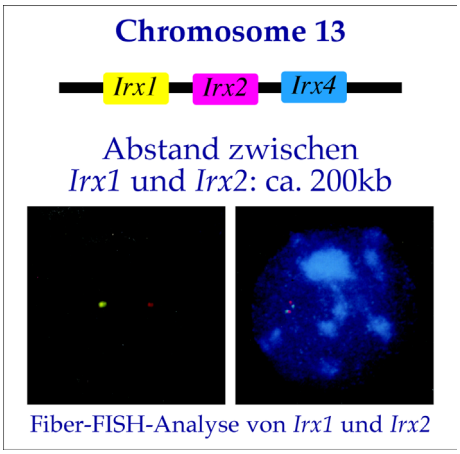


Abb. 11 : Chromosomale Lokalisation und Abstandsmessung von *Irx2* zu *Irx1*

In der Maus sind die Gene *Irx1* und *Irx2* auf Chromosom 13 lokalisiert. Die Fiber-FISH Analyse ergab einen Abstand von *Irx1* zu *Irx2* von ca. 200 kb, angezeigt durch Fluoreszenssignale (rot: *Irx1*, grün: *Irx2*).

II.2 ERSTELLUNG UND ANALYSE DER *IRX2*-VERLUSTMUTANTE

Die embryonale Stammzell-(ES-Zell-)-Technologie in Verbindung mit der zelleigenen homologen Rekombination ermöglicht es, eine gezielte Veränderung eines bestimmten Genlokus durchzuführen und diese in der Keimbahn der Maus zu etablieren. Säugerzellen besitzen die enzymatische Maschinerie, welche die homologe Rekombination zwischen eingebrachteten DNA-Molekülen und ihrem endogenen chromosomalen Locus ermöglichen (Doetschman et al., 1988)(Bronson and Smithies, 1994)(Capecchi, 1989). Diese Möglichkeit, gezielt Gene in ES-Zellen (embryonalen Stammzellen der Inneren Zellmasse der Blastozyste) zu mutieren und daraus Verlustmutanten in der Maus herzustellen, wurde im Laufe der Jahre technisch verfeinert, um die Häufigkeit der homologen Rekombination zu optimieren. Um ein Gen gezielt auszuschalten, ist ein Rekombinationskonstrukt notwendig, welches *in-vitro*

hergestellt wird, das einen Selektionsmarker (in der Regel das *Neomycin*-Resistenzgen) und ein Reportergen (*lacZ, β-Galactosidase*) enthält, welcher flankiert ist von homologen Regionen des genomischen Lokus. In den ES-Zellen wird dann die endogene Sequenz mittels homologer Rekombination gegen die des Rekombinationskonstruktes ausgetauscht.

II.2.1 ENTWICKLUNG UND DURCHFÜHRUNG DER SCHRITTE ZUR KLONIERUNG DER IRX2-REKOMBINATIONSKASSETTE

Die Intergation des Rekombinationskonstruktes soll bewirken, dass die Funktion eines Zielgens gestört wird. Im Falle von *Irx2* bedeutete dies, die funktionell wichtige Homeobox zu entfernen. Es hat sich gezeigt, dass die Größe des flankierenden Homologiebereiches für die Effizienz des Rekombinations-ereignisses von großer Bedeutung ist (Thomas and Capecchi, 1987). Um eine hohe Rekombinationsfrequenz zu erhalten, sollten die homologen Abschnitte in einer Gesamtgröße von 10kb liegen (Mansouri, 2000).

Vor der Herstellung des *Irx2*-Rekombinationskonstruktes wurde der genomische Klon pBS 4.6.1 modifiziert (Abb. 12). Es wurde ein 1 kb großer Bereich auf der 3´-Seite als spätere sog. externe Sonde entfernt (*BglII, EcoRI*) welcher eine entscheidende Rolle bei der späteren Genotypisierung der Mäuse spielte. Die Sequenz der externen Sonde ist nicht im Rekombinationskonstrukt enthalten und nimmt auch nicht an der homologen Rekombination teil. Die externe Sonde diente als Hybridisierungssonde, um die korrekte Integration in den *Irx2*-Lokus zu überprüfen.

Die zu deletierende Region von 2,5 kb umfasste die Homeodomäne in Exon III und beide Start-Kodons in ExonII und ExonI. Die zu entfernenden Bereiche in den Vektoren pBS 4.6.1 und pBS 4.6.9 waren von ausreichender Sequenz flankiert (Abb. 12). 5´der Deletion befanden sich 4,7 kb und 3´der Deletion 5 kb homologe Sequenz. Im verbleibenden genomischen Klon wurde über eine veränderte EagI und SalI Schnittstelle die Selektionskassette pGNA eingesetzt, welche 7,3 kb groß war und sowohl das LacZ-Gen (β-Galaktosidase-Gen) als auch das *Neomycin*-Gen enthielt.

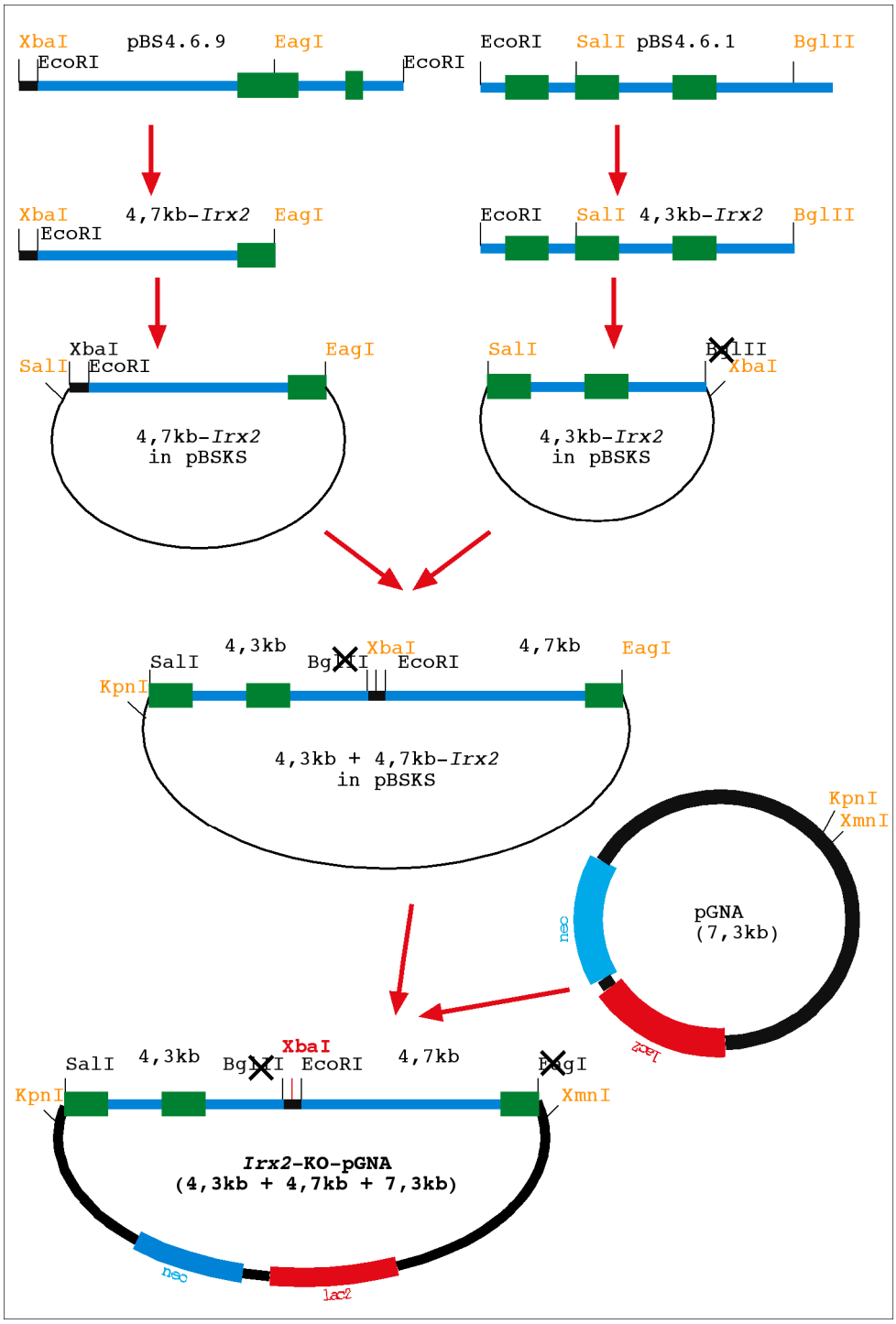


Abb. 12: Klonierungsschema zu Erstellung der *Irx2*-Rekombinationskassette.

Die schematische Dartsellung beinhaltet alle Angaben zur Größe der Konstrukte, zur Zahl der Exons und zur Verwendung von Schnittstellen und Plasmiden. Der Subklon pBS 4.6.1 wurde zuerst um den Bereich der externen Sonde verkürzt. Anschließend wurden die beiden Subklone getrennt vorbereitet auf die Fusion mit der Rekombinationskassette des pGNA-Vektors. Zur Linearisierung wurde die singuläre Schnittstelle XbaI verwendet.

Die Integration der Selektionskassette in einen genomischen Klon, der Intron I und/ oder II enthielt, führte zu instabilen Ligationsprodukten in Bakterien. Aufgrund von starken Rekombinationsereignissen war zusätzlich notwendig, die Klonierungen in einem pGNA-Vektor zu erstellen, dessen Replikationsstart (origin of replication) derart modifiziert ist, dass nur wenige Kopien des Plasmids pro Zelle produziert werden. Die Verwendung von reparatur-defizienten Bakterien (XL-10Gold; Stratagene) erwies sich als nützlich.

II.2.2 GENTRANSFER IN ES-ZELLEN

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Mausblastozyste des Mausstammes 129Sv gewonnen. Sie können in Kultur ohne Differenzierung gehalten werden. Wenn sie auf embryonalen Fibroblasten und/oder in Anwesenheit von LIF (leukaemia inhibitory factor) kultiviert werden, so dass sie ihre Pluripotenz behalten (Mansouri, 2001). 30 µg des Rekombinationskonstruktes wurden in ca. $1x10^7$ ES-Zellen der *MPI-II-ES*-Zellinie elektroporiert.

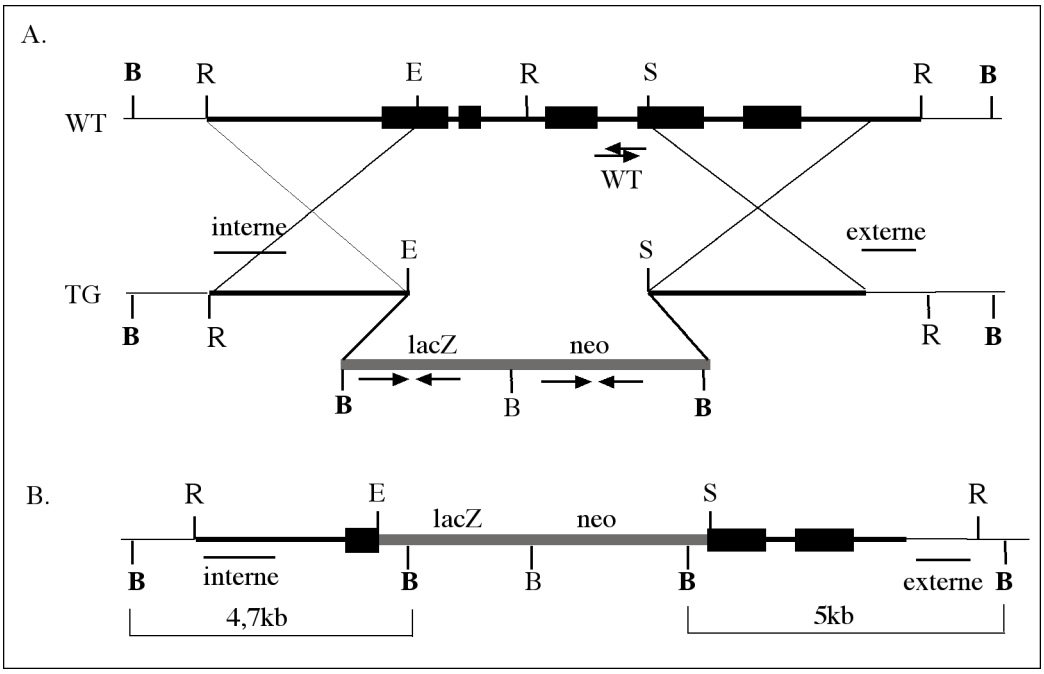


Abb. 13: Schema der erwarteteten homologen Integration zur Erzeugung des transgenen Lokus.

A. Der *Irx2*-Wildtyp (WT)-Lokus enthält fünf Exons (schwarze Kästen) und liegt zwischen zwei *BamHI*-Schnittstellen (B). Das erstellte Rekombinationskonstrukt

enthält homologe Bereiche: auf der 5´Seite von *EcoRI* (RI) bis *EagI* (E) und auf der 3´Seite von SalI (S) bis zum Beginn der Sequenz für die externen Sonde. Angegeben sind die Sonden (externe, interne) und die Stellen für die Genotypisierungs-PCR von Neomycin (neo), lacZ und Wildtyp (WT). Die WT-PCR amplifiziert einen Bereich im deletierten dritten Intron.

B. Das homolog integrierte Rekombinationskonstrukt weist bei einer Restriktionsendonucleasebehandlung mit *BamHI* (B) Fragmentgrößen von 4, 7 Kb bzw. 5 Kb auf.

Die mit dem *Irx2*-Konstrukt transformierten Zellen wurden daraufhin mit *Geneticin* (G418) auf ihre Neomycin-Resistenz selektiert. Nach der Selektion konnten über 220 ES-Zell-Klone isoliert werden. Zur Identifizierung des homologen Rekombinationsereignisses wurde genomische DNA aus den ES-Zellen gewonnen. Für deren Analyse werden im Southern-Blot sowohl die externe wie auch eine interne Sonde benutzt (Abb. 13). Der Verdau der genomischen DNA mit *BamHI*, Gelauftrennung, Southern-Blot-Analyse und anschließender Hybridisierung mit der externen Sonde zeigte eine ca 12 kb Bande für das Wildtyp-Allel und einer zusätzliche 5 kb Bande für das homolog rekombinierte Allel. Bei der Hybridisierung mit der internen Sonde entsprach das rekombinierte Allel 4,7 kb. Von den ca. 220 ES-Zell-Klonen zeigten sechs das richtige Rekombinationsereignis (Nr. 5, 69, 184, 185, 198, 217).

II.2.3 MORULA-AGGREGATION VON ES-ZELLEN

Vier der positiven ES-Zellen (Nr. 5, 69, 184, 198) wurden mit Wildtyp-Morulae aggregiert, die aus dem NMRI-Mausstamm gewonnen wurden. Nicht alle Morulae entwickelten sich außerhalb des Körpers, es konnten ca. 90 % der aggregierten Embryonen retransferiert werden. Ebenso entwickelten sich nicht alle transferierten Embryonen zu Chimären. Entscheidend für die Weiterentwicklung sind Faktoren wie die der Synchronisation der Ammenmütter und die Sauberkeit während des Retransfers. Die Chimären entwickeln sich normal und die ES-Zellen beteiligen sich an der Entwicklung aller embryonalen Gewebetypen, einschließlich der Keimbahn (Robertson, 1987).

Nach ca. sechs Wochen wurden die Chimären mit NMRI-Wildtypmäusen verpaart, wobei der Grad des Chimärismus dabei anhand der Fellfarbe erkennbar ist. Je höher dieser Grad, desto höher ist auch die prozentuale Wahrscheinlichkeit, dass die chimäre Maus die transgene Information auch in ihren Keimzellen trägt und somit diese Information an ihre Nachkommen weitergibt. Eine Keimbahntransmission konnte bei

den Nachkommen anhand der Augenfarbe erkannt werden. Mäuse mit schwarzen Augen entstammten der Keimbahn der transgenen ES-Zellen (Stamm: 129Sv), wohingegen Mäuse mit roten Augen von den nicht-transgenen ES-Zellen (Stamm: NMRI) abstammen. Keimbahn transmittierende Chimären wurden auf dem Inzuchtstamm Sv129 und dem Auszuchtstamm NMRI weitergezüchtet. Der Mausstamm Sv129 bietet die Vorteile eines genetisch reinen Hintergrundes, da auch die ES-Zellen und die genomische DNA im Rekombinationskonstrukt diesem entstammen. Bei Müttern des Stammes 129Sv ist die Zahl der Nachkommen und die Pflegebereitschaft eingschränkt. Diese Einschränkungen treten nicht in einem NMRI-Hintergrund auf. Die folgende Abbildung (Abb. 14) gibt schematisch den Ablauf der Erstellung einer Verlustmutante dar.

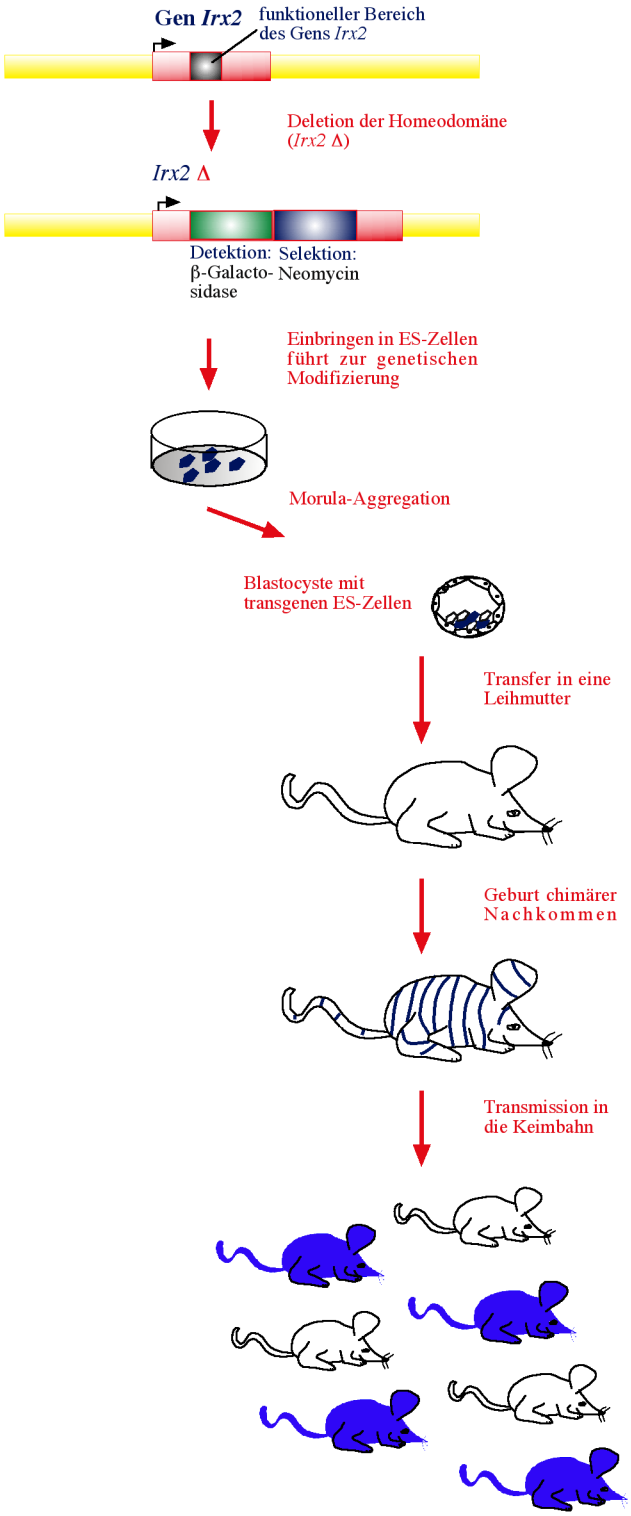


Abb. 14: Schematische Darstellung der Aggregation und des Verpaarungsschemas zur Herstellung einer *Irx2*-Verlustmutante.

In vitro werden Bereiche des Zielgens ersetzt durch Sequenzen von Selektionsgenen. Daraufhin wird das Rekombinationskonstrukt mittels Elektroporation in ES-Zellen eingeführt, wobei die zelleigenen Prozesse der homologen Rekombination das

Konstrukt ins Genom der Zellen integrieren. Angezeigt wird das Integrationsereignis durch die Resistenz der Zelle gegen das Gift *Geneticin*. DNA-Analysen der Zellen geben Auskunft über die Form der Integration. Ist in den Ziellokus, in diesem Fall das *Irx2*-Gen, inseriert, läßt man die Stammzellen sich zu Morulae entwickeln. Nach der Aggregation werden chimäre Mäuse (F0, blau-weiß) geboren und mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Die Transmission in die Keimbahn kann über die Fellfarbe (weiß/ blau) nachgewiesen werden. Die Nachkommen sind die F1-Generation.

II.2.4 Analyse der Mauskolonie von ES-Zellklon 69

Die Aggregation der Klone Nr. 5, 69, 184 und 198 führte zur Keimbahntransmission von Nr. 69. Heterozygote Tiere der Mauslinie *Irx2*-69 wurden miteinander verpaart. Erwartet wurde eine Verteilung von Wildtypmäusen (WT) zu heterozygoten Tieren (+/-) zu homozygoten Mäusen (-/-) nach der Mendelschen Regel von 1 : 2 : 1.

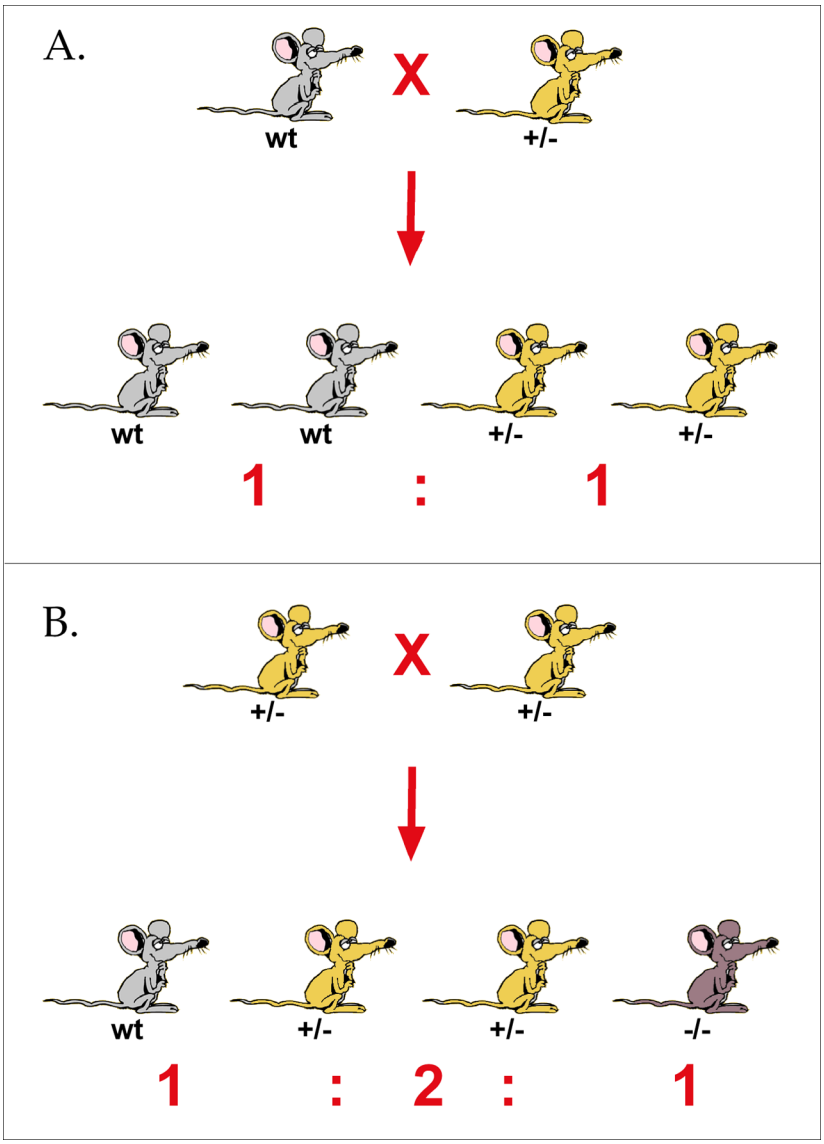


Abb. 15: Bildliche Darstellung der zuerwartenen Verpaarungsergebnissen bei reinen Mendelschen Erbgängen.

A. Werden heterozygote (+/-) Tiere mit wildtyp (+/+) Mäusen verpaart, so entstehen wildtyp und transgene Nachkommen in einem Verhältnis von 1 : 1.

B. Bei Verpaarung von heterozygoten (+/-) Eltern teilen sich die Genotypen in einem Verhältnis von 1 : 2 : 1 auf.

Die Genotypisierung der *Irx2*-Mäuse erfolgte mittels einer Southern-Blot- bzw. einer PCR-Analyse. Der ES-Zellklon *Irx2*-69 hatte bei Hybridisierung mit der externen Sonde und Verdau der genomischen DNA mit BamHI das erwartete Bandenmuster von 12 kb für das Wildtyp-Allel und 5 kb für das transgene Allel ergeben. Die Verwendung der externen Sonde garantiert, dass sich das veränderte Alle im *Irx2*-Lokus befindet. Das vollständige Rekombinationskonstrukt war homolog in den *Irx2*-Lokus integriert.

Die Analysen der transgenen Tiere der dazugehörigen Mauskolonie *Irx2*-69 wichen hiervon ab. Bei der Hybridisierung mit der externen Sonde zeigte das transgene Allel eine unerwartete falsche Bandengröße von 10 kb. Die Integration der Rekombinationskassette führte zu einem instabilen und nicht zu analysierenden transgenen Ereignis. Der Zielort ist durch unkontrollierte Rekombinationsereignisse verändert worden und daher wurde die Analyse dieser Mauskolonie eingestellt.

II.2.5 UNTERSUCHUNG DER MAUSKOLONIE VON ES-ZELLKLON 184

Die Aggregation der Klone Nr. 5, 184 und 198 wurde wiederholt. Zusätzlich wurden die positiven ES-Zellklone Nr. 185 und Nr. 217 aggregiert. Keimbahntransmission wurde für Nr. 184 erreicht.

Die Genotypisierung der *Irx2*-Mäuse erfolgte mittels der Southern-Blot- bzw. PCR-Analyse. Der ES-Zellklon *Irx2*-184 hatte nach dem Verdau der genomischen DNA mit *BamHI* und der Hybridisierung mit der externen Sonde und Verdau der genomischen DNA mit *BamHI* das erwartete Bandenmuster von 12 kb für das Wildtyp-Allel und 5 kb für das transgene Allel ergeben (Abb. 16). Die Analyse von transgenen Tieren der aufgebauten Mauskolonie *Irx2*-184 zeigte das entsprechend gleiche Muster, wobei die Hauptanalyse auf der Mauskolonie vom Stamm NMRI beruhte. Im folgenden wurde mit einer Kombination aus einer WT-PCR, die Teile des IntronIII amplifiziert, das im

transgenen Allel deletiert ist und einer TG-PCR, die das *Neomycin*- oder *LacZ*-Gen nachweist, genotypisiert. Zur Kontrolle der Stabilität hinsichtlich der intergrierten Rekombinationskassette wurden über den gesamten Verlauf der Untersuchung DNA-Stichproben der Kolonie sowohl mit der externen wie auch mit der internen Sonde hybridisiert. Es wurde keine Abweichung festgestellt .

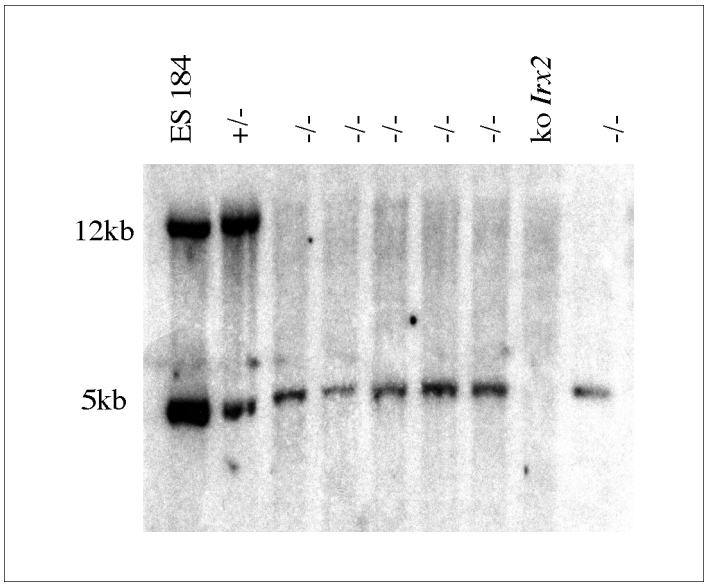


Abb. 16: Southern-Blot-Hybridisierung mit der externen Sonde zum Nachweis der Integration der Rekombinationskassette in den *Irx2*-Lokus.

Analysiert wurde DNA, isoliert aus den embryonalen Membranen eines heterozygoten und mehrer homozygoter Tiere im Alter von E12,5. Die erste Spur enthällt als positive Kontrolle die heterozygote DNA der aggregierten ES-Zelle Nr.184. Spur zwei enthällt DNA eines heterozygoten Tieres. Die Spuren 3-7 und 9 verifizieren das zuvor erhaltene PCR-Ergebnis der Homozygotie für diese Tiere. Die 8. Spur ist als Negativkontrolle anzusehen, da sie das Rekombinationskonstrukt enthält, das nicht mit der externen Sonde hybridisiert. Das Wildtyp-Allel entspricht einer Gößе von ca. 12 kb und das transgene Allel 5 kb. Das Ergebnis der gezeigten Genotypisierung ist wie folgt: Spur 1 und 2 enthalten DNA heterozygoter Enbryos und die Spuren 3 bis 7 und 9 DNA homozygoter Embryos.

II.2.6 PHÄNOTYPANALYSE DER MAUSLINIE IRX2-184

II.2.6.1 ANALYSE DES VERPAARUNGSMUSTERS VON IRX2-MUTANTEN

Die Analyse der *Irx*2-Mutante ergibt eine interessante geschlechtsspezifische Verteilung der inserierten Mutation unter den Nachkomme (Abb. 17).

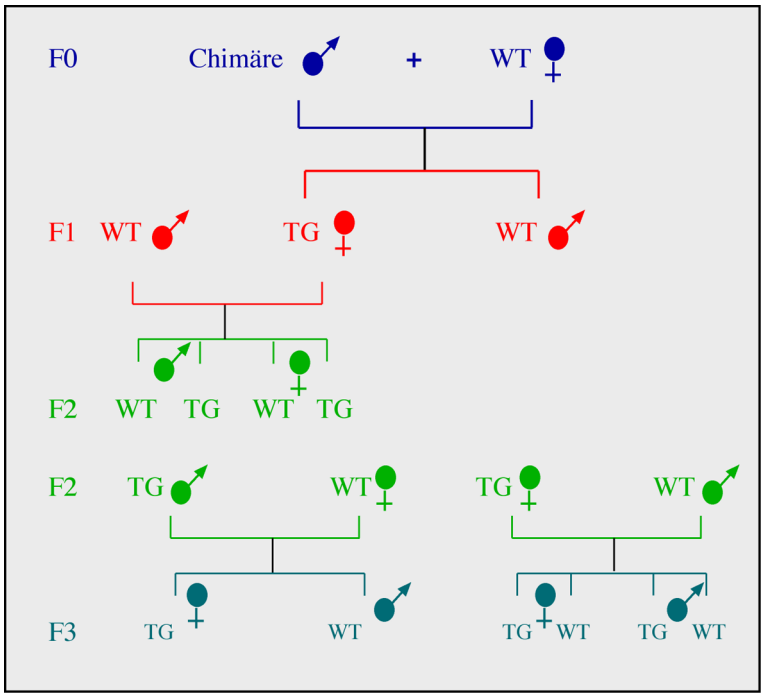


Abb. 17: Vererbungsschema der ersten Generationen der Mauslinie *Irx2*-184.

Es kommt zu unterschiedlicher Merkmalsausprägung je nachdem, welche Keimbahn vom transgenen Allel durchlaufen wurde, wie in der Abbildung beschrieben wird. F0-F3: Generationsfolgen, WT: Wildtyp, TG: Transgenes Tier

Verpaarung von heterozygoten Weibchen mit Wildtyp-Männchen

Bei der Verpaarung von heterozygoten Weibchen mit Wildtyp-Männchen entstanden sowohl männliche als auch weibliche transgene Tiere. Die Verteilung der Genotypen entspricht dem Mendelschen Verhältnis von WT :TG = 1 : 1 (111 : 110 und 67 : 60 bei den Männchen und 46 : 50 bei den Weibchen)(Abb. 18).

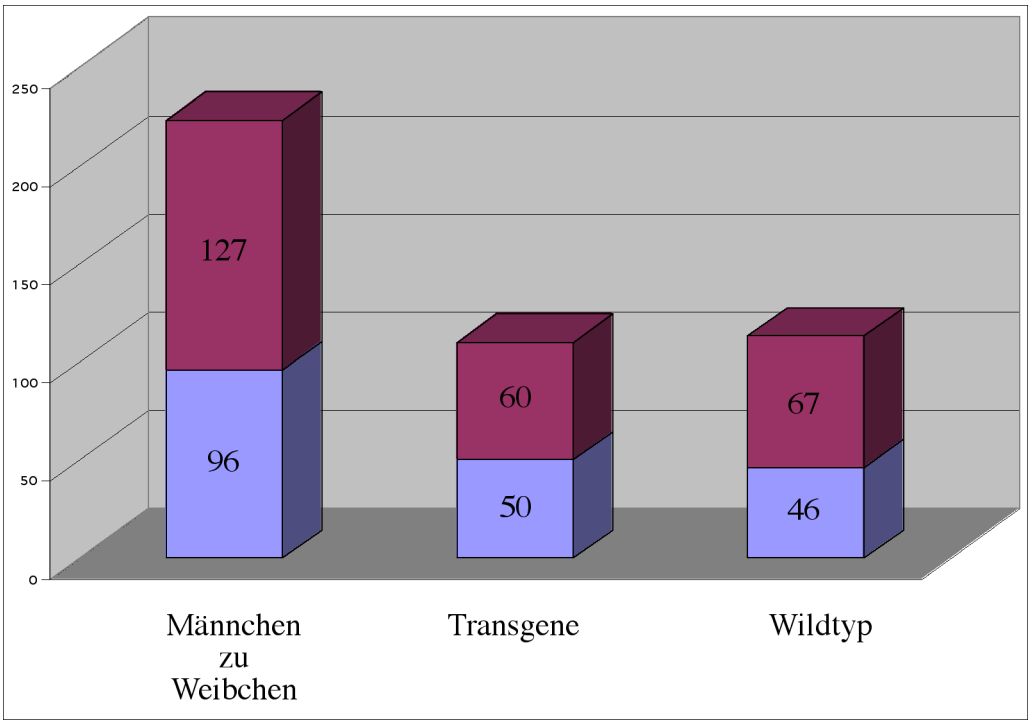


Abb. 18: *Irx2*-Verpaarungsergebnisse von heterozygoten Weibchen mit Wildtyp-Männchen.

Das Balkendiagramm gibt die Verhältnisse der entstehenden Genotypen in Verbindung zu ihrem Geschlecht an. Die rot markierten Balken entsprechen den Männchen, die blauen den Weibchen. Die Y-Achse gibt die Anzahl der untersuchten Nachkommen an.

Verpaarung von heterozygoten Männchen mit Wildtyp-Weibchen

Die Verpaarung von heterozygoten Männchen der F2 Generation ergab eine bemerkenswerte Verteilung. Die Verteilung der Genotypen entspricht ca. einem Verhältnis von Wt : TG = 1 : 1 oder 59 : 44 Wildtypmäusen zu transgenen Tieren (Abb. 19). Die Analyse der Genotypen in Bezug zum Geschlecht der Tiere zeigte, dass alle transgenen Tiere weiblich sind.

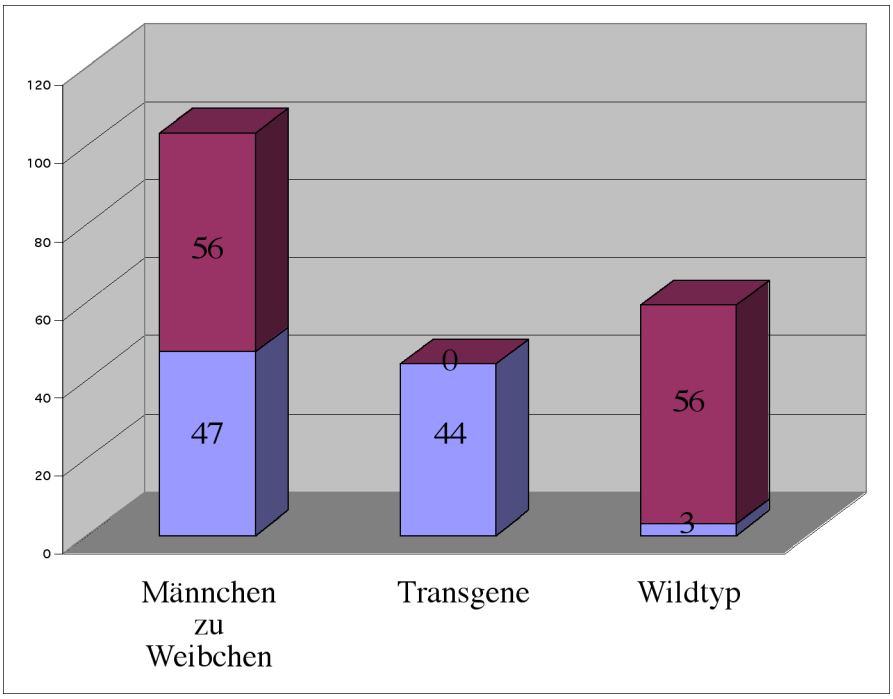


Abb. 19: *Irx2*-Verpaarungsergebnisse von heterozygoten Männchen mit Wildtyp-Weibchen.

Das Balkendiagramm gibt die Verhältnisse der entstehenden Genotypen in Verbindung zu ihrem Geschlecht an. Die rot markierten Balken entsprechen den Männchen, die blauen den Weibchen. Die erste Säule gibt die Anzahl der untersuchten Männchen zu Weibchen an. Die zweite Säule weist das Ergebnis der Transgenen aus und die dritte das der Wildtypen. Die Y-Achse gibt die Anzahl der untersuchten Nachkommen an.

Parallel zur Analyse der geborenen Würfe wurden Embryonen der Stadien E8,5 bis E18,5 genotypisiert und auf ihr Geschlecht hin getestet. Da die ersten morphologischen Unterschiede in der Entwicklung der Geschlechtsorgane erst ab E14,5 entstehen, fällt die visuelle Geschlechtsbestimmung aus. Stattdessen wurde eine *SRY*-PCR entwickelt. Das Gen *SRY* liegt auf dem Y-Chromosom und ist spezifisch für männliche Tiere. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Genotypisierung hinsichtlich des *Neomycin*-Gens (obere Reihe) zur Identifizierung der transgenen Tiere und der *SRY*-Geschlechtsbestimmung (untere Reihe). Auch die Analyse embryonaler Würfe bestätigt die auffällige geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen. Es gibt keine männlichen heterozygoten Tiere im Alter zwischen E8,5 bis E18,5 (Abb. 20).

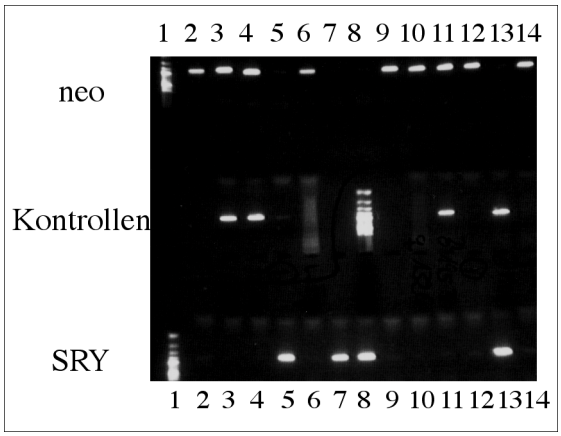


Abb. 20: Genotypisierungsergebnis der Nachkommen eines Wurfes im Alter von E9.0 entstanden aus einer Verpaarung eines heterozygoten Vaters und einer Wildtyp-Mutter.

Die obere Reihe zeigt den Transgenen-Nachweis. Die Spuren 2 bis 14 enthalten DNA verschiedener Embryonen. Die untere Reihe zeigt den Nachweis des männlichen Geschlechts. Die Spuren 2 bis 14 enthalten wie in der oberen Reihe die DNA der entsprechenden Embryonen. Die mittlere Reihe enthältt die Kontrollen: Spur 3 bis 6 für die neoPCR: 3: DNA der Spur 2, 4: knock-out Konstrukt, 5: keine DNA, 6: WT-DNA und Spur 10 bis 13 für die SRY PCR: 10: DNA der Spur 2, 11: DNA der Mutter, 12, keine DNA, 13: DNA des Vaters.

Die Verpaarungsergebnisse weisen, wie bereits erwähnt, auf einen Genlokus mit monoallelischer Aktivität hin. Die genomische Prägung ist häufig begleitet von differentiellen Methylierungsmustern in der genomischen Sequenz des entsprechenden Gens. Großangelegte Untersuchungen der internationalen Datenbanken haben für das Chromosom 13 der Maus kein differentielles Methylierungsmuster vorhergesagt. Dennoch ist es interessant zu untersuchen, ob vielleicht ausschließlich der *Irx2*-Lokus Methylierungsunterschiede zeigt. Es gibt Restriktionsenzyme, die ihre Zielsequenzen ausschließlich schneiden, wenn sie nicht methyliert sind. Andere Enzyme sind nicht methylierungssensitiv. Die Enzyme *HpaII* und *MspI* sind Isoschizomere, sie erkennen die gleiche Schnittsequenz, aber bei methylierter DNA schneidet *MspI* nicht**.** Im Vergleich von DNA-Proben, die mit beiden Enzymen verdaut wurden und anschließender Hybridisierung mit spezifischen Sonden, ist ein unterschiedliches Schnittmuster visualisierbar.

Es wurden männliche und weibliche Wildtyp-DNA getrennt verdaut, die Fragmente aufgetrennt und mit genomischen Fragmenten des 5´Bereiches hybridisiert. Es entstand

kein differentielles Schnittmuster der Enzyme *HpaII* und *MspI* bei verschiedenen Sonden des 5´-Bereichs. Die monoallelische Expression des *Irx2*-Gens prägt sich in der untersuchten Region 5 kb vor dem ATG nicht in einem differentiellen Methylierungsmuster an den Schnittstellen der beiden Enzyme aus (Daten nicht gezeigt).

Verpaarung der Heterozygoten

Insgesammt wurden Nachkommen aus Verpaarung von Elterntieren, die beide heterozygot sind, 396 Nachkommen untersucht (Abb. 21) Die Verteilung der Genotypen ist wie folgt: WT : TG = 1 : 3. Die allgemeine Verteilung ist nicht auffällig. Aber die Bezugnahme auf das Geschlecht der Tiere zeigt, dass es bei den männlichen Tieren statistisch eine zu große Zahl an wildtyp Tieren (88) im Vergleich zu transgenen (115) gibt. Überraschend ist, dass die Anzahl der Wildtyp-Weibchen mit 11 aus 193 deutlich unter der zu erwartenenen Anzahl liegt.

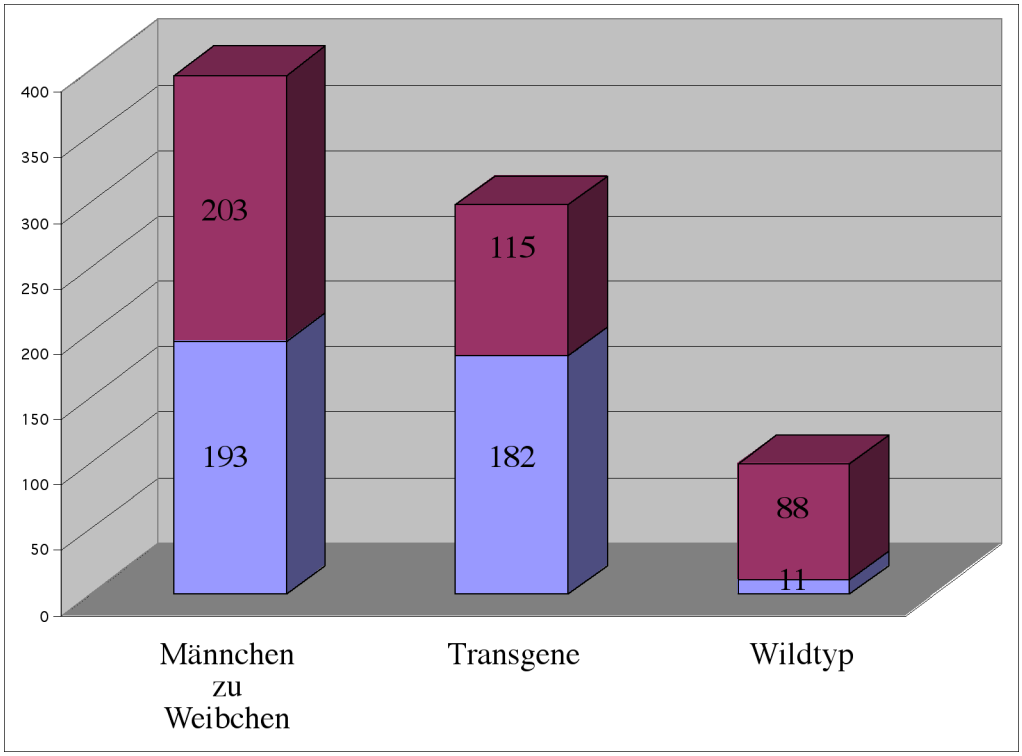


Abb. 21: Ergebnisse der Verpaarung von heterozygoten *Irx2*-Eltern.

Das Balkendiagramm gibt die Verhältnisse der entstehenden Genotypen in Verbindung zu ihrem Geschlecht an. Die rot markierten Balken entsprechen den Männchen, die blauen den Weibchen. Die erste Säule gibt die Anzahl der untersuchten Männchen zu Weibchen an. Die zweite Säule weist das Ergebnis der

Transgenen aus und die dritte das der Wildtypen. Die Y-Achse gibt die Anzahl der untersuchten Nachkommen an.

Das ausgeprägte Geschlecht kann durch Mutationen verändert werden und sogar konträr zum Genotyp sein. Das Geschlecht der Nachkommen wurde visuell anhand der sekundären Geschlechtsmerkmale bestimmt. Um die Möglichkeit zu analysieren, ob transgene Tiere bevorzugt weibliche Geschlechtsmerkmale ausbilden und daher die zu große Anzahl an weiblichen Transgenen begründen, wurden die inneren Geschlechtsorgane nach morphologischen Veränderungen untersucht. In den untersuchten Tieren konnten keine morphologisch sichtbaren Veränderungen in der Geschlechtsentwicklung festgestellt werden. Desweitern wurde mittels der PCR-Technik das Vorhandensein des Y-typischen SRY-Gens ermittelt. Genotyp und Phänotyp der Tiere in der Kolonie waren übereinstimmend. Ein Geschlechtswechsel in den transgenen Tieren liegt nicht vor (Daten nicht gezeigt).

Die Verpaarung von heterozygoten Tieren ermöglicht die Bildung von Nachkommen, die die Mutation auf beiden Allelen tragen (= sog. Nullmutante). Sie haben die Funktion des *Irx2*-Gens vollständig verloren. Bis zum Alter von E18.5 konnten homozygote Tiere nachgewiesen werden, jedoch nicht nach der Geburt. Folglich sterben die homozygoten Tiere mit *Irx2*-Deletion bei der Geburt.

Die männlichen Chimären der Mauslinie *Irx2*-184 wurden mit Weibchen der Wildtyp-Stämme 129Sv und NMRI verpaart. Erwartet wurde eine Verteilung von Wildtypmäusen (WT) zu heterozygoten Tieren (+/-) nach der Mendelschen Regel von 1 : 1. Die Analyse zeigte, dass nur +/- Weibchen geboren wurden, nicht aber +/- Männchen. Die Verpaarung von heterozygoten Weibchen der F1-Generation mit Wildtyp-Männchen ergab eine Verteilung an heterozygoten Tieren entsprechend den Mendelschen Regeln. Wurden Männchen der F2-Generation weiterverpaart, so wiederholte sich das Ergebnis der F1-Generation, es wurden keine +/- Männchen geboren. Wurden Weibchen der F2-Generation weiterverpaart, so ergab sich eine Verteilung entsprechend den Mendelschen Regeln. Der Phänotyp variiert, je nachdem, ob die Mutation durch die väterliche oder die mütterliche Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben wird. Dieses Phänomen der Ungleichheit eines Allels hinsichtlich der elterlichen Abstammung ist ein Anzeichen für genomische Prägung.

II.2.6.2 MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Das mit dem Reporterkonstrukt eingebrachte *LacZ*-Gen wurde über den *Iroquois*-Lokus kontrolliert, daher wurde es räumlich und zeitlich spezifisch wie das *Irx2*-Gen reguliert. Seine Aktivität ließ sich über eine Farbreaktion nachweisen. Durch die Expressionsanalysen konnte bestimmt werden, das die frühe *Irx2*-Expression, von E8,5 bis E12,0, von einem eigenen Enhancer gesteuert wurde. Dieser Enhancer mußte in dem deletierten Bereich liegen, der 70bp vor dem ersten ATG begann und drei Introns umfaßte. Dabei wurde dieser Enhancer mit entfernt. Die Genexpressionsbereiche von *Irx2* konnten in den Entwicklungsstadien von E8,5 bis E12,0 daher nicht mittes *LacZ*-Färbung dargestellt werden, wohingegen die Aktitvität des *LacZ*-Gens von E12,5 an positiv von den verbleibenden Kontrollregionen von *Irx2* beeinflußt wurde. Morphologisch waren keine Störungen im Aufbau der Embryonen zu erkennen (Abb. 22). Die Hirnblasen, das Blutgefäßsystem, die Extremitäten und auch die Rumpflänge entsprach den erwarteten Werten.

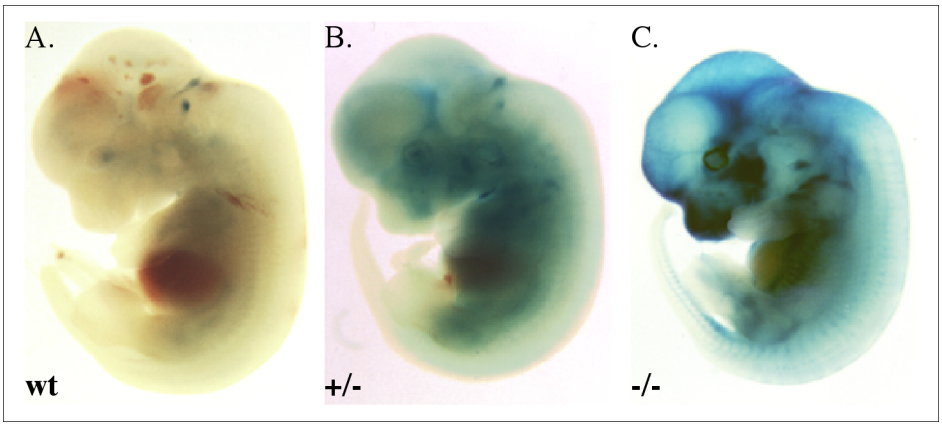


Abb. 22: *LacZ*- Färbung von Embryonen im Alter von E12.5.

Embryo A ist genetisch Wildtyp und zeigt keine *LacZ*-Färbung. Die beiden blauen Punkte im Hinterhirn entstehen bei jeder Färbung und sind als unspezifische Hintergrundreaktionen zu betrachten. Embryo B enthält eine Kopie des Transgens und Embryo C zwei Kopien, dementsprechend ist das Signal höher. Der morphologische Aufbau der Embryonen ist nicht gestört und es sind keine Wachstumsdefizite zu erkennen.

Histologische Schnitte von Embryonen verschiedenen Alters wurden angefertigt und untersucht. Es konnte keine Abweichung in der Morphologie entdeckt werden. Die folgende Abbildung vergleicht Schnitte eines Wildtyp-Embryos und eines homozygoten Tieres im Alter von E12,5. Auch sie sind ein Beispiel dafür, dass keine Unterschiede im generellen Aufbau der Organe entstanden sind. Folgende Abbildung zeigt, dass der Aufbau wichtiger Organe wie auch einiger Sinnesorgane nicht gestört ist (Abb. 23).

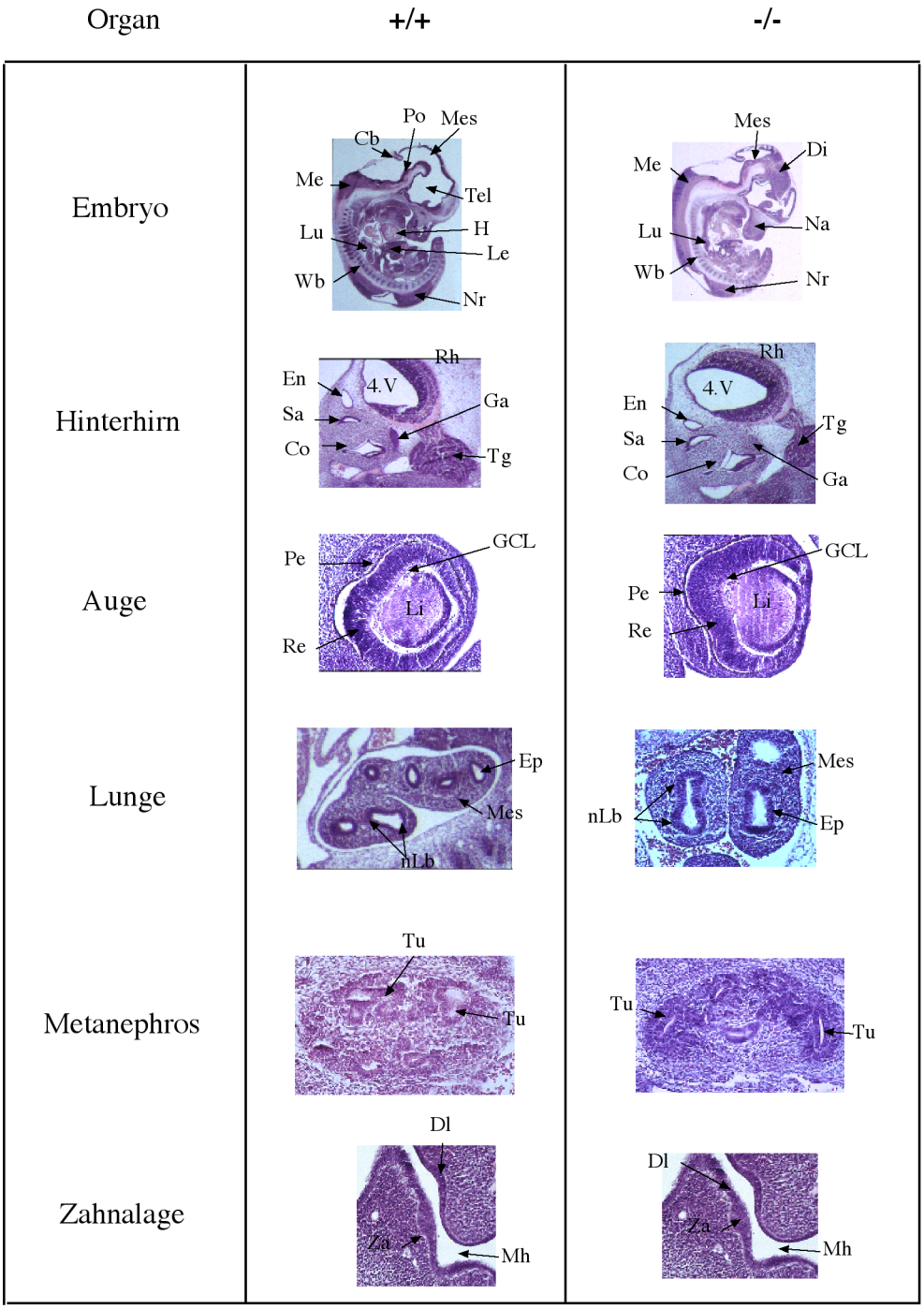


Abb. 23: Histologischer Vergleich ausgewählter Organe von *Irx2*-Mutanten und Wildtyp-Tieren im Alter E12,5.

gesamter Embryo: Die Körper sind vollständig dreidimensional aufgebaut. Cb: Cerebellum, H: Herz, Le: Leber, Lu: Lunge, Me: Medulla, Na: Nase, Nr: Neuralrohr, Po: Pons, Tel: Telencephalon, Wk: Wirbelkörperanlage

Hinterhirn: Die Orientierung des Hinterhirns mit den wichtigen Nervenverbindungen zum Trigeminus sind aufgebaut. Die Anlagen des Innenohrs liegen vor. Co: Cochlea,

En: Endolympfsack, Ga: Ganglion des VIII. Hirnnervens, Rh: Rhombische Lippe, Sa: Sacculus, Tg: Trigeminalganglion.

Auge: Es bildet sich zum richtigen Zeitpunkt die Ganglionzellschicht. GCL: Ganglionzellschicht , Pe: Pigmentepithel, Re: Retina

Lunge: Neue Lungenbläschen (nLB) entstehen mit einer klaren Unterteilung in Epithel (Ep) und Mesenchym (Mes).

Metanephros: In sich formenden Metanephros entstehen die typischen Gänge (Tu).

Zahnanlage: Die Verdickung der Dentallamina (Dl) hat in der Mundhöhle (Mh) mit der Bildung der Zahnanlage (Za) begonnen.

Die Untersuchung an histologischen Schnitten zu verschiedenen Zeitpunkten ergab keine Hinweise auf den Grund der embryonalen Lethalität der homozygoten Tiere. Die Funktionalität von Organen und des Zentralnervensystems läßt sich morphologisch nur bedingt bewerten.

Der perinatale Tod deutet auf das Versagen von lebenswichtigen Organen wie zum Beispiel des Atemsystems hin.

II.2.6.3 Humane Lokalisation von Irx2 und das Cri-du-chat Syndrom

Um Hinweise auf die Verbindung der *Iroquois*-Gene zu einem möglichen humanen Syndromen zu analysieren, wurde mittels FISH *in situ*-Hybridisierung die Lokalisation von *Irx2* im Genom des Menschen untersucht. *Irx2* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 5, an die Position 5p15.3. Die tandemartige Organisation der *Iroquois*-Gene ist auch im Menschen konserviert. So sind die humanen Orthologe *(hIrx1, hIrx2* und *hIrx4)* auf Chromosom 5 (5p15) ebenfalls geklustert. Neben der Nukleotidsequenz ist auch die chromosomale Organisation konserviert.

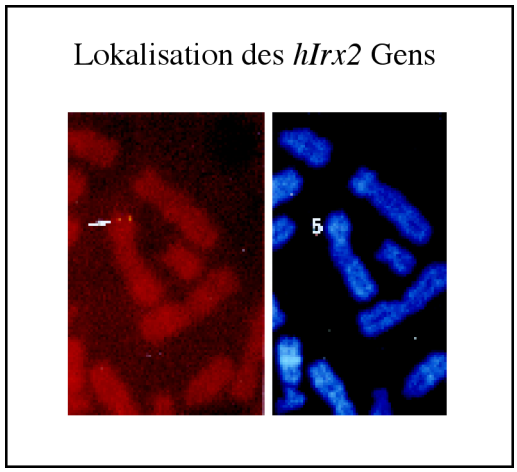


Abb. 24: Chromosomale Lokalisation des humanen *Iroquois*-Gens *hIRX2*.

Mittels *FISH-in-situ*-Analyse mit einer spezifischen Sonde für das humane *IRX2*-Gen wurde die chromosomale Lokalisation ermittelt auf dem Chromosom 5. Die Fluoreszenzsignale sind mit einem Pfeil hervorgehoben.

Die chromosomale Position 5p15 ist verbunden mit dem menschlichen Katzenschrei-Syndrom (cri-du-chat, CDC). Liegt eine heterozygote Deletion in diesem Bereich vor, so entwickelt sich je nach Größe und Position der Veränderung ein unterschiedliches Krankheitsbild. Homozygote Merkmalsträger sind nicht bekannt. Beeinträchtigt sind bei den Patienten neben ihren geistigen Fähigkeiten, die Entwicklung des Kehlkopfes und die Funktionalität von Organen wie Herz, Lunge und Nieren. Die Lokalisation von *Irx2* in der kritischen chromosomalen Region des Syndroms macht seine Beteiligung im CDC wahrscheinlich.

Für eine *Irx2*-Analyse in Bezug auf CDC stand nur eine DNA-Probe eines Patienten zur Verfügung. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Engel vom Humangenetischen Institut in Göttingen zur Verfügung gestellt. Dabei wurde analysiert, ob der CDC-auslösende Bruchpunkt im *Irx2*-Gen liegt. Dieses ist mittels eines veränderten Restriktions-Bandenmuster, gefolgt von einer Hybridisierung mit spezifischen Sonden detektierbar. Das ist im Southern Blot nachweisbar, wenn der Bruchpunkt im *Irx2*-Gen liegt und damit die Abfolge der Sequenz verändert ist. Allerdings tragen viele Patienten große Deletionen, die eine Zuordnung zu einem speziellen Gen in der kritischen Region unmöglich machen. Die untersuchte DNA des Patienten zeigte eine große Deletion und erwies sich als ungeeignet (Daten nicht

gezeigt). Aufgrund der chromosomalen Lokalisation ist *Irx2* als Kandidatengen für die Auspägung der monochromatischen Stimme der Neugeborenen und der Verzögerung des Spracherlernens einzustufen.

II.2.7 ENTWICKLUNG DER MEHRFACHEN SELEKTION IN ES-ZELLEN UND ERSTELLUNG DER DOPPELMUTANTE IRX1/IRX2.

Die Gene der *Iroquois*-Genfamilie sind durch Duplikation jeder aus dem anderen hervorgegangen. Dabei kommt es meist zur Entwicklung neuer, spezifischer Funktionen. Es können aber auch Bereiche mit überlappenden Funktionen entstehen. Um mögliche redundante Phänotypen zwischen *Irx1* und *Irx2* auszumachen, wurde der Doppel-Knock-out von *Irx1* und *Irx2* durchgeführt. Es wurden diese beiden Gene ausgesucht, da ihre Orte der Genaktivität in der Lunge zum Beispiel vollständig überlappen. Theoretisch wäre es auch interessant gewesen, die paralogen gene *Irx2* und *Irx5* in einer Doppelmutante zu untersuchen., jedoch existierte zum Zeitpunkt der Erstellung der Doppelmutante von *Irx5* erst ein cDNA -Fragment.

Für die Generierung der Doppelmutante wurden die bereits *Irx2*-transgenen ES-Zellen genutzt (Abb. 25). Sie wurden ein zweites Mal elektroporiert mit einem Rekombinationskonstrukt, indem die Homeodomäne von *Irx1* entfernt wurde. Die Deletionskassette für den Doppel-Knock-out ersetzt den Bereich der *Irx1* Homeobox durch das *Puromycin*-Gen (*pKO-puro*; Stratagene). Wichtig ist die Verwendung eines zweiten selektiven Markers. Die *Irx2*-transgene Zellen sind mittels *Neomycin* auf die Integration getestet worden. Um die Integration des zweiten Transgens zu kontrollieren, wird das *Puromycin*-Gen als positiver Selektionsmarker eingesetzt, da ein Vorteil von *Puromycin* ist, dass es sehr effizient wirkt und die Selektion in weniger als fünf Tagen beendet werden kann. Weiterhin wurde bei dieser Kassette auf der 5´-Seite außerhalb des homologen Bereiches die *HSV-Thymidin-Kinase* (*Tk*) als negativer Selektionsmarker eingebaut. Dieser negative Selektionsmarker diente dazu, möglichst viele falsch integrierte Stammzellen zu selektieren und auszuschließen. Bei der nicht homologen Rekombination wird auch das *Tk*-Gen integriert und dementsprechend das Protein gebildet. Dieses ist allerdings für die Zelle toxisch. Bei homologer Integration des Rekombinationskonstrukts wird hingegen das *Tk*-Gen abgeschnitten und intrazellular

abgebaut. Als Basis der Klonierung für das *Irx2*-Konstrukt dient der Vektor pKO-#1908 (Stratagene).

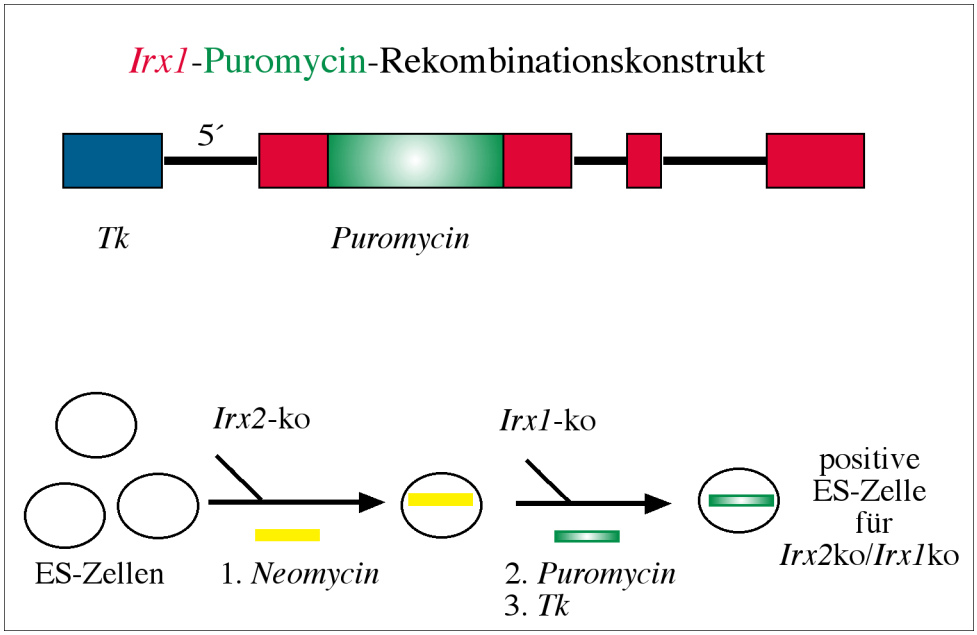


Abb. 25: Skizze über die Strategie der Erstellung des *Irx1/Irx2*- Doppel-Knock-out.

Die Deletionskassette für den Doppel-Knock-out ersetzt den Bereich der *Irx1* Homeobox durch das *Puromycin*-Gen. Der Ablauf des Experimentes sieht vor, dass ES-Zellen, die bereits das *Irx2*-Ko-Konstrukt tragen und damit Neomycin resistent sind in einer weitern Elektroporation mit dem *Irx2*-Ko-Konstrukt transfiziert werden. Dadurch ist die dreifache Selektion auf *Neomycin*, *Puromycin* und *Tk* möglich.

Die Qualität der ES-Zellen hinsichtlich einer Keimbahntransmission nimmt mit zunehmender Anzahl der Passagen ab. In diesem experimentellen Ansatz mußten die ES-Zellen drei verschiedene Selektionen mit der entsprechenden Anzahl an Passagen durchlaufen und überleben. Es wurden mehrere Klone identifiziert, die beide Rekombinationskassetten an homologer Stelle enthalten. Für die Bildung des Doppel-Knock-out ist es essentiell, dass beide Kassetten auf demselben Chromosom intergriert werden, da sie ansonsten bei der Verpaarung zur F1-Generation unterschiedlich segregiert werden. Daher wurde eine FISH- *in-situ* Analyse durchgeführt, um die tatsächliche chromosomale Lokalisation beider Rekombinationskonstrukte festzustellen. Vier ES-Zellklone wurden aggregiert, von denen einer in die Keimbahn gelangte.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es möglich ist, die ES-Zellen einer dreifachen Selektion mit der entsprechenden Anzahl an Passagen auszusetzten und trotzdem verlieren sie

nicht ihr Potential, Keimbahnzellen zu bilden, nicht verloren. Die Analyse der Doppelmutanten wurde frühzeitig beendet, da der Phänotyp des singulären *Irx2*-Knock-outs eine frühe embryonale Lethalität zur Folge hat. Die Embryonen zeigen eine gestörte Gastrulation und sterben um E6.5 ab (Zülch, 2001). Eine überlappende Funktion beider Gene kann es zu diesem Zeitpunkt nicht geben, da *Irx2* erst ab E8,5 aktiv ist. Die Erstellung des Doppelknock-out war eine Kollaboration zu gleichen Teilen mit Armin Zülch.

II.3 EXPRESSIONSANALYSE DES *IRX2*-GENS

Das Wissen über einen räumlichen und zeitlichen Expressionsverlauf eines Gens gibt wesentliche Anhaltspunkte zu dessen Funktion. Dazu wurde die *Irx2*-Genaktivität vom embryonalen Alter E8,5 bis zur Geburt untersucht. Neben der Analyse der regional spezifischen Expressionsdomänen wurden zusätzlich einzelne Organe untersucht. Zu der Analyse verschiedener Entwicklungsstadien der Maus wurden Embryonen bis zu einem Alter von E11,5 sowie freipräparierte Organe mit der nicht radioaktiven Gesamtköper (whole-mount-) *in-situ*-Hybridisierung und ältere Stadien der mausentwicklung auf Paraffinschnitten mittels radioaktiver *in-situ*-Hybridisierung verwendet.

II.3.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE IRX2-EXPRESSION

Irx2 zeigt eine spezifische, aber auch sehr dynamische Genaktivität während der embryonalen Entwicklung der Maus (Abb. 26). Die Expressionsbereiche lassen sich sowohl zeitlich als auch räumlich unterteilen. Der folgende Abschnitt faßt die wichtigsten Schritte der dynamischen Expression zusammen, um dann auf einzelne regionale Schwerpunkte wie den Schlunddarm und die Lunge einzugehen.

Die frühe Genaktivität von *Irx2* von E8,5 bis E12,5 zeigt ein regionalisierendes Muster, wohingegen die späteren Expressionsdomänen an Orten aktiver Zelldifferenzierung lagen (Abb. 26). Generell ist das *Irx2*-Transkript in Abkömmlingen

aller drei Keimblätter vorhanden. Die Expression liegt in ektodermalen Derivaten (ZNS, Haut und Zahnanlagen), in mesodermalen (undifferenziertes Mesenchym und Knorpel) und in endodermalen (Lungenepithel) Komponenten vor.

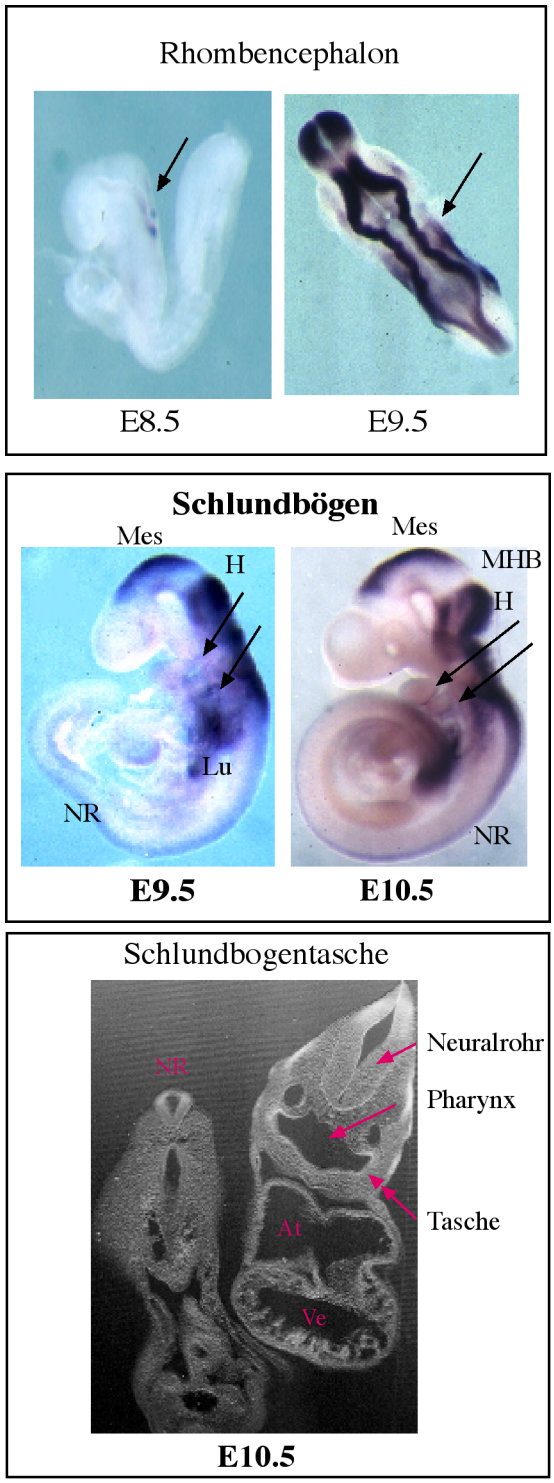


Abb. 26: Darstellung der *Irx2*-Aktivität in den embryonalen Stadien E8,5 bis E10,5.

oben: Der Transkriptionsstart des *Irx2* Gens liegt zeitlich bei E8,5 und räumlich in Rhombomer vier (Pfeil). Die Expression breitet sich über das ganze Rhombencephalon aus (Pfeil). Ebenfalls beginnt die Aktivität im Mesencephalon bei Tag E9,5.

mitte: Die Expression manifestiert sich im Mittel- und im Hinterhirn. Weiter Orte der Genexpression sind die Lunge (Lu), das Neuralrohr (NR) und die ersten beiden Schlundbögen (Pfeile).

unten: Die frontale Schnittebene ermöglicht den genauen Einblick in die *Irx2*-Expression der Schlundbogentasche, sowohl im Ektoderm als auch im Endoderm des Pharynx.

Die *Irx2*-Expression beginnt im Embryonalstadium E8,5 und liegt dabei im Hinterhirn (Abb. 26). Die *Irx2*-Genaktivität ist dort in Rhombomere vier zu finden und breitet sich bis E9.0 über alle Rhombomere aus. Es gibt eine funktionelle Verbindung zwischen dem Aufbau des Rhombencephalons, der Organisation der Hirnnerven und der Zuordnung von auswandernden Neuralleistenzellen bzw. mesodermalen Zellen in die Schlundbögen, ob auf der Höhe des vierten Rhombomers Neuralleistenzellen in den zweiten Schlundbogen entsandt werden. Desweiteren entspringen hier die Wurzeln der beiden Hirnnerven VII (Vestibucochlearer Nerv) und VIII (Glossopharyngealer Nerv).

Irx2 Genaktivität zeigt sich in der Schlundtasche zwischen dem ersten und dem zweiten Schlundbogen im embryonalen Stadium E9,5. An dieser Stelle liegen Ektoderm und Entoderm direkt aufeinander. Diese Furche wird den äußeren Gehörgang und die Paukenhöhle des Mittelohrs bilden, beides sind Orte von *Irx2* Expression, besonders im Alter E18,5 (Daten nicht gezeigt). In den Schlundbögen sind jeweils einzelne Zellen *Irx2* positiv. Ebenfalls im Alter von E9,5 entsteht im Mesencephalon (Mittelhirn) die zweite zentralnervöse Expressionsdomäne. Das Organisationszentrum im Hinterhirn, die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHB) ist scharf ausgespart.

Die *Irx2*-Genexpression zeigt sich in den folgenden Entwicklungsstadien im Dien-, im Mesen-, im Meten- und im Myelencephalon, nur der proximalste Teil, das Telencephalon bleibt expressionsfrei.

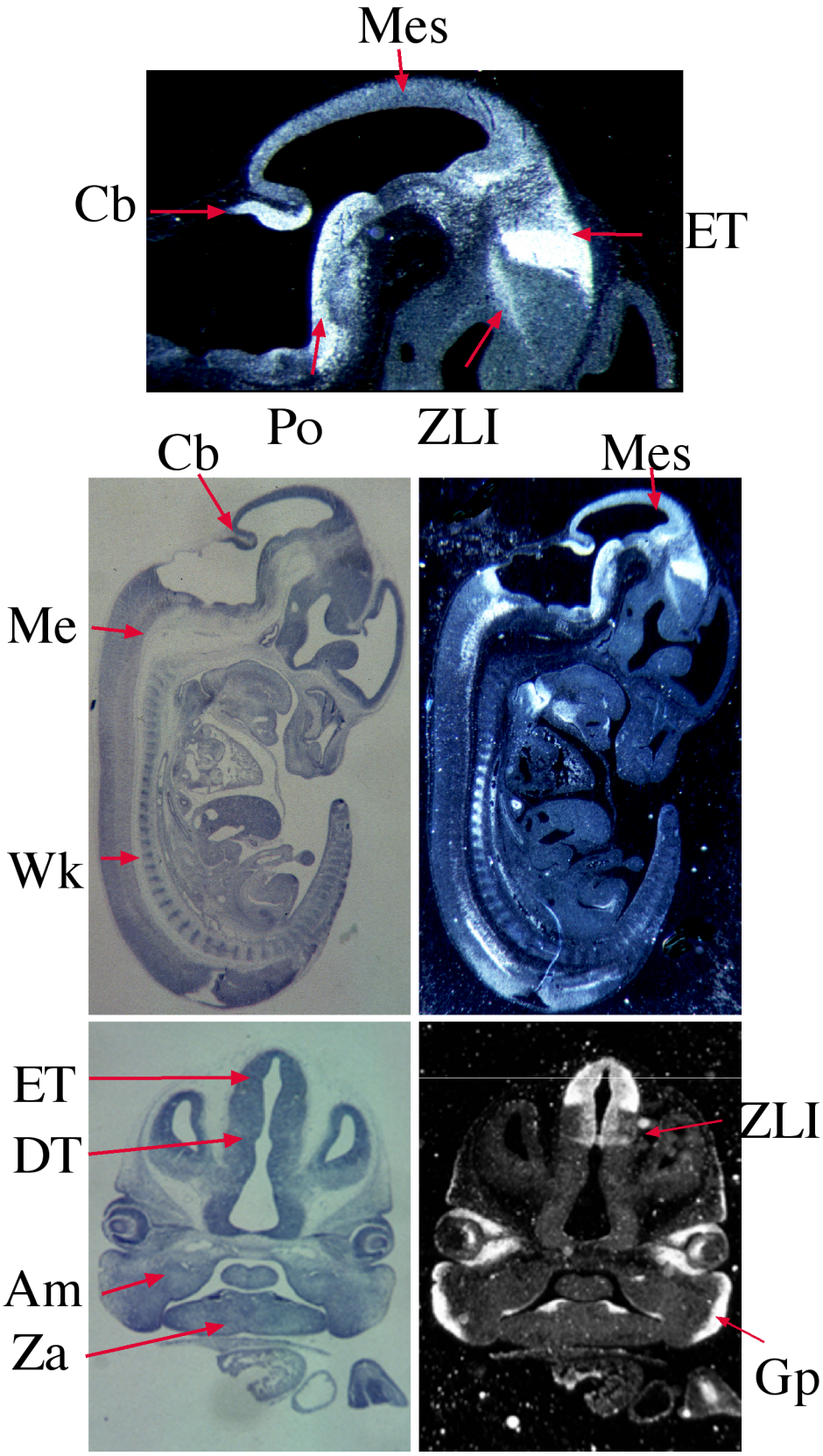


Abb. 27: Zentralnervöse Expression von *Irx2* im embryonalen Stadium E12,5, dargestellt auf Gewebeschnitten mittels radioaktiver Markierung der Genaktivität.

oben: Vergrößerung der sagitalen Ansicht des Gehirns. Die Expression liegt im Epithalamus (ET), der Zona limitans (ZLI), im Mesencephalon (Mes), in der Kleinhirnanlage (Cb) und in der Brücke (Po) vor.

mitte: Sagitale Ganzkörperansicht in Hell- und Dunkelfeld. Im Dunkelfeld ist die *Irx2*-Aktivität durch die weiße Farbmarkierung zu erkennen. Neben den eben beschriebenen Domänen liegt *Irx2* Aktivität in der Medulla (Me), dem Thyroidknorpel (Tk), der Lunge (Lu) und den Wirbelkörpern (Wk) vor.

unten: Frontale Kopfansicht in Hell- und Dunkelfeld. Diese Schnittrichtung eröffnet den Blick auf die hochspezifische Expression im Diencephalon. Im Epithalamus (ET) liegt *Irx2* Aktivität sowohl im der Ventrikular- wie auch in der Mantelschicht vor. Im Dorsalen Thalamus (DT) ist Aktivität in der Ventrikularschicht zu finden. Weitere Expressionsdomänen sind die Zona limitans (ZLI), das Augenmesoderm (Am), die Retina, die Zahnanlagen (Za) und die epipharyngeale Plakode des Gesichts (Gp).

Die Expression an E12,5 im Diencephalon, das kranial an die Vierhügelplatte *(Lamina tecti)* grenzt, zeigt sich in der sagittalen Sicht im Epithalamus und in der *Zona limitans intrathalamica,* die dorsalen und ventralen Thalamus voneinander trennt und später zur Medulla lamina wird. Der Epithalamus, der dem Thalamus dorso-kaudal aufsitzt, entwickelt sich im Adultus zur Epiphyse (Zirbeldrüse). Die Zirbeldrüse enthält speziell differenzierte Neurone, die eine endokrine Funktion zeigen; sie produzieren das Hormon Melatonin, welches als Vermittler der zirkadianen Rhythmik agiert. In der frontalen Ansicht zeigt sich, dass die Ventrikularzone des dorsalen Thalamus eine zusätzliche Region von *Irx2*-Aktivität ist, die in der sagittalen Ansicht nicht sichtbar ist (Abb. 27). Der Thalamus setzt sich aus vielen Einzelkernen zusammen, die durch zahlreiche Assoziationsfasern eng miteinander verbunden sind. Allgemein kann gesagt werden, dass er das "Tor zur Großhirnrinde" ist, da nahezu alle sensiblen und sensorischen Bahnen im Thalamus kreuzen und von hier aus zur Großhirnrinde verschaltet werden, wobei zahlreiche Integrationsvorgänge und vermutlich sogar eine selektive Auslese der Sinnesinformationen stattfinden.

Die Brücke *(Pons)*, die dem *Cerebellum* gegenüberliegt und vom *Isthmus rhombencephalic* bis zur *Medulla oblongata* reicht, besteht aus der dem Ventrikel zugewandten dorsalen Kernschicht (*Pars posteriores pontis*) und der ventral liegende Faserschicht (*Pars anteriores pontis*). Die Brücke und die *Medulla oblongata* bilden den rautenförmigen Boden und das Cerebellum das Dach des vierten Ventrikels. Die *Irx2*-Genexpression liegt sowohl in der Ventrikularzone, die die pontinen Kerne enthält, als

auch im Bereich der Nervenfasern vor, die zur *pontinen Formatio reticularis (FR)* gehören. Diese durchziehen das ganze Hirnstammtegmentum bis ins Rückenmark hinab und sind funktionell für die Verschaltung von Reflexen zuständig. Im Boden der Rautengrube liegen das Brech- und Atemzentrum, im medullaren Bereich das Kreislaufzentrum.

Im Neuralrohr ist *Irx2* entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert und zwar dabei sowohl im dorsalen Rückenmark in der Schicht der proliferierenden Nervenzellen als auch in den Interneuronen in der ventralen Hälfte. Desweiteren liegt *Irx2*-Aktivität in den Ganglienzellen der Retina (Abb. 27) und im Ganglion des VIII. Hirnnervs in den Stadien E12,5 bis 18,5 vor (Abb. 28).

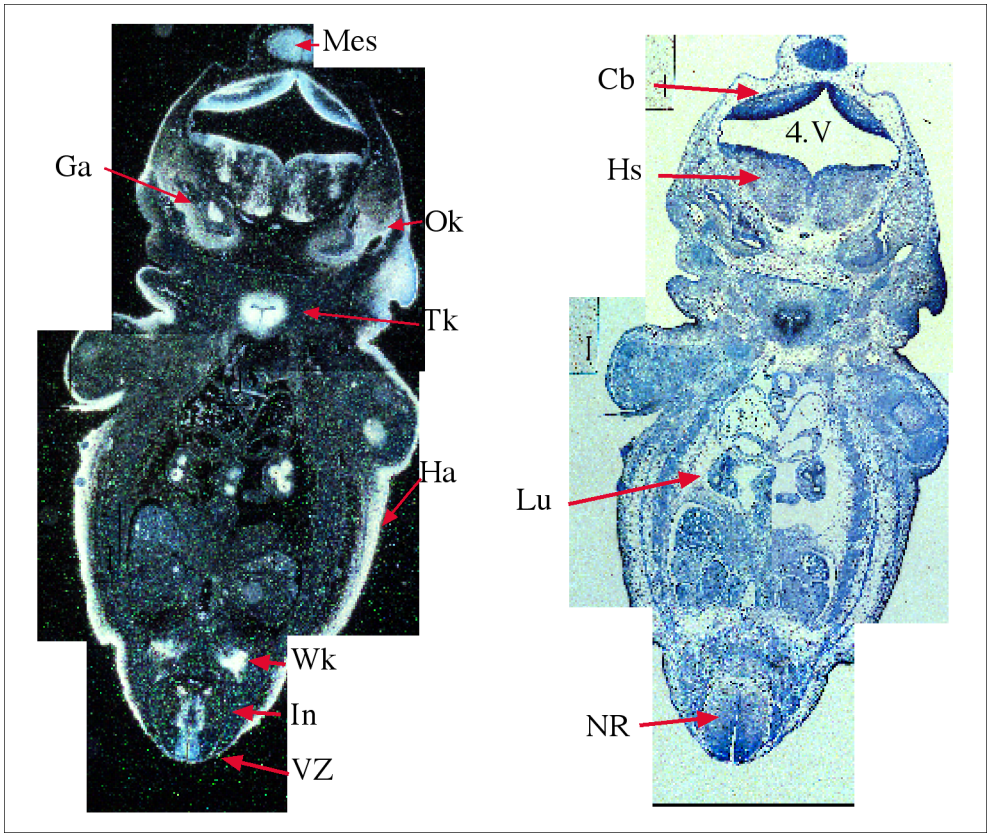


Abb. 28: Expression des *Irx2*-Gens im Stadium E12,5 (frontaler Schnitt).

Die *Irx2*-Expression zeigt sich spezifisch in den branchial-motorischen Säulen, der Formatio reticularis, im Hirnstamm (Hs)und in der Cerbellaranlage (Cb). Im Rückenmark ist *Irx2* in den Interneuronen (In) und der dorsalen Venrikularschicht (VZ) aktiv. Weiter prominente Orte der Genaktivität sind das Mesencephalon (Mes), die Haut (Ha), die Lunge (Lu), die Wirbelkörper (Wk), die Ohrkapsel (Ok), das Ganglion (Ga) des VIII. Hirnnervens und die Anlage der Thyroidknorpel (Tk).

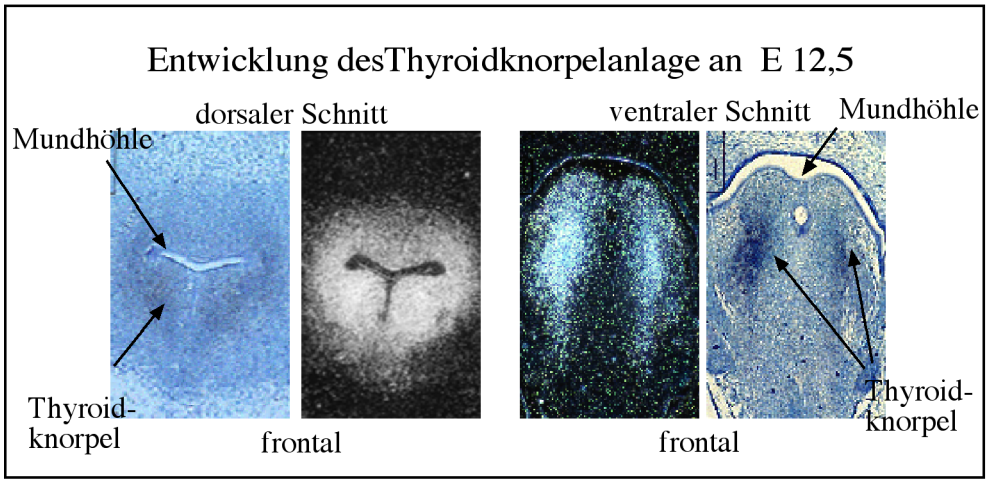
Die Haut des Embryos, insbesondere das Gesichtsektoderm der epipharyngealen Plakode, zeigt *Irx2*-Expresion (Abb. 28). Außerdem zeigt im Stadium E12,5 das Zahnleistenepithel im prospektiven Kiefer *Irx2*-Genaktivität zum Zeitpunkt der Entwicklung der Stratifizierung des ektodermalen Epithels der Mundbucht. Des weiteren liegt *Irx2*-Aktivität in Bereichen einiger mesenchymaler Knorpelvorstufen wie den Wirbelkörperanlagen, in der Anlage der Phalangen, in der Ohrkapsel und im Thyroidknorpel vor.

Mit zunehmendem Alter schwindet die breite Aktivität im Hirn und nach der Geburt bleibt sie auf einzelne Bereiche wie den *Epithalamus*, die *superioren Colliculi*, die äußere Rindenschicht des *Cerebellums*, den dorsalen *Raphekern* und einzelne Kerngebiete im *Pons* beschränkt (Becker, 1997).

II.3.2 SPEZIEFIZIERUNG DER EXPRESSION VON IRX2 WÄHREND DER LARYNXENTWICKLUNG

Im Embryo werden die Schlundbögen als transiente Grundelemente des Wirbeltierkörpers angelegt. Ihre ursprüngliche Funktion als Reusendarm oder als Kiemenapparat haben sie verloren. Sie stellen das Zellmaterial für die artspezifische Differenzierung des Viszeralskeletts und des Schlunddarms. Sie entwickeln sich zu Ober- und Unterkiefer, zum Mittelohr, zum Zungenbein und zu den Knorpeln des Kehlkopfes (Larynx). Die Zugehörigkeit von Zellen zu einem der Schlundbögen bestimmt ihr Entwicklungsschicksal. Schon bevor sie auswandern, ist Ihr Bestimmungsort festgelegt.

Irx2 Expression in der Entwicklung des Kehlkopfes



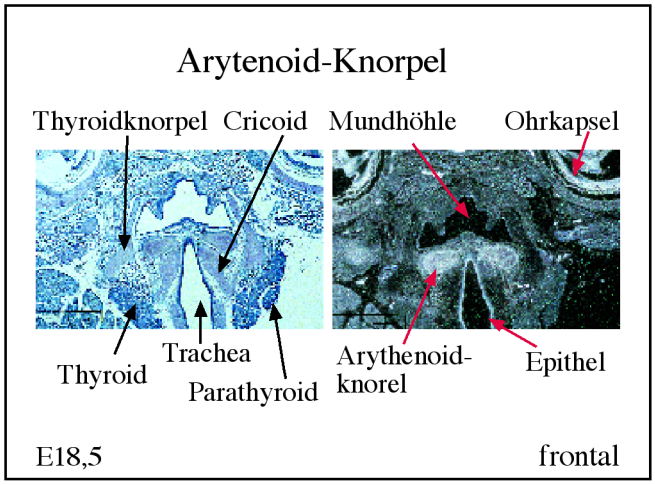


Abb. 29.: Expression von *Irx2* während der Entwicklung des Kehlkopfes analysiert an frontalen Gewebeschnitten.

oben: Die undifferenzierte Knorpelanlage für den Kehlkopf zeigt in ihrer gesamten dorso-ventralen Ausdehnung *Irx2*-Aktivität an E12,5.

unten: Im embryonalen Stadium E18,5 sind die unterschiedlichen Kehlkopfknorpel zu unterscheiden. *Irx2*-Aktivität liegt spezifisch in den Arytenoidknorpeln und nicht im Schildknorpel oder dem Cricoidknorpel vor.

An E12,5 ist eine massive Expressionsdomäne exakt in den sich entwickelnden Knorpelanlagen des Larynx zu sehen (Abb. 29). Morphologisch unterscheidbar werden die einzelnen Bestandteile des Kehlkopfes nicht vor dem Stadium E14,5 (Abb. 29). Sie entwickeln sich aus Zellen der Schlundbögen vier und sechs. Zellen dieser Bögen entstammen dem lateralen Plattenmesoderm. Kurz vor der Geburt (E18,5) zeigt sich,

dass der Kehlkopf aus dem großen Schildknorpel (Thyroidknorpel), dem Cricoid, dem Cuniculat-, dem Cuneiform- und den Arytenoidknorpeln besteht. *Irx2*-Expression ist ausschließlich in den Knorpeln der Arytenoid zu sehen. Die Arytenoidknorpel bedingen durch ihre Stellung die unterschiedliche Spannung der Stimmbänder und damit Tonlage und Modulation der Stimme.

II.3.3 EXPRESSION VON IRX2 WÄHREND DER ORGANOGENESE AM BEISPIEL DER LUNGENENTWICKLUNG

Irx2 und auch ein weiteres Mitglied der *Iroquois*-Genfamilie der Maus, *Irx1*, sind in spezifischen, nicht neuronalen Organen wie der Lunge aktiv (Becker et al., 2001). Während der frühen Säugerentwicklung bilden sich aus dem Endoderm eine Reihe von Organen wie Leber, Bauchspeicheldrüse und Lunge. Die Lungenknospen entstehen aus dem Vorderdarm der kaudalen Pharynxregion und bestehen aus epithelialen Endodermschichten, die von Mesenchym umgeben sind (Hogan and Yingling, 1998). Zwischen dem Glandularstadium und dem Kanalikularstadium der Lungenentwicklung wachsen die Lungenknospen aus, bilden dabei zuerst zwei Bronchi und später aus diesen beiden viele Bronchiolen, die sich in einem komplexen Muster verzweigen (Ten Have-Opbroek, 1991).

Die Expression von *Irx2* beginnt bei E8,5 im anterioren Vorderdarm dorsal des Herzschlauchs. In dieser Phase entwickelt sich die laryngo-tracheale Grube, die sich mehr und mehr einstülpt und zum trachealen Diverticulum wird (Kaufmann and Bard, 1999). Es kommt zur Trennung von Luft- und Speiseweg. Die Abschnürung vom Schlunddarm wächst aus und bildet die Lungenanlage. Der Pharynx teilt sich posterior in die Speiseröhre (*Oesophagus*) und die Luftröhre (*Trachea*). Nach der Trennung entstehen aus dem vorderen Teil des Diverticulums die Luftröhre und aus dem distalen die Lungenbläschen. *Irx2* markiert die Region der ersten Entstehungsschritte im Vorderdarm. Sobald die ersten Hauptbronchien gebildet sind, ist *Irx2* ausschließlich im Epithel der sich bildenden Lungenbläschen aktiv. Keine Genexpression ist in den angrenzenden Strukturen, den Blättern des Brustfells (*Pleura pulmonalis et parietalis*), dem *Ductus de Cuvier*i, in den die vordere und die hintere Cardinalvene münden, und dem umliegenden Mesenchym zu verzeichnen. Mit zunehmender Verzweigung konzentriert sich die Hauptmenge des Transkripts auf die distalen Enden

der Bläschen. Entstehen neue, so bedeckt *Irx2* Expression die Trennungszone. Die Genaktivität läßt deutlich in der Phase der Entstehung der terminalen Bronchiolen nach und endet an Tag E14.5.

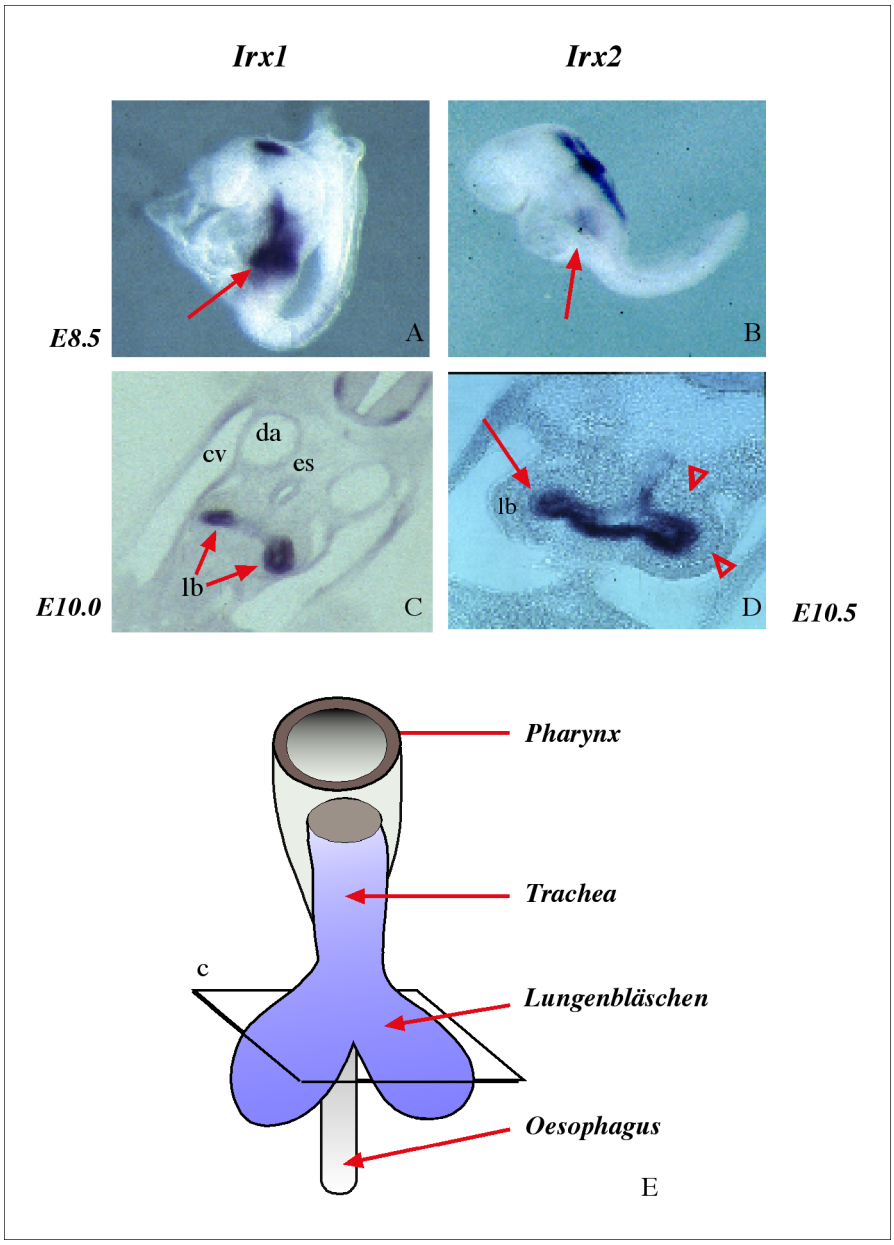


Abb. 30: Die Genaktivität von *Irx2* und *Irx1* markiert den Bereich der Entstehung der Lungenanlage.

Irx1 ist in einer breiten Domäne im Vorderdarm und im Mesencephalon aktiv (A). Die Lungenexpression (C) läßt sich auf transversalen Schnitten (E) dem Epithel der Lungenbläschen (lb) zuordnen.

Irx2 ist spezifisch im Vorderdarm (Pfeil) und im Rhombencephalon aktiv (B). Die Lungenexpression (D) zeigt sich auf transversalen Schnitten im Epithel der Lungenbläschen (lb).

In (E) ist die Schnittebene und der Aufbau der Lungenanlage in diesem Stadium angegeben. cv: Cardinalvene, da: dorsale Aorta, es: Ösophagus, lb: Lungenbläschen.

Die Aktivitäten von *Irx2* und *Irx1* liegen in überlappenden Bereichen und Strukturen vor, aber sie zeigten deutliche Unterschiede in der Intensität der Expression. Zudem ist die stets stärkere Expression von *Irx1* im Stadium E8,5 wesentlich breiter in der Vorderdarmregion ausgeprägt als *Irx2*. In diesem Stadium beginnt die *Irx2*-Expression im Vorderdarmbereich in der Region der laryngo-tracheale Falte. *Irx1* ist im Stadium E10,5 ausschließlich in der Epithelschicht der Lungenknospen, nicht aber in der mesenchymalen Schicht exprimiert. Während der nächsten Entwicklungsphase, dem Kanalikularstadium, bleibt *Irx1* weiterhin epithelial in den sich entwickelnden Bronchii exprimiert. Im Stadium E12,5 und E13,5 konzentrieten sich die *Irx1*-Transkripte vorrangig auf den distalen Bereich der sich formenden Lungen. Einen Tag später ist die Expression auf die Randbereiche der Lungen beschränkt. Die *Irx1*-Aktivität stoppt mit dem Beginn der Alveolarphase.

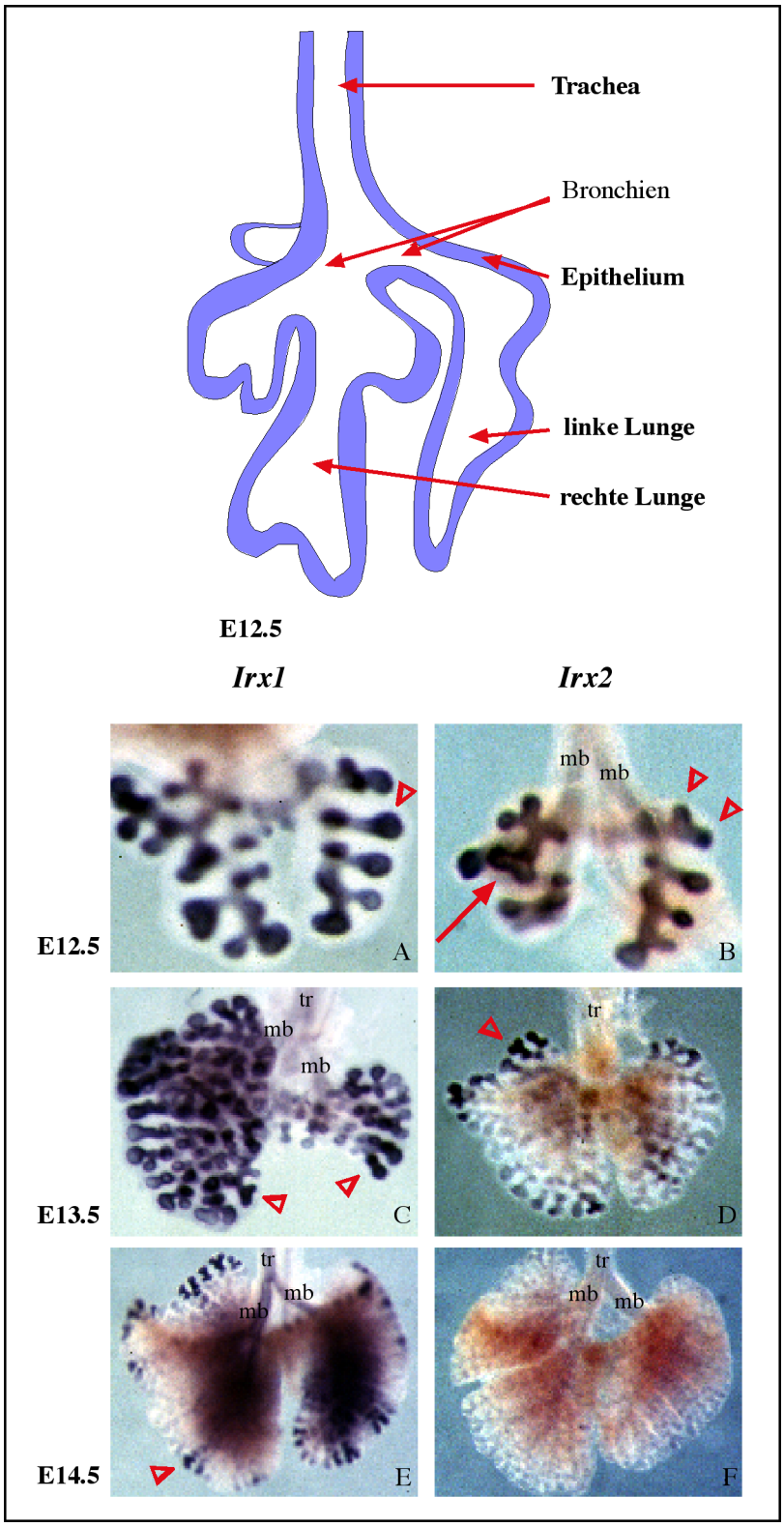


Abb. 31: Spezifische Expression von *Irx1* und *Irx2* während der Phasen des Lungendifferenzierung.

oben: Skizze des Lungenaufbaus im Stadium E12,5 mit Angabe der Position der fünf Lungenlappen.

A; C, G: *Irx1*-Aktivität ist sichtbar in den sich ständig verzwiegenden Lungenbläschen der angegebenen Stadien. Weder in den Hauptbronchien (mb) noch in der Luftröhre (tr) ist das Gen aktiv.

B, D, F: *Irx2*-Aktivität zeigt sich in den Lungebläschen und markiert das Epithel der neuentstehenden Bläschen. Das Maximum der Aktivität liegt bei E12, 5 und sie kling bis zum Stadium E14,5 ab.

Die Morphogenese der verzweigten Lungenanlage wird gesteuert durch Interaktionen von Faktoren in Epithel und Mesenchym (Spooner et al., 1994). Die Suche nach möglichen Kandidatengenen für die regulative Interaktion mit den *Iroquois*-Genen in der Lungenentwicklung erfolgt mit Hilfe der Daten aus der Analyse von *D. melanogaster*. Die *Iroquois*-Gene in der Fliege - *araucan, caupolitan* und *mirror* - regulieren den *achaete-scute* Komplex (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Ein verwandtes Gen des *achaete-scute* Komplexes in der Maus ist das Gen *Mash1* (Guillemot et al., 1993). Die Gene des *Iroquois*-Komplexes in der Fliege werden ihrerseits von *cubitus interruptus (ci)* kontrolliert. Auch für dieses Gen sind verwandte Gene in der Maus entdeckt worden: *Gli1, Gli2* und *Gli3* (Grindley et al., 1997). Die angesprochenen Faktoren der Regulationskaskade aus *Drosophila* wurden auf ihre ortsspezifischen Aktivitäten in der Lungenentwicklung getestet.

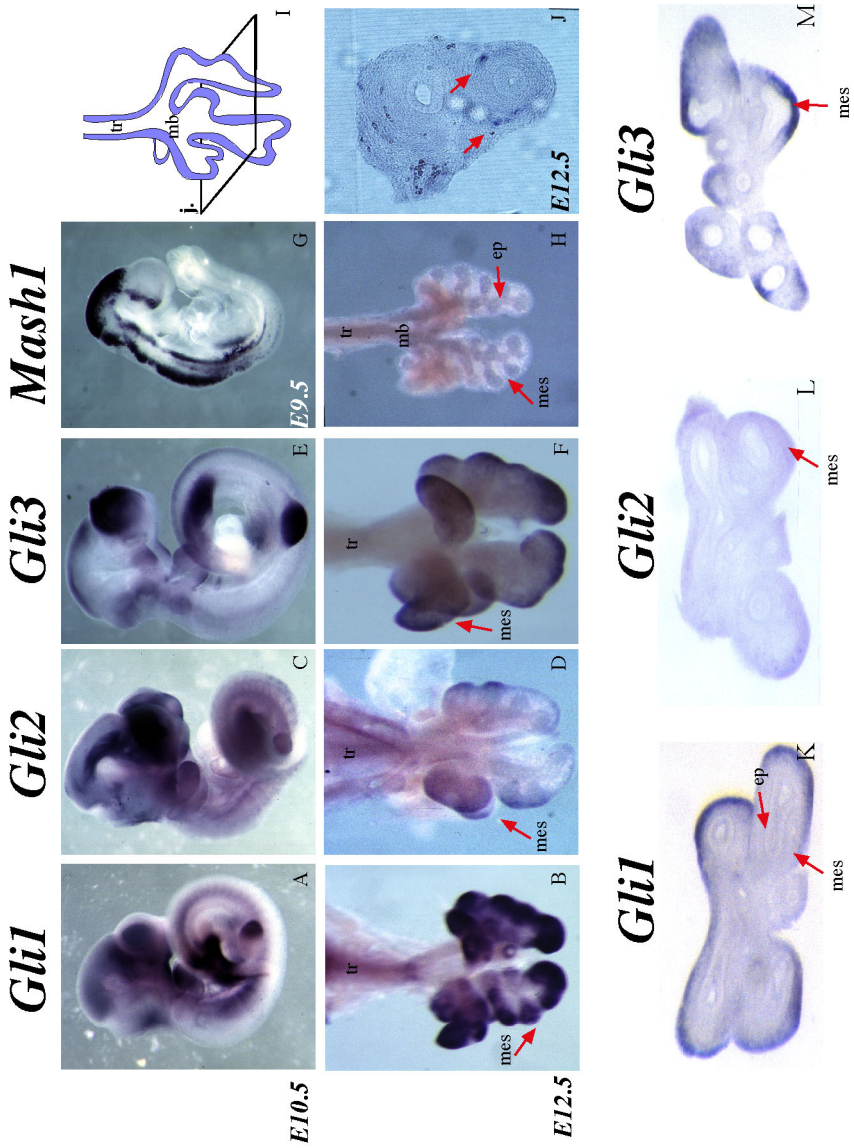


Abb. 32: Expression der drei *Gli*-Gene und *Mash1* in der Lungenentwicklung der Maus.

A, C, E, G: Übersichtsexpression der jeweiligen Gene im Alter E10.5

I: Skizzierter Lungenaufbau mit eingezeichneter Schnittebene des Bildes J.

B, D, F, H: Darstellung der Genexpressionen und Lungenanlagen im Alter von E12.5.

J: Transverse Schnitte durch die Lunge mit *Mash1*-Genexpression.

K, L, M: Transverse Schnitte, die deutlich mesenchymale Expressionen zeigen.

Die *Gli*-Gene sind nicht wie *Irx2* und *Irx1* im Epithel der Lungenbläschen aktiv, sondern im Mesenchym. Die Expression von *Gli1* ist gleichmäßig auf das Randmesenchym verteilt. Das *Gli3*-Transkript hingegen konzentriert sich auf die Mesenchymbereiche rund um neuentstehende Bläschen. *Gli2* folgt der Expression von *Gli3,* ist aber wesentlich schwächer. Entsprechend der Expressionsdomänen und der Erkenntnisse aus der genetischen Analyse in der Fruchtfliege, sind die *Gli*-Gene hervorragende Kandidaten für regulative Interaktionen, die das Verzweigungsmuster und die Differenzierung der embryonalen Lunge steuern. Bekannt ist aus Mutantenanalysen, dass in *Gli2*-Mausmutanten eine Reihe von Skelettdefekten und abnormale Lungen entstehen (Mo et al., 1997)(Motoyama et al., 1998).

Die inhaltliche Grundlage zur Auswahl des *Mash1*-Gens kommt ebenfalls aus der Analyse der Fruchtfliege. Bei den Genprodukten des *Iroquois*-Komplexes in *Drosophila* handelt es sich um Homeobox-Transkriptionsfaktoren, die die bisher einzigen bekannten positiven und direkten Regulatoren des *Achaete-Scute*-Komplex *(AS-K)* sind (Gómez-Skarmeta et al., 1995). So aktivieren *auracan* und *caupolitan* den *AS*-Komplex in bestimmten proneuralen Zellgruppen (Gómez-Skarmeta and Modolell, 1996). Da ihre Expression räumlich größer ist, als die des aktivierten *AS-K,* muß es noch weitere Kofaktoren geben, die an der räumlichen Begrenzung beteiligt sind. Die *Iroquois*-Gene definieren das Vormuster, indem Vorläuferzellen mit neuronaler Kompetenz entstehen. Diese Kompetenz wird vermittelt durch die Aktivität der proneuralen Gene, wie *achaete* und *scute* (Simpson, 1997)(Heitzler et al., 1996). Basierend auf diesem Wissen ist ein Genaktivitätsmuster, das auf homologe Funktionen hinweisen könnte, zu erwarten. Außerdem zeigt sich, dass *Mash1*-Aktivität in ausgesuchten Zellgruppen im Bereich der *Irx*-Genaktivität vorliegt. *Mash1*-positive Zellen können ausschließlich in Schnitten detektiert werden (Abb. 32). Sie liegen am epithelialen Rand der *Irx*-Expressionsdomänen und markieren die Vorläufer der neuroendokrinen Zellen der Lunge (Borges et al., 1997).

II.4 ANALYSE DER *MASH1*-MUTANTE

Bei der Analyse der Lungenaktivität von *Irx2* und der Schlundbogendifferenzierung gab es deutliche Hinweise auf eine interessante Funktion des *Mash1*-Gens in diesen Strukturen. Die Verlustmutante *Mash1*-/- ist von F. Guillemot (Guillemot et al., 1993) erstellt und zur Analyse freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. In der Analyse werden verschiedene embryonale Entwicklungsstadien der Maus im Alter E12,5, E15,5 und E18,5 untersucht. Dabei wurde mit der nicht radioaktiven Gesamtköper- (whole-mount-) *in-situ*-Hybridisierung und auf Paraffinschnitten von Mausembryonen mittels radioaktiver *in-situ*-Hybridisierung gearbeitet. Weiterhin dienten Antikörper-Färbungen ebenfalls auf Mausparaffinschnitten, der Analyse.

Im embryonalen Stadium E12,5 ist die *Mash1*-Genaktivität an Vorderdarmpräparaten zu sehen. Die Aktivität konzerntriert sich auf zwei ovale Strukturen, die Ultimobranchialkörpern. Die Ultimobranchialkörper sind Teil der entstehenden Schilddrüse (Thyroid). Sie besteht ferner aus den Thyroglobulin-produzierenden Zellen (Follikelzellen) und den Calcitonin-prodizierenden Zellen (C-Zellen). Die Entwicklung der Schilddrüse aus zwei Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs beginnt mit einer endodermalen Verdickung im Boden des Pharynx kaudal des entstehenden ersten Branchialbogens an Tag E8,5. Dieses endodermale Diverticulum wird die Thyroglobulin-produzierenden Zellen bilden. Desweitern schnüren sich aus der vierten Schlundtasche die Ultimobranchialkörper ab. Im Stadium E15,5 fusionieren sie mit den Follikelzellen. In der folgenden Entwicklung löst sich die ovale Struktur auf und die Schilddrüse entsteht mit der Mischung an Thyroglobulin-produzierenden und Calcitonin-prodizierenden Zellen. Als vergleichende Marker für die transienten Strukturen werden das *Ttf1*-Gen (Lazzaro et al., 1991), das *Pax9*-Gen (Peters, 1998) und *c-ret* (Lo et al., 1991) benutzt. Die Aktivität von *Ttf1* findet sich in allen Vorläuferzellen der Schilddrüse. *Pax9* ist aktiv in den Derivaten der dritten und vierten Schlundbogentasche, d.h. in Thymus, Parathyroid und den Ultimo-branchialkörpern. Als allgemeiner Marker für Zellen, die von Neuralleistenzellen abstammen, dient *c-ret*.

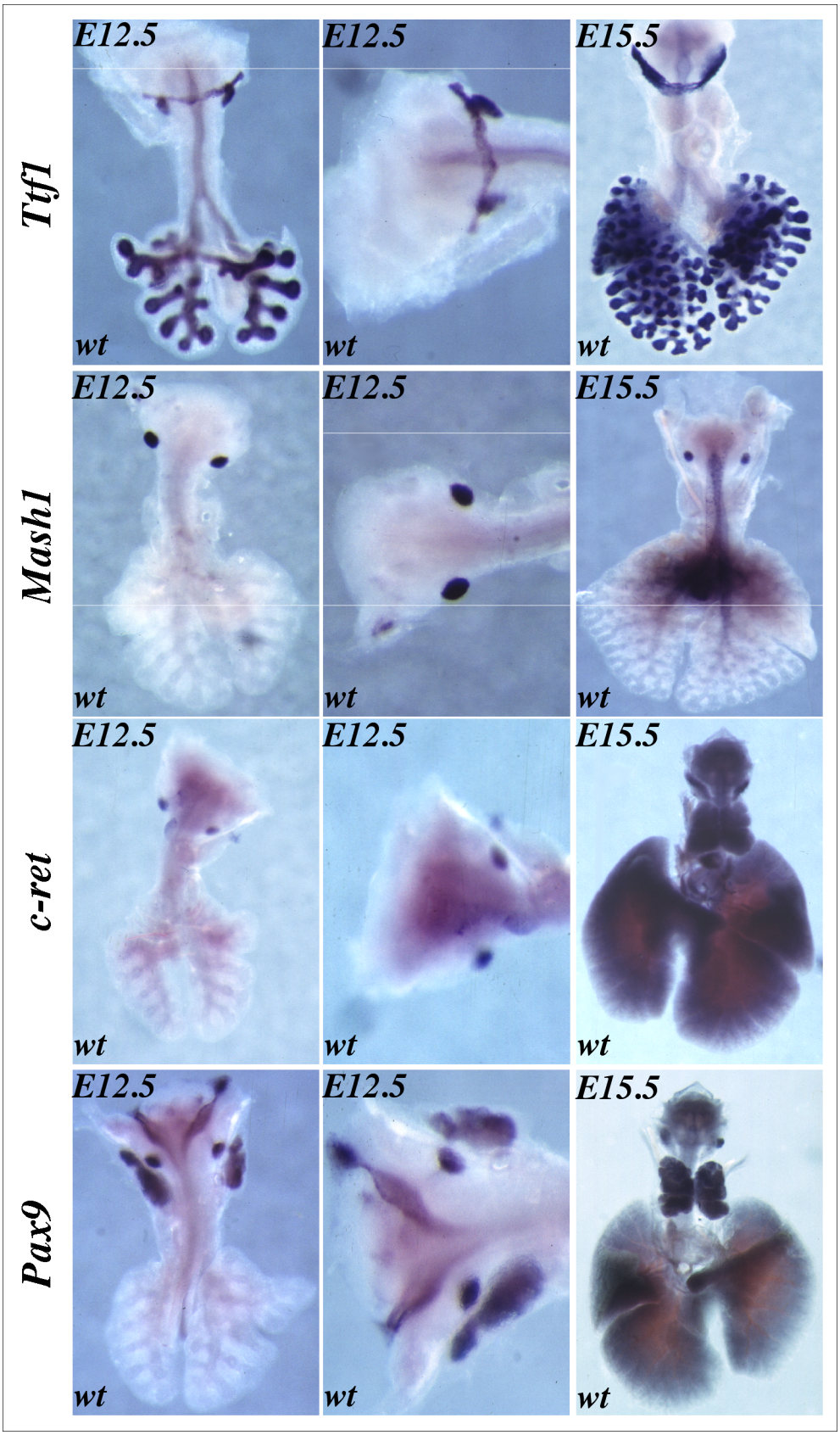


Abb. 33: Vergleich der Genaktivitäten von *Ttf1, Mash1, c-ret* und *Pax9* in Wildtyp-Mäusen an E12,5 und E15,5.

Vorderdarmpräparate von Wildtyp-Mäusen (wt) wurden auf Genaktivität von *Mash1*, *Ttf1*, *Pax9* und *c-ret* getestet.

Ttf1 markiert die Vorläuferzellen der Schilddrüse, die Ultimobranchialkörper und die Follikelzellen. *Mash1* ist spezifisch in den Ultimobranchialkörpern und c-*ret* in den Neuralleistenzellen aktiv. Die Genaktivität von *Pax9* mmarkiert die Entstehung und Wanderung der Ultimobranchialkörper des Parathyroids und des Thymus.

Die Fragestellung der folgenden Untersuchung zielt auf die Funktionalität der C-Zellen in der *Mash1*-Mutante. Für die Analyse wurden Paraffin-Schnitte der Schilddrüse von *Mash1*-/- Mäusen präpariert und Antikörper-Nachweisreaktionen unterzogen. Wobei die Gewebeproben im Alter E18,5 von Wildtyp-Mäusen eine Färbung mit dem Anti-Thyroglobulin-Antikörper zeigen. Die Follikelzellen stellen den größten Teil der Schilddrüse und produzieren Thyroglobulin, die verstreut liegenden, einzelnen C-Zellen reagieren auf den Anti-Calcitonin-Antikörper. In der Mutante sind morphologisch keine Unterschiede in Größe und Form des Thyroids zu erkennen. Die spezifische Färbung mit Anti-Thyroglobulin zeigt, dass das Organ vorhanden ist. Es lassen sich jedoch keine C-Zellen mit Anti-Calcitonin nachweisen. In der *Mash1*-Mutante fehlen spezifisch die Calcitonin-produzierenden Zellen.

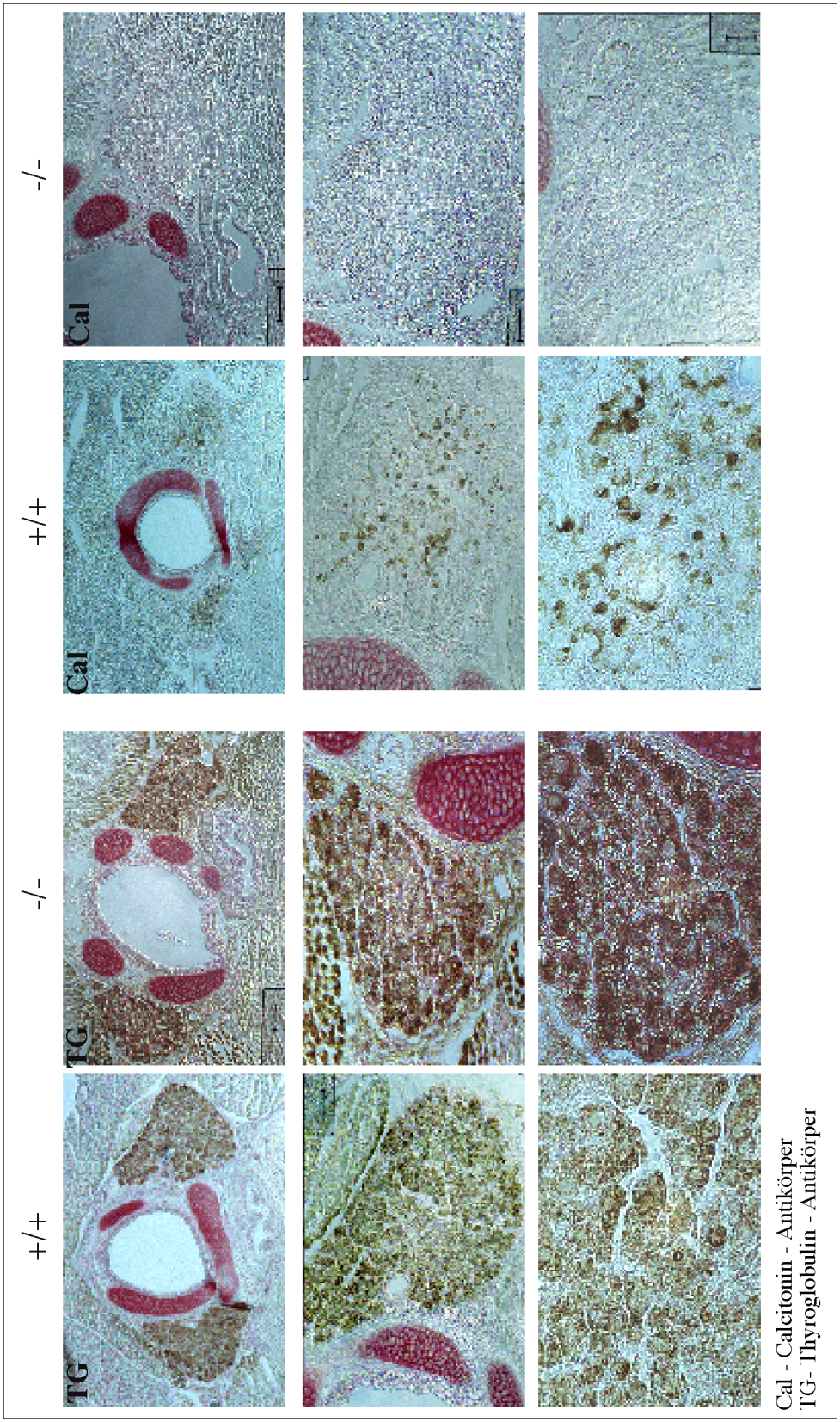


Abb. 34: Darstellung von hormon-produzierenden Zelltypen in der Schilddrüse von Wildtyp- und *Mash1*- defizienten Tieren im Alter E18,5.

Sowohl im Wildtyp (WT) als auch in der *Mash1*-Mutante werden mit Thyroglobulin (TG) die Follikelzellen markiert. Calcitonin-produzierende Zellen können nur im WT nachgewiesen werden.

Im Stadium E12,5 ist sowohl in den Gewebeschnitten der Mutante wie auch im Wildtyp-Vergleichstier das Genprodukt von *Ttf1* lokalisierbar, d.h. dass die Vorläufer der Follikelzellen und die Ultimobranchialkörper vorhanden sind.

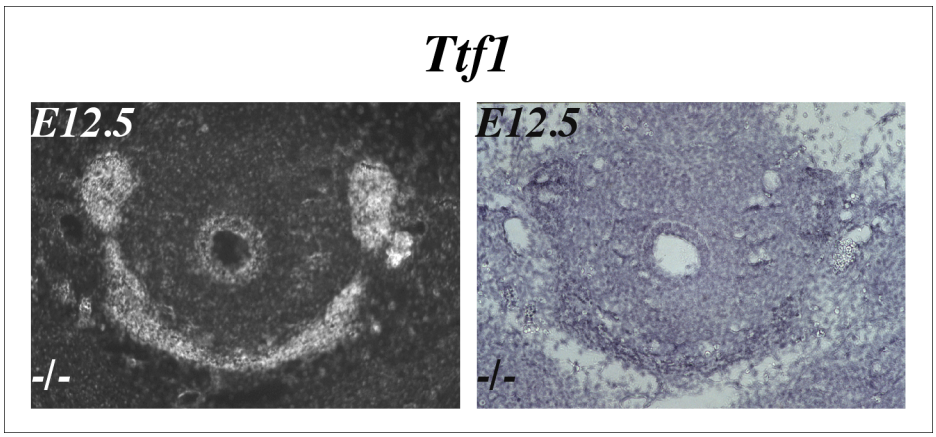


Abb. 35: Expression von *Ttf1* in der *Mash1*-Mutante.

In der sagitalen Schnittebene zeigt sich die Genaktivität von *Ttf1* sowohl in den Ultimobranchialkörpern wie auch in den Follikelzellvorläufern.

Die Frage nach der Auflösung der Ultimobranchialkörper in den Thyroidanlage wird untersucht mittels *in-situ* Analyse an Tag E15,5 der Enbryonalentwicklung an sagitalen und transversalen (cross) Gewebeschnitten.

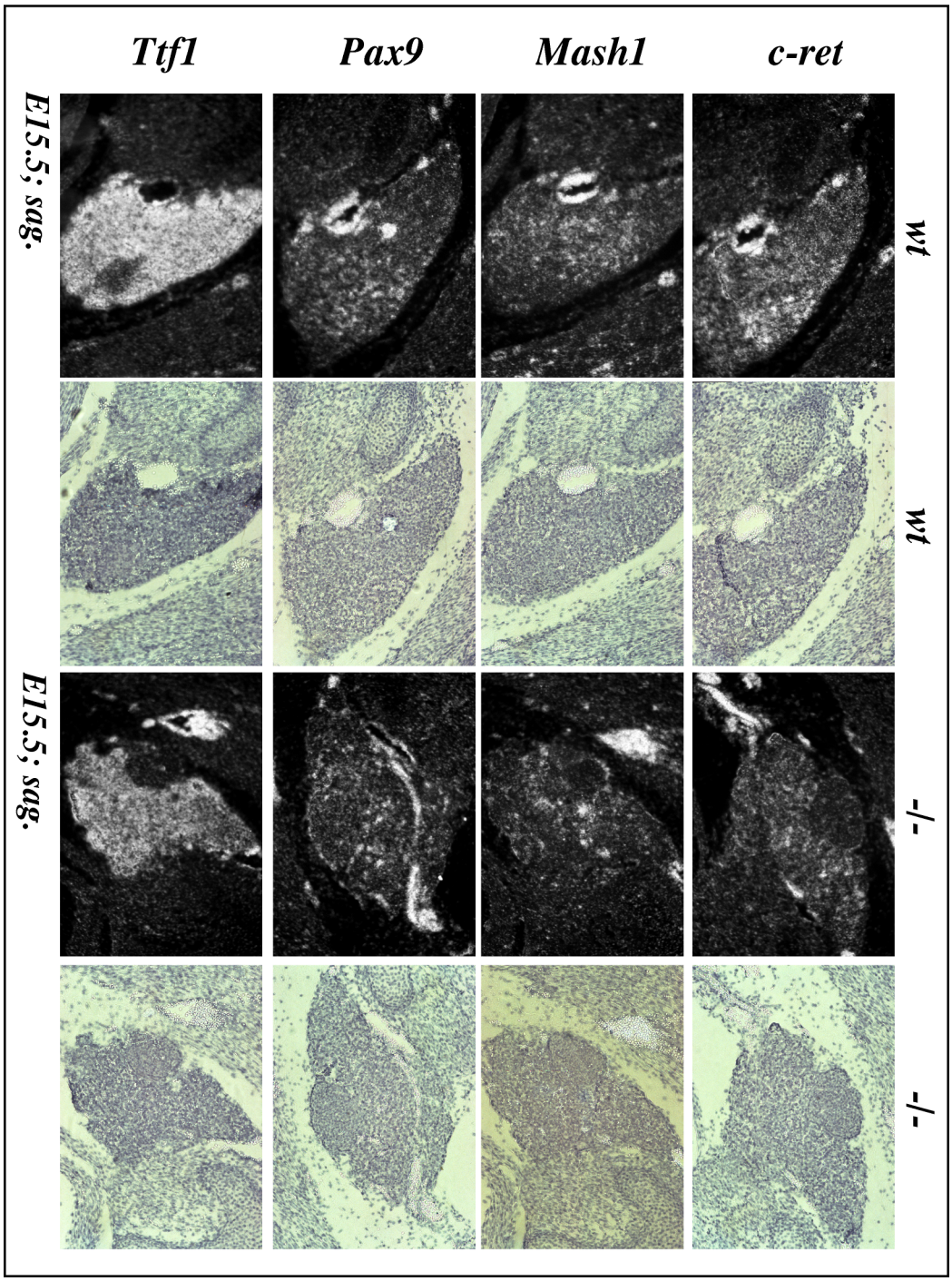


Abb. 36: Genexpressions- und Strukturnachweis in Wildtyp-Mäusen und homozygoten *Mash1*-Mutanten in sagitalen Schnitten.

Die Struktur des Thyroids wird deutlich in der Expression des *Ttf1*-Gens. Diese Struktur ist in der Mutante nicht verändert. Alle untersuchten Gene zeigen Aktivität in der Schilddrüse der *Mash1*-Mutante.

Es zeigte sich anhand des *Ttf1* Transkriptnachweises, dass die Vorläufer der Follikelzellen vorhanden sind. *Pax9* positive Zellen, die den Ultimobranchialkörper entstammen, liegen ebenfalls vor. Ebenso können Neuralleistenzellen mittels der Sonde *c-ret* nachgewiesen werden. Verwendet wurde auch die *Mash1*-Sonde, denn in der *Mash1*-Verlustmutante liegt zwar kein funktionsfähiges Mash1-Protein vor, aber es existiert aber eine verkürtzte, nicht funktionelle Form der mRNA, die mittels *in-situ* Experimenten nachgewiesen werden kann. Die in ihrer Aussage übereinstimmenden histologischen Schnitte der sagitalen wie transversalen Ebenen belegen, dass im Entwicklungsstadium E15,5 die Zellen der Ultimobranchialkörper in der Schilddrüse vorliegen.

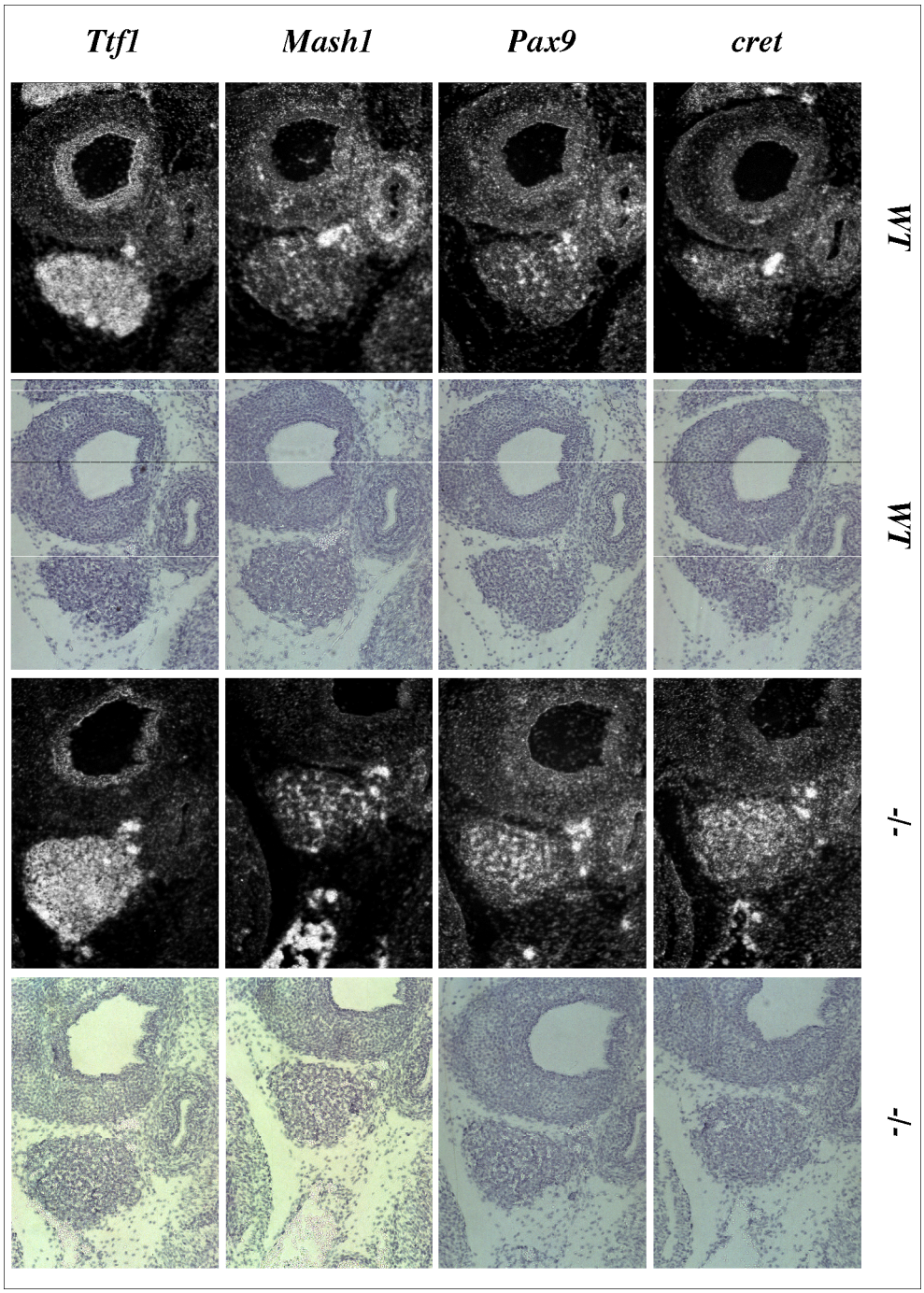


Abb. 37: Genexpressions- und Strukturnachweis in Wildtyp-Mäusen und homozygoten *Mash1*-Mutanten in transversalen Schnitten.

Die Struktur des Thyroids wird deutlich in der Expression des *Ttf1*-Gens. Die morphologische Gestalt ist in der Mutante nicht verändert. Alle untersuchten Gene zeigen Aktivität in der Schilddrüse der *Mash1*-Mutante.

In der Mutante ist weder die Wanderung und noch die Integration der *Mash1* positiven Zellen defizitär. Die fehlende *Mash1*-Funktion verhindert die Reifung der C-Zellen, so dass kein Calcitonin produziert wird.

III. DISKUSSION

Im Forschungsgebiet der Entwicklungsbiologie führte die Kombination der Genetik, der Zell- und Molekularbiologie zu einem besseren Verständnis der Prozesse der Embryonalentwicklung. Die Entwicklung jedes Organismus steht unter der präzisen Kontrolle eines genetischen Programms, das sich unter anderem in der exakten Ausgestaltung des Körpers zeigt. Die Klärung der Funktion des *Irx2*-Gens als Vertreter der *Iroquois*-Genfamilie anhand der erstellten Verlustmutante steht im Mittelpunkt der hier beschriebenen Studie.

DIE CHARAKTERISIERUNG DES IRX2-GENS IN DER MAUS

DIE IROQUOIS-GENFAMILIE DER MAUS

Der Entdeckung der *Iroquois*-Gene in *Drosophila melanogaster* folgte unsere gezielte Suche nach homologen Sequenzen im Genom der Maus und die Identifizierung der *Iroquois*-Genfamilie (Bosse et al., 1997; Becker, 1997; Zülch, 1997). Diese Genfamilie besteht zum heutigen Zeitpunkt aus den sechs Mitgliedern *Irx1* bis *Irx6* (Bosse et al., 1997; Bosse et al., 2000; Bruneau et al., 2000; Cohen et al., 2000; Peters et al., 2000).

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *Irx1* und *Irx2* auf Chromosom 13 und die duchgeführte Abstandsmessung weisen auf eine enggekoppelte Organisation mit nur 200 Kb Distanz hin. Diese Daten zeigen in Kombination die Lokalisation aller Mitglieder der *Iroquois*-Familie in einer geklusterten Abfolge der Gene *Irx1, Irx2* und *Irx4* auf Chromosom 13 und von *Irx3, Irx5* und *Irx6* auf Chromosom 8 (Peters et al., 2000; Bosse et al., 2000). Damit besteht jeder der beiden Kluster aus drei *Iroquois*-Genen, deren Position zu einander streng konserviert ist.

Die Bestimmung der Sequenz der neugefundenen Mausgene machte eine phylogenetische Einteilung möglich, so konnten die Mitglieder der *Iroquois*-

Genfamilien der Vertebraten in sechs orthologe Gruppen unterteilt werden. Ausgehend von den Ergebnissen der Sequenzuntersuchungen bilden jeweils zwei Gene eine paraloge Gruppe: *Irx1* mit *Irx3*, *Irx2* mit *Irx5* und *Irx3* mit *Irx6*. Da vergleichbare intergenische Abstände vorliegen, ist von einer singulären Verdopplung des Klusters auszugehen. Denn es ist unwahrscheinlich, dass bei drei einzelnen Duplikationen ebenfalls die Gesamtorganisation erhalten geblieben wäre. Da von allen untersuchten Wirbeltierarten mindestens vier orthologe *Irx*-Gene bekannt sind, welche die paralogen Gruppen abdecken. Der Zeitpunkt der Verdoppelung wird vor der Trennung der evolutiven Linien von Fisch, Amphibien, Vögeln und Säugern vermutet. Wahrscheinlich hat die Vervielfältigung des *Iroquois*-Kluster im Zuge der genomweiten Duplikation in der frühen Phase der Evolution der Vertebraten statt gefunden (Skrabanek and Wolfe, 1998).

Die Iroquois-Proteine bilden eine sehr konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren, wie dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der Iroquois2-Proteine entnommen werden kann, mit den nahezu identischen Strukturmotiven der Homeo- und der Iro-Domäne.

Die Homeodomäne der Iroquois-Proteine gehört aufgrund ihrer Sequenz in die TALE-Gruppe (=three aminoacid loop extension Gruppe), die ein verwandtes Motiv zu dem homeodomänen-assozierten Motiv, genannt MEINOX, darstellt (Bürglin, 1997). Der erstaunliche Nachweis eines derart "alten" Motivs weist auf die Existenz eines Ur-Gens dieser Familie hin, das schon vorhanden war in der gemeinsamen Entwicklungslinie von Pflanzen, Pilzen und Tieren. Die TALE Homeoboxgene sind demnach eine sehr "alte" Gruppe, die sich seit der Phase der Protozoenevolution von den typischen Homeodomänen getrennt entwickelt hat (Bürglin, 1997).

Der Aminosäuresequenzvergleich verweist auf eine zweite hochkonservierte Domäne in den Iroquois-Proteinen. Die *Iro*-box ist allen *Iroquois*-Genen gemein, und sogar in den orthologen Gene bei Fliege und Wurm vorhanden. Bisher kann diesem kurzen Motiv keine Funktion zugeordnet werden, aber theoretisch vorstellbar ist, dass es für Protein-Proteininteraktion wichtig ist. In einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* wurde ein neues *Zn-Finger*-Protein identifiziert, welches an die *Iro*-Domäne bindet (Gómez-Skarmeta, pers. Mitteilung).

Das *Irx2*-Transkript enthält als einziges der sechs Mausgene am nicht-translatierten 3´-Ende (UTR, untranslated region) eine K-Box. Sie ist ein Sequenzmotiv, das bei den Genen des *enhancer of split* in Drosophila entdeckt und untersucht wurde (Lai et al., 1998). Zellinterne Prozesse steuern über Bindung an dieses Motiv die Weiterverarbeitung der mRNA und damit den Proteingehalt in der Zelle. Die Deletion der K-Box in den Genen des *enhancer of split* führt zur Transkriptanhäufung über das normale Maß hinaus und damit zu Phänotypen, die ebenfalls mit der Überexpression des entsprechenden Gens erzielt werden können. Die K-Box, die ebenfalls in den *Iroquois*-Genen von *Drosophila* vorliegt, ist nur in der Sequenz des murinen *Irx2*-Gens bestehen geblieben. Es muß von Bedeutung sein, die zu bildenen *Irx2*-Proteinmenge in Abstimmung mit dem Notch-Signalweg (Lai et al., 1998) genau zu kontrollieren. Auffällig ist bei allen Untersuchungen auf RNA-Ebene gewesen, dass die detektierbare Transkriptmenge von *Irx2* deutlich unter der anderer muriner *Iroquois*-Gene lag.

EVO DEVO: DER VERGLEICH DER BISHER BEKANNTEN FUNKTIONEN DER IROQUOIS-GENE IM TIERREICH

Die ausserordentlich hohe Identität der Aminosäuren der Irx2-Proteine auch außerhalb der bekannten konservierten Domänen läßt vermuten, dass die Proteine ähnliche Interaktionen eingehen können. Der Erhalt der Sequenz der K-Box in den Transkripten der *Irx2*-Gene kann auf gemeinsame funktionelle Aufgaben verweisen.

Ein Vergleich ist möglich mit *Xiro2*, von dem funktionelle Daten zur Verfügung stehen. Das Ortholog (*Xiro2*) des Frosches ist funktionell redundant mit *Xiro* und *Xiro3*. Sie markieren das dorsale Ektoderm in der Phase der Gastrulation (Gómez-Skarmeta et al., 2001), welches darauffolgend ein neurales Entwicklungsschicksal nimmt. In der ausgebildeten Neuralplatte kontrollieren sie die Menge der vorhandenen undifferenzierten neuralen Zellen und zu späterer Zeit die Entwicklung spezifischer Neuronen.

Die Frage nach einer möglichen funktionellen Übereinstimmung neben der konservierten Nukleotidsequenz ist vielschichtig zu beantworten. Zum einen zeigen die *Irx*-Gene in der Maus auch nicht miteinander überlappende Expressionsbereiche, in denen daher keine redundante Funktion zu erwarten ist. Zum anderen kann die beschriebene Funktion von *Xiro2* nicht vollständig mit dem Funktionsbereich von *Irx2*

der Maus korreliert werden, da Funktionen unter den Mausgenen aufgeteilt sind. Insbesondere die Aktiviät während der Gastrulation kann definitiv nicht von *Irx2* ausgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt noch keine *Irx2*-Expression besteht. Diese Kontrolle über Zellschicksale wird bei der Bildung der drei Keimblätter in der Maus von *Irx1* ausgeübt (Zülch, 2001).

Bessere Vergleichsmöglichkeiten bestehen bei der Spezifizierung von neuralen Bereichen. Die territoriale Einteilung des Neuralektoderms in *Xenopus* entspricht der Regionalisierung der Gehirnanlage durch die *Irx2*-Expression. *Irx2* setzt die regionale Ordnung des Organisators der Mittel-Hinterhirn-Grenze (MHB) um und definiert insbesondere mit seiner scharfen Expressionsgrenze das Hinterhirn. Vergleichbar ist diese Aktivität mit der Funktion der *Iroquois*-Gene in *Drosophila*, die in der Augen-Imaginalscheibe die aufgebaute Ordnung des dortigen Organisators umsetzen (Cavodeassi et al., 2001). Neueste Ergebnisse aus der Analyse von Überexpressionsexperimenten im Huhn zeigen, dass eine ektopische Genaktivität von *cIrx2* im Mittelhirn dort Hinterhirnstrukturen entstehen lassen kann (Diaz del Coral, pers. Mitteilung).

Nun zeigen aber gerade die zentralnervösen Expressionsdomänen funktionellen Überlappungen zwischen den verschiedenen Genen des *Iroquois*-Familie der Maus. Eindeutige funktionelle Zuständigkeiten können daher nur von Mehrfachmutanten aufgedeckt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die *Irx2*-Gensequenz außerordentlich stark konserviert wurde in den Entwicklungslinien von Amphibien, Vögeln und Säugern. Bedacht werden muß der deutliche Unterschied zwischen der Redundanz der *Iroquois*-Proteine von *Droxophila* und *Xenopus*, der im Widerspruch steht zur funktionellen Ausgestaltung in der Maus. Für die *Iroquois*-Gene in der Maus wird eine Mischung an redundanten und singulären Funktionen erwartet (Zülch, 2001).

ANALYSE DES PHÄNOTYPS DER IRX2-VERLUSTMUTANTE.

UNTERSUCHUNG DER URSACHEN DES PERINATALEN TODES

Der erste Aspekt des zu besprechenden Phänotyps ist der perinatale Tod der Mutanten. Noch im Stadium E18,5, also einen Tag vor der Geburt, können homozygote

Tiere identifiziert werden. Die morphologische Analyse dieser deckte keinerlei anatomische Besonderheiten auf und doch sterben die Tiere. Dies ist ein deutlich Hinweis darauf, dass essentielle Körperfunktionen des Fötus gestört sind. Denn nach der Geburt muß er alle lebenserhaltenen Funktionen, wie das Atmen, den Elektrolyt- und Hormonhaushalt, das Kreislaufsystem und die Stoffwechselfunktionen selbst steuern und ausführen.

Verschiedene Veränderungen in den angesprochenen Lebensfunktionen führen zu Tieren, die zwar geboren werden, dann aber die ersten Stunden nicht überleben. Alle nicht lebensfähigen Babies werden von den Mütter nach der Geburt sofort aufgefressen. Die Tatsache, dass keine homozygoten Tiere postnatal detektiert werden konnten, läßt vermuten, dass der sofortige Tod aufgrund von Atemfehlfunktionen eintritt.

Für die lebenswichtige Respiration ist der anatomisch korrekt geformte Luftweg notwendig, damit die Luft ein- und auströmen kann. Desweiteren müssen funktionstüchtige Lungenbläschen vorliegen. Sowohl der Kehlkopf wie auch die Lunge sind prominente Ort der *Irx2*-Genaktivität. Der anatomische Aufbau läßt in der Mutante jedoch keine Veränderungen erkennen, so dass von einem funktionellen Versagen ausgegangen werden kann.

Die zentralnervöse Steuerung der Atemfunktion liegt im Hinstamm in den autonomen Atemzentren und wird über die branchial-motorischen und branchial-sensorische Reizleitungen reguliert. Das Atemzentrum entsteht medio-ventral in der Medulla oblongata, deren Entwicklung mit der Ausbildung des Rhombencephalons beginnt. Das Rhombencephalon zeigt im embryonalen Stadium E9,5 einen Aufbau aus sechs bis acht Kompartimenten. In diesen Rhombomeren ist *Irx2* von Beginn an aktiv. Das Hinterhirn unterteilt sich in das kranial gelegene Metencephalon, aus dem Pons und Cerebellum hervorgehen, und das weiter kaudal liegende Myelencephalon, das sich zur Medulla oblongata ausbildet. In allen diesen Strukturen hat sich die rhombencephale *Irx2*-Aktivität erhalten. Die Gliederung des embryonalen Neuralrohrs in Grund- und Flügelplatte (motorisch und sensibel) ist im Hinterhirn annähernd erhalten geblieben: In der Grundplatte sind vorwiegend motorische Hirnnervenkerne und weitere motorische Zentren zu finden, wohingegen die Flügelplatte im Dienst sensibler Verschaltung steht (Trepel, 1995). Die breite unspezifische *Irx2*-Expression verändert sich und ist mit zunehmender Differenzierung in distikten Strukturen erkennbar. Eine klare und deutlich

abgegrenzte Aktivität zeigt *Irx2* in der Medulla in den Hirnnervenkernen der branchial-motorischen Säule und in der *Formatio reticularis* (FR), welche aus einem Netz von Nervenzellen besteht, dass sich vom Hirnstammtegmentum bis ins Rückenmark zieht und die Hirnnervenkerne miteinander verschaltet. Sie koordinieren die Aufrechterhaltung des lebenswichtigen inneren Körpermilieus vom Schluckreflex bis hin zur Atmung.

Die Genexpression von *Irx2* folgt der Entwicklung und Differenzierung der Strukturen des Hirnstamms, die an der nervösen Steuerung der Atemfunktionen beteiligt sind. Störungen im Netzwerk der Atemkontrolle aufgrund des *Irx2*-Genverlusts sind morphologisch nicht nachweisbar, werden aber im Verlust der Lebensfähigkeit aufgrund von Sauerstoffmangel resultieren.

Die Beweisführung der Todesursache kann oft erst nach Jahren der Analysen erfolgen. Zum Beispiel sterben die intensiv untersuchten *Mash1*-Mutanten kurz nach der Geburt (Guillemot et al., 1993). Die Mutanten verzeichnen einen großen Verlust autonomer Neuronen, doch die Ursache der Lethalität konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Angenommen wird, dass Fehlfunktionen des autonomen Nervensystems zum Tode führen (Sang et al., 1999). Aufgrund des Expressionmusters von *Irx2* und des eingetretenen Phänotyps läßt sich postulieren, dass die *Irx2*-Mutanten an morphologisch nicht detektierbaren Atemwegsdysfunktionen sterben.

GRUNDLAGEN DER MONOALLELISCHEN WEITERGABE DER IRX2-MUTATION

Die Ergebnisse der Mutationsverteilung in den Nachkommen führte zu interessanten Folgerungen. Die eingeführte Mutation im *Irx2*-Gen wird abhängig von ihrer Herkunft unterschiedlich umgesetzt. Durchläuft sie die mütterliche Keimbahn, so scheint der Verlust der genetischen Information das Leben der Nachkommen nicht zu beeinflussen. Entstammt sie aber der väterlichen Keimbahn, so zeigt sich, dass transgene Söhne zu keinem untersuchten Zeitpunkt der Entwicklung nachweisbar sind.

Ein ersten Ansatz zum Verständnis der erzielten Daten besteht in der Untersuchung der Übereinstimmung von genotypischen und phänotypischem Geschlecht der Nachkommen. Im allgemeinen ist das Geschlecht der Mäuse ab einem Alter von drei Wochen an den Genitalien abzulesen. Bei "sex switch" Mutanten kann diese visuelle Bestimmung irreführen. In Mäusen, deren phänotypisches Geschlecht nicht zur

genetischen Ausstattung paßt, treten sogenannte *Ovo-Testis* auf. In der embryonalen Anlage der Gonaden sind bis E14.5 keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auszumachen, erst danach entwickeln sich aus den Anlagen entweder Ovarien oder Hoden (Testis) (Kaufmann and Bard, 1999). Ist die Regulation dieser Prozesse gestört, so entwickeln sich parallel sowohl Ovarien wie Hoden.

Die Untersuchung der *Irx2*-Mutante ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer "sex switch" Mutation.

Festzuhalten bleibt, dass die Merkmalsausprägung durch zwei Faktoren bestimmt wird, nämlich durch das Geschlecht der Embryonen und die Herkunft der Mutation. Jedoch einen funktionelle Regulation zwischen dem X-Chromosom und den Genen des 13. Chromosoms ist nicht bekannt.

Das Vererbungsmuster weist auf einen Effekt mit genomischer Prägung hin und die meisten untersuchten Phänomene dieser Art zeichnen sich durch ein unterschiedliches Methylierungsmuster der beiden Allele aus. Methylierungen finden an CpG-Dinukleotide Nukleotiden statt (Sasaki et al., 1993). Im Genom sind die CpG-Dinukleotide keinesfalls zufällig verteilt, sondern sie treten häufig in sog. CpG-Inseln auf (Robertson, 2000). Diese "Inseln" sind Bereiche von mehr als 500bp, in denen eine weit über dem Durchschnitt liegende Anzahl von CpGs vorliegen (Reik and Walter, 2001). Sie bewirken eine besonders offene Chromatinstruktur auf und sind "hot spots" für Umlagerungen und Mutationen (Tazi and Bird, 1990). In diesen Bereichen finden beispielsweise 30% aller Punktmutationen der Keimbahn statt, die zur Entstehung von Krebs führen (Greenblatt et al., 1994).

Der identifizierte *Iroquois2*-Lokus weist ebenfalls meherere CpG-Inseln auf, die zudem umgeben sind von repetitiven Sequenzen. Dies deutet auf eine chromosomale Region hin, die durch Methylierung stillgelegt werden kann (imprinting, genomische Prägung).

Allerdings zeigte sich bei der Analyse des Methylierungsmusters des *Irx2*-Lokus, dass diese Art der Regulation hier nicht vorliegt. Auch beim *Mash2*-Gen zeigte sich, dass die monoallelische Expression nicht durch eine Methylierung der CpG-Inseln erfolgt (Tanaka et al., 1999).

Interessanterweise liegt auch in Drosophila eine elternspezifische Vererbung vor (FlyBase, 2002). Sowohl die paternale wie auch die maternale Vererbung des

Heterochromatinzustands ist beobachtet worden (Cavalli, 1998). Es wird die Existenz von zellulären Erinnerungsmodulen (CMM, cellular memory modules) postuliert, an die die Proteine der PcG (*polycomb*-Gruppe) und TrxG (*trithorax*-Gruppe) binden. Diese Module fungieren als "Schalterelemente" (switchable elements), die verschiedenen Formen der Chromatinkonformation induzieren und stabil weitergeben können. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass der *Iroquois*-Komplex Ziel einer solchen Inaktivierung, vermittelt durch die polycomb-Proteine, ist (Netter et al., 1998). Die Proteinen der polycomb-Gruppe verändern die Chromatinstruktur und beieinflussen so den Zugriff der Transkriptionsmaschinerie auf die DNA. (Brock and van Lohuizen, 2001). Diese epigentische Mechanismen bleiben stabil in der Entwicklung erhalten, wobei die Proteine der Polycomb Gruppe den stillgelegten Zustand eines Lokus auf Dauer erhalten können. Interessanterweise bindet beispielsweise das polycomb-Protein an Promotoren von homeotischen Genen *in vivo* erst, nachdem eine Reprimierung etabliert wurde, um sie dann in der Folge zu erhalten (Orlando et al., 1998). Dieser Regulatinsprozess, der auf der Wirkung von *PcG* und *TrxG* beruht, scheint nicht nur auf *Drosophila* beschränkt zu sein. Untersuchung in der Maus konnten zeigen, dass auch hier die orthologen Gene homologe Funktionen ausüben (Wang et al., 2001).

Der "Konflikt-Hypothese" (Moore, 1991) zufolge ist anzunehmen, dass das paternal aktiv *Irx2*-Gen für ein Protein mit wachstumsfördernder Funktion kodiert. Denn die Aktivität von Wachstumsinhibitoren werden der Hypothese entsprechend vom mütterlichen Genom reguliert werden. Postuliert wird so ein Kampf der Geschlechtern um die mütterlichen Ressourcen (Moore and Haig, 1991). Ein gutes Beispiel im Rahmen dieser Idee ist das Imprinting von *Igf2*. Das *Igf2*-Gen kodiert für einen Wachstumsfaktor und wird von väterlichen Chromosom transkribiert. Der unter maternaler Kontrolle stehende Igf2-Rezeptor bedingt hingegen eine Reduktion des im Cytoplasma vorliegenden Igf2-Proteins und vermindert so dessen wachstumsfördernde Funktion.

Abschließend läßt sich sagen, dass auch *Irx2* einen monoallelischen Erbgang aufweist. Analog zur Regulation von *Mash2* äußert sich die genomische Prägung nicht in einem differentiellen Methylierungsmuster. Zudem stehen auch schon die Gene des *Iroquois*-Komplexes von Drosophila unter epigentischer Kontrolle.

IMPLIKATIONEN DES IRX2-GENS IN DAS HUMANE SYNDROM CRI-DU-CHAT

In dieser Arbeit wurde die humane chromosomale Lokalisation des *Irx2*- Gens bestimmt. *Irx2* liegt auf dem kurzen Arm (p) des humanen Chromosoms 5 (5p15.3). Bei Funktionsverlust dieser Region (Deletionen, Translokationen)tritt das Cri-du-chat-Syndroms (CDC, Katzenschrei Syndrom) auf. Zuerst wurde dieses Syndrom 1963 von LeJeune beschrieben. Dabei war ein hoher monochromatischer Geburtsschrei der betroffenen Kinder das Haupterkennungsmerkmal. Das Katzenschrei-Syndrom ist eine genetische Krankheit mit einer Auftrittswahrscheinlichkeit von 1:50000 Geburten.

Das Cri-du-chat-Syndrom umfaßt eine breit gefächerte Symptomatik mit einer dementsprechend variablen Lebenserwartung der heterozygoten Merkmalsträger. Die allgemeinen Symptome umfassen Gesichtsanomalien, Sprachschwierigkeiten und zum Teil sehr starke mentale Defizite, die ein eigenständiges Leben nicht ermöglichen. Ferner liegt der typische Katzenschrei im Frühkindalter vor. Als Zeichen der Variabilität des Phänotyps sei erwähnt, dass die älteste Patientin mit diagnostiziertem Katzenschrei 80 Jahre alt ist (Iwasa, 1998).

Es ist anzunehmen, dass an der Ausprägung der variablen Symptomatik mehrere Gene beteiligt sind. Die Identifikation und Analyse ist komplex, denn nur ca. 13% der Patienten haben die Mutation geerbt. Eltern von Merkmalsträgern zeigen in sehr vielen Fällen eine balancierte Translokation im Bereich des kurzen Arms des Chromosoms 5. In der Keimbahn und damit in ihren Nachkommen wandelt sich die balancierte in eine nicht-balancierte Translokation um. Es ist augenscheinlich, dass die Region um die Lokalisation des Katzenschrei-Syndroms anfällig für genomische Umorganisation ist. Die Rekombinationsfreudigkeit des Lokus hängt von der Sequenz und der damit verbundenen offenen DNA-Konformation ab. Ein vermehrtes Auftreten von Nukleotid-Wiederholungen und ein hoher GC-Gehalt, wie sie auch im *Irx2*-Gen der Maus vorliegen, erhöhen die Wahrscheinlichkeiten von Rekombinationsereignissen, die zu Translokationen führen könnten.

Die Cri-du-chat-Patienten zeigen eine deutliche Variabilität in der Zytogenetik ihres Karyotyps (Mainardi et al., 2001).

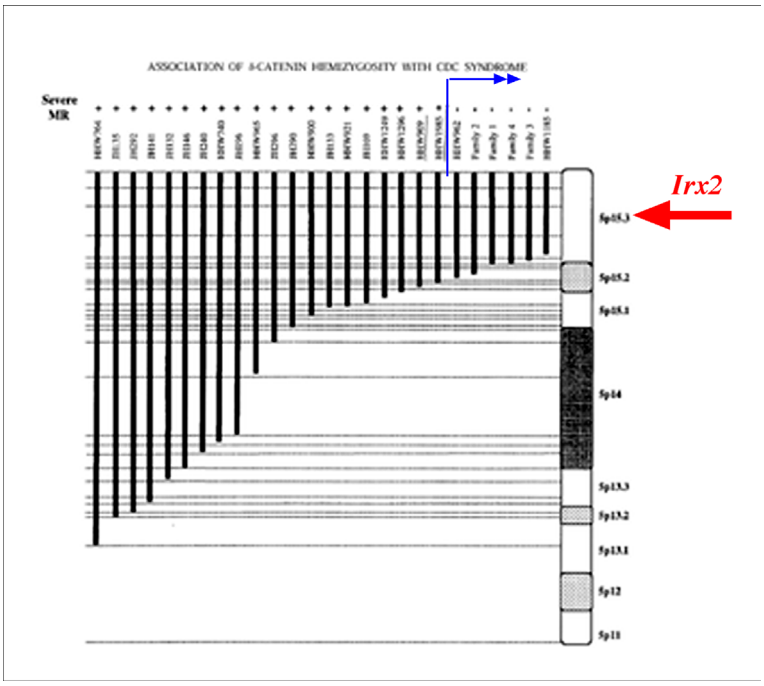


Abb. 38: Chromosomale Bruchpunktanalyse in Verbindung mit der mentalen Retardierung der CDC-Patienten, aus: (Mainardi et al., 2001)

Eine starke mentale Retardierung (severe MR+) geht einher mit einem Chromosomenverlust von 5p13 bis 5p15.2. Patienten mit Chromosomen-aberrationen in 5p15.3 (roter Pfeil) zeigen keine Demenz (blauer Pfeil, MR-).

Die Analyse der chromosomalen Bruchpunkte, die zum Ausbruch der Krankheit geführt haben, verweist auf einen divergenten Ursprung der Mutation, die in den meisten Fällen *de novo* entstanden ist. In der untersuchten Patienten-Gruppe von Mainardi (Mainardi et al., 2001) zeigen 77,5% eine terminale Deletion, bei der Genmaterial von 5p13 bis 5p15 verloren gegangen ist. In einigen Fällen sind die verkürzten Chromosomen über ihre Telomere fusioniert, und die neugeformten Ringchromosomen können die anstehende Meiose nicht korrekt durchlaufen. Durch doppelten Strangbruch und Verlust mittlerer chromosolmaler Bereiche entstehen bei 8,75% interstizielle Deletionen mit entsprechendem Informationsverlust.

Die zytogenetische Analyse hat die auslösende Region auf zwei Megabasen im Abschnitt 5p15.2 bis 5p15.3 eingegrenzt (Overhauser et al., 1986). Seit Jahren wird nach relevanten Genen in den 48 Mb (=Megabasen) des kurzen Arms des fünften Chromosoms, der etwa 1,5% des Genoms des Menschen enthält, gesucht (Simmons et al., 1997). Bekannt sind einige wenige Gene in der kritischen Region, von denen bisher

zwei möglicherweise in das CDC-Syndrom involviert sind. Delta-catenin (*CTNND2*) ist ein Adhäsionsprotein, welches in der neuralen Mausentwicklung aktiv und im Kontext der Zellmobilität von Bedeutung ist. Die genomische Lokalisation des humanen *CTNND2*-Gens entspricht der Position 5p15,2 (Medina et al., 2000). Ebenfalls dort liegt die genetische Information für das *Semaphorin F*-Gen. Es kodiert für einen Faktor, der im embryonalen Gehirn der Maus aktiv ist. Seine Funktion liegt in der Leitung von auswachsenden Neuronen (=axon guidance molecule) (Simmons et al., 1997).

Wegweisend sind die zytogenetischen Untersuchungen an einer Patientin gewesen, die die typische Stimmlage aufweist und leichte Lernverzögerungen zeigt, aber weder mental retardiert ist noch eine auffällige Gesichtsform besitzt (Sreekantaiah et al., 1999). Ihr Karyotyp zeigt eine *de novo* Deletion sowie eine zusätzliche invertierte Duplikation der 5p Region auf. Es wurde evident, dass ausschließlich ein Defizit genomischer Sequenz an 5p15.3 vorliegt. Diese Daten unterstützen die Idee, dass es zwei kritische Regionen gibt, von denen 5p15.3 für den Phänotyp des Katzenschreis (Dysphonie) und 5p15,2 für die starke mentale Beeinträchtigung verantwortlich ist (Goodart et al., 1994)(Gersh et al., 1997).

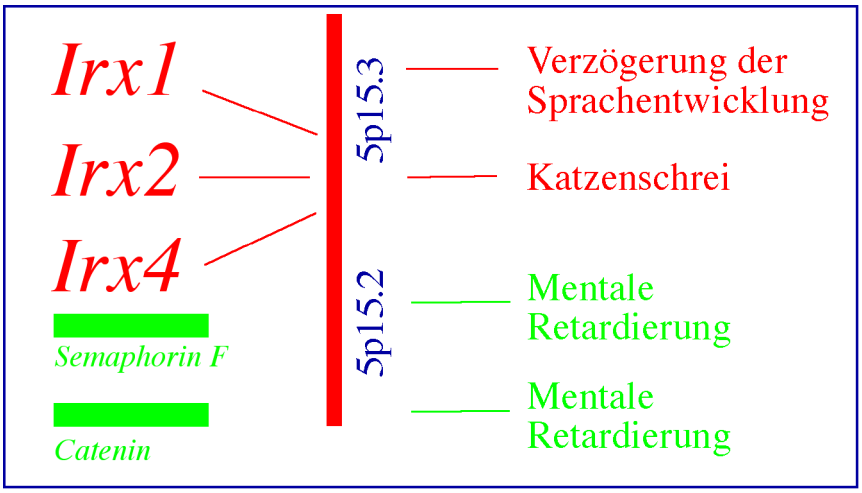


Abb. 39: Zuordnung der phänotypischen Ausprägung des CDC-Syndroms

Für eine korrekte Lebensprognose ist es unerläßlich, den Bruchpunkt so genau wie möglich bestimmen zu können.

Verschiedene Formen von Dysphonien in Neugeborenen sind das Ergebnis von nicht ausgereifter Innervation des Larynx (Hirschberg, 1999). Die Ursachen der Dysphonie der Katzenschrei-Patienten ist nicht geklärt.

Die Analyse der murinen *Irx2*-Expression zeigte, dass dieses Gen während der Kehlkopfentwicklung der Maus von Bedeutung ist. So ist *Irx2* ganz speziell in den Knorpeln des Larynx aktiv, welche die Stimmlage regulieren. Denn die Arytenoid-Knorpel variieren über die Spannung der Stimmbänder die Ausprägung der Stimme. Neben der chromosomalen Lokalisation untermauert das murine Genaktivitätsmuster die herausragende Bedeutung von *Irx2* als Kandidatengen für das Katzenschrei Syndrom.

Ein weiterer Aspekte der murinen *Irx2*-Funktion ist der perinatale Tod bei homozygotem Genverlust. In allen bekannten Fällen sind die CDC-Patienten ausschließlich heterozygote Merkmalsträger, d.h. es gibt auch hier keine lebenden homozygoten Erbträger.

Die Vererbung des CDC Syndroms gibt seit Jahren Rätsel auf. Bemerkenswert ist die ungleiche Verteilung der Merkmale abhängig vom Geschlecht der Nachkommen und der Weitergabe durch die mütterliche oder väterliche Keimbahn. Die Anzahl der untersuchten Patienten, die die krankheitsauslösende Mutation geerbt haben, ist zu gering, um statistisch klare Aussagen treffen zu können. Dennoch wurde festgehalten, dass mehr Mädchen als Jungen mit der Krankheit geboren werden (Ivison, 1999) und, dass in 90,2% der Fälle das Chromosom 5 mit einer Deletion von Vater vererbt wird (Ivison, 1999). Auch in der *Irx2*-Mutantenanalyse gibt es einen klaren Überschuß an weiblichen transgenen Tieren und die Weitergabe durch die männliche Keimbahn verstärkt den Phänotyp.

Entsprechend der parentalen Herkunft des veränderten humanen Chromosoms 5 stellt sich die Frage, ob der CDC-Lokus der genomischen Prägung unterliegt (Church et al., 1995). Die Analyse einer Mutter und ihres Sohnes mit identischer doppelter, perizentrischer Inversion zeigt die Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen. Dabei entwickelt ausschließlich der Sohn die CDC-Symptome, was bedeutet, das sich die Mutation geschlechtsspezifisch ausprägt. Die Inversion im Genom des Sohnes resultiert nicht in einem genetischen Informationsverlust, sondern in einer veränderten Regulation des CDC-Region. Diese Region zeigt je nach Geschlecht eine unterschiedliche Aktivität,

was auf einen Effekt wie die genomische Prägung oder variable Penetranz hinweist (Goodart et al., 1996).

DIE MAUS ALS MODELLORGANISMUS DER HUMANEN FORSCHUNG

Die Maus ist der beste Modellorganismus für die Analyse humaner Krankheiten, da gezielte Verlustmutationen in ihren Genom verankert werden können. Obwohl ihre Entwicklung natürlich teilweise divergent von der menschlichen Entwicklung verläuft, so ist sie doch in eine Vertreterin der hochentwickelten Säuger. Alle säugerspezifischen Fragen, wie zum Beispiel die genomische Prägung können untersucht werden. Entscheidend ist die exzellente Vergleichbarkeit von physiologischen Vorgängen, die es ermöglichen, die Grundlagen von Krankheiten zu studieren.

Zusätzlich zeigte sich durch die Vergleiche von Nukleotidsequenzen und Genfamilien, dass nicht nur einzelne Gene in ihrem Aufbau konserviert wurden in der Evolution, sondern dass auch die Organisation der Gene auf den Chromosomen vergleichbar ist. Unter Verwendung von Krankheits-Syndromen wie Cri-du-chat als Marker wurden die Chromsomen von Säugern und Primaten untersucht (Tarazami et al., 1998). Das Chromosom 5 des Menschen ist z.B syntenisch mit Chromoson 4 von Schimpanse und Orang-Utan (Tarazami et al., 1998) und weiten Teilen des Chromosom 13 der Maus.

Hierin liegt ein weiterer Ansatz begründet, warum die Maus ein sehr gutes Tiermodell für die Untersuchung humaner Krankheiten ist. Über die Lokalisation des Mausgens kann potentiell die chromosomale Position des humanen Homologs vorhergesagt und damit das cytogentische Wissen der Humangenetik über diese Region genutzt werden.

DIE HERAUSRAGENDE ROLLE VON MASH1 WÄHREND DER ENTWICKLUNG DER C-ZELLEN DES THYROIDS

ANALYSE DER INTERAKTION DES MURINEN ORTHOLOGS DES PRONEURALEN ACHAETE-SCUTE KOMPLEX UND DEN IROQUOIS-GENEN

Die theoretische Grundlage einer Verbindung zwischen den *Iroquois*-Genen und dem *achaete-scute* Ortholog, *Mash1,* in der neuralen Entwicklung wird durch experimentale Daten untermauert, die in den Untersuchungen der genetischen Regulationskaskaden in *Drosophila* und *Xenopus* gewonnen wurden. Die späte Funktion der drei Gene des

Iroquois-Komplexes (*Iro*-C) bedingt die Bildung sensorischer Organe auf dem Notum der Fliege. In der *Iro*-Mutante ist die Anzahl der sensorischen Borsten stark vermindert und diese Reduktion geht einher mit dem Verlust der Genexpression der *achaete-scute*-(AS-C) Gene auf dem seitlichen Notum (Gómez-Skarmeta et al., 1996). Die *achaete-scute* Gene zeigen proneurale Potenz, d.h. dass sie innerhalb ihrer Expressionsdomänen die Bildung von Sinnesorganen induzieren können. Folglich führt das Fehlen ihrer Aktivität zum Verlust dieser Sinnesorgane (Leyns et al., 1996). Der Funktionsverlust der einzelnen *Iroquois*-Gene bedingt die Deletion verschiedenen wie auch überlappender Expressionsdömanen der *achaete-scute* Gene. Demnach ist die Kombination der *Iroquois*-Genaktivitäten mit ihren singulären und redundanten Funktion die Voraussetzung für die Aktivität der proneuralen Gene. Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, dass eine gegebene Intensität an *Iroquois*-Aktivität vorliegt. Die genetische Interaktion konnte in *in vitro*-Studien belegt werden, bei der das Protein des Gens *araucan* an ein konserviertes cis-Element im regulativen 5´-Bereich der *achaete-scute* Gene bindet (Gómez-Skarmeta and Modolell, 1996). Durch Überexpression von *Iro*-C vergrößert sich der Aktivitätsbereich der *achaete-scute*-Gene und damit kann eine aktivierende Funktion postuliert werden (Gómez-Skarmeta and Modolell, 1996). Allerdings weisen Folgeexperimente daraufhin, das die Interaktion in ihrer Form bei der Fruchtfliege indirekt ist, d.h. unter Zuhilfenahme weiterer Faktoren abläuft. Dazu steht im Gegensatz, dass die Ergebnisse aus Überexpression chimärer Proteine in *Xenopus* deutlich auf eine direkte, reprimierende Funktion der Transkriptionsfaktoren des *Iroquois*-Komplex hinweisen (Gómez-Skarmeta et al., 2001).

Die Untersuchung der genetischen Interaktionen zwischen den Orthologen Gene der eben beschrieben Regulation in der Maus wurde anhand einer Promotoraktivierungsstudie durchgeführt. Das Iroquois1- bzw. das Iroquois2- Protein der Maus wurde in COS-Zellen, die eine veränderte Form des *Mash1*-Promotors enthalten, überexprimiert. Dieser veränderte Promotor (Verma-Kurvari et al., 1998) wird nicht gefolgt von der kodierenden Sequenz des *Mash1*-Gens, sondern von der GFP-Markerkassette. Der Ansatz des Experimentes erfordert, das bei Aktivierung des *Mash1*-Promotors GFP (green fluorescent protein) gebildet wird, welches anschließend visuell detektierbar ist. Allerdings konnte weder mit Irx1 (A. Zülch, pers. Mitteilung) noch mit Irx2 (Daten nicht gezeigt) das Promotorkonstrukt aktiviert werden. Diese Experimente

belegen, dass in der Maus keine direkte positive Regulation zwischen *Irx1, Irx2* und *Mash1* besteht.

Für eine abschließende Interpretation hinsichtlich der Regulation zwischen den genannten Genen fehlen noch weitere Daten. Zum einen gibt es noch vier weitere *Irx*-Proteine, deren Interaktionen noch nicht untersucht sind und zum anderen existiert ein weiteres Ortholog des AS-Komplex in der Maus, nämlich *Mash2*. Es ist nicht definitiv auszuschließen, dass zwischen den weiteren Mitgliedern dieser Genfamilien direkte Interaktionen bestehen.

MASH1 ZEIGT NEBEN DER NEURALEN EINE HOCHSPEZIFISCHE AKTIVIÄT IN DER ENTWICKLUNGSPHASE DES PHARYNX

Die orthologen Gene des AS-Komplex in der Maus, *Mash1* und *Mash2*, kodieren für Transkriptionsfaktoren, die sehr unterschiedliche Funktionen ausüben. *Mash2* wirkt in der Entwicklung der extraembryonalen Strukturen und wird monoallelisch exprimiert (Tanaka et al., 1999). Das *Mash1*-Gen kontrolliert die Differenzierung spezifischer neuraler Zelllinien (Guillemot et al., 1993) und ist aktiv im autonomen Nervensystem. Dort ist es essentiell für den korrekten Aufbau des sympathischen, parasympathischen und viszeralen Netzes (Lo et al., 1991; Guillemot et al., 1993). *Mash1*-defiziente Tiere sterben in den ersten Tagen nach der Geburt. Verschiedene Ansätze liefern Erklärungsansätze für den postnatalen Tod der Tiere. Es zeigt sich, dass sie kaum Nahrung aufnehmen bzw. verstoffwechseln können. Der mangelhaften Aufbau des peripheren Nervensystems resultiert in einer fehlerhaften viszeraler Innervation (Sang et al., 1999) und steht einem Überleben der Mutanten entgegen.

Ein weiterer prominenter Expressionsort des *Mash1*-Gens liegt in den Derivaten des vierten Schlundbogentasche, in den Ultimobranchialkörpern. Sie sind ein Bestandteil der entstehenden Schilddrüse (Thyroid), die aus den Thyroglobulin-produzierenden Zellen (Follikelzellen) und den Calcitonin-produzierenden Zellen (C-Zellen) zusammensetzt.

Die Entwicklung der Schilddrüse beginnt mit einer endodermalen Verdickung im Boden des Pharynx kaudal des entstehenden ersten Branchialbogens an Tag E8,5. Dieses endodermale Diverticulum wird die Thyroglobulin-produzierenden Zellen bilden. Desweiteren schnüren sich aus der vierten Schlundtasche die Ultimobranchialkörper (Ub) ab. Es wird seit Jahren diskutiert, ob dessen Zellen den epibranchialen Plakoden

(Larsen, 1993), den mesenchymalen Komponenten der vierten Tasche (Fontaine, 1979) abstammen oder sich aus Neuralleistenzellen bilden. Neuere Publikationen gehen davon aus, dass sie der Neuralleistenzelllinie entstammen. Sie greifen damit die Hypothesen von LeLievre auf (Le Lievre and Le Douarin, 1975), der postuliert, dass sie in den vierten Schlundbogen kurz nach dessen Bildung einwandern (Kaufmann and Bard, 1999). Nach der Trennung bewegen sich die Ultimobranchialkörper kaudalwärts in Richtung der Schilddrüsenanlage. In der folgenden Entwicklung von E13,5 bis E15,5 löst sich die ovale Struktur auf und ihre Zellen fusionieren mit den Follikelzellen im anterioren und dorsalen Bereich. Es entsteht die Schilddrüse mit einer Mischung an Thyroglobulin-produzierenden und Calcitonin-prodizierenden Zellen, die mit der Hormonproduktion im Embryonalstadium E17,5 starten.

Der Entwicklung des vollständigen Organs liegen massive Zellwanderungen zugrunde, die den "Abstieg" der Schilddrüse entlang der rostrokaudalen Achse bedingen. Eine fehlerhafte Regulation dieses Prozesses resultiert in anatomischen Auffälligkeiten wie dem "lingualen" Thyroid oder "Zysten" im Halsbereich. Bei Menschen entsteht der linguale Thyroid, wenn das Organ nach der Bildung nicht wandert, sondern im dorsalen Teil der Zunge verbleibt. Häufiger treten Zysten auf, die Resten der Schilddrüsenanlage entsprechen, die nicht vollständig bis ins superioren Mediastinum vorgedrungen sind. Sie verbleiben auf dem Weg beispielsweise auf Höhe der ersten trachealen Ringe und bilden ektopisches Schilddrüsengewebe.

AUFSTELLUNG ANATOMISCHER UND MOLEKULARER ZUSAMMENHÄNGE DER THYROIDENTWICKLUNG ANHAND DER MASH1 VERLUSTMUTANTE

Mash1-Aktivität ist sehr spezifisch im Vorderdarm der Maus zu finden, so dass eine Untersuchung der Ultimobranchialkörper in der Verlustmutante hochinteressant erschien. Bei der Ermittlung einer möglichen Funktionsstörung der Schilddrüse muß die schrittweise Entstehung bedacht werden, denn es kann sowohl die Wanderung, wie die Fusion oder die Reifung defizitär sein.

Die Untersuchung des Zeitpunkts der Fehlentwicklung erfolgtemittels *in situ* Analyse der Genaktivitäten von *Ttf1*, *c-ret* und *Pax9*. Die Genaktivität von *Ttf1* ist in der Mutante nicht verändert, denn nach wie vor liegt sie in den Ultimobranchialkörper und in den Vorläufern der Follikelzellen. Dementsprechend ist die Bildung der

Ultimobranchialkörper (Ub) durch den Verlust der *Mash1*-Aktivität nicht gestört. Der zweite kritische Schritt ist die Fusion der verschiedenen Zelltypen. Der molekulare Nachweis der Zellen aus den Ubs wird durch die Darstellung der Genaktivitäten von *Ttf1* und *Pax9* geliefert. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass diese Zellen, wie auch in andere Neuralleistenzellen, das Gen *c-ret* aktiv ist. Den besten Beweis dafür, dass Zellen, die aus den Ubs entstanden sind, bis zum Tag E15,5 nicht verloren gehen, liefert die verwendete *Mash1*-Sonde. In der Verlustmutant liegt kein funktionstüchtiges Mash1-Protein vor, aber es existiert eine verkürzte mRNA, die mit der *in-situ*-Hybridisierung detektiert werden kann. Somit kann klar demonstriert werden, dass die *Mash1*-positiven Zellen durch den Funktionsverlust in den frühen Phasen der Schilddrüsenentwicklung nicht beeinträchtigt sind. In der Mutante ist weder die Wanderung und noch die Integration der *Mash1* positiven Zellen defizitär.

Die Untersuchung des korrekten Aufbaus eines Organs ist ein wichtiger Schritt in der Mutantenanalyse. Doch die Funktionsanalyse ist erst mit der Untersuchung der Differenzierung der Zellen abgeschlossen. Die Funktion der Schilddrüse beinhaltet unter anderem die Produktion der Hormone Calcitonin und Thyroglobulin. Der Verlust des *Mash1*-Gens prägt sich in der Unfähigkeit der Schilddrüse aus, Calcitonin zu produzieren. Die fehlende Genfunktion verhindert die Reifung der C-Zellen und bewirkt so, dass das lebenswichtiges Calcitonin nicht produziert werden kann.

Der Vergleich mit anderen Genen, die an der funktionellen Ausgestaltung der Schilddrüse beteiligt sind, macht die einzigartige Stellung des Mash1-Gens für die Bildung der C-Zellen deutlich. In der *Ttf1*-Verlustmutante entstehen weder die Follikel- noch die Calcitonin-produzierende Zellen (Lazzaro et al., 1991). In der *Pax9*-Mutante findet keine Bildung von Thymus und Parathyroid, den Derivaten der dritten Schlundbogentasche, statt (Peters, 1998). Das Gen *Ttf1* scheint demnach für die Bildung der Schilddrüse in der frühen Phase von Bedeutung zu sein (Lazzaro et al., 1991). Speziell wichtig Für die spezifische Entwicklung der Follikelzellen ist das Gen *Pax8* (Mansouri et al., 1998). Denn in der Pax8-Verlustmutante bildet sich zwar eine Schilddrüse, diese besteht aber ausschließlich aus C-Zellen.

Die Reifung der C-Zellen ist die Vollendung eines Entwicklungsprogramm der Organogenese, dass mit der Bildung der Ultimobranchialkörper aus der vierten Schuldtasche beginnt. Die Ergebnisse der vorliegenden Funktionsanalyse belegen, das

die molekularen Mechanismen, welche die Organogenese der Schilddrüse vollenden, abhängig sind von der Funktion des *Mash1*-Gens.

REGULATION DES KALZIUM HAUSHALTS DER ZELLEN

Das Hormon Calcitonin reguliert im Körper die Konzentration der Kalzium-Ionen (Ca^{2+}). Schon millimolare Änderungen der Konzentration im Blut und im extrazellulärem Plasma sind kritisch für die Organismen. Dies beruht auf der Rolle der Kalzium-Ionen als Regulatorsubstanz bei vielen Zellprozessen. Calcitonin wird von den C-Zellen der Schilddrüse als Antwort auf eine Hyperkalzämie sezerniert. Es unterdrückt den Calziumverlust aus den Knochen, die ein großes Reservoir von Kalzium- und Phosphat-Ionen bilden. Im Gegenspiel mit dem Parathyroidhormon, wird die körpereigene Konzentration eingestellt und kontrolliert.

Für das Verständnis von Krankheiten ist es notwendig die Schritte zu entschlüsseln, die zur Herstellung der Schilddrüsenhormone führen. Die humane Krankheiten des Hypothyroidismus tritt in 1:5000 bis 1:3000 Neugeborenen auf. Es ist absolut kritisch, die Krankheit früh zu diagnostizieren, da sie unbehandelte bei den betroffenen Kindern zu irreversiblen Schädigungen in der geistigen Entwicklung führt und Debilität und Cretinismus hervorruft.

Die funktionellen Analysen der Kontrollgene *Irx2* und *Mash1* haben die wichtigen Rollen dieser Gene in verschiedenen Aspekten der Säugerentwicklung aufgezeigt. Generell sind neben den singulären Funktionen der Gene insbesondere die Interaktionen innerhalb von Regulationskaskaden von Interesse. Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl *Irx2* als auch *Mash1* innerhalb ihres genetischen Netzwerkes für die funktionelle Differenzierung lebenswichtiger Organe verantwortlich sind.

IV. MATERIAL UND METHODEN

IV.1. ORGANISMEN

IV.1.1 MÄUSE UND EMBRYONEN

NMRI (Weibchen) und C57Bl/6/xSJL oder 129Sv Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover bezogen. Zur Gewinnung von Embryonen für RNA-Präparationen, *in-situ*-Hybridisierungen und Morula-Aggregationen wurden die Mäuse ü.N. verpaart und der Tag des Vaginalpfropfes als Tag 0,5 post coitum der Embryonalentwicklung (E0,5) gezählt.

Die anlysierte *Mash1*-Mausmutante wurden von F. Guillemot zur Analyse zur verfügung gestellt (Guillemot et al., 1993).

IV.1.2 BAKTERIEN

Transformationen wurden mit den *E. coli*-Stämmen *DH5*α (Hanahan, 1985), *XL-10*-Gold (Stratagene), *SURE* (Stratagene) durchgeführt. Als Wirt für λ- Phagen wurde der Stamm *LE392* oder *C600* verwendet.

IV.1.3 ES-ZELLEN

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

IV.2 MATERIALIEN

IV.2.1 CHEMIKALIEN

Die genutzten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz), J.T. Baker (Deventer, Holland), Roth (Karlsruhe), Biomol (Ilvesheim) und Gibco Laboratories (Detroit, USA) bezogen. Phenol verschiedener pH-Werte wurde zuerst von der Firma Amresco (Solan, Ohio) und im späteren Verlauf der Arbeit von Roth (Karlsruhe) bezogen, ohne dass qualitative Unterschiede zu beobachten waren. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "p.a." (zur Analyse).

IV.2.2 RADIOCHEMIKALIEN

Die Firma Amersham (Braunschweig) lieferte die im gesamten Verlauf der Arbeit genutzten Radiochemikalien (^{32}P-dCTP und ^{35}S-dUTP).

IV.2.3 VERBRAUCHSMATERIAL

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

IV.2.4 ENZYME

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

IV.2.5 REAKTIONSSETS ("KITS")

Es wurden folgende Kits benutzt:

Kit	**Hersteller**
BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
Multiprime DNA labelling system	Amersham Life Science

Probe Quant G-50 Micro Columns	Amersham
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAexII Gel Extraction Kit	Qiagen
Trizol	Life Technologies
Oligotex mRNA Kit	Qiagen

IV.2.6 MEMBRANEN

Es wurde mit ungeladenen Nylon-Membranen der Firma Qiagen (Düsseldorf) gearbeitet, die sie ihrerseits von der Firma PAL erhalten.

IV.2.7 DNA-BIBLIOTHEKEN

genomische λ-Phagenbibliothek

Die genomische Bibliothek Ola129 wird seit einigen Jahren in unserem Labor verwendet.

cDNA-Bibliothek

Das Durchmustern verwchiedener Bibliotheken diente dazu, die *Irx2*-cDNA zu vervollständigen. Die ersten Fragmente wurden aus einer E8,5-cDNA-Bibliothek gewonnen (Becker, 1997), die freundlicherweise von Dr. B. Hogan (Fahrner et al., 1987) zur Verfügung gestellt wurde. Bei der zusätzlich verwendeten DNA-Bibliothek handelt es sich um die E10,5-Bibliothek der Firma Stratagene (Oligo-dT und Random-primed; E10,5; C57/Bl6; #938303).

IV.2.8 VEKTOREN

Für Klonierungen wurden das Plasmid Bluescript II KS+ (Stratagene, USA), pGEM-T oder pGEM-T-Easy (Promega) genutzt. Zur Erstellung des *Knock-out* Konstruktes wurde der pGNA-Vektor genutzt.

IV.2.9 GRÖßENMARKER

Für die DNA-Auftrennung wurden verschiedene Größenmarker verwandt:

a) 1 kb-Marker (Biolabs):

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

b) 100 bp-Marker (Biolabs):

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

c) λ– Marker:

bp: 14000, 8000, 7000, 7500, 6500, 4300, 3600, 2400, 1900, 1300, 1000, 700

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

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

IV.2.10 OLIGONUKLEOTIDE

Die Oligonukleotide dienten entweder als Sequenzierprimer oder sie wurden zur PCR benutzt. Sie wurden von den Firmen Eurogentec (Köln) oder NAPS (Göttingen) bezogen. Die folgende Aufzählung zeigt ausschließlich die wichtigsten Oigonukleotide:

T7-Primer (Stratagene) : 5´-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3´
T3-Primer (Stratagene) : 5´-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3´
Primer neoA: 5´- CGG ATC AAG CGT ATG ATG CAG CCG -3´
Primer neoB: 5´- CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG- 3´
Primer lacZ1: 5´- TTGGCGTAAGTGAAGCGAC- 3´
Primer lacZ2: 5´- AGCGGCTGATGTTGAACTG- 3´

IV.2.11 FILME

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

IV.2.12 PHOTOARBEITEN UND SEQUENZBEARBEITUNG

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

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

IV.2.13 IN-SITU-HYBRIDISIERUNGSSONDEN

Die folgenden *in-situ* Hybridisierungssonden wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt: *Gli1, Gli2* und *Gli3* von A. Joyner (Mo et al., 1997); *BMP4* von B. Hogan (Hogan, 1996); *Mash1* von F. Guillemot (Guillemot et al., 1993); *Irx1* von A. Zülch (Zülch, 1997); *Ttf1* von R. Di Lauro (Lazzaro et al., 1991); *c-ret* von D.J. Anderson (Lo and Anderson, 1995); und *Pax9* von A. Mansouri (Peters, 1998).

IV.2.14 MEDIEN, NÄHRBÖDEN, STANDARD-LÖSUNGEN

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

1x SSC:
0,15 M NaCl
15 mM NaCitrat, pH 7,0

TE:
10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

STE:
150 mM NaCl
8 mM Tris-Cl pH 8
0,8 mM EDTA pH 8,0

10 x TBE:
108 g Tris base
40 ml 0,5M EDTA, pH 8,0
55 g Borsäure
ad 1.000 ml H_2O

10 x Ladepuffer für RNA:
50 % Glycerin (steril)
1 mM EDTA
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylen Cyanol FF

SM-Puffer:
100 mM NaCl
10 mM $MgSO_4$
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,01 % Gelantine

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

10 x Ladepuffer für DNA:
0, 25 % Bromphenolblau
0. 25 % Xylen Cyanol FF
10x TAE
25% Gycerin
1 % SDS
1 mM EDTA

10 x PBS-Puffer:
1,3 M NaCl
70 mM Na_2HPO_4
30 mM $NaH_2PO_4 . 2 H_2O$
pH 7,0

Neutralisierungslösung:
1.5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl (pH 7,4)

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

NZY-Topagar (Topagar):
21 g NZY-broth
7 g Agarose
in 1 l VE-Wasser

Hybridisierungslösung:
7 % SDS
0,5 M Na_2HPO_4 pH 7,2

Waschpuffer
für Hybridsierungen:
1 % SDS
40 mM Na_2PO_4 pH 7,2

Chloroform/Isoamylalkohol (CI):
Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 24:1.

Kanamycin:
10 mg/ml in H_2O gelöst und bei -20 °C gelagert

Proteinase K:
Proteinase K (Boehringer) wurde mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml in H_2O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

EtBr-Lösung:
100 mg Ethidiumbromid in 10ml H_2O gelöst und im Dunkeln aufbewahrt; verwendete Konzentration betrug 2mg/ml.

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

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

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

Ampicillin:
25 mg/ml in H_2O, steril filtriert, und bei -20 °C gelagert

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

IV.3 METHODEN

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

IV.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN

PLASMIDPRÄPARATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT

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

Es wurden 5 ml einer *E. coli*-Kultur ü.N. in LB-Medium mit Selektionsmarker bei 37°C angezogen. Die Kultur wurde 10 Min. mit 4.000 rpm bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 250 µl Puffer P2 zugeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und nach maximal 5 Min. Inkubation bei RT 350 µl Puffer N3 zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand auf die QIAprep Spin-Säule gegeben. Durch kurze Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT wurde die DNA an die Säulenmatrix gebunden und mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Die DNA wurde in ein sauberes Eppendorfgefäß eluiert, wozu 50 µl Puffer EB auf die Säule gegeben, 1 Min. bei RT inkubiert und danach erneut 1 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert wurden. Die erwartete DNA Konzentration entspricht 200-400 ng/µl.

PLASMIDISOLATION MIT DEM QIAFILTER MAXIPREP KIT

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

Es wurden 100 ml *E. coli*-Kultur ü.N. in LB-Medium mit Selektionsmarker bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben angezogen, wenn das verwendete Plasmid mit ca 200-500 Kopien pro Beakterienzelle vorkommt. Die Kultur wurde durch 10minütige Zentrifugation mit 4.000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml kaltem P1-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 ml P2-Puffer wurde 6 mal invertiert, 5 Min. bei RT inkubiert und 10 ml gekühlter P3-Puffer zugegeben. Der Überstand wurde in die QIAfilter Cartridge gefüllt. Während der nun folgenden 10 Min. Inkubation bei RT wurden eine QIAGEN-tip 500-Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Das Zellysat wurde durch die QIAfilter Cartridge gedrückt und das klare Lysat auf die QIAGEN-tip 500-Säule auftragen. Es folgte zweimaliges Waschen der Säule mit je 30 ml QC-Puffer. Die DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer eluiert, durch Zugabe von 10,5 ml eiskaltem Isopropanol gefällt und durch eine 30 Min.

Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA mit 5 bis 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut durch Zentrifugation mit 15.000 g (4 °C, 10 Min.) pelletiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurde die isolierte Plasmid-DNA an der Luft getrocknet (ca 30 Min. RT) und in 1/10 TE resuspendiert.

IV.3.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

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

IV.3.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Trennung von DNA-Fragmente nach ihrer Größe wird die Agarosegelelektrophorese (Thorne, 1966) (Helling et al., 1974) (McDonell et al., 1977)(Johnson and Grossman, 1977)(Southern, 1975) verwendet, wobei die DNA entsprechend ihrer Größe und ihrer Form im elektrischen Feld zur Anode wandert.

Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend wurden 0,3 - 2 %ige Agarosegele mit jeweils 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit Ladepuffer versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei kurzwelligem UV-Licht (258 nm) fotogafiert. Präparative Gele sollten, um die Bildung von Thymidin-Dimeren und Strangbrüche zu vermeiden, nur langwelligem, energieärmerem UV-Licht (Wellenlänge > 300 nm) ausgesetzt werden. Für die Präperation von 0,3%igen Gelen ist es zur Stabilisierung erforderlich, eine Unterlage aus einem 1%igem Gel zu giessen. Für ein großes Gel wurden verwendet: 100ml 1%iges Gel und 350ml 0,3%igem Gel.

IV.3.4 GEWINNUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN MIT DEM QIAEX GEL EXTRACTION KIT

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agaosegelen wurde mit Hilfe des "QIAEX Gel Extractions Kit" von der Firma Qiagen durchgeführt. Das Protokoll arbeitet nach dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an Selikon-Gel-Partikel in

der Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen. Dabei macht man sich zunutze, dass DNA bei hohen Salzkonzentrationen an der Säulenmatrix haften bleibt, während Kontaminationen weggewaschen werden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann die DNA eluiert werden. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer QX, PE und EB sind in den Herstellerangaben zu finden (Qiagen, 2000).

IV.3.5 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA

Das Restriktionsschneiden wurde gemäß den Angaben des Enzymherstellers durchgeführt. Restriktionsansätze mit mehreren Enzymen konnten gleichzeitig erfolgen, wenn die Enzyme dieselben Reaktionsbedingungen erforderten. Unterschieden sich die Reaktionspuffer nur in der NaCl Konzentration, wurde zuerst mit der niedrigeren Salzkonzentration und dem entsprechenden Enzym inkubiert, anschließend wurde die Salzkonzentration für das zweite Enzym eingestellt, bevor dieses zugegeben wurde. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Ionen, mußte nach dem ersten Schneiden eine PCI-Extraktion (IV.3.6) mit anschließender Ethanolfällung (IV.3.7) durchgeführt werden, bevor mit dem zweiten Enzym geschnitten werden konnte. Die Reaktionsansätze wurden zum Teil zwischen verschiedenen Retsriktionsverdauen mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen (28104) gereinigt.

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

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion (Kirby, 1956)(Marmur, 1960)wurde zu einem Volumen einer wässrigen DNA-Lösung ein Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol gegeben (Mengenverhältnis 25 : 24 : 1). Nach intensivem Mischen auf dem Vortexer wurde die Emulsion zur Phasentrennung bei RT mit 13.000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Danach befanden sich denaturierte Proteine, Membranbestandteile und organisch lösliche Moleküle in der unteren Phenol/ Chloroform-Phase und in der Interphase. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase. Zur einfacheren Handhabung bei der Phasentrennung wurde vor der Zentrifugation Wachs zugegeben, welches sich in der Interphase sammelte.

Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Je nach benötigtem Reinheitsgrad der DNA kann der Vorgang mehrmals

wiederholt werden. Anschließend wurde, um Phenolspuren zu beseitigen, nach obigem Schema eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) durchgeführt. Die DNA wurde in der Regel nach der Extraktion mit Ethanol (IV.3.7) gefällt.

IV.3.7 ETHANOLFÄLLUNG VON DNA AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

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

IV.3.8 ISOPROPANOLFÄLLUNG VON DNA AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

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

Anstatt Ethanol wurden 0,7 Volumina Isopropanol zur DNA-Lösung zugegeben. Die Methodik ist analog zur Ethanolfällung.

IV.3.9 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

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

Ligationen wurden mit 10 - 100 ng Vektor und dem 3-fachen molaren Überschuß des entsprechenden Fragments in Ligase-Puffer mit 1 mM ATP und 1 U *T4*-DNA-Ligase

angesetzt. Überhang-Ligationen („sticky ends”) wurden 3 h. bei 20 °C oder ü.N. bei 14 °C, Ligationen mit stumpfen Enden („blunt ends”) stets ü.N. bei 14 °C inkubiert.

10X LIGASE-PUFFER:
660 mM Tris/HCl (pH 7,6)
66mM $MgCl_2$
0,1 M DTT

IV.3.10. „BLUNT END"-KLONIERUNG

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

- 5' Überhänge mit Klenow-Fragment der *DNA-Polymerase I* (Boehringer Mannheim) und den entsprechenden Nukleotidmix direkt im Reaktionsansatz aufgefüllt (*Klenow* arbeitet in den meisten Puffern zufriedenstellend).
- 3' Überhänge mit *T4*-Polymerase (stärkere 3' - 5' Exonukleaseaktivität als Klenow) abgebaut.

IV.3.11 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN

Bei der Elektroporation wird eine Mischung aus Bakterien und DNA einem kurzen, aber intensiven elektrischen Feld von 1,8 kV, welches einen exponentiellen Abfall zeigt, ausgesetzt (Dower et al., 1988). Dies führt zur vorübergehenden Bildung von Poren in der Membran von lebenden Zellen (Calvin and 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* auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und 5 h bis ü.N. bei 37 °C leicht geschüttelt. Mit diesen 5 ml wurde 1 l LB-Lösung angeimpft und bei 37 °C geschüttelt (300 rpm), bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht wurde. Nun wurde das Wachstum gestoppt, indem die Bakterien ca. 15 - 30 Min. in einem Eiswasserbad abgekühlt wurden. Hiernach wurden die Zellen durch ein 15 Min. Zentrifugieren (4200 rpm, 4 °C) pelletiert. Die Bakterien

wurden in 1 l eiskaltes ddH_2O aufgenommen und nach dem Lösen wie bereits beschrieben erneut pelletiert. Dieser Waschschritt wurde mehrfach wiederholt, doch jedesmal wurde das Pellet nur kleineren Mengen ddH_2O aufgenommen. Die letzten Schritte entsprechen 0,5 l ddH_2O bzw. 20 ml 10 % Glycerinlösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das nun erhaltene Pellet in 2 - 3 ml 10 %-Glycerinlösung aufgenommen und gut gemischt. Die Konzentration betrug nun in etwa $3*10^{10}$ Zellen/ ml. Danach wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Die Zellen sind nun fertig für eine Elektroporation und können nach Bedarf aufgetaut werden. Generell ist es besser einige Zellen während der Präperation zu verlieren, als sie zu lange von 4 °C zu nehmen oder sie zu stark zu zentrifugieren. Weniger ist mehr.

TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION

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

SOC-MEDIUM:

Bacto-Trypton 2 %
Bacto-Yeast Extrakt 0,5 %
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
$MgCl_2$ 10 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)
$MgSO_4$ 10 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)
Glucose 20 mM (nach dem Autoklavieren zugeben)

IV.3.12 SEQUENZIERUNG ("CYCLE SEQUENCING")

Zum Sequenzieren der DNA wurde ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese beruht (Sanger et al., 1977) (Tabor and Richardson, 1987). Einzelsträngige DNA dient dabei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Es wurden variable Primer zugegeben, die mit der DNA hybridisieren kann. DNA-Polymerasen benötigen für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden wurden auch

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

IV.3.13 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

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

BEISPIEL FÜR EINEN REAKTIONSANSATZ:

- 5 µl 10x Puffer (enthält 25 mM $MgCl_2$)
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Primer1 (10 µM)
- 1 µl Primer2 (10 µM)
- 50 ng-1.000 ng DNA-Matrize
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- x µl H_2O (auf 50 µl auffüllen)

Σ 50 µl

REAKTIONSBEDINGUNGEN

1.Schritt:	94°C	5’
2.Schritt:	94°C	30’’
3.Schritt:	55 - 65 °C	30’’
4.Schritt:	72°C	40’’

Schritte 2. - 4. 25 - 30 mal wiederholen

5.Schritt: 4°C Temperatur halten

GENOTYPISIERUNGS-PCR:

Zum Genotypisieren wurde zum einen eine *Irx2*-WT-PCR, die den deletierten Intronbereich zwischen dem dritten und dem vierten Exon (Primer F+V oder B+Z) erfaßt, und zum anderen eine *Neomycin*- oder *lacZ*-PCR durchgeführt. Das Geschlecht embryonaler Tiere wurde durch eine PCR auf das SRY-Gens des Y-Chromosoms ermittelt.

IRX2-WT-PCR	*NEO-PCR*	*LACZ-PCR*
Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: FV + BZ	Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: neoA + neoB	Ansatz (wie oben beschrieben) Primer: lacZ1 + lacZ2
Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 65°C Zyklenzahl: 30x	Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 65°C Zyklenzahl: 25x	Protokoll (wie oben beschrieben) Annealingtemperatur: 65°C Zyklenzahl: 30x

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

IV.3.14 SOUTHERN-BLOT-ANALYSE

Die nachfolgend aufgeführt Analyse wurde nach der Beschreibung von Southern oder Chomczynski durchgeführt (Southern, 1975)(Chomczynski and Quasba, 1984).

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde in Agarosegelen aufgetrennt, gefärbt und mit einem Längenmaß fotogafiert. Das Gel wurde 15 Min. lang unter Schütteln mit 0,25 M HCl behandelt (Depurinisierung; reduziert die Größe der DNA-Fragmente im Gel und verbessert dadurch die Effizienz, mit der große Fragmente auf die Filter transferiert werden können) und anschließend mit VE-Wasser gespült. Da ausschließlich Nylon-Memranen verwendet wurden, konnte der Transfer der DNA unter alkalischen Bedingungen erfolgen („alkalisches Blotting”). Hierzu wurde die DNA für

mindestens 30 Min. in Denaturierungslösung denaturiert und anschließend ca. 30 Min. in der Neutralisierungslösung geschwenkt. Zum Blotten wurde der Aufbau nach Southern verwendet. Als Transferlösung diente 20x SSC. Der Transfer dauerte 12-16 h, je nach Größe der Fragmente und Menge der DNA in dem Gel. Nach dem Blotten wurde die Membran in 2x SSC gespült, luftgetrocknet und bei 80°C für 1h gebacken. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (0,3 J/cm^2) kovalent auf dem Filter fixiert.

DENATURIERUNGSLSG.:	*NEUTRALISIERUNGSLSG.:*
0,5 M NaOH	1,5 M NaCl
1,5 M NaCl	0,5 M Tris
	HCl (pH 7,2)

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

RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem "Multiprime DNA labelling system" von Amersham. Bei diesem System (Feinberg and Vogelstein, 1983) wird doppelsträngige DNA bei 95°C zu Einzelstrang-DNA denaturiert. Zu der ssDNA (>50ng) werden Klenow-Enzym, Zufallssequenz-Hexamerprimer, dNTPs und ^{32}P-markiertes dCTP gegeben. Bei der Polymerisation werden neben normalen dNTPs auch ^{32}P-dCTPs in den Strang eingebaut.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Probe auf 50 ml mit STE aufgefüllt und über eine *G-50*-Mikrosäule (Sephadex G-50 Probe Quant; Pharmacia) gegeben. Die Präparation der Säule umfaßt kurzes vortexen sowie das Aufbrechen der Ausflußöffung. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß gestellt und bei 735 xg 1 Min. zentrifugiert, das Eluat wird verworfen. Die Reaktionsmischung wird vorsichtig auf die Säule pipettiert und für zwei Min. bei 735 xg zentrifugiert. Der Durchfluß enthält die aufgereinigte Sonde, die freien Nukleotide wurden von der Säule zurückgehalten.

Um die Qualität der Sonde zu prüfen, wurden 1 µl von 50 µl Säulendurchfluß für eine Szintillationszählung eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Sonde sollte ein Signal von 15 - 25 Millionen counts liefern. Die Sonde wurde für 10 Min. bei 95°C denaturiert und sofort danach in die Hybridisierungslösung gegeben.

Bei der Genotypisierung kam es bei einigen Sonden zu starkem Signal-Hintergrund. In diesem Fall wurde die Sonde mit großen Mengen denaturierter WT-DNA abgesättigt. Nach der Denaturierung von DNA und Sonde wurden beide für 20 Min. bei 65°C inkubiert und erst dann zur Membran gegeben.

HYBRIDISIERUNG DER MEMBRANEN

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

Die Membranen wurden zunächst für mindestens 1 Stunde (meist ca. 2 h) mit 20 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Nach der Prähybridisierung wurde die vorbereitete, radioaktiv markierte DNA-Sonde für 10 Min. im Heizblock bei 95°C denaturiert und sofort in 12 ml Hybridisierungslösung (auf 65°C vorgewärmt) gegeben. Die Konzentration der Sonde sollte ungefähr 10^6 counts/ml betragen. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsflasche gefüllt. Die Hybridisierung wird im 65 °C-Schrank über Nacht durchgeführt. Die Membranen wurden mehrmals je 30 Min. bei 65 °C gewaschen, wobei die Salzkonzentrationen der Waschlösungen konstant abnahmen.

Die Exposition erfolgte mit einem Biomax-Film bei -70 °C. Die Expositionsdauer betrugt meistens ein bis drei Tage, bei der externen Sonde auf genomischer DNA allerdings 14 Tage. Die Entwicklung des Films wurde mit einer Entwicklermaschine durchgeführt.

GENOTYPIEREN DER IRX2-MAUSMUTANTEN MITTELS SOUTHERN-BLOT ANALYSE

Das Genotypisieren der *Irx2*-Mausmutanten erfolgte ab dem embryonalen Alter von E10,5 mittels Southern-Blot-Analyse. Die genomische DNA wurde enzymatisch mit *BamHI* verdaut. Die Hybridisierung erfolgte dann mit der radioaktiv markierten ext-Sonde. Drei Modifikationen haben sich dabei als sinnvol herausgestellt. Zum einen wurde die markierte Sonde mit WT-DNA gegenhybridisiert, die Membran mit Fisch-Sperma-DNA in der Prähybridisierung abgesättigt und zum anderen hat sich der Hybridisierungspuffer der Fa. Stratagene (*Quickhyb*-Solution) als signalverstärkend erwiesen.

Waschschritte:

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

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

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

VORBEHANDLUNG DER WIRTSBAKTERIEN

Von dem Bakterienstamm *LE392/C600* wurde eine 100 ml-ü.N. Kultur in LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM $MgSO_4$ angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 4.000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in der Hälfte des ursprünglichen Volumens in 10 mM $MgSO_4$ aufgenommen. Diese Bakterien waren nun für eine Infektion mit Lambda-Phagen kompetent. Die Bakterien wurden bei 4 °C aufbewahrt und blieben etwa eine Woche verwendbar.

TITERBESTIMMUNG EINER PHAGENBIBLIOTHEK

Die Ausplattierung einer genügend hohen Anzahl von Phagen aus einer Bibliothek war Voraussetzung für die erfolgreiche Identifizierung eines bestimmten Klons. Daher mußte der aktuelle Titer der verwendeten Bibliothek bekannt sein. Hierzu wurde jeweils eine Verdünnungsreihe in SM-Puffer angesetzt, um den Titer der Bibliothek durch Auszählen von Phagenplaques bestimmen zu können. Diese Reihe umfaßte in der Regel fünf Verdünnungen von $1 : 10^2$ bis $1 : 10^6$. Aus der Anzahl der Plaques unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren ließ sich die Zahl der infizierenden Phagen pro Volumeneinheit der Bibliothek errechnen.

AUSPLATTIEREN DER PHAGENBIBLIOTHEK

Die Phagen wurden mit einer Dichte ausplattiert, die gerade noch Einzelphagen erkennen ließ. Die gewünschte Phagenzahl wurde mit der entsprechenden Menge

Bakterien 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die infizierten Bakterien mit ca. 46 °C warmem Topagar gemischt und auf 37 °C vorgewärmte Agarplatten plattiert. Nach Erstarren des Topagar wurden die Platten umgekehrt für ca. 5 - 9 h bei 37 °C inkubiert, bis die Plaques einen Durchmesser von ca. 1,0 mm erreicht hatten. Anschließend wurden die Platten bis zum Herstellen der Filter bei 4 °C aufbewahrt.

TRANSFER DER PHAGEN AUF NYLON-MEMBRANEN UND HYBRIDISIERUNG

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

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

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

3. ÄQUILIBRIEREN
5 Min. 2x SSC

4. LUFTTROCKNEN

Zuletzt wurde die Phagen-DNA durch UV-Bestrahlung (300 m J/cm^2, 302 nm) an die Nylonmembran kovalent gebunden. Mittels radioaktiver Hybridisierung konnten die positiven Phagenklone ermittelt werden.

ISOLIERUNG REKOMBINANTER PHAGENKLONE

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

ANLEGEN EINEN PHAGENSTOCKS

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

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

Der entsprechende Phagenklon wurde auf einer 150 mm Petrischale konfluent ausplattiert. Anschließend wurden die Phagen mit 10 ml SM und einigen Tropfen Chloroform ü.N. bei 4 °C von der Platte gewaschen. Der Überstand wurde unter Zugabe von DNase und RNase (Endkonzentrationen jeweils 10 µg/ml) 30 min bei 37 °C in 50 ml Röhrchen (Falcon) verdaut, zentrifugiert (3.500 rpm, 30 min, Minifuge T) und der Überstand mit gleichem Volumen 20 % Polyethylenglykol-6.000/2 M NaCl für 2 h (4 °C) präzipitiert. Die Phagen wurden pelletiert (3.500 rpm, 30 min), getrocknet, in 500 µl SM gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Mit weiteren 200 µl SM wurden die Falcon-Röhrchen einmal nachgewaschen. Nach einer Chloroformextraktion erfolgte ein weiterer RNase-Verdau (Endkonzentration 20 µg/ml; 15 min bei 37°C) und ein Proteinase-K-Verdau (Endkonzentration von 10 µg/ml; nach Zugabe von 5 µl 10 % SDS und 5 µl 0,5 M EDTA-Lösung; 15 min bei 37 °C). Abschließend wurde eine Phenol- und Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (nicht vortexen) der Phagen-DNA durchgeführt, diese mit dem gleichen Volumen Isopropylalkohol oder Ethanol gefällt und 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Phagen DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl TE gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

SM-PUFFER:

NaCl 100 mM
$MgSO_4$ 10 mM
Tris/HCl, pH 7,5 50 mM
Gelatine 0,01 %

IV.3.17 PRÄPARATION GENOMISCHER MAUS-DNA

Das Gewebe (ca. 1 cm Schwanz oder embryonales Gewebe) wurde in 450 µl Proteinase K-Puffer, der 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) enthielt, gegeben und über Nacht bei 56 °C inkubiert. Die unverdauten Haare und Knochen wurden am nächsten Tag abzentifugiert (5 Min., 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A), die genomische DNA im Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt und zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A). Das DNA Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl TE gelöst (bei 37 °C unter leichtem Schütteln). Für Embryonen jünger als E8,5 muß der gesamte Embryo zur PCR Analyse benutzt werden.

PROTEINASE-K-PUFFER:

NaCl 200 mM
Tris/HCl, pH 8.5 100 mM
EDTA 5 mM
SDS 0,2 %

IV.3.18 ARBEITEN MIT RNA

VORBEREITUNGEN FÜR DAS ARBEITEN MIT RNA

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

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

Bei dem *TRIzol*-Protokoll wurde das Gewebe in einer monophasischen Mischung aus saurem Guanidiniumthiocyanat, saurem Phenol und Chloroform homogenisiert

(Chomczynski and Sacchi, 1987)(Chomczynski, 1993). Guanidiniumthiocyanat ist ein sehr effektives Mittel zur Proteindenaturierung (Chomczynski and Sacchi, 1987); Extraktion mit saurem Phenol und Chloroform ermöglicht nach Zentrifugation die effektive Trennung von RNA in der wässrigen Phase von DNA und Protein in der Phenol/Chloroformphase.

Dazu wurden Embryonen verschiedenen Alters, Mausgehirne bzw. Lungen von 1 Tag und älteren Mäusen in PBS (mit DEPC) präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bei -80 °C gelagert. Zur RNA-Präparation wurde eingefrorenes Gewebe direkt aus dem -80 °C-Schrank in ein steriles Greinerröhrchen mit Trizol gegeben. Es wurde 1 ml Trizol pro 50 - 100 mg Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde solange homogenisiert, bis keine Gewebeteilchen mehr sichtbar sind. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu ermöglichen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol wurde das Röhrchen für 15 Sek. intensiv geschüttelt. Es schloß sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 - 3 Minuten an. Die Probe wurde zur Phasentrennung mit 12.000 g bei 4 °C für 15 Min. zentrifugiert. Die farblose obere Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt. Die rote untere Phase enthielt DNA und Proteine und wurde verworfen. Zur RNA-Fällung wurden 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem 1 ml Trizol zugegeben. Die Probe wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12.000 g bei 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Die ausgefällte RNA bildete ein Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit mindestens 1 ml 75 % Ethanol pro 1 ml eingesetztem Trizol gewaschen. Die Probe wurde mit einem Vortexer gemischt und mit 7.500g bei 4 °C für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird in RNase-freiem DEPC-H_2O aufgenommen. Damit sich die RNA besser löste, konnte sie für 10 Min. bei 50 °C inkubiert werden. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

ISOLIERUNG VON POLYA$^+$-RNA AUS GESAMT-RNA MIT DEM OLIGOTEX MRNA-KIT (MINI-PRÄPARATION)

Der Oligotex-Kit von Qiagen beruht auf der Bindung von mRNA mit polyadenylierten 3'-Enden an Oligo-dT-Primer, die an eine Festphasenmatrix gekoppelt

sind. Die Bindung erfolgt in einem Hochsalzpuffer, die Elution bei Niedrigsalzbedingungen (Qiagen, 2000).

Dazu wurde die Oligotex-Suspension auf 37 °C, der Elutionspuffer auf 70 °C erwärmt. Die RNA wurde in 250 µl DEPC-H_2O gelöst. Dazu wurden 250 µl 2x Bindepuffer und 15 µl Oligotex-Suspension gegeben und das ganze 3 Min. bei 65 °C inkubiert, um RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Zur Hybridisierung der RNA an die Oligo-dT-Primer wurde 10 Min. bei RT inkubiert. Danach wurde 2 Min. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl OW2 Waschpuffer resuspendiert und die Suspension auf Spin-Säule gegeben. Diese wurde 30 Sek. mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Danach wurde ein zweites Mal mit 400 µl OW2 Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (30 Sek., 13.000 rpm, RT) wurde die Spin-Säule in RNase-freies Eppendorfgefäß gestellt und mit 30 - 50 µl vorgeheiztem (70 °C) Elutionspuffer durch eine 30 sekündige Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT eluiert. Zur besseren Ausbeute kann der Elutionsschritt nochmals wiederholt werden. Die Lagerung der polyA$^+$-RNA erfolgte bei -80 °C.

IV.3.19 NORTHERN BLOT

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

NORTHERN BLOT: ELEKTROPHORESE

Um ein RNA-Gel mit einem Volumen von 100 ml zu gießen, wurden 88 ml DEPC-H_2O mit 1 g Agarose aufgekocht und die Flüssigkeit auf 55°C abgekühlt. Erst dann wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 1,8 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Die Elektrophorese wurde 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer zugegeben. Für die Probendenaturierung wurden 4,5 µl RNA-Lösung (ca. 20 µg Gesamt-RNA oder 1-3 µg polyA$^+$-RNA) mit 2,0 µl 10x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10,0 µl deionisiertem Formamid versetzt. Die Mischung wurde für 15 Min. bei 55 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Auftragspuffer und 1 µl EtBr wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Der aufgetragene RNA-Marker wurde

genauso behandelt. Der Gellauf erfolgte für ca. 3 Stunden bei 100 Volt, bis die Bromphenolblau-Bande ungefähr 2/3 des Gels durchlaufen hatte.

Nach dem Gellauf wurde auf dem UV-Tisch mit einem fluoreszierenden Lineal neben der Markerspur fotografiert, damit sich später die Größe der Marker-Banden bestimmen läßt. Dann wurde das Gel für 20 Min. in 20x SSC inkubiert. MOPS-Puffer, verwendetes H_2O und sonstige Lösungen müssen RNase-frei sein.

NORTHERN BLOT: TRANSFER

Der Aufbau und der Ablauf des Northern Blots entsprechen dem des Southern Blots. Allerdings bedarf die bereits einzelsträngig vorliegende RNA keiner Denaturierung und Neutralisierung. Nach dem Blotten wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (300 m J/ cm^2, 366 nm) kovalent auf der Membran fixiert.

NORTHERN BLOT: HYBRIDISIERUNG

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

PRÄHYBRIDISIERUNG
bei 65 °C für 2 Stunden

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

NORTHERN BLOT: WASCHSCHRITTE UND EXPOSITION

Northernblots wurden auf folgende Weise gewaschen:

Waschschritt 1: frische Prähybridisierungslösung, 30 Min. bei 60 °C
Waschschritt 2 - 4: Waschpuffer 20 Min. bei 60 °C

Danach wurde die Membran noch feucht in Plastikfolie eingeschweißt oder in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit Klebebändern in einer Expositionskassette befestigt. Es wurden immer zwei Filme aufgelegt, wobei der eine nach 3 Tagen und der zweite je nach Stärke des Signals nach 1,5 - 3 Wochen entwickelt wurde. Die Exposition wurde bei -80°C durchgeführt. Als Filmmaterial wurden Biomax-Filme benutzt. Die Entwicklung des Films erfolgte mit einer Entwicklermaschine.

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

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

ALLGEMEINES ZUR RADIOAKTIVEN IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

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

Diese Methode ermöglicht organ-, gewebe- und unter Umständen auch zellspezifische Analyse des Expressionsmusters eines Gens. Zudem können im Gegensatz zum Whole-mount-*in-situ*-Hybridisierungsverfahren auch ältere Embryonen und adultes Gewebe ohne penetrationsprobleme bearbeitet werden.

HERSTELLUNG EINER MATRIZE FÜR DIE IN-VITRO-TRANSKRIPTION

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

IN-VITRO-TRANSKRIPTION DER RNA-SONDEN

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

ANSATZ:

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

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

AUFREINIGUNG DER RNA-SONDEN

Nach der *in-vitro*-Transkription wurde die DNA-Matrize auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und zur Aufreinigung auf eine vorbereitete *G-50*-Mikrosäule (Sephadex Probe-Quant; Pharmacia) gegeben und 2 Min. mit 735 g bei RT zentrifugiert. Die bei der Transkription nicht eingebauten Nukleotide wurden dadurch entfernt. Zur RNA-Sonde, die sich im Eluat befand, wurden 50 µl deionisiertes Formamid gegeben und 1 µl der Sonde mit einer Szintillationslösung im Szintillationszähler gemessen.

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

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

Ablauf:

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

f. 100 %Ethanol	24 h	m. Paraplast-Plus, 60 °C	24 h
g. 100 %Isopropanol	24 h	n. Paraplast-Plus, 60 °C	24 h

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

4 % PFA IN 1X PBS:
40 g Paraformaldehyd (PFA)
ad 1.000 ml mit 1x PBS
bei 60 °C gelöst

HERSTELLUNGVON PARAFFINSCHNITTEN

Dazu wurde der in Paraffin eingebettete Embryo in ein Mikrotom der Firma Leica eingespannt und geschnitten. Die 8 - 15 µm dicken Schnitte wurden anschließend auf der Wasseroberfläche eines 45 °C-Wasserbades entspannt und von dort auf einen Superfrost-Objektträger der Firma Menzel Gläser (Braunschweig) aufgenommen. Diese geringe Schnittstärke ist von Vorteil, da sie eine zelluläre Analyse erlaubt. Die Schnitte wurden für 1 h auf eine 37 °C-Wärmeplatte gelegt, ü.N. bei 37 °C getrocknet, am darauffolgenden Tag bei RT bis zur Verwendung gelagert.

PRÄHYBRIDISIERUNG

Die Prähybridisierung dient dem Entparaffinieren der Schnitte, außerdem zum Vorbereiten der Hybridisierung.

Ablauf:

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

k. 1x PBS	5 Min.	y. 80 % Ethanol	2 Min.
l. 4 % PFA	20 Min.	z. 90 % Ethanol	2 Min.
m. 1x PBS	5 Min.	aa. 95 % Ethanol	2 Min.
n. 1x PBS	5 Min.	bb. 100 % Ethanol	2 Min.

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

ACETYL.-MIX:
0,1 M Triethanolamin
0,05 M Acetanhydrid

PROTEINASE-K-PUFFER:
20mM Tris/HCl, pH 7,5
1mM EDTA, pH 8,0

HYBRIDISIERUNG DER SCHNITTE

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

IN-SITU-HYBRIDISIERUNGS-PUFFER:
10 % Dextransulfat
50 % deion. Formamid
100 mM DTT
300 mM NaCl
10 mM $NaHPO_4$, pH 6,8
10 mM Tris/HCl pH 8,0
5 mM EDTA, pH 8,0
5 mg/ml Hefe-tRNA
0,2 mg/ml Ficoll-400
0,2 mg/ml PVP

WASCHEN DER OBJEKTE

Die Objektträger wurden in Träger einsortiert und 20 - 30 Min. bei 65 - 70 °C in Waschpuffer bewegt, je nach der erforderten Stringenz. Anschließend wurden die Schnitte 3 - 5 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C gewaschen. Zur RNase-Behandlung wurden die Objektträger jeweils 15 Min. im NTE ohne RNase, dann 15 Min. im NTE mit 20 mg/ml RNase A und nochmals 15 Min. ohne RNase jeweils bei 37 °C behandelt. Danach wurden die Schnitte 30 Min. in Waschpuffer bei 37 °C und jeweils 15 Min. in 2x

SSC und 0,1x SSC bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 % 80 %, 90 %, 95 % und 100 % Ethanol, jeweils 2 Min.). Nachdem die Schnitte gut getrocknet waren, wurden sie in einer Röntgenfilmkassette ü.N. auf Standard-Röntgenfilm (BIOMAX, Firma Kodak) exponiert, um die Stärke des Signals für die Expositionszeit abschätzen zu können.

WASCHPUFFER:	*NTE:*
50 % Formamid	0,5 M NaCl
2x SSC	0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)
0,01 M β-Mercaptoethanol	1 mM EDTA

EXPONIEREN, ENTWICKELN UND FÄRBEN DER IN-SITU-HYBRIDISIERUNGEN

In einer Dunkelkammer (ohne Rotlicht) wurden die Objektträger in eine 1:1 mit Wasser verdünnte Kodak NTB-2 Emulsion getaucht, die auf 42 °C erwärmt wurde, und 2 h bei RT getrocknet. Die Objektträger wurden dann in eine lichtdichte Plastikbox einsortiert. Die Objektträger wurden so bei 4 °C 10 Tage exponiert. Schließlich wurden die Objektträger in der Dunkelkammer (ohne Rotlicht) 3 Min. in D19 Entwickler (80 g/ 500 ml) der Firma Kodak entwickelt. Es folgten 1 Min. Behandlung in 1 %iger Essigsäure, 3 Min. Fixierung in 30 %iger Natriumthiosulfatlösung und mehrmaliges Waschen in dH_2O (2x 10 Min. bei RT, 5 Min. bei 42 °C, 10 Min. bei RT und 30 Min. bei RT). Eine Färbung wurde für 20 Min. in einer gefilterten Giemsa-Lösung durchgeführt. Die gefärbten Objektträger wurden vorsichtig, aber gründlich mit Leitungswasser (nicht deionisiert) gespült. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Einschlußmittel (Eukitt) unter Deckgläschen eingedeckelt. Fotografien wurden mit einem Leitz Labovert Hellfeld-Dunkelfeld-Mikroskop und einem Kunstlichtfilm (Fa. Kodak, 320T) gemacht.

GIEMSA-STOCKLÖSUNG:	*GIEMSA FÄRBELÖSUNG:*
0,75 g Giemsa	8 ml Giemsa-Stocklösung
50 ml Methanol	4 ml Na-Phosphat-Puffer (0,2 M; pH 6,0)
50 ml Glycerin	188 ml ddH_2O

IV.3.21 mRNA-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG AN GANZEN EMBRYONEN („WHOLE-MOUNT"-HYBRIDISIERUNGSTECHNIK)

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

Hybridisierung wurde nach dem Protokoll von Wilkinson durchgeführt (Wilkinson, 1992).

VORBEREITUNG DER EMBRYONEN UND GEHIRNE

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

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

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

HERSTELLUNG DER IN-VITRO-RNA-SONDE

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

In-vitro-Transkription

Folgender Transkriptionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert:

Transkriptionsansatz:	
DEPC-H_2O	11 µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
10x DIG-Nukleotid-Mix	1 µl
linearisiertes Plasmid (1 µg/µl)	1 µl
RNasin (30 U/µl)	1 µl
RNA-Polymerase (10-50 U/µl)	1 µl

Nach Entnahme eines 1 µl Aliquots für ein Analysegel (1 % Agarose/TBE Gel) wurde der Ansatz unter Zugabe von 2 µl DNase (20 U/ml, RNase-frei) weitere 15 min

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

10X DIG-NUKLEOTID MIX:
GTP, ATP , CTP, 10 mM
UTP 6,5, mM
DIG-UTP, 3,5 mM

10X TRANSKRIPTIONSPUFFER:
Tris/HCl (pH 7,5), 400 mM
$MgCl_2$, 60 mM

HYBRIDISIERUNG, ANTIKÖRPERINKUBATION UND FÄRBUNG

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

Hybridisierung

Zur Hybridisierung der Sonde wurden die Embryonen zunächst durch eine abfallende Methanolreihe (75 % in PBT, 50 % in PBT, 25 % in PBT) rehydriert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBT wurden die Embryonen in 6 % H_2O_2/PBT für 1 h bei RT gebleicht. Anschließend wurden sie dreimal in PBT gewaschen. Die Embryonen wurden je nach Alter unterschiedlich lange mit Proteinase K behandelt, wodurch die Zugänglichkeit der Sonde und des Antikörpers erhöht wurde. Hierfür wurden die Embryonen in 10 µg Proteinase-K/ml PBT gemäß folgenden Richtzeiten bei RT inkubiert.

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

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

(PRÄ-) HYBRIDISIERUNGSLÖSUNG:

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

Waschschritte

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

Ablauf:

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

LÖSUNG 1

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

LÖSUNG 3:

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

PBT:

0,1 % Tween-20 in 1x PBS

LÖSUNG 2

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

10X TBST (100ML):

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

Antikörperinkubation

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

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

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

Entfernen des Antikörpers

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

Ablauf:

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

NTMT-LÖSUNG

NaCl, 100 mM
Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM
Levamisol, 2 mM
$MgCl_2$, 50 mM
Tween-20, 1 %

Färbung und Analyse

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

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

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

VIBRATOMSCHNEIDEN VON WHOLE-MOUNT-GEFÄRBTEN EMBRYONEN BZW. GEHIRNEN

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

Um das Gewebe näher zu untersuchen, welches das Gen exprimiert, wurden Vibratomschnitte von 40 µm angefertigt. Sie ermöglichten es, einen Eindruck von tieferliegenden Gewebeschichten zu erhalten und auch dreidimensionalen Eindruck von der Schnittebene zu erhalten. Zunächst wurden die Embryonen bzw. Gehirne aus dem 80 % Glycerol/PBT, über 50 % Glycerol/PBT und schließlich in PBT überführt. Dann wurde das Gewebe in die Gelatine-Albumin-Lösung gelegt, damit das Gewebe

physiologisch ausgeglichen ist. Parallel wurden 2 ml der Gelatine-Albumin-Lösung mit 80 µl einer 50 %igen Gluteralaldehydlösung gemischt. Dies wurde leicht angetrocknet bevor der Embryo auf diesem Block in der gewünschten Position plaziert wurde. Nun wurden 2 ml einer frisch angemischten Gelatine-Albumin-Lösung mit 80 µl einer 50 %igen Gluteralaldehydlösung dazugegeben. Nach 30 minütigem Aushärten, wurde der Block auf dem Vibratomblock befestigt. Die 40-µm-Schnitte wurden mit einem Vibratomschneidegerät („Pelco-1.000") unter Wasser durchgeführt. Die Schnitte wurden einzeln auf vorbehandelte Objektträger (s. mRNA-*in-situ*-Hybridisierung) aufgezogen und mit einer Lösung (Moviol, Fa. Hoechst) eingedeckelt.

GELATINE-ALBUMIN-MIX:
Gelatine 490 mg
Albumin 30 g
Saccharose 20 g

IV.3.22 NACHWEIS VON ß-GALAKTOSIDASE (X-GAL-FÄRBUNG)

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

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

X-GAL-FÄRBELÖSUNG:
X-Gal, 1 mg/ml
$K_3Fe(CN)_6$, 5 mM
$K_4Fe(CN)_6$, 5 mM

Nach erfolgter *ß-Galaktosidase*-Färbung wurden die Embryonen/Geirne in PBS gewaschen und anschließend in einer ansteigenden Glycerin/PBS-Reihe (30 %, 50 %, 80 %) aufgeklärt. In jeder Lösung wurden die Embryonen für 1 - 2 Tage belassen.

IV.3.23 METHODEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN

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

Generell wurden die Zellen in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37 °C vorgewärmt. Alle Arbeiten wurden mit Plastikmaterial (Pipetten, Gewebekulturschalen und -platten) durchgeführt.

MEDIUM FÜR DIE KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN FIBROBLASTEN

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

MEDIUM FÜR DIE KULTIVIERUNG VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN

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

PRÄPARATION VON PRIMÄREN NEOMYCIN- BZW. PUROMYCIN-RESISTENTEN FIBROBLASTEN

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

MITOTISCHE INAKTIVIERUNG VON FIBROBLASTEN

Konfluente Mausfibroblasten wurden unmittelbar vor Benutzung als Fibroblasten-Zellen durch Behandlung mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Dazu wurde dem Fibroblastenmedium Mitomycin C zugesetzt (100 mg/ml) und die Mitomycin C-Behandlung 2,5 h bei 37 °C durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen und trypinisiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 8 x 104 Zellen/cm^2 ausplattiert. Die Gewebekulturschalen waren zuvor mit einer 0,1 %igen Gelatine-Lösung für 15 Min. behandelt worden.

TRYPSINBEHANDLUNG VON ZELLEN

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

KULTIVIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN (ES-ZELLEN)

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

DNA-TRANSFER IN EMBRYONALE STAMMZELLEN DURCH ELETROPORATION

Die embryonalen Stammzellen wurden nach der Trypsinbehandlung gezählt und zweimal mit PBS gewaschen. Ca. 1,5 x 107 Zellen wurden in 0,8 ml PBS suspendiert, mit 25 mg den Rekombinationskonstruktes sorgfältig gemischt und in die Elektroporationsküvette (Biorad; 4 mm Elektrodenabstand) überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 Min. bei RT inkubiert und anschließend die Zellen mit einem Impuls von 500 µF und 250 V elektroporiert. Mittels dieses Strompulses werden die ES-Zellen mit dem Rekombinationskonstrukt transformiert. Die Zellen wurden nach dem Strompuls für 5 Min. nicht bewegt, anschließend in ES-Zellmedium aufgenommen und auf den vorbereiteten Fibroblasten-Zellrasen ausplattiert.

SELEKTION EMBRYONALER STAMMZELLEN NACH ELEKTROPORATION, UM IRX2-KO-PURO POSITIVE ES-ZELLEN ZU ISOLIEREN.

Irx2-KO-puro

Das Medium elektroporierter ES-Zellen wurden 24 h nach der Elektroporation gegen ein mit *G418* und *Puromycin Dihydrochlorid* enthaltendes Selektionsmedium ausgewechselt (4 µg/ml *Puromycin Dihydrochlorid*; 2 mM *Gancyclovier*). Das

Selektionsmedium wurde täglich erneuert. Ab dem fünften Tag wurde nur noch mit *Puromycin Dihydrochlorid* selektioniert.

GEWINNUNG VON ES-ZELL-EINZELKLONEN

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

EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN

Primäre Fibroblasten

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

Embryonale Stammzellen

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

MEDIUM FÜR FIBROBLASTEN:	*MEDIUM FÜR ES-ZELLEN:*
Zellkulturmedium	ES-Zellmedium
+ 10 % DMSO	+ 10 % FCS
	+ 10 % DMSO

Auftauen von Zellen

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

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

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

Der Ablauf der FISH-Detektion erfolgte nach Heng et al, 1992, und Heng und Tsui 1993. Dabei wurde die Chromosomen auf den Objektträgern für 1h bei 55 °C gebacken. Nach RNase-Behandlung wurden die Objekte bei 70 °C für 2 Min. in 70 % Formamid/ 2xSSC denaturiert, gefolgt von einer Dehydrierung mittels einer EtOH-Reihe. Die Sonden wurden für 5 Min. in einem Hybridisierungsmix aus 50 % Formamid/10 % Dextransulfat bei 75 °C denaturiert. Die entsprechende Sonde wurde dann auf die denaturierten Chromosomen-Objektträgern aufgetragen und so ü.N. hybridisiert. Danach wurden die Objekte gewaschen und das Signal amplifiziert und detektiert. Die *FISH*-Signale und das DAPI-Bandenmuster wurde separat analysiert und fotogafiert. Das Herstellen der *FISH*-Kartierungs-Daten wurde durch Überlagerung der *FISH*-Signale und der DAPI-Chromosomen-Bandemuster erreicht (Heng and Tsui, 1993).

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

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

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

GEWINNUNG VON 8-ZELLSTADIEN (MORULAE) AUS TRÄCHTIGEN MÄUSEN

Superovulierte C57Bl/6J- oder NMRI-Weibchen, die am Tag E2,5 trächtig waren, wurden nach Betäubung mit CO_2 durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Tiere

wurden auf den Rücken gelegt, das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert und der Bauchraum geöffnet. Der Uterus wurde mit einer stumpfen Pinzette gefaßt, und mit einer spitzen Pinzette wurden Mesometrium und Fettgewebe abgestreift. Das Ovidukt wurde zwischen Uterus und Ovar abgetrennt und bis zur Durchspülung in M2 Medium bei RT inkubiert. Die 8-Zellstadien, die sich zum Zeitpunkt der Präparation im Ovidukt befanden, wurden folgendermaßen gewonnen: Unter dem Binokular wurde das Fimbrium mit einer feinen, stumpfen Pinzette über ein Glasschälchen gehalten, eine 2,5 ml Spritze mit einer 27g-Kanüle vorsichtig in das Lumen Fimbriums eingeführt, und die 8-Zellstadien unter leichtem Druck herausgespült. Anschließend wurden die 8-Zellstadien unter dem Binokular mit einer ausgezogenen Pasteurpipette (über einen Schlauch mit Mundstück) aufgesaugt und die 8-Zellstadien mehrfach in M2 Medium gespült und in M16 Medium abgelegt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter dem Binokular durchgeführt.

M2 Medium:		**M16 Medium:**	
10x Hank's Puffer	3 ml	10 x Earle's-Puffer	1ml
$NaHCO_3$ 7,5 %	141 µl	$NaHCO_3$ 7,5 %	270 µl
Hepes-Puffer 1 M	630 µl	Na-Pyruvat100 mM	33 µl
Na-Pyruvat 100 mM	99 µl	Pen/Strep10.000 U/ml	100 µl
Pen/Strep10.000 U/ml	300 µl	BSA	40 mg
NaOH 1 M	30 µl	Na-Lactat	26 mg
BSA	120 mg	ad H_2O	10 ml
Na-Lactat	78 mg	M16 Medium:	
ad H_2O	30 ml	10 x Earle's-Puffer	1ml

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

VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN FÜR MORULA-AGGREGATION

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

AGGREGATION VON ES-ZELLEN MIT 8-ZELLSSTADIEN

Bevor 8-Zellstadien mit ES-Zellen aggregiert werden konnten, mußte die *Zona pellucida* von den 8-Zellstadien entfernt werden. Dazu wurden die 8-Zellstadien nacheinander in Tyrode´s Säure gewaschen, wodurch die *Zona pellucida* sich auflöste. Anschließend wurden die 8-Zellstadien mehrfach in M16 Medium gut gewaschen und in die Vertiefungen einer Aggregations-platte in M16 Medium abgelegt. In den Vertiefungen der Aggregationsplatte wurde ein Zellhaufen aus ca. 4 - 15 ES-Zellen an das 8-Zellstadium aggregiert und beides ü.N. bei 5 % CO_2-Atmosphäre und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die aggregierten Embryonen in einem Tropfen M16 Medium gewaschen, gesammelt und in pseudoschwangere Weibchen (Fostermäuse) übertragen.

Tyrode´s Säure:	g/100 ml
NaCl	0,800
KCl	0,020
$CaCl_2.x2H_2O$	0,024
$MgCl_2x2H_2O$	0,010
Glukose	0,100
Polyvenylpyrrolidone (PVP)	0,400

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

TRANSFER AGGREGIERTER EMBRYONEN IN PSEUDOSCHWANGERE FOSTERMÄUSE

Pseudoschwangere Fostermäuse wurden durch Verpaarung mit vasektomierten Männchen erzeugt. Zur Injektionsnarkose pseudoschwangerer Fostermäuse wurden 0,7 - 0,8 ml Avertin intraperitoneal injiziert. Die Maus wurde auf den Bauch gelegt und der Rücken wurde zwischen Rippenbogen und Beckenkamm mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde mit einem sagitalen Schnitt (1 cm) neben der Wirbelsäule, unmittelbar unter dem Rippenbogen eröffnet. Der Hautschnitt wurde über den Fettkörper oberhalb des Uterus verschoben, die Bauchdecke mit einer spitzen Pinzette gefaßt und mit einem Schnitt eröffnet. Der am Ovar anliegende Fettkörper wurde aufgesucht, mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und zusammen mit Ovar, Ovidukt und Uterushorn aus der Bauchhöhle herausgehoben. Der Fettkörper wurde mit einer Arterienklammer fixiert. Der Uterus wurde mit einer feinen Pinzette kurz vor dem Übergang in das Ovidukt

fixiert und mit einer 26 g-Kanüle unterhalb der Pinzette perforiert. In diese Öffnung wurde eine Glaskapillare eingeführt, in die zuvor die aggregierten Embryonen (in ca. 10-20 µl M16-Medium) aufgenommen worden waren. Die Embryonen wurden durch leichten Druck in das Lumen des Uterus eingespült. Die Arterienklemme wurde entfernt, der Uterus mit Ovidukt, Ovar und Fettkörper zurückgelegt und der Hautschnitt mit einer Wundklammer versorgt. Die Fostermäuse wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose auf einer Wärmeplatte vor Unterkühlung geschützt.

Avertin:	
Tribromethanol	0,5 g
Tert-Amylalkohol	0,25 g
H_2O	39,5 g
bei 42 °C 4 h lösen, sterilfiltrieren	

IV.3.26 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

REPORTER PLASMIDKONSTRUKTE

Das *Irx2*-Gen wurde zum einen in einen *pcDNA1.1*-Vektor (Invitrogen) mit *CMV*-Promotor (*Irx1*-pcDNA) und zum anderen in einen *pTRACER*^{TM}-*CMV2*-Vektor (Invitrogen) mit *CMV*-Promotor und *Green-Fluorenzent-Protein (GFP)* (*Irx2*-pTRACER) kloniert. Beide Klonierungen erfolgten über eine EcoRI-Klonierung.

DNA-GEWINNUNG AUS HUMANEN FIBROBLASTEN

Tiefgefrorene humane Fibroblasten wurden mit Medium (α-MEM + 10% FCS) aufgetaut und plattiert. Alle 2 -3 Tage wurden die Zellen mit Trypsin (1x Trypsin, 3 min., 37°C) behandelt, in neuem Medium aufgenommen und gesplittet. Eine 10cm^2-Schale an humanen Fibroblasten ergab ca. 15µg DNA. Zur DNA-Gewinnung wurden die Zellen mit *Proteinase K* behandelt (ü.N. bei 56°C). Alle weiteren Schritte sind analog zur Gewinnung aus Mausbiopsien oder ES-Zellen.

CO-TRANSFEKTION MITTELS LIPOFECTAMIN (GIBCO,BRL)

Drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, so dass die Schalen 0,2 - 0,3 x 10^6 Zellen pro Platte aufwiesen. Das entsprechende *Mash1*-Promotorkonstrukt (1 µg) wurde mit *CMV-GFP* (*pTRACER*; 0,5µg) und 2 µg *Irx2*-pcDNA oder *Irx2*-

pTRACER cotransformiert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamin (Gibco/ BRL). Nach 48 h wurde die β–Galactosidase-Aktivierung des *Mash1*-Promotors mittels lacZ-Färbung ermittelt.

IV.3.27 HERSTELLUNG VON ANTISERA (IRX2-ANTIKÖRPER)

REINIGUNG VON IRX2-PROTEIN AUS E. COLI

Zur Affinitätsreinigung der synthetisierten Oligonucleotide wurden die am Aminoterminus mit einem Histidinhexamer-Tag versehenen, löslichen Fusionsproteine auf eine Nickelsäule (NiNTA, Qiagen; 5 ml Bettvolumen) gegeben. Die Säule wurde mit 10 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 10 ml Elutionspuffer durch einen pH-Sprung eluiert. Die 1 ml große Fraktionen wurden aufgefangen und mit jeweils 100 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Zum Nachweis des Fusionsproteins wurden Aliquots der Fraktionen in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Zur Quantifizierung wurde zu 5 µl Proteinlösung 1 ml verdünnte Bradford-Reagenzlösung (Biorad; 1 : 5 in H_2O) gegeben und die OD_{595} gemessen.

PHOSPHATPUFFER	*WASCHPUFFER*	*ELUTIONSPUFFER*
20 mM Na-Phospat (pH7,8)	20 mM Na-Phospat (pH6,0)	20 mM Na-Phospat (pH4,0)
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl

IMMUNISIERUNG UND BLUTABNAHME

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

REINIGUNG VON ANTISERUM

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

Die Proteinlösung wurde mehrfach gegen Kopplungspuffer dialysiert (HEPES, pH 7,5), um Tris und andere Substanzen zu entfernen, die mit ihren Aminogruppen interagieren könnten. Weiterhin wurde das Säulenmaterial mit drei Bettvolumen eiskaltem dH_2O gewaschen. Das dialysierte Protein wurde zur Kopplung zur feuchten Matrix gegeben und 4 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem die Lösung entfernt wurde, wurde die Matrix wie folgt gewaschen:

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

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

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

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

IV.3.28 WESTERN-BLOT

Die nachfolgend aufgeführte Proteinanalyse, wurde nach der Beschreibung von Towbin durchgeführt (Towbin et al., 1979).

SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Proben wurden in Laemmli-Ladepuffer gelöst, für 5 Min. auf 95 °C erhitzt und abzentrifugiert (Laemmli, 1970). Gewebeproben wurden im Ladepuffer mit Hilfe eines Branson-Cell Disruptors zerschallt, bis eine nichtvisköse Lösung entstanden war. Zur Herstellung eines kleinen Gels (Trenngel 6 x 11 x 0,1 cm) wurde die Trenngellösung angesetzt und zum Auspolymerisieren zwischen gereinigte, zusammengeklammerte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol weggewaschen, die Sammelgellösung zugegossen und der Kamm zum Formen der Taschen eingeschoben. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine vertikale Gelkammer eingespannt. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze geladen. Elektrophoretisiert wurde bei max. 150 V für 2-3 h, bis die Lauffront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Geles erreicht hat.

LAEMMLI-LADEPUFFER:
SDS, 2 %
Glycerol, 10 %
Tris-HCl, pH 6,8, 60 mM
DTT, 100 mM
Bromphenolblau 0,01 %

TRENNGEL:
H_2O, 2 ml
Acrylamidmix 1,7 ml
Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M, 1,3 ml
SDS (10 %), 50 ml
APS (10 %), 50 ml
TEMED, 2 ml

ACRYLAMIDMIX:
Acrylamid, 29,2 %
Methylenbisacrylamid 0,8 %
in H_2O

SAMMELGEL:
H_2O 2,1 ml
Acrylamidmix, 0,5 ml
Tris-HCl, pH 6,3, 1 M 0,38 ml
SDS (10 %), 30 ml
APS (10 %), 30 ml

LAEMMLI-LAUFPUFFER:
Tris-HCl, pH 8,3, 25 mM
Glycin, 250 mM
SDS, 0,1 %

ACRYLAMIDMIX:
Acrylamid, 29,2 %
Methylenbisacrylamid 0,8 %
in H_2O

Das *Irx2*-Protein wurde durch *in-vitro*-Translation mittels des Transkriptions- und Translationssystems (*TNT*, Promega) hergestellt.

ELEKTROBLOTTEN VON PROTEINGELEN

Das nachfolgend aufgeführte Elektroblotten von Proteingelen, wurde nach der Beschreibung von Khysen-Anderson durchgeführt (Khysen-Anderson, 1984).

Nach der Trennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine durch elektrophoretischen Transfer auf Kunststoffmembranen (Immobilon, Millipore) übertragen. Dazu wurde folgender Aufbau verwendet:

ELEKTROBLOT:
Elektrode (-)
Drei Lagen Filtrierpapier in Transferpuffer
Membran
Polyacrylamid-Gel
Drei Lagen Filtrierpapier in Transferpuffer
Elektrode (+)

Zum Blotten wurde das Gerät "Novablot Electrophoretic Transfer Kit" der Firma LKB verwendet. Es wurde bei 0,8 mA/cm^2 Gelfläche 1,5 h lang geblottet. Nach dem Transfer wurden die Proteine reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt, um die Position der

Größenstandardproteine auf die Membran zu übertragen und die Qualität des Transfers zu beurteilen.

TRANSFERPUFFER:
Tris Base, 48 mM
Glycin, 39 mM
SDS, 0,037 % (vol/vol)
Methanol, 20 % (vol/vol)
add H_2O

FÄRBELÖSUNG:
Ponceau-S, 0,2 %
Trichloressigsäure, 3 %
Sulfosalicylsäure, 3 %

IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN

Zum Entwickeln wurde die Membran nach dem Blotten eine Stunde unter ständiger Bewegung in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Absorption von Antikörpern an der Membran zu verhindern.

Danach wurde das in Blockierungslösung verdünnte Antiserum zugegeben. Das Ganze wurde in einem Plastikbeutel eingeschweißt und die Inkubation erfolgte auf einem Schütteltisch ü.N. bei 4 °C. Anschließend wurde der Blot viermal je 5 Min. lang bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem 1:200 in Blockierungslösung verdünnten Schwein-Anti-Kaninchenimmunglobulin-Peroxidase-Konjugat (DAKO No. P217) inkubiert. Nach erneutem Waschen (2x 5 Min., 2x 15 Min. PBS) wurde der Blot mit dem ECL-Chemiluminiszenz-Reagenz (Amersham) nach den Vorschriften des Herstellers entwickelt. Die gewaschene Membran wurde für 1 Min. in der frisch angesetzten Entwicklungslösung inkubiert, kurz mit Filtrierpapier abgetupft, in Haushaltsfolie eingeschlagen und sofort auf Kodak-*XAR* Röntgenfilmen exponiert. Die Exponierungszeit betrug in der Regel nur wenige Sekunden. Alternativ wurden Blots mit Diaminobenzidin oder Chlornaphtol als Substrat entwickelt (Harlow and Lane, 1988). Zur Größenbestimmung wurden die Rf-Werte der Markerproteine gegen den Logarithmus der bekannten Molekulargewichte aufgetragen. Die Größe des zu bestimmenden Proteins wurde duch Interpolation aus dem gemessenen Rf-Wert berechnet.

BLOCKIERUNGSLÖSUNG:
Milchpulver 5 % in PBS

IV.3.29 IMMUNHISTOCHEMIE

HERSTELLEN VON GEFRIERSCHNITTEN

Gefrierschnitte wurden auf einem Kryostaten (Leitz) angefertigt. Dazu wurde zunächst eine Schicht Einbettmittel (Tissue-Tec; Miles) auf einem auf Trockeneis liegenden Objekthalter aufgetragen und angefroren. Nach nochmaligem Auftragen von Tissue-Tec wurde der gefrorene Embryo auf der noch flüssigen Schicht in die zum Schneiden gewünschte Position gebracht. Langsam wurde schichtweise mehr Einbettmittel um den Embryo aufgetragen bis dieser vollständig umhüllt war (Embryo sollte beim Einbetten nicht auftauen).

Es wurden 5 mm dicke Schnitte angefertigt, die vom Messer mit einem mit Gelatine und Chromalaun beschichteten Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden 15 Min. bei 50 °C auf einer Wärmeplatte getrocknet und dann in einem mit Klebeband versiegelten Plastibrand-Objektträgerkasten trocken bei -20 °C aufbewahrt.

IMMUNFÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN

Die Gefrierschnitte wurden im Objektträgerkasten aufgetaut und in Färbegestelle einsortiert. Darin wurden die Schnitte mit Aceton nachfixiert (30 s, Raumtemperatur), die endogene Peroxidase inhibiert (0,5 % H_2O_2 in Methanol für 30 Min.) und mehrmals in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger einzeln herausgenommen, PBS durch Papiertücher, der Antikörper, 1:200 verdünnt in Blockierungslösung, aufgetragen und für 6 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde viermal je 5 Min. in PBS gewaschen und der Nachweisantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Peroxidasekonjugat DAKO No. P744) wie oben angegeben (1:200 verdünnt) aufgetragen. Nach 60 Min. Inkubation wurde erneut gewaschen und mit DAB-Lösung 5 Min. lang entwickelt.

BLOCKIERUNGSLÖSUNG
5 % Milchpulver in PBS

DAB-ENTWICKLUNGSLÖSUNG
0,5 mg/ml DAB (Sigma)
filtriert
0,05 % H_2O_2

Danach wurde erneut mit PBS gewaschen, mit einer Alkoholreihe dehydriert, in Eukitt eingedeckelt und im Lichtmikroskop mit Nomarski-Interferenzkontrast beobachtet.

IV.3.30 HISTOLOGISCHE METHODEN

HÄMATOXILIN-EOSIN-FÄRBUNG

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung wurde zur histologischen Untersuchung der Embryonen benutzt. Hämatoxilin bewirkt eine Blaufärbung der Zellkerne, während das Zytoplasma durch Eosin rot gefärbt wird. Die Schnitte werden wie o.a. als Paraffinschnitte hergestellt.

Ablauf:

a. Xylolersatz	3 Min.	l. dH_2O	1 Min.
b. Xylolersatz	3 Min.	m. Eosin	2 - 3 Min.
c. 100 % EtOH	2 Min.	n. dH_2O	1 Min.
d. 96 % EtOH	2 Min.	o. 50 % EtOH	2 Min.
e. 90% EtOH	2 Min.	p. 70 % EtOH	2 Min.
f. 80 % EtOH	2 Min.	q. 80 % EtOH	2 Min.
g. 70 % EtOH	2 Min.	r. 90 % EtOH	2 Min.
h. 50 % EtOH	2 Min.	s. 96 % EtOH	2 Min.
i. dH_2O	einmal kurz eintauchen	t. 100 % EtOH	2 Min.
j. Hämatoxilin (Harris)	5 - 7 Min.	u. Xylolersatz	2 Min.
k. HCl-Alkohol	3x 10 - 30 s..	v. Xylolersatz	2 Min.

Im Anschluß wurden die Schnitte mit *Eukitt*-Einbettmedium eingedeckelt und ü.N. getrocknet.

HCL-ALKOHOL

500 ml 70 % EtOH
5 ml konz. HCl

EOSIN:

0,5 g Eosin in 500ml dH_2O lösen unter Zugabe von zwei Tropfen konz. Essigsäure, filtrieren

HÄMATOXYLIN:

fertige Lösung, filtrieren

V. GLOSSAR, ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

GLOSSAR

Die Bedeutung einiger Fachwörter ist hier nochmals aufgeführt.

Aktivator: Molekül, das die Aktivität eines Gens anschaltet

Allel: Zustandsform eins Gens

Blastozyste: Embryonalstadium der Säugetiere, das der Blastula anderer Tierembryonen entspricht und in dem die Einnistung in die Uterus-schleimhaut erfolgt (Wolpert et al., 1999); die Blastozyste stellt den Tag E4.0 der Mausembryogenese dar

Blotting: Unter Blotting versteht man den Übertrag (Transfer) von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-, RNA- oder Proteingemischen auf spezielle Filter oder Membranen, die den spezifischen Nachweis einer bestimmten Nukleinsäuresequenz oder Proteinspezies erlauben

cDNA: komplementäre DNA; wird in der Gentechnik *in vitro* und mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* an isolierter, polyadenylierter, eukaryotischer mRNA, die als Matrize dient, erzeugt

detektieren: nachweisen, erkennen

downstream: wörtlich: stromabwärts; in einer Kaskade: unterhalb, als nachgeschalteter Faktor; bei einem Gen: weiter 3´ gelegen

Embryo: Frühstadium der Entwicklung mit embryonalem und extra-embryonalem Bereich

Enhancer: DNA-Sequenzen in 5´-Richtung vor eukaryotischen Promotoren, deren Funktion die Erhöhung der Transkriptionsrate ist

ES-Zellen (embryonale Stammzellen): pluripotente Stammzellen, die aus der Mausblastozyste hergestellt werden und sich *in vivo* zu allen Geweben, einschließlich der Keimbahnzellen, differenzieren

generieren: herstellen

Gen-Knock-out (KO): gezielte Deletion oder Inaktivierung (eines Gens)

Genexpression: Aktivität eines Gens

Homologe Gene: siehe orthologe Gene; In der Entwicklungsbiologie werden orthologe Gene häufig als homologe Gene bezeichnet, obwohl Ihre Homologie sich in erster Linie auf die Sequenz bezieht.

Homologe Rekombination: Rekombination zweier DNA-Moleküle an einer bestimmten Stelle, an denen sich ihre Sequenzen ähneln (Wolpert et al., 1999); Erzeugung neuer Kombinationen des genetischen Materials durch Austausch von Nukleinsäuremolekülen

Insert: Insert-DNA, Passagier-DNA, Fremd-DNA

in-situ-Hybridisierung: Technik, mit deren Hilfe man nachweisen kann, wo im Embryo bestimmte Gene exprimiert werden

Keimbahn: Zellen, die sich zu Spermien und Eizellen entwickeln

Kluster: Abfolge von Genen, die zumeist Kontrollelemente teilen

Konservierung: evolutive Erhaltung

Konstrukt: DNA-Molekül, das durch *in-vitro*-Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle entstanden ist

lacZ-Gen: *β-Galaktosidase*-kodierendes Cistron des *Lac*-Operons von *E. coli*

Mauschimären: Mäuse, die mittels ES-Zell-Aggregation oder ES-Zell-Injektion in Blastozysten hergestellt werden. Diese haben Organe und Gewebe welche ES-Zell- oder "Gastembryo"-Ursprungs sind. Weiterhin zeigt die Fellfarbe eine Mischfarbe, welche einen Hinweis auf den Grad des Chimärismus gibt

Morula: frühes Stadium des Säugerembryos ab ca. 8 Zellen (Blastomere) oder mehr. Sie zeigt die Gestalt einer Beere (Morula)

Northern-Blot: RNA-Blot, RNA-Transfer

Orthologe Gene: Gene verschiedener Spezies, die signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Nukleotidsequenz besitzen, da sie von einem gemeinsamen Ur-Gen abstammen

Paraloge Gene: Gene, die durch Duplikationen aus einanderder hervorgegangen sind im Genom eines Organismus.

Pluripotenz: Fähigkeit der Zellen, sich in die meisten Zelltypen des Organismus zu entwickeln. So entwickeln sich die Maus-ES-Zellen sich zu allen Geweben bis auf die Plazenta. Totipotente Zellen können sich dagegen in alle Zelltypen entwickeln.

Primer: jede Oligonukleotidsequenz, die nach Hybridisierung mit einer einzelsträngigen Nukleinsäure einen kurzen doppelsträngigen Bereich mit freier 3´- OH-Gruppe liefert und damit ein weiteres Auffüllen über *DNA-Polymerasen* oder *Reverse Transkriptasen* ermöglicht

Probe: Sonde (durch Denaturieren einzelsträngiger RNA oder DNA), welche zum Hybridisieren benutzt wird

Promotor: *RNA-Polymerase*-Bindungsstelle, Ort der Initiation der Transkription

Repressor: Molekül, das die Aktivität eines Gens unterdrückt

Reportergen: Im Gegensatz zu selektierbaren Markergenen, die eine Auslese rekombinanter Klone oder transgener Organismen gestatten, kann ein erfolgreicher Gentransfer auch über Reportergene anhand eines leicht erkennbaren Phänotyps erfolgen (z. B. *β-Galaktosidase*-Färbung)

Selektionsmarker: Bezeichnung für eine DNA-Sequenz, die es ermöglicht, ein Auswahlverfahren für Organismen, die einen veränderten Geno- oder Phänotyp haben, durchzuführen

Southern-Blot: DNA-Blot, DNA-Transfer

transgene Maus: Maus mit verändertem Genom durch z. B. stabile Integration eines neuen Gens oder die Inaktivierung eines bestimmten Gens

Translokation: Übertragung von chromosomalen Bereichen auf andere Chromosomen

upstream: wörtlich: stromaufwärts; in einer Kaskade: oberhalb, als vorgeschalteter Faktor; bei einem Gen: weiter 5´ gelegen

Western-Blot: Protein-Blot, Protein-Transfer

whole-mount-Hybridisierung: *in-situ*-Hybridisierung auf ganzen Embryonen

whole-mount-in-situ-Hybridisierung: Gesamtkörper-*in-situ*-Hybridisierung

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Neben den konventionellen physikalischen Einheiten, chemischen Symbolen und dem Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren finden folgende Abkürzungen und Symbole Verwendung:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase)
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
d	Tag
ddH_2O	bidestilliertes Wasser (Millipore)
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	ötales Kälber Serum (fetal calf serum)
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio−β-D-Galaktosid
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukaemia Inhibiting Faktor
Lsg.	Lösung
µ	micro
m	milli
M	molar
Min.	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Neo	Neomycin
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
p.c.	post coitum
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu	infektiöse Partikel (plaque forming units)
PIPES	Pipazarin-N-N´-bis(2-Ethansulfonsäure)
PVP	Polyvenyl-Pyrrolidon
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RSA (BSA)	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
ST I	Standard-I Nährmedium/Agar
ss	einzelsträngige
SSC	NaCl/NaCitrat (standard saline citrate solution)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung der Organismen wird durch die koordinierte Funktion von Entwicklungskontrollgenen gesteuert, die ihrerseits den Aktivitätsstatus anderer Gene regulieren.

Bei der Suche nach neuen, entwicklungsrelevanten Genen in der Maus wurde das *Irx2*-Gen identifiziert und als Mitglied der *Iroquois*-Genfamilie in die Gruppe der Transkriptionsfaktoren eingeordnet. Das *Irx2*-Gen enthält hochkonservierte Sequenzmotive und stammt wahrscheinlich von einem Ur-Gen ab, das bereits in der gemeinsamen Entwicklungslinie von Pflanzen, Pilzen und Tieren existierte.

Die Herstellung der Verlustmutante ist die Grundlage für die funktionelle Analyse des *Irx2*-Gens. Mittels gezielter homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen wurden die funktionellen Bereiche des *Irx2*-Gens deletiert.

Drei Aspekte der Funktionsanalyse sind bemerkenswert. Die *Irx2*-Mausmutante zeigt keine offensichtlichen morphologischen Defekte, dennoch versterben die Föten bei der Geburt. Dies läßt auf das Versagen lebenswichtiger Organe schließen. Desweiteren weisen die Ergebnisse der Funktionsanalyse auf eine ungleiche Ausprägung des Phänotyps, abhängig vom Geschlecht der Tiere und der Abstammung des mutierten Allels, hin. Die Untersuchung der genomischen Prägung des *Irx2*-Lokus läßt einen methylierungs-unabhängigen Mechanismus der epigenetischen Kontrolle postulieren.

Die chromosomale Lokalisation des *Irx2*-Gens in der Maus und im Menschen zeichnet es als ein relevantes Kandidatengen des Cri-du-Chat-Syndroms aus. Die vorhandene Genaktivität von *Irx2* in den murinen Arytenoid-Knorpeln des Kehlkopfes weist auf eine mögliche Ursache der veränderten Stimmbildung der humanen Katzenschrei-Patienten hin. Die Entdeckung von *Irx2* erlaubt die genetische Trennung zwischen den Symptomen der mentalen Fehlfunktion und der gestörten Stimmbildung.

Die Evo-Devo-Studien aus *Drosophila* und *Xenopus* verweisen auf eine Interaktion der *Iroquois*-Gene mit den Mitgliedern des *achaete-scute*-Komplexes. Eine direkte Regulation konnte für die orthologen Gene in der Maus nicht bestätigt werden. Die Zunahme der murinen Mitglieder innerhalb der Genfamilie gegenüber dem *Iroquois*-Komplex der Fliege bringt eine Aufteilung konservierter Funktionen mit, so dass regulative Interaktionen zwischen den *Iroquois*-Genen und den Orthologen des *achaete-scute*-Komplexes dennoch existieren können.

Die Analyse der *Mash1*-Mutante zeigt die essentielle Funktion des Gens in der Differenzierung der Calcitonin-produzierenden C-Zellen in der Schilddrüse der Maus. Calcitonin reguliert die Kalziumkonzentration des Körpers, die schon bei millimolaren Änderungen schwere physiologische Schäden hervorruft.

Die funktionellen Analysen des *Irx2*- und des *Mash1*-Gens lassen für beide Gene lebenswichtige Einzelfunktionen in der Embryonalentwicklung erkennen. Die Funktionsanalysen in dem Modellorganismus Maus sind daher wichtige Grundlagen für die Erforschung humaner Krankheiten.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). Current protocolls in molecular biology. I + II (New York: John Wiley & Sons).

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1995). Short protocols in molecular biology, 3rd Edition (New York: John Wiley & Sons).

Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E., and Cepko, C. L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. Science *283*, 1161-4.

Becker, M. B. (1997). Struktur- und Funktionsanalyse eines *Iroquois*-verwandten Gens der Maus -*Irx3*-. In Dept. Moleculare Cell Biology, MPIBPC (Göttingen: University of Göttingen).

Becker, M. B., Zülch, A., and Gruss, P. (2001). *Irx2* and *Irx1* expression in early lung development. Mech. Dev. *106,* 155-158.

Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B., and Papalopulu, N. (1998). Xiro3 encodes a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois genes and functions in neural specification. EMBO J. *17*, 191-203.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic. Acids Res. *7*, 1512-1523.

Borges, M., Linnoila, R., van de Velde, H., Chen, H., Nelkin, B., Mabry, M., Baylin, S., and Ball, D. (1997). An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. Nature *386*, 852-855.

Bosse, A., Stoykova, A., Nieselt-Struwe, K., Chowdury, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and P, G. (2000). Identification of a novel mouse *Iroquois* homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localization of all members of the mouse *Iroquois* gene family. Dev. Dyn. *218*, 160-174.

Bosse, A., Zülch, A., Becker, M. B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate *iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. Mech. Dev. *69*, 169-181.

Brock, H. W., and van Lohuizen, M. (2001). The polycomb group - no longer an exclusive club? Current Opinion in Genetics & Development *11*, 175 - 181.

Bronson, S., and Smithies, O. (1994). Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. J Biol Chem *269*, 27155-8.

Bruneau, B., Bao, Z., Tanaka, M., Schott, J., Izumo, S., Cepko, C., Seidman, J., and Seidman, C. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. Dev. Biol. *217*, 266-277.

Bürglin, T. R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBX, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. Nucleic Acids Res. *25*, 4173-4180.

Calvin, N. M., and Hanawalt, P. C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. J. Bacteriol. *170*, 2796-2801.

Capecchi, M. R. (1989). Altering the mouse genome by homologous recombination. Science *244*, 1288-1292.

Cavalli, A. (1998). Structural requirements of DNA-transcription. DNA Cell Biol. *20*, 381-391.

Cavodeassi, F., Modolell, J., and Gomex-Skarmeta, J. L. (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. Development *128*, 2847 - 2855.

Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. Biotech. *15*, 532-536.

Chomczynski, P., and Quasba, P. K. (1984). Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm. *122*, 340-344.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. *162*, 156-159.

Chou, and Fasman (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. in Enzymol. *47*, 45-178.

Church, D. M., Bengtsson, U., Nielson, K. V., Wasmuth, J. J., and Niebuhr, E. (1995). Molecular definition of deletions of different segments of distal 5p that result in distinct phenotypic features. Am. J. of Human Genetics *56*, 1162 - 1172.

Cohen, D. R., Cheng, C. W., Cheng, S. H., and Hui, C. C. (2000). Expression of two novel mouse *Iroquois* homeobox genes during neurogenesis. Mech.Dev. *91*, 317-321.

Dambly-Chaudière, C., and Leynes, L. (1992). The determination of sense organs in *Drosophila* : a search for interactimg genes. Int. J. Dev. Biol. *36*, 85-91.

Doetschman, T., Maeda, N., and Smithies, O. (1988). Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 8583-7.

Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic. Acids Res. *16*, 6127-6145.

Fahrner, K., Hogan, B. L. M., Flavell, R. A., and 1265-1271., T. o. H.-a. Q. g. i. e. a. a. m. (1987). Transcription of H-2 and Qa genes in embryonic and adult mice. EMBO J. *6*, 1265-1271.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. *132*, 6-13.

FlyBase (2002). Polycomb. http://flybase.bio.indiana.edu.

Fontaine, J. (1979). Multistep migration of calcitonin cell precursors during ontogeny of the mouse pharynx. Gen. Comp. Endocrinol. *37*, 81 - 92.

Funayama, N., Sato, Y., Matsumoto, K., Ogura, T., and Takahashi, Y. (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. Development *126*, 4129-38.

Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. *120*, 97-120.

Gehring, W. J. (1994). Guidesbook to the Homeobox Genes., D. Duboule, ed. (Oxford: Oxford University Press).

Gehring, W. J. (1985). Homeotic genes, the homeo box, and the genetic control of development. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *50*, 243-251.

Gersh, M., Grady, D., Rojas, K., Lovett, M., Moyzis, R., and Overhauser, J. (1997). Development of diagnostic tools for the analysis of 5p deletions using interphase FISH. Cytogenetics & Cell Genetics *77*, 246 - 251.

Gómez-Skarmeta, J. L., del lel Calle-Mustiemces, E., and Modolell, J. (2001). The Wnt-activated Xiro1 gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates Bmp4. Development *128*, 551-560.

Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., del lel Calle-Mustiemces, E., Ferrés-Marcó, M. D., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolitan*, two members of the novel *Iroquois* complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. Cell *85*, 95-105.

Gómez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., del lel Calle-Mustiemces, E., Modolell, J., and Mayor, R. (1998). Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complexgenes, controls development at the neural plate. EMBO J. *17*, 181-190.

Gómez-Skarmeta, J. L., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolitan* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. Genes. Dev. *10*, 2935-2945.

Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culí, J., Ferrés-Marcó, M. D., Belmonte, D., and Modolell, J. (1995). Cis-regulatorion of *achaete* and *scute* : Shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. Genes Dev. *9*, 1869-1882.

Goodart, S. A., Butler, M. G., and Overhauser, J. (1996). Familial double pericentric inversion of chromosome 5 with some features of cri-du-chat syndrome. Human Genetics *97*, 802 - 807.

Goodart, S. A., Simmons, A. D., Grady, D., Rojas, K., Moyzis, R. K., Lovett, M., and Overhauser, J. (1994). A yeast artificial chromosome contig of the critical region for cri-du-chat syndrome. Genomics *24*, 63 - 68.

Goriely, A., Diez del Corral, R., and Storey, K. G. (1999). *c-Irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. Mech. Dev. *87*, 203-6.

Greally, A., and John, M. (2000). The undelible mark of the genome. J. of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry *April*.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer res. *54*, 4855 - 4878.

Grindley, J. C., Bellusci, S., Perkins, D., and Hogan, B. L. (1997). Evidence for the envolvement of the *Gli* gene family in embryonic mouse lung development. Dev Biol *188*, 337-348.

Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, D. J., Anderson, D. J., and Joyner, A. L. (1993). *Mammalian achaete-scute homolog 1* is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. Cell *75*, 463-476.

Hanahan, D. H. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*., D. M. Glover, ed. (Oxford: IRL Publisher).

Harlow, E., and Lane, D. (1988). Antibodies. A labratory manual., C. S. Harbour, ed. (New York: Cold Spring Harbour Labratory).

Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Cateret, C., and Simpson, P. (1996). Genes of the *Enhancer of Split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. Development *122*, 161-171.

Helling, R. B., Goodman, H., and Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. of Virology *14*, 1235-1244.

Heng, H. H. Q., Squire, J., and Tsui, l.-C. (1992). High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 9509-9513.

Heng, H. H. Q., and Tsui, l.-C. (1993). Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. Chromosoma *102*, 325-332.

Hirschberg, J. (1999). Dysphonia in infants. Int. J. of Pediatric Otorhinolaryngology *49*, 293 - 296.

Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. (1994). Manipulating the Mouse Embryo. A Labratory Manual., 2nd Edition (New York: Cold Spring Harbour Labratory Press).

Hogan, B. L. (1996). *Bone morphogenetic proteins*: Multifunctional regulators of vertebrate development. Genes. Dev. *10*, 1580-1594.

Hogan, B. L., and Yingling, J. M. (1998). Epithelial/mesenchymal interactions and branching morphogenesis of the lung. Curr.Opin. Gene Dev. *8*, 481-486.

Ivison, B. (1999). Cri du Chat support group of Australia Inc. Internet:http:// home.vicnet.net.au/-criduch/what.htm#Message.

Iwasa, Y. (1998). The conflict theory of genomic imprinting: How much can be explained? Curr.Topics in Developmental Biology *40*, 255 - 293.

Johnson, P. H., and Grossman, L. I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. Biochemistry *16*, 4217-4225.

Kaufmann, M. H., and Bard, J. B. L. (1999). The anatomical basis of mouse development. (London: Academic Press).

Khysen-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods *10*, 203-209.

Killian, J. K., and al., e. (2001). Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the Quaternary. Hum Mol Genetics *10*, 1721-1728.

Killian, J. K., Buckley, T. R., Stewart, N., Munday, B. L., and Jirtle, R. L. (2001). Marsupials end eutherians reunited: genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution. Mammalian Genome *12*, 513-517.

Kirby, K. S. (1956). A new method for the isolation of desoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. Biochem. J. *66*, 495-504.

Laemmli, E. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head if *bacteriophage T4*. Nature *227*, 680-685.

Lai, E. C., Burks, C., and Posakony, J. W. (1998). The K box, a conserved 3´UTR sequence motif, negatively regulates accumulation of enhancer of split complex transcripts. Development-Suppl. *125*, 4077 - 4088.

Larsen, W. J. (1993). Human Embryology, Volume 1st. (New York: Churchill Livingstone).

Lazzaro, D., Price, M., De felice, M., and Di Lauro, R. (1991). The transcriptionfactor Ttf-1 is expressed at the onset of Thyroid and lung morphogenesis an in restricted regions of the foetal brain. Development *113*, 1093 - 1104.

Le Lievre, C. S., and Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivativesof the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. J. Embryol. Exp. morph. *34*, 125 - 154.

Lewis, M. T., Ross, S., Strickland, P. A., Snyder, C. J., and Daniel, C. W. (1999). Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. Cell & Tissue Research *296*, 549-54.

Leyns, L., Gomez-Skarmeta, J., and Dambly-Chaudiere, C. (1996). *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of Drosophila. Mech. Dev. *59*, 63-72.

Lo, L. C., and Anderson, D. J. (1995). Postmigratory neural rest cells expressiong c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. Neuron *15*, 527 - 539.

Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T., and Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially-restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. Genes Dev *5*, 1524 - 1537.

Mainardi, P. C., Perfumo, C., Cali, A., Coucourde, G., Pastore, G., Cavani, S., Zara, F., Overhauser, J., Pierluigi, M., and Bricarelli, F. D. (2001). Clinical and molecular characterization of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. J. of Medical Genetics *38*, 151 - 158.

Manning, J. E., Hershey, N. D., Broker, T. R., Pellegrini, M., Mitchell, H. K., and Davidson, N. (1975). A new method of in situ hybridization. Chromosoma *53*, 107-117.

Mansouri, A. (2001). Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice., Volume 175, P. M. Starkey and R. Elaswarapu, eds. (Totowa, NY: Humana Press Inc.).

Mansouri, A. (2000). Mouse Knockouts, 2nd Edition: Macmillian Refernce Ltd.).

Mansouri, A., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. Nature genetics *19*, 87 - 90.

Marmur, J. (1960). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. *3*, 208-218.

Marshall, L. G. (1979). Evolution of metatherian end eutherian (mammalian) characters: a review based on cladistic methology. Zool J Linnean Soc *66*, 369-410.

McDonell, M. W., Simon, M. N., and Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. *110*, 119-146.

McDougall, J. K., Dunn, A. R., and Jones, K. W. (1972). In situ hybridization of adenovirus RNA and DNA. Nature *236*, 346-348.

McGinnis, W. (1985). Homeo box sequences of the Antennapedia class are conserved only in higher animal genomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *50*, 263-270.

McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. Cell *68*, 283-302.

McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A., and Gehring, W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila antennapedia* and *bithorax* complexes. Nature *308*, 428-433.

McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J., and Simon, M. A. (1997). *mirror* encodes a novel *PBX*-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. Genes Dev. *11*, 1073-1082.

Medina, M., Marinescu, R. C., Overhauser, J., and Kosik, K. S. (2000). Hemizygosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. Genomics *63*, 157 - 164.

Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., and Cheng, S. H. (1997). Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in the skeletal patterning and development. Development *124*, 113-123.

Moore, T., and Haig, D. (1991). Genomic imprinting in mammalian develoment: a parental tug-of-war. Trends Genet *7*, 45 - 49.

Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M., and C.C., H. (1998). Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of the lung, trachea and oesophagus. [see comments]. Nat. Genet. *20*, 54-57.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Nature *292*, 635-638.

Netter, S., Fauvarque, M. O., Diez del Corral, R., Dura, J. M., and Coen, D. (1998). white+ transgene insertions presenting a dorsal/ventral pattern define a single cluster of homeobox genes that is silenced by the polycomb group proteins in *Drosophila melanogaster*. Genetics *149*, 257 - 275.

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.

Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J., and Paro, R. (1998). The binding of trithorax and polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. Embo J. *17*, 5141 - 5150.

Overhauser, J., Beaudet, A. L., and Wasmuth, J. J. (1986). A fine structure physical map of the short arm of chromosome 5. Am. J. of Human Genetics *39*, 562 - 572.

Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K. und Balling, R. (1998). Pax9-deficient mice lach pharyngeal pourch derivatives and teeth and exhibit cranialfacial and limb abnormalities. Genes Dev *12*, 2735 - 2747.

Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., and Rüther, U. (2000). Organization of mouse *Iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. Genome Res. *10*.

Posakony, J. W. (1994). Nature versus nature: Asymmetric cell divisions in Drosophila bristle development. Cell *76*.

Reik, W., and Walter, J. (2001). Genommic imprinting: parental influence on the genome. Nature reviews *2*, 21 - 32.

Robertson, E. J. (1987). Embryo-derived stem cell lines, in *Tertocarcinomas* and *Embryonic Stem Cells*., E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL).

Robertson, K. D. (2000). DNA methylation in health and disease. Nature *1*, 11-19.

Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified b-globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature *324*, 163-166.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science *239*, 487-491.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science *230*, 1350-1354.

Sambroock, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Edition, C. S. H. Laboratory, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sang, Q., Ciampoli, D., Greferath, U., Sommer, L., and Young, H. M. (1999). Innervation of the esophagus in mice that lack Mash1. J. of Comp. Neurology *408*, 1 - 10.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *74*, 5463-5467.

Sasaki, H., Allen, N. D., and Surani, M. A. (1993). DNA methylation and genomic imprinting in mammals. In: "DNA methylation: Molecular biology and biological significance." Birkhäuser, Basel, 469 - 486.

Simmons, A. D., Overhauser, J., and Lovett, M. (1997). Isolation of cDNAs from the cri-du-chat critical region by direct screening of a chromosome 5-specific cDNA library. PCR Methods & Applications *7*, 118 - 127.

Simpson, P. (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. Curr. Opin. Genet. Dev. *7*.

Skrabanek, L., and Wolfe, K. H. (1998). Eukaryote genome duplivation - where´s the evidence? Curr. Opin. Genet. Dev. *8*, 694 - 700.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for the differentiation of insuline-producing beta-cells in mammalian pancreas. Nature *386*, 399-402.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. *98*, 503-517.

Spooner, B. S., Hartman, P., and Paulsen, A. (1994). Gravity in mammalian organ development. J Exp Zool *269*, 212-222.

Sreekantaiah, C., Kronn, D., Marinescu, R. C., Goldin, B., and Overhauser, J. (1999). Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a patient with a typical catlike cry and no other findings of the cri-du-chat syndrome. Am. J. Med. Genet. *86*, 264 - 268.

St. Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., and Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. Nature *387*, 406-409.

Tabor, S., and Richardson, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *84*, 4767-4771.

Tam, P. P. L., and Behringer, R. R. (1997). Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. Mech. Dev. *68*, 3-25.

Tan, J. T., Korzh, V., and Gong, Z. (1999). Expression of a zebrafish iroquois homeobox gene, Ziro3, in the midline axial structures and central nervous system. Mech. Dev. *87*, 165-8.

Tanaka, M., Puchyr, M., Ggertsenstein, M., Harpal, K., Jaenisch, R., Rossant, J., and Nagy, A. (1999). Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation. Mech.Dev. *87*, 129 - 142.

Tarazami, S. T., Kringstein, A. M., Conte, R. a., and Verma, R. S. (1998). Comparative mapping of the cri du chat and DiGeorge syndrome regions in the great apes. Genes Genet Syst *73*, 135 - 136.

Tazi, J., and Bird, A. (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. Cell *60*, 909 - 920.

Ten Have-Opbroek, A. (1991). Lung development in the mouse embryo. Experimental Lung Research *17*, 111-130.

Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell *51*, 503-512.

Thorne, H. V. (1966). Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. J. Mol. Biol. *24*, 203-211.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76*, 4350-4353.

Treisman, J., Gonczy, P., Vashishtha, M., Harris, E., and Desplan, C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. Cell *59*, 553-562.

Trepel, M. (1995). Neuroanatomie, Struktur und Funktion. Urban & Schwarzenberg Verlag.

Verma-Kurvari, S., Savage, T., Smith, D., and Johnson, J. E. (1998). Multiple elements regulate *Mash1* expression in the developing CNS. Dev. Biol. *197*, 106-116.

Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J. C., Nagy, A., and Magnuson, T. (2001). Imprinted X inactivation maintained by a mouse *polycomb* group gene. Nature Genetics *28*, 371-375.

Weisblat, D. (1994). Evolution of developmental mechanisms. In Curr. Topics in Developmental Biology, R. A. Pedersen, ed., pp. 103-134.

Wilkinson, D. G. (1992). in situ hybridisation; a practical approach. (London: Oxford University Press).

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., and Meyerowitz, E. (1999). Entwicklungsbiologie (Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

Zülch, A. (2001). Funktionsanalyse des *Irx1*-Gens der Maus. In MPIBPC, Dept. Mol. Cell Biology (Göttingen: Universität Göttingen).

Zülch, A. (1997). Struktur- und Funktionsanalyse eines *Iroquois*-verwandten Gens der Maus -*Irx2*-. In Dept. Moleculare Cell Biology, MPIBPC (Göttingen: University of Göttingen).

VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre eigene Motivation und Begeisterungsfähigkeit mir den Laboralltag spannend und persönlich angenehm gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Gruss für die Möglichkeit an diesem hochinteressanten Thema arbeiten zu können. Sein stetes Interesse an den Ergebnissen und dem Fortgang meines Projektes, der Aufdeckung der Funktionen der Iroquois-Genfamilie hat mich motiviert und begeistert.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Ehlers für die hilfreichen und freundlichen Gespräche und für die Übernahme der Begutachtung. Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Entgegenkommen.

Meinen großen Dank möchte ich Armin Zülch aussprechen. Unsere fachlichen Diskussionen waren hilfreich und hoch produktiv.

Ich habe mich sehr gefreut, dass Frau Dr. Anastassia Stoykova mir mit ihrem Fachwissen immer zur Seite stand.

Ich richte meinen Dank an Dieter Treichel, Joachim Berger, Nora Speer, Wencke Armsen, Silke Eckaert und Barbara Meyer für ihre tolle Unterstützung in allen fachlichen Fragen.

Auf keinen Fall vergessen möchte ich den Spaß, den ich mit Marjo Salminen, Francesco Cecconi und Viktor Tarabykin beim Skifahren und den abendlichen wisenschaftlichen Diskussionen in Klosters und Val Thorens hatte.

In sehr guter Erinnerung habe ich auch die Hilfe von Luc St.Onge unteranderem im Moment der Entscheidung über die weitere Analyse meines ersten Knock-outs.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor Maria Belaoussoff, Nicole Andrejewski, Guy Goudrou, Sharif Masour, Jens Krull, Sabine

Geisendorf, Alexandra Driehorst und Heike Fett bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft mit zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch der " *Iroquois*-Gruppe" mit Juan Modolell, José Luis Gómez-Skarmeta, Roberto Mayor, Ruth Diaz del Coral und Peter Gruss für die vielen Ideen und Diskussionen, die in der *Iroquois*-Gruppe entstanden sind.

Marianne Schuster möchte ich für die vielen großen und kleinen Hilfen danken, die sie trotz ihrer vielen eigenen Arbeit übernommen hat und mir so das Leben sehr erleicherte.

Hilfe in letzter Stunde bei Rechtschreibkorrekturen und dem Drucken der Arbeit kam von Armin Zülch, Anne Becker, Nicole Andrejewski und Joachim Berger. Vielen Dank!

Mein Dank gilt meinen geliebten Eltern und meinen Schwestern, die mich immer in jeder erdenklichen Weise unterstützt und gefördert haben.

Das sich meine Erinnerungen an die Doktorarbeit nicht ausschließlich auf fachliche Fragen beschränken, habe ich Armin Zülch zu verdanken. Wir haben zusammen an der Entschlüsselung der *Iroquois*-Funktionen gearbeitet und dabei wunderschöne Momente erlebt. Danke !

IX. PUBLIKATIONEN

Bosse, A., Zülch, A., **Becker, M. B.**, Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate *iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. Mech. Dev. *69*, 169-181.

Becker, M. B., and Gruss, P. (2000). Functional analysis of two gene trap lines 5A-89 and 5A-97. AMGEN report, 216-224.

Treichel, D., **Becker, M. B.**, and Gruss, P. (2001). The novel transcription factor gene *Sp5* exhibits a dynamic and highly restricted expression pattern during mouse embryogenesis, Mech. Dev. 103, 150-155

Becker, M. B., Zülch, A., and Gruss, P. (2001). *Irx2* and *Irx1* expression in early lung development. Mech. Dev. 106, 155-158

Zülch, A., **Becker, M. B.**, and Gruss, P. (2001). Expression pattern of *Irx1* and *Irx2* during mouse digit development. Mech. Dev. 106, 159-162

Becker, M. B., Zülch, A., Guillemot, F., and Gruss, P. (2002). The proneural gene *Mash1* is essential for *C-cell* differentiation. *in Vorbereitung*.

Zülch, A., **Becker, M.-B.**, and Gruss, P. (2002). *Irx1,* a prepattern gene essential during murine gastrulation. *in Vorbereitung*.

Becker, M. B., Zülch, A., and Gruss, P. (2002). Irx2 ko . Functional analyis of the *Irx2* gene in mouse. *in Vorbereitung*

deutschsprachige Arbeiten:

Becker, M. B. (1997). Struktur- und Funktionsanalyse eines *Iroquois*-verwandten Gens der Maus -*Irx3*. Diplomarbeit in der Abt. Molekulare Zellbiologie am MPIBPC (Göttingen: Universität zu Göttingen)

Becker, M.-B., Zülch, A. und Gruss, P. (2001). Von der undifferenzierten Zelle zum komplexen Organismus. Biologie in unserer Zeit *2*, 88-97.

Becker, M. B., Zülch, A. und Gruss, P. (2002) Ontogenie: Wie wir werden, was wir sind. Brockhaus, akzeptiert, im Druck.

X. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:	***May-Britt Becker*** Am Weendespring 24A 37077 Göttingen *15.09.1971 in Köln ledig, deutsche Staatsbürgerin
1982 - 1991	Besuch des Gymnasiums "An der Stenner" in Iserlohn Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1991	3-monatiger Sprachaufenthalt in Nordamerika
1991 - 1997	Studium der Biologie an der Universität Göttingen
1993	Diplomvorprüfung: Molekulare Genetik, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie; Note: "sehr gut"
1993 - 1996	Hauptstudium mit Schwerpunkt in Molekularer Genetik
1996	Mündliche Diplomhauptprüfung im Hauptfach Molekulare Genetik und den Nebenfächern Zoologie und Organische Chemie
1996 -1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Peter Gruss. Thema: "Struktur- und Funktionsanalyse eines *Iroquois*-verwandten Gens der Maus - *Irx3* "
1997	Verleihung des Hochschulgrades Diplom-Biologin an der Universität Göttingen; Note: "sehr gut"
1998 - 2002	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Peter Gruss. Thema: "Funktionsanalyse der Entwicklungskontrollgene *Irx2* und *Mash1* in der Maus"