

# **Funktionelle Analyse des murinen Homeobox Transkriptionsfaktors *Noto***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

**Dipl.-Biol. Anja Beckers**

geboren am 20.08.1977, in Aachen

2007

Referent: Prof. Dr. Achim Gossler

Korreferent: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Tag der Promotion: 22. November 2007

# Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Achim Gossler für seine engagierte Betreuung bedanken, die wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne seine Betreuung, zahlreiche Diskussionen, Ratschläge und Anregungen, die dieses interessante Projekt betrafen, sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die in seinem Institut herrschen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.

Allen ehemaligen und momentanen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gossler sowie allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Molekularbiologie danke ich für die überwiegend angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für sämtliche Hilfsbereitschaft. Im Einzelnen danke ich ganz besonders Frau Dr. Karin Schuster-Gossler für ihren Sachverstand und ihre extrem zeitaufwendige Mithilfe bei der Herstellung des Knockouts. Für die Zusammenarbeit in den ersten 3 Jahren meiner Doktorarbeit und bei der ersten Veröffentlichung danke ich zusätzlich noch Hanaa Ben Abdelkhalek. Des Weiteren bin ich Leonie Alten von ganzem Herzen dankbar, dass ich mit ihr in den letzten 2 Jahren in dem „*Noto*-Projekt“ so toll zusammenarbeiten konnte.

Viele Kollegen und vor allem auch ehemalige Kollegen aus dem Institut für Molekularbiologie haben mir nicht nur durch Diskussionen, Tipps und Tricks sondern auch durch gemeinsame Aktivitäten die Arbeit erleichtert.

Juliane Feller sowie Leonie Alten danke ich zusätzlich für ihr detailliertes Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer und auch größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, meinen Schwestern und meinen Freunden die mich immer super unterstützt haben. Ich bin auch sehr froh, dass meine Mutter mir in der schwersten Zeit dieser Arbeit, der experimentellen Phase, trotz ihrer schweren Krankheit immer mit einem offenen Ohr zur Seite stand. Durch sie hab ich auch nie vergessen, dass es neben der mir sehr wichtigen Arbeit auch noch andere vergleichbar wichtige Dinge im Leben gibt ☺!  
Danke!!!

Meiner Mutter

## Abstract

The homeobox transcription factor *Noto* encodes the murine member of the vertebrate *Not* gene family, whose function was so far unknown. The aim of this PhD thesis was to prove that *Noto* is the gene affected in the spontaneous truncate (*tc*) mutation, and to investigate the function of *Noto* during embryonic development with the help of a null-allele. Therefore the *gfp* gene was introduced into the locus by homologous recombination in mouse embryonic stem cells to inactivate *Noto*, and a mouse line carrying this allele was established. Complementation test with the generated null-allele and *tc* proved that *tc* represents a hypomorphic allele of *Noto*. Notochord and skeletal defects both in heteroallelic as well as in homozygous null-mice were virtually identical to those in homozygous *tc* mutants. However, *Noto* null mutants in contrast to *tc* mutants showed a very high postnatal lethality rate. It was shown that this is caused by laterality defects and associated malformations of the heart demonstrating that *Noto* has an essential role in the establishment of left-right asymmetry: *Noto* regulates 1) the morphogenesis of the primitive node also known as posterior notochord (PNC), representing the “organ of asymmetry” in mice, and 2) is indispensable for the formation of functional cilia. The vast majority of *Noto* mutant embryos exhibited abnormal node morphology with a changed distribution of the so-called pit- and crown cells. Cilia in this region were reduced in length and mostly immotile what could be traced back to a massive disruption of the normal axonemal structure. Additionally, some basal bodies were located abnormally deep in the cytoplasm. The transcription factors *Foxj1* and *Rfx3*, that regulate different aspects of cilia formation and anchoring, and additional genes, which products are essential for functional cilia, were significantly down regulated. Collectively the results of this thesis show that *Noto* is essential for the development, of the notochord at different stages of development and during early development acts upstream of *Foxj1* and *Rfx3* in the genetic hierarchy that regulates the establishment of a correct left-right asymmetry in the PNC.

# Zusammenfassung

Der Homeobox Transkriptionsfaktor *Noto* kodiert für den murinen Vertreter der *Noto*-Genfamilie der Vertebraten, dessen Funktion bislang unbekannt war. Diese Promotionsarbeit hatte das Ziel zu beweisen, dass es sich bei *Noto* um das Gen handelt, das von der spontan entstandenen truncate (*tc*) Mutation betroffen ist, und mit Hilfe eines Null-Allels die Funktion von *Noto* während der Embryonalentwicklung zu untersuchen. Dazu wurde *Noto* im Rahmen dieser Arbeit mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus durch Einführung des Gfp Gens inaktiviert, und eine Mauslinie mit diesem Allel hergestellt. Durch Komplementationstest des hergestellten Nullallels mit *tc* wurde nachgewiesen, dass *tc* ein hypomorphes Allel von *Noto* darstellt. Dabei zeigte sich, dass sich Notochord- und Skelettdefekte sowohl in heteroallelischen als auch in homozygoten Null-Mutanten nicht wesentlich von homozygoten *tc* Mutanten unterscheiden, *Noto* Null-Mutanten im Gegensatz zu *tc* jedoch eine sehr hohe postnatale Letalitätsrate aufwiesen. Es wurde nachgewiesen, dass diese auf Lateralitätsdefekten und damit verbundenen Fehlbildungen des Herzens beruht, und eine essentielle Rolle von *Noto* bei der Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie aufgezeigt: *Noto* steuert 1.) die Morphogenese des Primitivknotens, der auch als posteriores Notochord (PNC) bezeichnet wird, und in der Maus den Ort für die Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie der inneren Organe darstellt, und ist 2.) für die Bildung funktioneller Zilien unerlässlich. *Noto* mutante Embryonen weisen größtenteils eine abnormale Knotenmorphologie auf, bei der die Verteilung der sog. Gruben- und Kronenzellen verändert ist. Zilien in dieser Region sind in ihrer Länge reduziert und größtenteils unbeweglich, was auf massive Störungen der normalen axonemalen Struktur zurückgeführt wurde. Zusätzlich waren auch einige Basalkörperchen abnormal tief im Zytoplasma lokalisiert. Die Transkriptionsfaktoren *Foxj1* und *Rfx3*, die verschiedene Aspekte der Zilienbildung und Verankerung regulieren, sowie weitere Gene deren Produkte für funktionelle Zilien essentiell sind waren deutlich herunterreguliert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit dass *Noto* essentiell für die Entwicklung des Notochords in verschiedenen Abschnitten der Entwicklung ist, und während der frühen Entwicklung in der genetischen Kaskade, die die Etablierung einer korrekten Links-Rechts Asymmetrie im PNC reguliert, oberhalb von *Foxj1* und *Rfx3* wirkt.

Key words: notochord, left-right asymmetry, ciliogenesis

Schlagwörter: Notochord, Links-Rechts Asymmetrie, Ziliogenese

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Präimplantationsentwicklung	2
1.2 Die Postimplantationsentwicklung	4
1.3 Der Primitivknoten und das daraus hervorgehende Notochord	7
1.4 Die truncate Mutante (tc)	12
1.5 Die Homeoboxgene	13
1.6 Die Links-Rechts Asymmetrie der Wirbeltiere	14
1.7 Die Entstehung von Lateralität während der Embryogenese	16
1.8 Der Notch-Signalübertragungsweg	20
1.9 Der Transkriptionsfaktor <i>Foxj1</i>	22
1.10 Ezrin, ein Protein der ERM-Familie	23
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>25</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.2 Computerprogramme	26
2.1.3 Datenbanken	26
2.1.4 Klonierungsvektoren und Wirtsbakterien	27
2.1.5 Bestandteile des Targeting-Konstrukts und verwendete Plasmide	27
2.1.6 Bakteriennährmedien	27
2.1.7 Oligonukleotide und Primer	28
2.1.8 <i>In situ</i> Hybridisierungssonden	29
2.1.9 Verwendete Puffer und Lösungen	30
2.1.10 Verwendete Antikörper für die Immunhistologie	33
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen – Restriktionsverdau	33
2.2.2 Partieller Restriktionsverdau	34
2.2.3 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	34
2.2.4 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	34
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	35
2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	35



---

2.2.7	Phenol/Chloroform- Extraktion	35
2.2.8	Präzipitation von Nukleinsäuren (DNA oder RNA)	36
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	36
2.2.10	Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter Bakterien	36
2.2.11	Identifizierung rekombinanter Kolonien	37
2.2.12	Präparation von Plasmid-DNA	37
2.2.13	DNA-Sequenzierung	38
2.2.14	Southern-Blot Hybridisierung	38
2.2.15	Herstellung radioaktiv ( <sup>32</sup> Phosphor- $\alpha$ -dCTP) markierter DNA-Sonden	39
2.2.16	Hybridisierung von Southern-Blot-Membranfiltern	39
2.2.17	Polymerase-Kettenreaktion („PCR“)	40
2.2.18	Amplifizierung langer DNA-Sequenzen („Long-range PCR“)	40
2.2.19	Ortsgerichtete Mutagenese (PCR-basierend)	41
2.2.20	Subklonierung von PCR-Produkten	41
2.2.21	Genotypisierung von Mäusen und Mausembryonen per PCR	42
2.2.22	„Gene Targeting“, die Generation einer „Knockout Maus“	44
2.2.23	DNA Aufbereitung für die Elektroporation in ES-Zellen	46
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>46</b>
2.3.1	Kulturbedingungen für ES-Zellen	46
2.3.2	ES-Zell-Medien	47
2.3.3	Elektroporation von ES-Zellen	49
2.3.4	Identifikation, Anzucht und Auswahl von resistenten ES-Zell-Kolonien	49
2.3.5	DNA Präparation aus ES-Zell Klonen	50
2.3.6	Überprüfung des Targeting-Erfolgs der ES-Zell Klone mittels PCR	50
<b>2.4</b>	<b>Embryologische Methoden</b>	<b>51</b>
2.4.1	Verwendete Mäuse	51
2.4.2	Isolation von Embryonen	51
2.4.3	Präparation von genomischer DNA aus embryonalen Dottersäcken	51
2.4.4	Präparation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	52
2.4.5	Skelettpräparation	52
2.4.6	Herstellung von markierten RNA-Proben für die <i>in situ</i> Hybridisierung	53
2.4.7	Histochemische Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridisierung („Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung = WISH)	54
2.4.8	Fluoreszenz Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridisierung (Fluoreszenz „Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung = F-WISH)	55
2.4.9	Fluoreszenz/histochemische Doppel <i>in situ</i> Hybridisierung	56
<b>2.5</b>	<b>Histologische Methoden</b>	<b>57</b>
2.5.1	Paraffineinbettung von Embryonen	57
2.5.2	Gegenfärbung von Plastikpräparaten mit Eosin-Färbelösung	58

2.5.3	Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Paraffinpräparaten	59
2.5.4	Elektronenmikroskopie	60
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>62</b>
3.1	Klonierungsstrategie für die Herstellung des <i>Noto</i> Knockouts	62
3.2	Expressionsanalyse von <i>Noto</i> mit dem GFP Reporter	65
3.3	Morphologische Analyse von <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Nachkommen	67
3.4	Analysen zu dem Skelettphänotyp <i>Noto</i> mutanter Mäuse- Vergleich des GFP-Null-Allels mit dem truncate Allel	68
3.5	Vergleich des Notochordphänotyps des GFP-Null-Allels mit dem truncate Allel anhand der Aktivität von GFP bzw. lacZ	70
3.6	Molekulare Analyse des Notochords anhand der <i>Brachyury (T)</i> Expression	72
3.7	Analysen zur Lateralität in den <i>Noto</i> Mutanten	74
3.8	Molekulare Analyse der Links-Rechts Determination in den <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten	77
3.9	Molekulare Analyse der anterior-posterior Determination in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten	79
3.10	Analyse der Primitivknotenregion in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten	81
3.11	Vergleich der <i>Noto</i> -Expression mit der <i>gfp</i> -Expression in den Knotenzellen von heterozygoten <i>Noto</i> <sup>GFP/+</sup> Embryonen	83
3.12	Weitere Analysen zur Morphologie des Primitivknoten in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten	84
3.13	Analyse der Primitivknotenregion in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten anhand von Elektronenmikroskopischen Aufnahmen	85
3.14	Analyse von Genen, die in dem Aufbau (Ziliogenese) oder in der Funktion der Knotenzilien involviert sind	90
3.15	Videomikroskopische Analyse der Motilität von Zilien der PNCs in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> Mutanten	93
3.16	Analysen zur Lokalisation von Membranproteinen	93
3.16.1	Expressionsanalysen von Genen, die für Proteine der ERM-Familie kodieren	94
3.16.2	Analysen zur Lokalisation von inaktiven Ezrin in ventralen Primitivknotenzellen	95
3.16.3	Lokalisation von aktivem Ezrin in den ventralen Primitivknotenzellen	97
3.16.4	Analysen zur Lokalisation von EBP50 in den ventralen Zellen des Primitivknoten/PNC	98

---

3.17	Analysen zur <i>Dll1</i> Expression in <i>Noto</i> <sup>GFP</sup> mutanten Embryonen sowie <i>Noto</i> Expression in <i>Delta</i> <sup>lacZ</sup> Mutanten.	99
<b>4.</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>101</b>
4.1	Die Rolle von <i>Noto</i> in der Entwicklung des Notochords und der Wirbelsäule	101
4.2	Die Rolle von <i>Noto</i> in der Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie	104
4.3	Der Transkriptionsfaktor <i>Noto</i> reguliert die Ziliogenese im Primitivknoten/PNC und wirkt den Transkriptionsfaktoren <i>Foxj1</i> und <i>Rfx3</i> vorgeschaltet	104
4.4	Untersuchungen zu möglichen Ursachen für die fehlerhafte Verankerung der Basalkörperchen an das apikale Zytoskelett der ventralen Knotenzellen	107
4.5	Erste Analysen bzgl. eines Zusammenhangs zwischen <i>Noto</i> und dem Notch-Signalübertragungsweg	109
4.6	Eine konservierte Funktion von <i>Noto</i> in der Bildung des Primitivknotens, als "Organ der Asymmetrie"	111
4.7	<i>Noto</i> ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der genetischen Hierarchie, der die Knotenmorphologie, die Ziliogenese sowie Zilienbewegung und somit auch die Links-Rechts Determination kontrolliert	114
<b>5.</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>116</b>
<b>6.</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b><i>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</i></b>	<b>137</b>

## Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
A	Adenin
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
AP	anterior-posterior
AV	animal-vegetal
AVE	anteriores viszerales Entoderm, das anteriore primitive Entoderm der Säugetierembryonen
BBR	Boehringer-Blockierungs-Reagenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dd	doppelt destilliert
DIG	Digoxigenin

---

Diss.	Dissertation
DMEM	Zellkulturnährmedium (Dulbeccos modified eagle medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpc	Tag nach Konzeption (engl. days post conception)
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGO	früher Gastrula Organisator (engl.: early gastrula organizer)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierende Protein
h	Stunde(n)
IFT	Intraflagellarer-Transport
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen
KV	„Kupffer's vesicle“
l	Liter
LB	Bakterienmedium (Luria Broth)
LPM	Lateralplattenmesoderm
m	milli
M	Molar
MGO	mittlerer Gastrula Organisator

---

mM	milli Molar
μ	mikro
μM	mikro Molar
MAB	Maleinsäurepuffer
MCS	multiple Klonierungsstelle in Vektoren (engl. multiple cloning site)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano
nc	Notochord
nf	Neuralfalten
np	Neuralplatte
nt	Neuralrohr (engl. neural tube)
NTMT	Natriumchlorid-Tris-Magnesium-Tween-Puffer
o.g.	oben genannte
OD 600	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
p	pico
pBS	pBlueSkript
PBS	phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PBT	phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung mit Tween
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	4 % Paraformaldehyd in PBS
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pM	picomolar

---

PNC	posteriore Notochord
pp	prächordale Platte
ps	Primitivstreifen
PSM	präsomitische Mesoderm
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
sc	Rückenmark (engl. spinal cord)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	sogenannte
SP6	RNA-Polymerase
SPM	Seitenplattenmesoderm
T	Thymin
T3	RNA-Polymerase
T7	RNA-Polymerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheiten (engl.: units)
u.A.	unter Anderem
Univ.	Universität
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Die Bildung der Körperachsen ist ein fundamentaler Prozess in der frühen Embryonalentwicklung und ist bei allen Vertebraten evolutionär konserviert. Die geordnete Morphogenese der inneren Organe erfolgt entlang der anterior-posterioren (AP) Achse. Zusätzlich wird der Embryo entlang einer dorsal-ventralen (DV) Achse sowie einer links-rechts (LR) Achse organisiert. Die Embryonalentwicklung der Maus von der befruchteten Eizelle über die Entstehung der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) während der Gastrulation, bis hin zu einem reifen Organismus ist geprägt von der positionsabhängigen Differenzierung von Organen und Geweben entlang der drei Körperachsen. Die Körperachsen sowie die drei Keimblätter eines Wirbeltierembryos werden unter dem Einfluss eines regulatorischen Zentrums, dem Organisator, etabliert. Sekretierte Signalmoleküle aus dem Organisator selbst und von Zellen, die vom Organisator abstammen, können die Identität benachbarter Zellen bestimmen und nehmen damit Einfluss auf den koordinierten Ablauf der Embryogenese.

Schon lange vor der Gastrulation und dem Auftreten des Organisators am anterioren Ende des Primitivstreifens, also schon vor der Implantation der Blastozyste, sind Asymmetrien im Mausembryo zu finden. Die erste Achse in der Zygote stellt die animal-vegetale (AV) Achse dar. Der animale Pol der Zygote ist durch die dortige Lage der Polkörperchen gekennzeichnet. Die AV-Achse korreliert wenig später mit der Achse der Bilateralasymmetrie, der die Zygote in einen proximalen und einen distalen Teil unterteilt (Gardner 1997). Der proximale Teil der Zygote beinhaltet die „Innere Zellmasse“. Des Weiteren konnten Gardner et al. zeigen, dass die Innere Zellmasse im Eizylinder leicht geneigt liegt, und dass es Hinweise gibt, dass die Achse der Bilateralasymmetrie mit der späteren anterior-posterioren (AP) Achse im Embryo korreliert (Smith 1980; Gardner et al. 1992; Weber et al. 1999; Ciemerych et al. 2000). Ob es auch einen funktionellen Zusammenhang gibt ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht erwiesen. Die Mechanismen, welche die Präimplantationsentwicklung bei Säugetieren bestimmen, werden schon lange kontrovers diskutiert. Eine zentrale Frage war und ist, ob Determinanten eine Schlüsselrolle spielen, in der Art, wie es im Nichtsäuger-Vertebraten-Modellsystem der Fall ist. In den letzten 10 Jahren wurde auf der einen Seite proklamiert, dass die Achse der Maus-Blastozyste



schon in der befruchteten Eizelle vorweggenommen festgelegt ist. Eine Art „prepatterning Modell“, das vorschlägt, dass ein Mechanismus stattfindet, der dem Nichtsäuger Modell ähnlich ist (Gardner 1997; Gardner 2001; Piotrowska et al. 2001; Piotrowska and Zernicka-Goetz 2001; Gardner 2002; Zernicka-Goetz 2002; Zernicka-Goetz 2005). Hier wird beispielsweise gesagt, dass schon die erste Zellteilung der Mauszygote die Achse der Blastozyste prognostiziert und somit den Bruchpunkt der Symmetrie des Embryos darstellt. Bei dieser ersten Zellteilung sollen Blastomeren mit zwei verschiedenen Entwicklungscharakteristika entstehen (Plusa et al. 2005). Verschiedene Forschungsergebnisse anderer Labore konnten aber im Gegensatz dazu dieses Modell nicht unterstützen. Sie schlugen ein sog. „Regulatives Modell“ vor (Alarcon and Marikawa 2003; Chrosicka et al. 2004; Hiragi and Solter 2004; Alarcon and Marikawa 2005; Louvet-Vallee et al. 2005; Motosugi et al. 2005). In einer Arbeit wurde beispielsweise gezeigt, dass die 2-Zell Blastomere sich nicht voneinander unterscheiden und ihre genaue spätere Zugehörigkeit zur Inneren Zellmasse mit polarem Trophektoderm und/oder zum restlichen Trophektoderm sich nicht voraussagen lässt. Sie stellten zusätzlich fest, dass die ellipsenförmige *zona pellucida* einen mechanischen Druck ausübt und räumliche Grenzen bildet, sodass das sich zusammenfügende Blastozoen an das eine Ende der längeren Achse der Blastozyste „gedrängt“ wird, was zu einer ersten Polarität im Mausembryo führt (Motosugi et al. 2005). Dieses Modell wurde auch gerade vor kurzem erst durch eine Publikation einer weiteren Arbeitsgruppe unterstützt (Kurotaki et al. 2007).

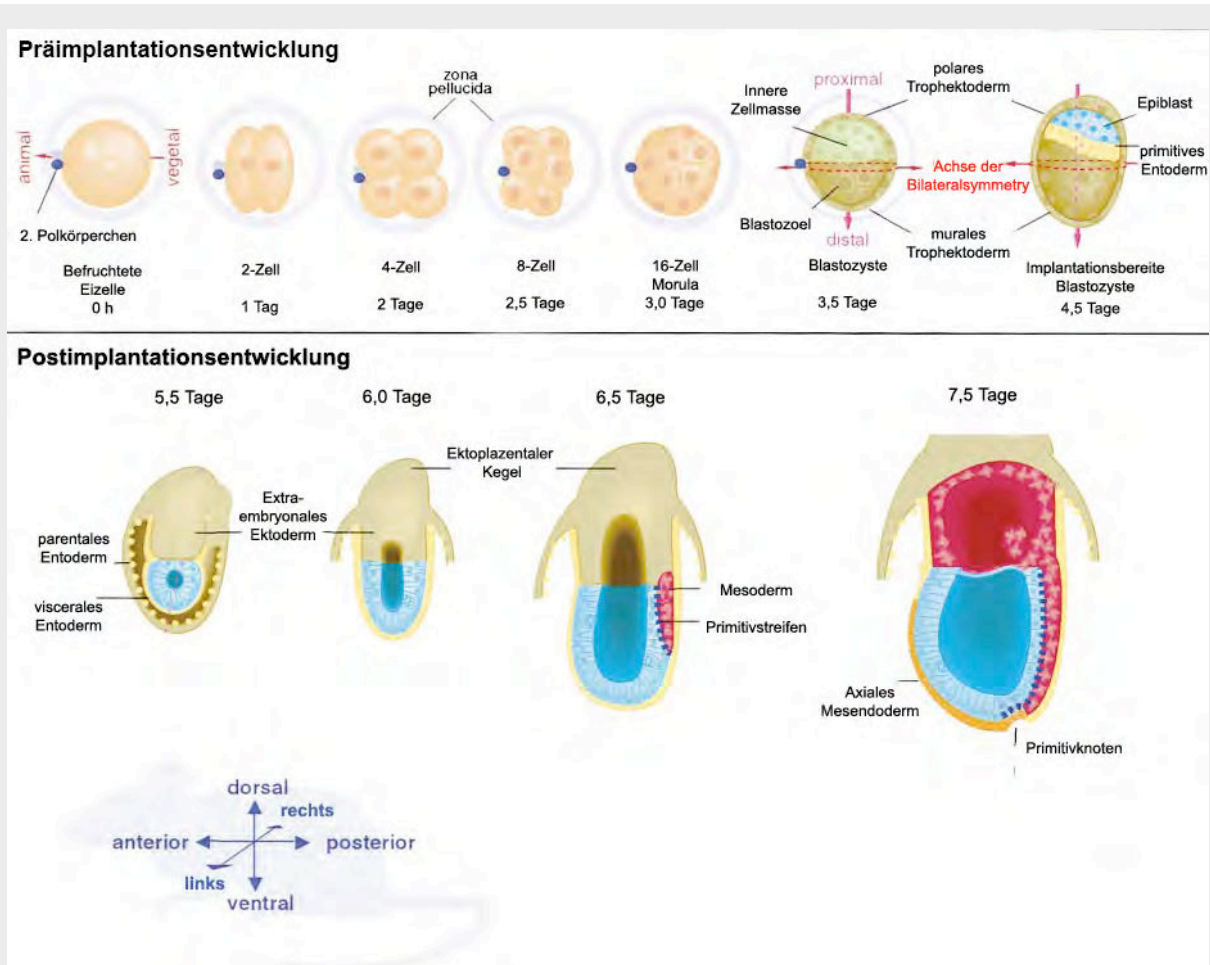
Die Festlegung der Achsen im Mausembryo, egal ob in der Präimplantations- oder auch später während der Postimplantationsentwicklung, ist ein wichtiges Forschungsgebiet der Entwicklungsbiologie.

## 1.1 Die Präimplantationsentwicklung

Die Embryonalentwicklung der Maus beginnt mit der Bildung der Zygote aus der weiblichen Ei- und der männlichen Samenzelle. Noch vor der Befruchtung erfolgt in der Eizelle die erste meiotische Zellteilung und der erste Polkörper wird gebildet. Durch die Lage dieses Polkörpers lässt sich der animale Pol der Eizelle identifizieren und die erste Achse der Asymmetrie, die AV-Achse, ist somit existent.

Erst nach der Befruchtung der Eizelle wird die Meiose abgeschlossen und der

zweite Polkörper gebildet (siehe Abbildung 1). Die ersten Furchungsteilungen erfolgen während der Embryo den Eileiter hinunter wandert. In dieser Phase ist der Embryo noch von der *zona pellucida*, einer schützenden Glykoproteinhülle, umgeben. Beginnend mit dem 2-Zell-Stadium, das etwa 24 Stunden nach der Befruchtung erreicht ist, wird das zygotische Genom aktiviert und die maternale mRNA abgebaut. Nach zwei weiteren Teilungsschritten wird am Embryonaltag 2.5 *post coitum* (E2.5 *p.c.*) das 8-Zell-Stadium erreicht. In diesem Stadium kommt es durch die Ausweitung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Blastomeren zur Kompaktion des Embryos, in deren Verlauf die Zellen ihre apikal-basale Polarität erhalten. Über das charakteristische Morula-Stadium entwickelt sich der Embryo weiter zur Blastozyste am Tag 3.5 *p.c.*. In diesem Stadium lassen sich erstmals zwei verschiedene Zelltypen voneinander unterscheiden. Die äußeren Zellen der Morula entwickeln sich zum Trophektoderm, die inneren Zellen der Morula bilden einen kleinen Zellhaufen, der als „innere Zellmasse“ bezeichnet wird. Das Trophektoderm transportiert Flüssigkeit in das Innere der Blastozyste, wodurch ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, das sog. Blastozoele entsteht, in dem sich an einer Seite die innere Zellmasse befindet. Die innere Zellmasse selbst besteht aus pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die *ex vivo* kultiviert und, nach entsprechender Manipulation, zur Erzeugung von chimären Mäusen (siehe unter 2.2.22) mit genetisch veränderten Zellen genutzt werden können (Capecchi 1989; Beddington and Robertson 1999). Der Embryo kann nun in einen proximalen Anteil, der die innere Zellmasse enthält, und einen gegenüberliegenden distalen Anteil eingeteilt werden. Am Tag 4.0 bis 4.5 *p.c.* differenziert sich ein dritter Zelltyp an der Oberfläche der inneren Zellmasse, das primitive Entoderm, das später zur Ausbildung extraembryonaler Strukturen beiträgt. Die übrige innere Zellmasse, das primitive Ektoderm bzw. der Epiblast, entwickelt sich dagegen zum eigentlichen Embryo sowie zu extraembryonalen Strukturen des Mesoderms. Die Zellen des Trophektoderms tragen im weiteren Verlauf der Entwicklung ausschließlich zu extraembryonalem Gewebe bei. Nachdem sich im Blastozystenstadium die *zona pellucida* abgelöst hat, erfolgt etwa E4.5 *p.c.* die Einnistung der Blastozyste in die Uterusschleimhaut.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der frühen Mausentwicklung.** Der obere Teil der Abbildung zeigt die Präimplantationsentwicklung, bis zu der implantationsbereiten Blastozyste am Embryonaltag 4,5 *p.c.*. Darunter ist die Postimplantationsentwicklung bis zum Embryonaltag 7,5 *p.c.* dargestellt. Die Bezeichnung der Körperachsen wird unten links anhand des Profils einer adulten Maus erläutert. Für nähere Erläuterungen siehe Text; entnommen und überarbeitet aus: (Beddington and Robertson 1999).

## 1.2 Die Postimplantationsentwicklung

Etwa am Embryonaltag 5,5 *p.c.*, nach der Einnistung in die Uteruswand, wachsen Teile des Trophektoderms zum ektoplazentalen Kegel und extraembryonales Ektoderm heran. Das viszerale Entoderm, das aus dem primitiven Entoderm hervorgegangen ist, umhüllt den Epiblasten und das extraembryonale Ektoderm. Zusätzlich kommt es im Epiblasten zur Ausbildung der Proamnionhöhle, wodurch der für die Maus charakteristische Eizylinder entsteht, in dem der Epiblast als becherförmiges Epithel vorliegt. Bis zu diesem Zeitpunkt behält der Embryo

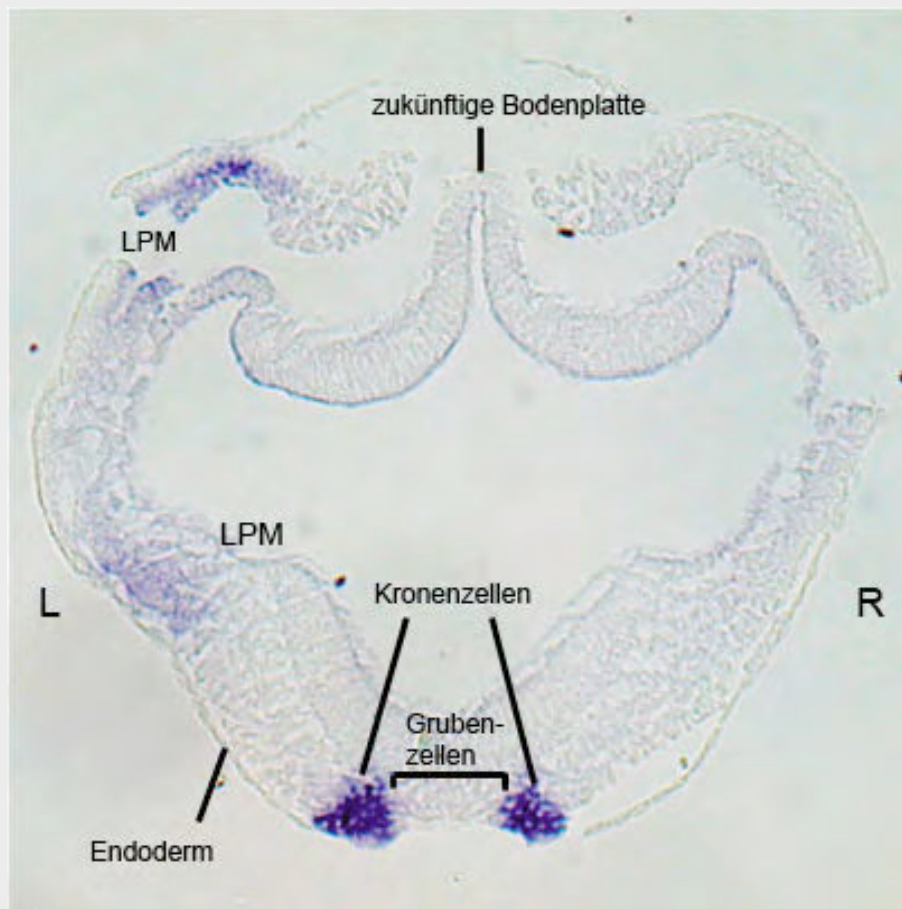
morphologisch seine radiale Symmetrie bei. Diese Symmetrie wird durchbrochen, wenn E6.5 mit der Ausbildung des Primitivstreifens an der Übergangzone von embryonalem zu extraembryonalem Ektoderm die Gastrulation beginnt. Mit Hilfe von molekularen Markern lässt sich jedoch bereits vorher, E5.5, eine Gruppe von Zellen am distalen Ende des viszeralen Entoderms von den restlichen Zellen dieser Schicht unterscheiden (Beddington and Robertson 1998). Diese Zellen wandern im weiteren Verlauf in ihre Position im anterioren viszeralen Entoderm (AVE), wo sie später die Bildung anteriorer embryonaler Strukturen regulieren.

Die anterior-posteriore Achse des Embryos wird also bereits festgelegt, bevor der Primitivstreifen den posterioren Anteil des Embryos auch morphologisch sichtbar macht. Während der Gastrulation (E6.5 bis E7.5) entstehen aus dem Epiblasten durch gerichtete Zellwanderung die drei Keimblätter. Im Bereich des Primitivstreifens durchlaufen Zellen des Epiblasten zunächst eine epithelial-mesenchymale Transition. Anschließend wandern sie durch den Primitivstreifen hindurch und breiten sich nach vorne und zur Seite hin zwischen dem primitiven Ektoderm und dem viszeralen Entoderm aus. Auf diese Weise entsteht eine Schicht mesodermaler Zellen. Zudem dringen einige Zellen aus dem Epiblasten in die viszerale Entodermschicht ein und ersetzen sie schrittweise, wodurch im Bereich der Mittellinie das definitive Entoderm entsteht. Das viszerale Entoderm wird dabei in den extraembryonalen Bereich verdrängt. Im Verlauf der Gastrulation verlängert sich der Primitivstreifen bis zur distalen Spitze des Eizylinders. Dabei bildet sich am Vorderende des Primitivstreifens der mittlere Gastrula Organisator (MGO). Diese Struktur ist homolog zum Spemann-Organisator im Amphibien-Embryo und zu den entsprechenden Strukturen im Zebrafisch- (Embryoschild) bzw. im Hühnerembryo (Hensenscher Knoten), und induziert nach Transplantation in heterotopische Regionen des Embryos eine sekundäre Körperachse (Lemaire and Kodjabachian 1996). Zellmarkierungsexperimente haben gezeigt, dass der Zeitpunkt und die Position des Einwanderens einzelner Zellen in den Primitivstreifen über deren zukünftige Position innerhalb des Embryos bestimmen (Tam and Beddington 1987; Lawson et al. 1991; Smith et al. 1994; Sulik et al. 1994). Zellen, die am posterioren Ende in den Primitivstreifen einwandern, werden zu extraembryonalem Mesoderm, das zur Bildung von Allantois, Amnion und viszeralem Dottersack, wichtigen Bestandteilen der Plazenta, beiträgt. Zellen, die durch den mittleren Teil des

Primitivstreifens wandern, tragen später zu paraxialem Mesoderm, intermediärem Mesoderm und Seitenplattenmesoderm (SPM) bei. Das axiale Mesoderm geht aus Zellen hervor, die durch den Primitivknoten wandern, und bildet das Notochord und das definitive Entoderm, aus dem sich der Darm entwickelt. Zellen aus dem Primitivknoten tragen zusätzlich zu den Somiten und zum Neuralrohr bei. Etwa am Embryonaltag 8.0 sind die embryonalen Achsen anterior-posterior, dorsal-ventral und links-rechts festgelegt (Beddington and Robertson 1999). Von diesem Zeitpunkt an schreitet die Entwicklung des Embryos schnell fort, wobei sich anteriore Strukturen zuerst entwickeln. Zwischen E7.5 und E8.5 beginnt die Entwicklung von Neuralrohr, Kopf und Herz. Die Neurulation wird am vorderen Ende des Embryos durch Signale des AVE eingeleitet. Das Neuroektoderm der Neuralplatte faltet sich auf und schließt sich später zum Neuralrohr. Die Entwicklung des Neuralrohrs geht einher mit dem Aufwölben der Kopffalte vom umgebenden Ektoderm und mit der Bildung der ersten Somiten aus dem Präsomitischen Mesoderm (PSM). Auf der ventralen Seite des Embryos entwickelt sich das Herz aus den gepaarten Herzanlagen von linkem und rechtem SPM sowie weiteren Vorläuferzellen. Dabei handelt es sich zu Beginn um ein tubuläres Herz. Als erster Hinweis auf eine spätere links-rechts Asymmetrie folgt eine rechtswärts Krümmung dieses zentral gelegenen Herzschlauches. Ab E8.0 beginnt die Einstülpung des Entoderms zum Vorderdarm und später zum Hinterdarm. Eine besondere Eigenart der Mausentwicklung ist die „Inversion der Keimblätter“, die sich darin zeigt, dass sich das Entoderm während der frühen Entwicklungsphasen in Relation zu den anderen Keimblättern außen befindet. Die Orientierung der Keimblätter wird erst mit einer Drehung des Embryos am Embryonaltag 8.75 korrigiert, so dass schließlich das Entoderm nach innen zu liegen kommt. Diese Inversion der Keimblätter bezeichnet man auch als embryonale Drehung. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden kontinuierlich Somiten gebildet, aus denen sich anschließend u.A. die Skelettmuskulatur und die Wirbelsäule bilden. Das intermediäre Mesoderm trägt zur Bildung des Urogenitalsystems bei, während sich aus Zellen des Seitenplattenmesoderms die Gliedmaßenknospen entwickeln. Die Entwicklung der inneren Organe (wie beispielsweise Lunge, Magen, Pankreas und Leber) erfolgt ausgehend von Ausstülpungen des Darmschlauches.

### 1.3 Der Primitivknoten und das daraus hervorgehende Notochord

Die zum Spemann-Organisator im Amphibien-Embryo homologe Struktur, der Organisator eines Vertebratenembryos, ist eine dynamische Struktur, die unterschiedliche Eigenschaften zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung besitzt. Der Organisator ist eine transiente Struktur, die für den Musterungsprozess des gesamten Körperplans unabdingbar ist (Camus and Tam 1999; Viebahn 2001). In der Maus wird diese Organisator-Struktur am Embryonaltag 6.5 am anterioren Ende des Primitivstreifens gebildet. Der frühe Gastrula Organisator („early gastrula organizer“ EGO), der sich E6.5 bildet, ist in der Lage eine unvollständige Achse, bei der ein anteriorer Anteil fehlt, zu induzieren und die aus dem EGO stammenden Zellen tragen nur teilweise zum anterioren axialen Mesoderm bei (Tam and Steiner 1999). Der mittlere Gastrula Organisator („mid gastrula organizer“ MGO) ist in der Lage die gesamte Achse zu bilden und die aus dem MGO hervorgehenden Zellen bilden den Großteil des anterioren axialen Mesoderms und tragen auch zur Bildung des Notochords in der Rumpfregeion bei (Kinder et al. 2001). Während der Verlängerung des Primitivstreifens wird der Organisator in die Richtung der distalen Spitze des Eizylinders verlagert und im „späten Primitivstreifen Stadium“ (E7.5) wird er morphologisch als seichte halbmondförmige Vertiefung sichtbar. Diese Vertiefung repräsentiert das posteriore Notochord (PNC) (Blum et al. 2007) und wird oftmals als Primitivknoten bezeichnet. Das PNC ist also mit der morphologischen Struktur des Primitivknotens gleichzusetzen. Das PNC bzw. der Primitivknoten, wie auch der EGO, induziert nur einen Teil der Achse (Beddington 1994). Das PNC bzw. der Primitivknoten an sich besteht aus zwei Zellschichten. Eine dorsale Zellschicht auf der Seite des Epiblasten und eine ventrale Zellschicht auf der entodermalen Seite. Die ventralen Zellen des Primitivknotens kann man in zwei Zellpopulationen unterteilen (siehe Abbildung 2). Zum einen in die sog. Grubenzellen in der zentralen Knotenregion und zum anderen in die sog. Kronenzellen (Shiratori and Hamada 2006). Die Kronenzellen befinden sich in einer hufeisenförmigen Region, die die Grube umrahmt. Die offene Seite des Hufeisens zeigt dabei in anteriore Richtung.

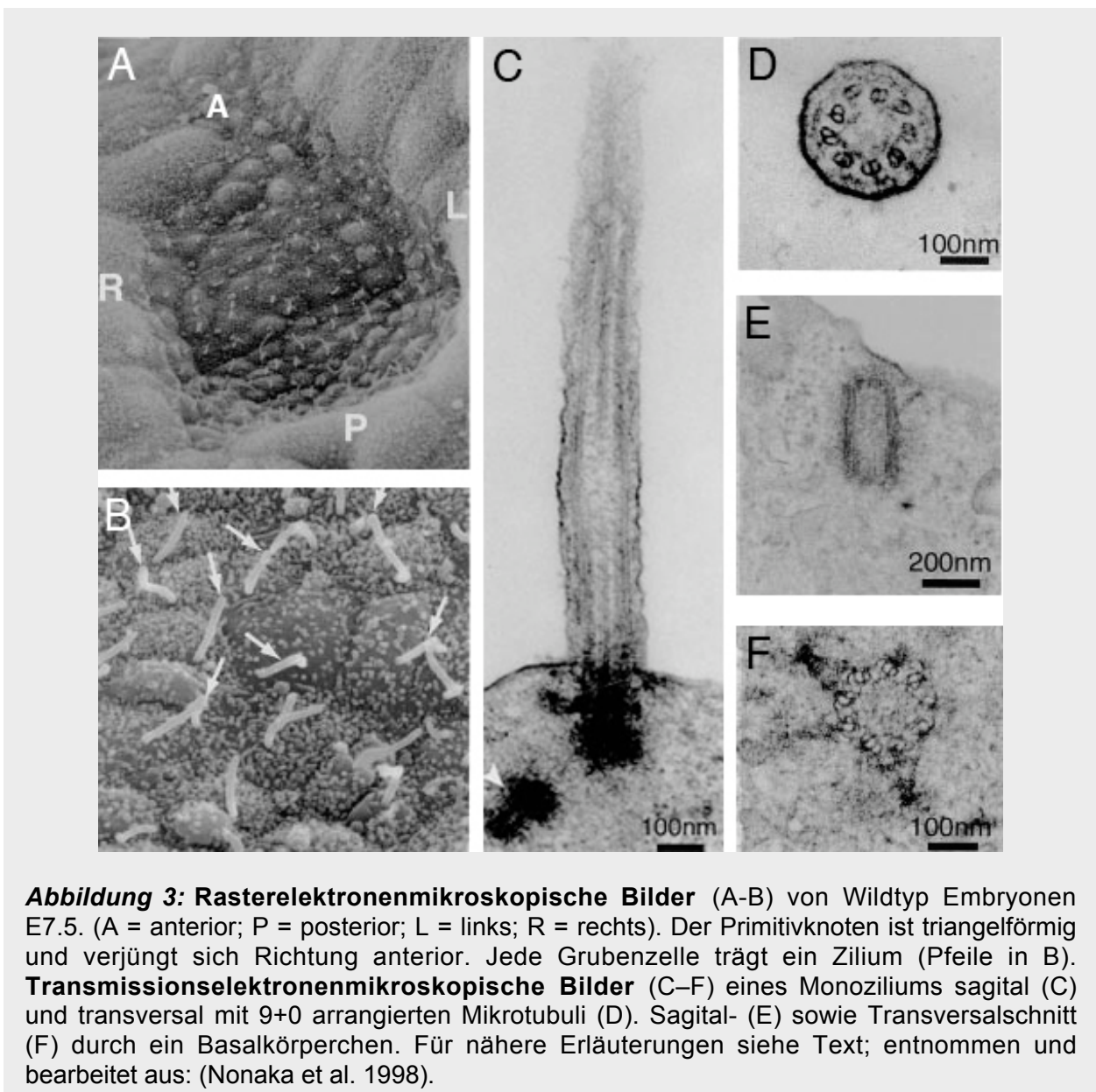


**Abbildung 2: Lokalisation von Kronen- und Grubenzellen in der Primitivknotenregion/ PNC.** Transversalschnitt durch einen E8.25 Embryo, der mit einer Probe für *nodal* hybridisiert wurde. Für nähere Erläuterungen siehe Text; entnommen und überarbeitet aus: (Shiratori and Hamada 2006).

Die in der zentralen Vertiefung liegenden Grubenzellen tragen Monozilien (Sulik et al. 1994), die in den extraembryonalen Raum gerichtet sind (siehe Abbildung 3 A, B und C). Diese Zilien sind einzigartig, da sie von ihrem Aufbau her zu der Gruppe der „primären Zilien“ gehören, aber darüber hinaus, was nicht normal ist, auch beweglich sind. Ein Faserbündel, das sog. Axonem, wird von Mikrotubuli gebildet, die nach dem so genannten 9+0-Muster angeordnet sind. Im Mittelpunkt jeder Zilie befinden sich keine zwei Zentraltubuli (Satir and Christensen 2006), wie man sie von anderen beweglichen Zilien her kennt. Ein Axonem besteht nur aus einem Ring von neun Doppeltubuli (Dublets), die jeweils aus einem A- und B-Tubulus bestehen (siehe Abbildung 3 D). An jedem A-Tubulus befinden sich Paare von armartigen Strukturen, die sog. Dyneinarme, die zum B-Tubulus des benachbarten Doublets



hinweisen. Die Dyneinarme bewerkstelligen unter Verbrauch von ATP ein Aneinandergleiten der Mikrotubuli und somit letztendlich die Bewegung von Zilien. Die Mikrotubuli entspringen alle aus einem Basalkörperchen (Kinetosom), das aus neun Mikrotubuli-Tripletts aufgebaut ist (siehe Abbildung 3 F). Diese Basalkörperchen stellen den "Motor für die Bewegung" der Zilien dar und sind an der apikalen Zelloberfläche lokalisiert (siehe Abbildung 3 E).



Die Monozilien im Zentrum des Primitivknoten rotieren synchron im Uhrzeigersinn, wodurch sie einen Flüssigkeitsstrom erzeugen, den sog. „Nodal Flow“ (Nonaka et al. 1998). Die Zellen in der Peripherie des Knoten tragen sensorische Zilien, von denen



man annimmt, dass sie in der Lage sind den Nodal Flow zu detektieren und in ein Signal umwandeln, das zu asymmetrischer Genexpression führt und somit zur Ausbildung der asymmetrischen Positionierung der inneren Organe.

Die Bildung eines voll entwickelten Primitivknotens wird durch *Arkadia (Ark)* im extraembryonalen Gewebe eingeleitet und durch *nodal* weiter vermittelt. *Ark* wirkt dem Transkriptionsfaktor *Foxa2* (früher: *HNF3 $\beta$* ) vorgeschaltet und spezifiziert die Vorläufer der Knotenzellen (Episkopou et al. 2001). *Foxa2* selbst ist für die Bildung eines organisierten Knotens unabdingbar. So bilden *Foxa2* defiziente Embryonen keinen Knoten und können dementsprechend auch keine Notochordzellen hervorbringen (Ang and Rossant 1994; Weinstein et al. 1994). Gleichermaßen haben Embryonen, denen der Transkriptionsregulator *Foxh1*, ein Vermittler von *nodal* Aktivität (Hoodless et al. 2001; Yamamoto et al. 2001), oder *Lim1* (Shawlot and Behringer 1995), oder *T* (Herrmann 1991) fehlen, keinen Primitivknoten und weisen Defekte der Mittellinienstrukturen, dem Notochord und der Bodenplatte des Neuralrohrs, die aus den anterioren Knotenzellen hervorgehen, auf.

Die *Chorda dorsalis* ("Rückensaite"), auch Notochord genannt, ist das ursprüngliche innere Achsenskelett aller Chordatiere und war für diese namensgebend. Es handelt sich dabei um eine stabähnliche Struktur, die sich ventral des Neuralrohrs in der Mittellinie des Embryos entlang der anterior-posterioren Körperachse ausdehnt. In den Embryonen der Vertebraten liegt das kraniale Ende des Notochords in der Nähe von Rathke's-Tasche, kaudal erstreckt es sich bis in die Schwanzspitze. In der Maus beginnt die Ausbildung des Notochords am Embryonaltag 7.0, jedoch stellt das Notochord eine klar unterscheidbare, anatomische Struktur erst von E8.5 der Entwicklung an dar. Zunächst bilden die Chordazellen den medialen Teil des Darmentoderms (Urdachdarm) entlang der Mittellinie des Embryos. Beginnend am E9.0 werden dann Chordazellen aufgefaltet und bilden einen festen, durchgehenden Verband von Zellen, der sich schließlich vom unterliegenden Entoderm ablöst. Dieser Prozess fängt am kranialen Ende an und setzt sich in kaudaler Richtung fort. Etwa am E13.0 weist das Notochord Einschnürungen in den Bereichen der sich bildenden Wirbelkörper auf sowie Erweiterungen in den Zwischenwirbelbereichen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden diese Bereiche zellfrei. Die Chordazellen in den erweiterten Bereichen bilden die *Nuclei pulposi* der Bandscheiben (Jurand 1974).

Das Notochord ist für die dorso-ventrale Musterbildung im Rückenmark und im paraxialen Mesoderm unabdingbar. Mutanten, bei denen die Entwicklung und/oder Integrität des Notochords gestört ist, zeigen Fehlbildungen der Wirbelsäule (gestörte Sklerotomdifferenzierung) und des Rückenmarks (Verlust der Bodenplatte). Wird das Notochord vor der Segmentierung des paraxialen Mesoderms experimentell entfernt, verschmelzen die sich bilateral bildenden Somiten in der Mittellinie und differenzieren in eine einzige Muskelmasse ventral des Neuralrohrs (van Straaten and Hekking 1991; Yamada et al. 1991). Die sklerotomale Differenzierung dieser Somiten scheint in der Abwesenheit des Notochords nicht stattzufinden (Pourquié et al. 1993), was zu Missbildungen des axialen Skeletts führt. Umgekehrt unterdrücken Transplantate des Notochords in das dorsale, unsegmentierte PSM die Bildung des Dermomyotoms weitgehend und führen zur ektopischen Bildung von Sklerotom (Pourquié et al. 1993). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass die Anwesenheit des Notochords die Proliferation von Sklerotomzellen sowie deren Differenzierung zu Knorpel stimuliert (Cheney and Lash 1981). Diese ventralisierenden Signale des Notochords werden von *sonic hedgehog (shh)* vermittelt (Bumcrot and McMahon 1995). *Shh* wird im Notochord und in der Bodenplatte exprimiert und kann die ventralisierenden Wirkungen des Notochords unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ersetzen (Echelard et al. 1993; Roelink et al. 1994).

Während die funktionelle Bedeutung des Notochords klar feststand und bis dato recht gut erforscht war, waren nur wenige Gene bekannt, die die Entwicklung des Notochords kontrollieren. In der Maus wurden zwei Gene, die eine entscheidende Rolle in der Notochordentwicklung spielen, mittels Positionsklonierung und zielgerichteter Mutagenese identifiziert (Herrmann et al. 1990; Ang and Rossant 1994; Weinstein et al. 1994). Bei diesen beiden Genen handelte es sich um die beiden Transkriptionsfaktoren Brachyury (*T*) und *Foxa2*. Homozygote *T* mutanten Embryonen fehlt der Knoten und das posteriore Notochord (Herrmann 1995) und ohne das homologe *no-tail* Gen hat der Zebrafisch (*Danio rerio*) einen ähnlichen Phänotyp (Griffin et al. 1995). Demgegenüber fehlt *Foxa2* mutanten Embryonen der Knoten und alle Notochordzellen (Ang and Rossant 1994; Weinstein et al. 1994). In Zebrafisch wurde ein weiteres, für die Notochordentwicklung wichtiges Gen, *floating head (flh)* identifiziert, das ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Es wirkt

dem *T* Gen, *no-tail*, vorgeschaltet in Notochordvorläuferzellen (Talbot et al. 1995). Ähnlich wie die *T* Mutanten bilden die *flh* Mutanten eine prächordale Platte, haben aber kein ausdifferenziertes Notochord (Talbot et al. 1995). Die *flh*-Orthologe, die Gene der sog. *Not*-Gruppe, wurden in Hühnchen (*Gallus gallus*) - *Gnot1* und *Gnot2* (Knezevic et al. 1995) und *Xnot* im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (von Dassow et al. 1993) bereits identifiziert, in der Maus (*Mus musculus*), als Beispiel eines Säugetiers, war aber bis dato kein „*Not* Gen“ bekannt. Insgesamt wurden in der Maus fünf Mutationen identifiziert, die spezifisch die Entwicklung und/oder Integrität des Notochords stören. Neben Brachyury (*T*) waren noch „Danforth’s short tail“ (*Sd*), „Pintail“ (*Pt*), „curly tail“ (*ct*) und „Truncate“ (*tc*) bekannt. Diese Mutationen wurden aufgrund der auffälligen Phänotypen im kaudalen Bereich des axialen Skeletts identifiziert. Die Phänotypen waren durch verkürzte oder geknickte Schwänze charakterisiert, die von den Entwicklungsstörungen des Notochords verursacht wurden (für eine Übersicht siehe (Johnson 1986; Theiler 1988)). Die o.g. Mutationen rufen spezifische Defekte der Notochordentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten während der Embryogenese und in unterschiedlichen Bereichen entlang der anterior-posterioren Körperachse hervor, was auf eine unterschiedliche genetische Kontrolle der Notochordentwicklung in den verschiedenen Körperabschnitten hindeutet. Bis zu Beginn dieser Dissertation war, wie oben bereits erwähnt, nur eines dieser Gene, *T*, kloniert und auf molekularer Ebene analysiert. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Funktion des „*tc*-Gens“ in der Embryonalentwicklung der Maus mit Hilfe eines durch gezielte Mutagenese hergestellten Null-Allels näher bestimmen werden.

#### **1.4 Die truncate Mutante (tc)**

Die truncate Mutante trägt eine rezessive Mutation auf Chromosom 6, die ausschließlich das kaudale axiale Skelett (Theiler 1957; Theiler 1959; Dietrich et al. 1993) beeinflusst. Das einzige noch existierende *tc* Allel war auf dem „swiss background“ entstanden und weist eine unvollständige Penetranz auf (80-90% auf dem 129/B6 Hintergrund). In homozygoten Embryonen zwischen E9.75 und E10.0 bricht das Notochord an unterschiedlichen Stellen posterior des 24. Somitenpaars ab und wird in seltenen Fällen weiter posterior wieder gebildet. Bei der Mehrheit der mutanten Embryonen endet das Notochord in der Sakralregion (Somiten 26-29),

gelegentlich bis zu zwei Somiten weiter kranial. Die Abwesenheit des Notochords im kaudalen Teil des Embryos führt zur Agenesie der weiter hinten liegenden Wirbelsäule, meist bis in die Sakralregion. Das Notochord, das sich früher in anterioren Körperabschnitten gebildet hat, bleibt intakt, was die Beschränkung der Missbildungen der Wirbelsäule auf den kaudalen Bereich erklärt. Die *tc* Mutation betrifft somit ausschließlich den kaudalen Abschnitt des Notochords. Die Notochordentwicklung setzt sich bis in die untere Lendenregion normal fort und hört dann abrupt auf. Dies ließ darauf schließen, dass die Bildung des Notochords während der Gastrulation nicht von *tc* betroffen ist und deutet darauf hin, dass *tc* spezifisch für die Notochordentwicklung um und nach dem Übergang von der primären zur sekundären Achsenbildung gebraucht wird, wenn sich die Schwanzknospe entwickelt und beginnt die Körperachse nach posterior zu verlängern.

Durch chromosomale und physikalische Kartierung wurde in der Arbeitsgruppe von Achim Gossler (Pavlova et al. 1998) eine 180 kb große Region eingegrenzt, die die *tc* Mutation enthält. Diese Region wurde subkloniert und in Kollaboration mit Dr. Richard Reinhardt (MPI für Molekulare Genetik, Berlin) sequenziert. In dieser Region befanden sich sechs bekannte oder vorhergesagte Gene. Wie sich herausstellte enthielt eines dieser Gene eine Homeobox, die auf Ebene der Aminosäuren (AS) eine 50-60% Identität mit verschiedenen Homeoboxgenen der *Not*-Gruppe aufwies. Für dieses neue potentielle Maushomolog, was zu anfangs erst als *Not* bezeichnet wurde (Abdelkhalek et al. 2004), später und in dieser Arbeit aber als *Noto*, wurde von einer Kollegin, Hanaa Ben Abdelkhalek, gezeigt, dass es im Primitivknoten und im entstehenden Notochord exprimiert ist und in der truncate Mutante eine Punktmutation aufweist. Abdelkhalek, H (2006): Molecular genetic characterization of the mouse truncate (*tc*) mutation. Hannover, Univ., Diss.

## 1.5 Die Homeoboxgene

Homeoboxgene kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch eine 60 AS umfassende DNA Bindedomäne, die sog. Homeodomäne, charakterisiert ist. Die Homeodomäne faltet sich in drei  $\alpha$ -Helices, wobei die dritte die DNA-Erkennungshelix darstellt. Das konservierte vier Basen Erkennungsmotiv, TAAT, kommt in den meisten Homeodomänen- Bindesequenzen vor, wobei die Selektivität

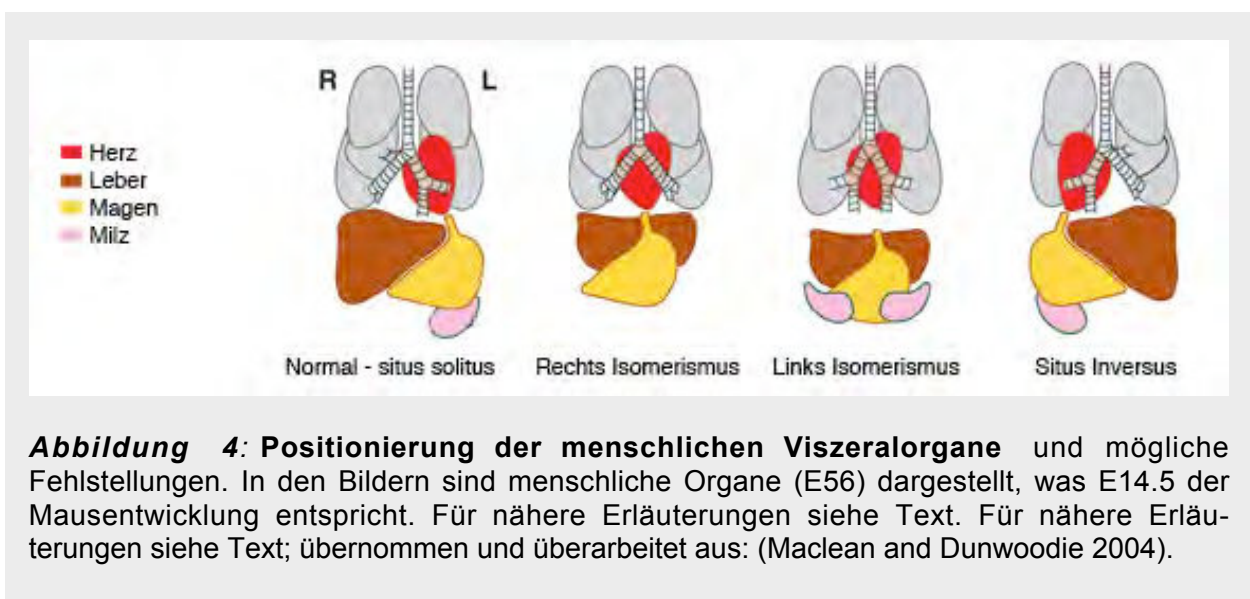
in den 3' benachbarten Basenpaaren liegt. Das direkt nach dem TAAT Motiv folgende Basenpaar wird von der AS 50 der Erkennungshelix erkannt. Homeoboxgene kommen in allen eukaryotischen Organismen vor und besitzen wichtige Funktionen in allen Entwicklungsvorgängen. So bestimmen Homeoboxgene z.B. die Geschlechtstypisierung bei Hefe (Wolberger et al. 1991) und die Blütenmusterbildung bei Pflanzen (Williams 1998). In der Achsenentwicklung der Invertebraten und Vertebraten spielen Homeoboxgene eine herausragende Rolle. Die homeotischen Effektorgene (*Hox*-Gene) in *Drosophila melanogaster*, die für die Spezifizierung von Identitäten entlang der AP-Achse notwendig sind, sind Beispiele hierfür. Des Weiteren zeigen die homeotischen Homeoboxgene von Fliege und Maus große Homologien sowohl in den Homeodomänen selbst als auch in der Regulation. Beispielsweise vermag ein *Deformed* Enhancerelement aus *Drosophila melanogaster* in transgenen Mäusen, das korrekte Expressionsmuster des maushomologen Gens wiederzugeben (Awgulewitsch and Jacobs 1992; Malicki et al. 1992).

## 1.6 Die Links-Rechts Asymmetrie der Wirbeltiere

“We each have two eyes, two ears, two arms and two legs, one each on each side of the body” (Gee et al. 1997) – mit diesen Worten wurde die äußere Symmetrie des Menschen beschrieben. Von außen betrachtet ist auch die Maus spiegelbildsymmetrisch aufgebaut. Schaut man aber in das Innere, so ist eine asymmetrische Positionierung vieler innerer Organe, wie z.B. Herz, Magen, Leber, Milz oder Bauchspeicheldrüse, zu erkennen. So nehmen Herz, Milz, Magen und Bauchspeicheldrüse der Säugetiere eine links-, die Leber eine rechtsseitige Lage ein. Des Weiteren stellen die Windungen von Dün- und Dickdarm mit einem rechts liegenden Blinddarmfortsatz, und die unterschiedliche Anzahl von Loben der Lungenflügel beider Seiten eine asymmetrische Lagebeziehung dar. In der Maus kommt es linkseitig zur Ausbildung eines Lungenlappens und rechtsseitig bildet sich eine viergelappte Lunge. Die normale asymmetrische Anordnung der Organe wird als *situs solitus* bezeichnet. Asymmetrisch gebaute und asymmetrisch sitzende Organe wären in der Evolution nicht entstanden, wenn dies dem Organismus nicht Vorteile gebracht hätte. Ein Beispiel dafür ist das überaus komplexe Verdauungssystem der höheren Wirbeltiere, das in asymmetrischen Schleifen und Schlingen in

der Leibeshöhle Platz sparend untergebracht ist. Desgleichen vermag bei ihnen erst ein asymmetrisches Herz das Blut in günstiger Weise auf den Körper- und den Lungenkreislauf zu verteilen, insbesondere auch bei den warmblütigen Vögeln und Säugern. Es verfügt dann über zwei getrennte Pumpensysteme: Das rechte versorgt die Lunge, das stärkere linke den übrigen Körper.

Beim Menschen tritt in 1 von 10000 Geburten eine komplette Inversion der Organlage (*situs inversus*) auf, die aber keinerlei Gesundheitsschäden nach sich zieht. Schwerwiegende Folgen gibt es im Falle von Heterotaxie, wenn Herz- und Magen-Darm-Situs (*situs cordis* und *situs viscerum*) in einer gegensätzlichen Lateralität angelegt werden (Burn 1991; Bowers et al. 1996; Kosaki and Casey 1998) und im Falle von Isomerismen (siehe Abbildung 4). Beim Isomerismus hat der Körper gewissermaßen nur zwei linke oder nur zwei rechte Hälften, zum Beispiel entweder überhaupt keine Milz und beiderseits eine 3-gelappte Lunge (bei der Maus 4-gelappt) oder gleich zwei Milzen und zwei Lungenflügel, die jeweils aus zwei Lappen bestehen (bei der Maus jeweils einem Lappen). Das Herz ist dann völlig symmetrisch (Maclean and Dunwoodie 2004) in der Mitte der Körperachse angeordnet. Die Krankheitsbilder sind komplex und können ganz verschieden ausfallen. Aus noch ungeklärten Gründen ist linksseitiger Isomerismus weniger gravierend. Vielfach macht er gar keine Beschwerden, während ein rechtsseitiger meist schon im ersten Lebensjahr eines Kindes zum Tode führt.



**Abbildung 4: Positionierung der menschlichen Viszeralorgane** und mögliche Fehlstellungen. In den Bildern sind menschliche Organe (E56) dargestellt, was E14.5 der Mausentwicklung entspricht. Für nähere Erläuterungen siehe Text. Für nähere Erläuterungen siehe Text; übernommen und überarbeitet aus: (Maclean and Dunwoodie 2004).

## 1.7 Die Entstehung von Lateralität während der Embryogenese

Die Entstehung der Wirbeltierlateralität während der Embryonalentwicklung lässt sich grob in drei zeitlich aufeinander folgende Phasen unterteilen. Phase 1 ist geprägt vom Bruch der ursprünglichen bilateralen Symmetrie von Gastrula- bzw. Neurula-Embryonen. Phase 2 wird durch asymmetrische Genexpression im Bereich des Primitivknotens und des Seitenplattenmesoderms (SPM) charakterisiert, die dann zu einer asymmetrischen Organmorphogenese in Phase 3 führt.

### 1. Phase: Bruch der embryonalen Symmetrie

Naiv gesehen ist die rechte bzw. linke Seite des Embryos mit der Festlegung der dorso-ventralen und anterior-posterioren Achse ebenfalls angelegt. Positionsspezifische Organentwicklung fordert jedoch eine molekulare Determination der beiden Körperhälften. In einer theoretischen Betrachtung postulierten Brown und Wolpert schon 1990 ein chirales Molekül (Brown et al. 1990), das die Entstehung von rechter bzw. linker Achse mit der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse koppelt. Ein solches Molekül könnte möglicherweise membranständig am gerichteten Transport von Wirkstoffen und deren rechts- bzw. linksseitigen Akkumulation beteiligt sein.

In der Maus gibt es zwei Mutationen, *inversus viscerum* (*iv*) und *inversin* (*inv*), die vermutlich an einem frühen Punkt der Lateralitätsentwicklung wirken. Die *iv* Mauslinie zeigt eine zufällige Ausprägung des Situs (Brown et al. 1990) während *inv* Mäuse einen 100% *situs inversus* aufweisen (Yokoyama et al. 1993). Die Klonierung der mutierten Gene brachte jedoch keinen großen Fortschritt bei der Identifizierung des die links-rechts Asymmetrie bestimmenden molekularen Mechanismus. Das *inv* Gen, ist ubiquitär im E7.5 Embryo exprimiert und kodiert für ein großes Protein mit unbekannter Funktion, das Inversin benannt wurde (Mochizuki et al. 1998; Morgan et al. 1998). Im Falle von der *iv* Mutation ist ein axonemales Dynein, das sog. „*left-right dynein*“ (*Ird*), heute auch *Dnahc11* genannt, mutiert (Supp et al. 1997), welches am Tag 7.5 der Embryonalentwicklung spezifisch, aber nicht asymmetrisch, in den ventral gelegenen Zellen des Primitivknotens, genauer in den Grubenzellen, exprimiert ist.

Anhand des menschlichen Kartagener Syndroms, das durch unbewegliche Zilien und ein häufiges Auftreten von Situsinversionen charakterisiert ist (Afzelius 1995b;

Afzelius 1995a), ließ sich dann aber eine mögliche Rolle von Zilien in der Lateralitätsentwicklung ableiten. Des Weiteren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Zilien im Primitivknoten gegen den Uhrzeigersinn rotieren und eine links gerichtete Flüssigkeitsbewegung, den sog. „Nodal Flow“ (Nonaka et al. 1998) verursachen. Darüber hinaus fanden sich in Mäusen nach gezielter Inaktivierung von KIF3B, einem Motorprotein der Kinesinfamilie, keine Zilien im Primitivknoten sowie ein randomisierter Situs (Nonaka et al. 1998). Dasselbe traf für Mäuse mit inaktiviertem KIF3A (Takeda et al. 1999) und POLARIS (*tg737*) (Murcia et al. 2000) zu. Der aus diesen Daten folgenden Hypothese nach sollte die, durch die Monozilien des Knotens ausgelöste, links gerichtete Flüssigkeitsbewegung sekretierte Wachstumsfaktoren spezifisch auf die linke Seite des Knotens verteilen und somit als frühestes Ereignis die Lateralität festlegen. Derzeitige Modelle sagen, dass der Nodal Flow das symmetriebrechende Signal entweder durch die Herstellung eines Gradienten aus einem sezernierten und transportierten Morphogen X erzeugt (Nonaka et al. 2002; Okada et al. 2005) oder der erzeugte Strom an sich physikalisch sensorische Zilien in der Peripherie des Knotens stimuliert (McGrath et al. 2003). Derzeit wird auch angenommen, dass in Mäusen der Nodal Flow linksseitig am Primitivknoten ein Kalziumsignal induziert, das dann spezifisch auf der einen Seite die *nodal*-Genexpression aktiviert. Dieses  $Ca^{2+}$ -Signal ist z.B. in Polycystins-2 defizienten Mäusen (*Pkd2*<sup>-/-</sup>) nicht nachweisbar (Shiba et al. 2005). Weitere Daten, gefunden in Nierenepithelzellen dieser Mäuse, zeigten eine mechanosensorische Funktion des Pkd2 in Monozilien. Andere Analysen haben jedoch auch Missbildungen des Primitivknotens und der Monozilien gezeigt (persönliche Mitteilung von Martin Blum). Es ist daher unklar, ob die Lateralitätsprobleme in Pkd2 Knockout Mäusen verursacht werden, weil aufgrund der Fehlbildungen kein laminarer Fluss entsteht, ob das asymmetrische Signal von den Zilien nicht detektiert werden kann oder ob eine Kombination beider Gründe zutrifft. Eine Analyse der Struktur und der Funktion des Primitivknotens von Pkd2 mutanten Mäusen wäre auch hier notwendig.

Die schlagkräftige linksgerichtete Kraft der Zilien wird vermutlich durch die Tatsache, dass die Zilien nach posterior geneigt sind, verursacht (Okada et al. 2005). Im Einklang mit dieser zentralen Rolle der Knotenzilien bei der Determinierung der links-rechts Asymmetrie führen Mutationen, die entweder den Aufbau der Monozilien



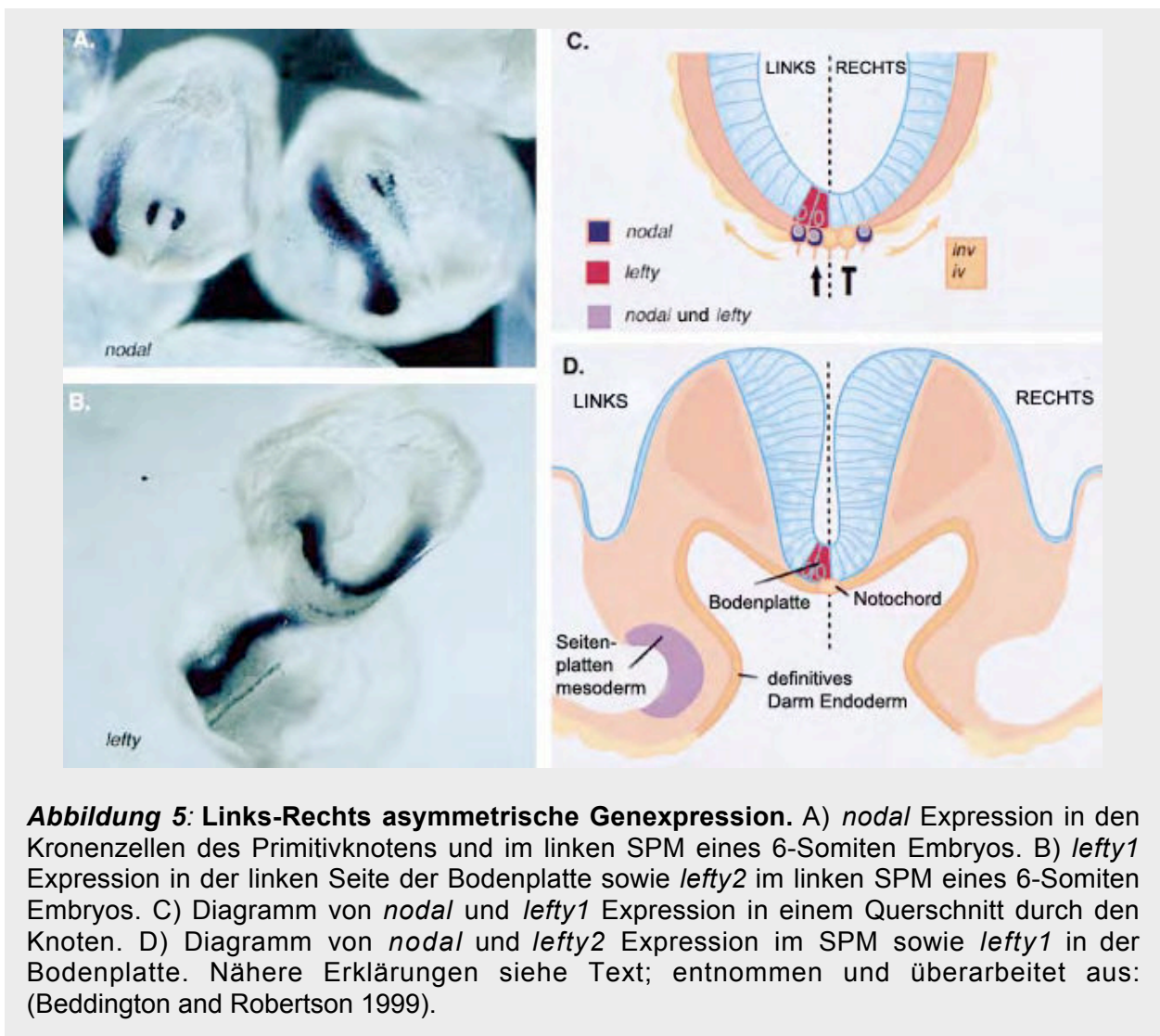
betreffen, ihre sensorische Funktion oder aber auch ihre Beweglichkeit, zur Störungen der Erzeugung der richtigen links-rechts Asymmetrie. Eine andere Mausmutante, der die motilen 9+2 Zilien in den zilientragenden Epithelzellen fehlen, die Hepatocyt nuclear factor/ forkhead homolog 4 defiziente Maus (*HFH<sup>-/-</sup>*), weist eine Randomisierung der links-rechts Asymmetrie auf. Sie besitzen aber die 9+0 Zilien im Knoten (Chen et al. 1998; Brody et al. 2000). *HFH4* ist ein Synonym für *Foxj1*, auf das später noch eingegangen wird (siehe unter 1.9).

Ein Nachweis der Kausalität von Nodal Flow und Lateralität wurde 2002 in der Arbeitsgruppe von Hiroshi Hamada erbracht (Nonaka et al. 2002). Sie kultivierten Mausembryonen unter dem Einfluss eines artifiziellen Flüssigkeitsstroms. Hier wurde in homozygoten *inversus viscerum* (*iv/iv*) mutanten Embryonen, bei denen der Nodal Flow aufgrund von bewegungslosen Zilien fehlt und eine Randomisierung der links-rechts Asymmetrie zur Folge hat, durch den artifiziellen Strom der Phänotyp gerettet. Unter dem Einfluss eines schnellen links gerichteten Stroms entwickelten die kultivierten Embryonen einen normalen Situs. Zusätzlich kann der Nodal Flow als ein allgemeingültiger Mechanismus für den Bruch der bilateralen Symmetrie in der frühen Wirbeltier-Neurula gelten, da andere Säugetierembryonen sowie Embryonen des Frosches *Xenopus laevis* und Zebrafischembryos auch Monozilien im Knoten besitzen (Essner et al. 2002b; Schweickert et al. 2007).

## **2. Phase:** Links-Rechts asymmetrische Genexpression

Die zweite Phase der embryonalen Lateralitätsentwicklung wird durch asymmetrische Genexpression in den Kronenzellen des Primitivknoten, im Seitenplattenmesoderm (SPM) und in der Bodenplatte des Neuralrohrs charakterisiert. Die erste asymmetrische Genexpression in der Maus ist im späten Kopffaltenstadium (E8.0) zu erkennen, wenn durch den Nodal Flow die *nodal* Expression in den Kronenzellen des Primitivknotens linksseitig verstärkt wird. Zum gleichen Zeitpunkt lässt sich in den Kronenzellen auch eine Expression von *dante* (auch *cerl-2* genannt) feststellen. Diese Expression von *dante* ist aber im Gegensatz zur Expression von *nodal* rechtsseitig verstärkt. *Dante* hat eine Schlüsselrolle in der Begrenzung des Nodal-Signalübertragungswegs auf die linke Seite des Mausembryos, indem es die Nodal-Aktivität zusätzlich auf der rechten Seite unterdrückt. Zu den wichtigsten asymmetrisch exprimierten Signalmolekülen gehören in der Maus drei Faktoren der TGF $\beta$ -Familie. Bei diesen drei

Signalmolekülen handelt es sich um *nodal*, *lefty1* und *lefty2*. In den sehr frühen Somitenstadien (E8.25, das entspricht etwa 3 bis 6 Somiten) wird die Expression dieser drei Signalmoleküle ausschließlich in bestimmten Zellpopulationen in der linken Seite des Mausembryos initiiert (siehe Abbildung 5). *Lefty1* ist in den Zellen der linken Bodenplatte des Neuralrohrs stark exprimiert, während *nodal* und *lefty2* im linken SPM koexprimiert sind (Levin et al. 1995; Collignon et al. 1996; Lowe et al. 1996). Ein abweichendes Genexpressionsmuster von *nodal* und/oder *lefty1/2* korreliert in Mutanten sehr eng mit Situs-Anomalien. Ein weiteres asymmetrisch exprimiertes Gen in dieser Kaskade stellt *Pitx2* dar, das zu der bicoid Familie der Homeoboxtranskriptionsfaktoren gehört und ein Zielgen der *nodal / lefty* Signalkette darstellt und für die asymmetrische Organogenese wichtig ist (Gage et al. 1999; Yoshioka et al. 1998).



### 3. Phase: Asymmetrische Organogenese

Im letzten Stadium der Lateralitätsentstehung vollführen die ursprünglich linearen Organe Herz und Darm eine Schleifenbildung, die die Organe in ihre asymmetrische Lage bringt. Räumlich begrenzte Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren (Herz: *eHAND*, *dHAND*) im Herz und Darm (Srivastava et al. 1995), sowie von Komponenten der extrazellulären Matrix, z.B. *flectin*, (Tsuda et al. 1996) und des Cytoskelets, z.B. Aktin, Desmin und Cytokeratine, (Itasaki et al. 1989; Schaart et al. 1989; Price et al. 1996) wurden berichtet. Eine Beteiligung dieser Faktoren bei der Schleifenbildung konnte durch genetische Manipulationen im Hühnchen nachgewiesen werden (Itasaki et al. 1991). Der molekulare Mechanismus dieser asymmetrischen Morphogenese ist bisher jedoch noch unklar. Jedoch konnte die Frage wie die transiente asymmetrische Genexpression in Phase 2 zu positionsgerechter Organentwicklung in Phase 3 führt erhellt werden. Das Homeoboxgen *Pitx2* wurde als ein Mediator von linker Positionsinformation zwischen Phase 2 und Phase 3 identifiziert.

## 1.8 Der Notch-Signalübertragungsweg

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die Interaktion zwischen Delta und Notch auch die Entwicklung der linken und rechten Körperhälfte maßgeblich mitbestimmt. Der Notch-Signalübertragungsweg wurde bislang mit verschiedenen wichtigen Entwicklungsprozessen in Verbindung gebracht. Dazu gehören unter anderen die Skelett- und Nervenentwicklung (Hrabe de Angelis et al. 1997), Spezifikationen in der Bauchspeicheldrüse (endokrine Zellen des Pankreas) (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Edlund 2002), die Muskeldifferenzierung (Schuster-Gossler et al. 2007), die Entwicklung des Blutgefäßsystems (Krebs et al. 2000; Hirashima and Suda 2006) oder der Nieren (Cheng et al. 2007; Rubio-Aliaga et al. 2007). Der Notch-Signalweg spielt auch bei der Bildung der T- und B-Lymphozyten des Immunsystems eine Rolle (Deftos and Bevan 2000); (Guidos 2002); (Lehar and Bevan 2002).

Fehlt in der Maus das Delta1-Molekül vollständig, wird die Entscheidung, wo rechts oder links ist, zufällig getroffen. Die wahrscheinlichste Ursache für diesen Links-Rechts-Defekt ist eine Entwicklungsstörung der Mittellinienstrukturen, die aus dem Primitivknoten/PNC hervorgehen, der ebenfalls Differenzierungsstörungen aufweist. In Mausmutanten, bei denen das *Delta1*- Gen ausgeschaltet ist, erfolgen die

Richtung der Herzdrehung und die Richtung der Embryonalrotation zufällig (Przemeck et al. 2003). Als Ergebnis der fehlerhaften Rotation liegt etwa bei der Hälfte der *Delta1*-Mutanten der Schwanz auf der linken anstatt auf der rechten Körperseite, und neben normal entwickelten Herzanlagen können *Delta1*-Mutanten auch unvollständig gedrehte oder vollkommen seitenverkehrte Herzen haben. Die *Delta1*-Funktion scheint also während der Embryonalentwicklung auch für die korrekte Drehung und die richtige Lage des Herzens erforderlich zu sein. Die links asymmetrische Expression von Genen, wie *nodal*, *lefty2* und *Pitx2* spiegelt in *Delta1*-Mutanten ein mehr oder weniger zufälliges Muster wider, da sowohl eine nur linksseitige oder rechtsseitige oder beidseitige als auch gar keine Expression für alle drei Gene beobachtet werden konnte (Przemeck et al. 2003). *Lefty1*, das normalerweise nur in der linken Seite der Bodenplatte des Neuralrohrs – dem späteren Rückenmark – exprimiert wird und verhindern soll, dass die Information „hier ist links“ auch an die rechte Seite weitergegeben wird, ist in *Delta1*-Mutanten nicht exprimiert. Die Bodenplatte des Neuralrohrs bildet mit dem darunter liegenden Notochord die Mittellinie des Embryos, die auch als eine physikalische Barriere zwischen linker und rechter Körperhälfte verstanden werden kann. In *Delta1*-Mutanten sind die Strukturen der Mittellinie gestört, was sich in einer veränderten Expression von Markergenen (*lefty1*, *Foxa2* und *T*) für die Bodenplatte und das Notochord ausdrückt. Aber auch morphologische Veränderungen lassen sich bei *Delta1*-Mutanten beobachten. Die Anzahl von Zellen in der Bodenplatte ist signifikant erhöht, während die Zahl der Zellen im Notochord deutlich verringert ist. Neben den molekularen zeigen *Delta1*-Mutanten also auch morphologische Defekte in der Mittellinie. Die entwicklungsbiologische Quelle der Mittellinienstrukturen ist der Primitivknoten, der sehr früh im Embryo angelegt wird und auch als zentraler Organisator der Entwicklung verstanden werden kann. Im Rasterelektronenmikroskop ist zu erkennen, dass der Primitivknoten von *Delta1*-Mutanten zu verschiedenen Entwicklungsstadien deutliche Veränderungen der Feinstrukturen bevor „links“ von „rechts“ überhaupt unterschieden werden kann, aufweist. Der Primitivknoten ist ungleichmäßig geformt und enthält zusätzliche, große Zellen ohne Zilien, was insgesamt gesehen eine gleichmäßige Fruchtwasserbewegung eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Diese frühen Störungen lassen vermuten, dass *Delta1* somit auch an der Differenzierung des Primitivknotens entscheidend beteiligt

ist. Tatsächlich sind alle untersuchten Gene des Notch-Signalübertragungswegs zum Zeitpunkt der Entstehung des Primitivknotens in ihm oder um ihn herum angeschaltet, was für die Beteiligung an der Entstehung des Primitivknotens spricht. In Mutanten, die kein funktionsfähiges Delta1- Molekül besitzen, sind dagegen die Gene *Notch1*, *Notch2* und *Lunatic fringe (Lfn)* entweder diffus oder sogar über den ganzen Embryo verteilt exprimiert (Przemeck et al. 2003). Der evolutionär hoch konservierte Delta-Notch-Signalweg ist an vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt und tritt oft dann in Aktion, wenn Strukturen voneinander abgegrenzt werden müssen oder wenn Entscheidungen über das weitere Entwicklungsschicksal von Zellen getroffen werden.

### 1.9 Der Transkriptionsfaktor *Foxj1*

FOXJ1 (auch als HFH-4 bekannt) ist ein Mitglied der Forkheadbox (F-box)-Familie der Transkriptionsfaktoren, die durch ihre konservierte 100 AS große DNA-Bindedomäne charakterisiert werden (Hackett et al. 1995). *Foxj1* ist im zilienbesetzten Respirationstrakt, in den Eileitern des weiblichen Reproduktionstrakts (Ovidukt), im zentralen Nervensystem und zusätzlich früh in der Embryonalentwicklung im PNC/ Primitivknoten exprimiert (Hackett et al. 1995; Lim et al. 1997; Pelletier et al. 1998; Blatt et al. 1999; Tichelaar et al. 1999). Gezielte Mutagenese des *Foxj1* Gens in der Maus führte zu einer Abwesenheit der 9+2 Axonemstrukturen in den Zellen des Respirationsepithels. Zusätzlich war eine Fehllokalisierung der Basalkörperchen in diesen Zellen zu beobachten (Chen et al. 1998; Brody et al. 2000), die normalerweise unter der apikalen Epithelzelloberfläche zu finden sind. Zusätzlich weisen homozygote *Foxj1* defiziente Mäuse, wie bereits erwähnt (siehe Seite 16), eine zufällige Determinierung der Links-Rechts Asymmetrie auf (Chen et al. 1998; Brody et al. 2000). Defekte im Aufbau der Zilien in der Knotenregion wurden bisher nicht beschrieben. Es wurde aber gezeigt, dass in Zellen des Respirationsepithels die Basalkörperchen der Mutanten tief im Zytoplasma lokalisiert sind. Dies wurde auf einen Defekt im Verankerungsprozess der Basalkörperchen an die apikale Seite des Zytoskeletts zurückgeführt (Gomperts et al. 2004). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass *Foxj1* eine allgemeinere Funktion in der Programmierung der Lokalisation von Membranproteinen an die apikale Seite von epithelialen Zellen besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass in

ausdifferenzierten Epithelzellen apikales Ezrin und Moesin nur in den zilientragenden Zellen exprimiert ist und nicht in den sekretorischen Epithelzellen des Respirationstrakts, und dass *Foxj1* ganz spezifisch für die apikale Lokalisierung von Ezrin, nicht aber von Moesin, gebraucht wird (Huang et al. 2003). Die *Foxj1* mutanten Zellen des Respirationstrakts, die kein apikales Ezrin aufwiesen, hatten auch kein ERM-assoziiertes EBP50 (Huang et al. 2003). *Foxj1* ist also notwendig für die apikale Lokalisation von Ezrin (*Villin2*) und entscheidend für apikal lokalisierte Proteinkomplexe.

### 1.10 Ezrin, ein Protein der ERM-Familie

Ezrin gehört zur Protein4.1-Superfamilie und bildet zusammen mit Radixin und Moesin eine Unterfamilie, die als ERM-Familie bezeichnet wird (Tsukita et al. 1994; Mangeat et al. 1999). Die ERM-Proteine sind wie Protein4.1 Membran-Zytoskelett-Verknüpfungproteine. Ezrin kommt in verschiedenen Epithelzellen vor und ist dort meist apikal lokalisiert (Hanzel et al. 1989; Hanzel et al. 1991). Für die Funktionen von Ezrin spielt die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren eine entscheidende Rolle (Nakamura and Ozawa 1996; Matsui et al. 1998). Es besitzt C und N-terminale-Assoziations-Domänen, welche die Bildung von Dimeren und Oligomeren ermöglichen und die für die Bindung an Aktin und möglicherweise auch an weitere Proteine wichtig sind. Im nicht-phosphorylierten Zustand sind die Assoziations-Domänen durch Faltung innermolekular maskiert und die Bindung an Aktin sowie aneinander ist nicht möglich oder erschwert. Eine Phosphorylierung führt zur Entfaltung der Assoziations-Domänen und so zur Aktivierung der Ezrinmoleküle. Diese können nun dimerisieren oder auch oligomerisieren; dies scheint eine Voraussetzung für die Translokation zum apikalen Zellpol zu sein (Chen et al. 1995; Kondo et al. 1997). Durch Phosphorylierung aktiviertes Ezrin bindet an Aktin und beteiligt sich an der Ausbildung von Mikrovilli und anderen Membranauffaltungen (Oshiro et al. 1998; Shaw et al. 1998). Darüber hinaus besitzt Ezrin Bindungsstellen für verschiedene Membranproteine wie CD44, die Interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, 2, 3) und die H<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-ATPase (Serrador et al. 1997; Tsukita et al. 1997; Heiska et al. 1998; Yonemura et al. 1998). Die Bindung von Ezrin an Proteine mit mehreren Transmembrandomänen durch ein weiteres Adaptermolekül vermittelt. EBP50 (ERM bindendes Phosphoprotein von 50kDa) wurde in Epithelien mit Ezrin

kolokalisiert gefunden (Reczek et al. 1997). EBP50 besitzt zwei PDZ-Domänen und verfügt über Bindungsstellen für Ezrin und für zytoplasmatische Domänen verschiedener Membranproteine (Hall et al. 1998).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Häufig verwendete Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, im größtmöglichen Reinheitsgrad von den im Folgenden aufgelisteten Firmen bezogen. Des Weiteren wurden auch andere Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen:

ABgene (Epsom, UK)  
Amersham Biosciences (Freiburg)  
AppliChem GmbH (Darmstadt)  
Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg)  
Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching)  
Biozym GmbH (Hessisch Oldendorf)  
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)  
Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, France)  
DAKO Diagnostika GmbH (Hamburg)  
Dianova GmbH (Hamburg)  
Eppendorf GmbH (Köln)  
Greiner Bio-One GmbH (Solingen)  
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG (Wehrheim)  
Invitrogen GmbH (Karlsruhe)  
Leica GmbH (Hamburg)  
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)  
MBI-Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)  
Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig)  
Merck KGaA (Darmstadt)  
MWG-Biotech GmbH (Ebersberg)  
New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)  
Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)  
PerkinElmer (Boston, USA)  
Polysciences, Inc. (Warrington, USA)  
Promega GmbH (Mannheim)  
Qiagen GmbH (Hilden)



Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)

Sarstedt (Nümbrecht)

Sigma Aldrich Chemie GmbH (München)

Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)

Die Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen.

### 2.1.2 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt:

Textverarbeitung: *Word v. X 2001* (Microsoft); *Reader 6.0* (Adobe)

Bildverarbeitung: *Photoshop 7.0 und CS* (Adobe), *Illustrator CS* (Adobe) und *Freehand 10* (Macromedia Inc.)

Literaturverwaltung: *EndNote X* (Wintertree Software)

Bilderstellung: *Leica FireCam Version 1.7.1* (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd UK); *FUJIFILM Photograb-300Z* (FUJI Photo Film Co, Ltd.); *FUJIFILM Image Reader Version 1.8E* (FUJI Photo Film Co, Ltd.); *Graphic Converter V 4.5* (Lemke Software GmbH)

Sequenzauswertung: *MacVector<sup>TM</sup> 7.2* (Accelrys Inc.)

Statistik: *Prism<sup>®</sup>* (GraphPad)

Internetrecherche: *Netscape Communicator 7.1* (Netscape Communications Corporation); *Safari Version 2.0.4* (Apple Computer, Inc.)

### 2.1.3 Datenbanken

Auf folgende Datenbanken wurde im Rahmen dieser Arbeit zugegriffen:

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>),

MGI (<http://www.informatics.jax.org/>),

ExpASy (<http://www.expasy.org/>),

FANTOM (<http://fantom2.gsc.riken.go.jp/>),

Celera (<http://www.celera.com/>)

#### 2.1.4 Klonierungsvektoren und Wirtsbakterien

Als bakterielle Klonierungsvektoren wurden in der Regel die kommerziell erhältlichen Plasmide pBluescriptII KS (+/-) (Stratagene), pNEB193 (New England Biolabs), pSL1180 (Amersham), pCR-TOPO<sup>®</sup>XL, pCRII-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) und pGem<sup>®</sup>T-Easy (Promega) benutzt. Als Wirtsbakterien dienten die *Escherichia-coli*-Variante *Epicurian coli* XL1-blue (Stratagene), XL10-Gold, SCS110 und *Epicurian coli* SURE (Stratagene) sowie OneShot<sup>®</sup> TOP10 (Invitrogen).

#### 2.1.5 Bestandteile des Targeting-Konstrukts und verwendete Plasmide

Die im *Noto*<sup>GFP</sup>(+neo)-Targeting-Konstrukt (siehe Abbildung 6) für die negative Selektion verwendete Diphtherie-Toxin-Selektionskassette (DT) stammt aus dem pKOSelectDT aus der pKO Scrambler Series<sup>™</sup> (Lexicon Genetics Incorporated). Das 1,2 kb, Rsr II-Fragment, beinhaltet den Promotor der RNA-Polymerase II gefolgt von der cDNA der Diphtherie Toxin-A-Kette und dem SV40 Polyadenylisierungssignal (PolyA). Die cDNA des verstärkt grün fluoreszierenden Proteins aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (eGFP = „enhanced green fluorescent protein“) gefolgt vom SV40 Polyadenylisierungssignal, was einem 0,96 kb großen Nco I -Pac I-Fragment entsprach, stammte aus dem pIRES2-EGFP Vektor (Clontech). Die Pac I-Schnittstelle war in diesem Ursprungsvektor nicht vorhanden. Sie wurde aus einer Afl III-Schnittstelle generiert. Des Weiteren wurde im *Noto*<sup>GFP</sup>(+neo)-Targeting-Konstrukt für die positive Selektion eine mit „loxP“-Erkennungssequenzen flankierte Neomycinresistenz-Selektionskassette verwendet. Diese Kassette beinhaltet den PGK-Promotor, die cDNA des Neomycinresistenzgens und das SV40 PolyA.

#### 2.1.6 Bakteriennährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
LB-Medium	für 1 Liter: 10g Bacto- Trypton; 5g Hefe- Extrakt; 5g NaCl; mit H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren. Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren Antibiotika (100 µg/ml Ampizillin oder 25 µg/ml Kanamycin) zugesetzt.

LB-Agarplatten	wie LB-Medium; zusätzlich 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugeben, nach dem Autoklavieren gießen und die entsprechenden Antibiotika erst kurz vor dem Gießen zusetzen („handwarm“)
----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Bakteriennährmedien

### 2.1.7 Oligonukleotide und Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH bezogen. Sämtliche molekularbiologischen Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, MBI Fermentas, Stratagene, oder Roche Diagnostics GmbH bezogen. Die Starteroligonukleotide (Primer), die zur Vervielfältigung (Amplifikation) von langen genomischen DNA-Fragmenten aus dem *Noto*-Lokus (notwendig für das Klonieren der Konstruktflanken) zum Einsatz kamen, sowie die Primer für die Amplifikation der 5'- und 3'-externen Southern-Sonden und das Primerpaar für das Durchsuchen der elektroporierten embryonalen Stammzellklone (ES-Zellklone), sind in der anschließend dargestellten Tabelle aufgelistet:

Name	5'-Primer (5'→3')	3'-Primer (5'→3')
Nco-mut	TCC CAG GAA CTC AGC GTA G	GCT GGC CAT GGC GCG AC
NotoLR1	TCC CAG GAA CTC AGC GTA G	TGT TTG CCA CAT AGC ACG
NotoLR2	CTG TCT TCT GGT TCG GTG	GTG GCT CAC AAT CTG TAA TG
NotoLR3	TCT TTC TCT CTC TCT TGC TCT CTC G	TTT CTG CTT ACA GGT TAC AGT CCG
NotoLR5	ACA TCT TTA GTA TCA GCG GTC	GGG TGG CAG AGA AAA CG
5'Sonde	TCT GTG GTT TGG GCT GTT GG	ATG GTC AGT GTG GGC TAT GTA GGG
3'Sonde	TAA GAG TTT TGG GGT GGG	AGA ACT GGG CAA AGG GAC
ESsreen	TGT CAC GTC CTG CAC GAC G	CAG CAA TCT CTC CAG TTT TTA TAC G

**Tabelle 2:** Auflistung der Primer, die in dem Zusammenhang mit der Herstellung des Knockouts benutzt wurden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Primer angeführt, die für die Genotypisierung der Mäuse und Embryonen verwendet wurden.

Name	5'-Primer (5'→3')	3'-Primer (5'→3')
wt-Allel	TGA CCA CCT CTC TCT CTC CCA TTG	CCA CCG CTT CCA TAC TGA TAC C
+neo-Allel	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG	ATA ACT TCA AGG GAA AAT AGG GGG
Δneo-Allel	GAG CAA AGA CCC CAA CGA GAA G	GCA ACC CAC ACA CAT AAA AAG GAG

**Tabelle 3:** Auflistung der Primer, die zur Genotypisierung benutzt wurden.

### 2.1.8 *In situ* Hybridisierungssonden

Die unten aufgeführten Plasmide enthalten mausspezifische cDNA-Insertionssequenzen. Angegeben sind der Genname, der Name des verwendeten Klonierungsvektors, das Enzym zum Linearisieren des Vektors, die RNA-Polymerase für die Synthese der Gegenstrang-RNA sowie die Bezugsquelle für das Plasmid.

Genname	Vektor	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase	Bezugsquelle
<i>Brachyury T</i>	pBS II SK	BamH I	T7	Gossler Labor
<i>dante (cerl-2)</i>	pBS II KS	EcoR I	T7	José António Belo
<i>Dll1</i>	pBS II SK	Xho I	T3	Gossler Labor
<i>Dnahc5</i>	pBS II SK	EcoR I	T3	Andreas Kispert
<i>Dncl2b</i>	pBS II SK-ZX	Pac I	T3	diese Arbeit
<i>Dnahc11</i>	pBS II KS	Hind III	T7	Martina Brückner
<i>Fgf8</i>	pBS II SK	Pst I	T7	Gail R. Martin
<i>Foxa2</i>	pGem3	Hind III	T7	Janett Rossant
<i>Foxj1</i>	pCRII	Hind III	T7	Brian P. Hackett
<i>Gbx-2</i>	pBS II SK	Sal I	T3	Andreas Kispert
<i>gfp</i>	pSP 73	BamH I	SP6	Gossler Labor
<i>Krox20</i>	pGem 4	EcoR I	T7	Andreas Kispert

Genname	Vektor	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase	Bezugsquelle
<i>lefty1</i>	pBS II KS	Pst I	T3	diese Arbeit
<i>lefty2</i>	pBS II SK	EcoR I	T7	Martin Blum
<i>Moesin</i>	pBS II SK	Sal I	T3	diese Arbeit
<i>nodal</i>	pBS II	BamH I	T7	Janet Rossant
<i>Noto</i>	pGem-T easy	Sac II	SP6	diese Arbeit
<i>Nphp3</i>	pBS II KS	Xho I	T7	Andreas Kispert
<i>Otx2</i>	pGem 3	Sal I	T7	Andreas Kispert
<i>Pitx2</i>	pBS II SK	Sac I	T3	Andreas Kispert
<i>Radixin</i>	pBS II SK	EcoR I	T3	diese Arbeit
<i>Rfx3</i>	pBS II KS	EcoR I	T7	Bénédicte Durand
<i>Shh</i>	pBS II SK	Hind III	T3	Andy McMahon
<i>Villin2</i>	pBS II SK	Kpn I	T3	diese Arbeit

**Tabelle 4:** Auflistung der für die Gegenstrangsynthese verwendeten Plasmide

### 2.1.9 Verwendete Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen wurden mit deionisiertem oder bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt und zum größten Teil autoklaviert oder sterilfiltriert. In der nachfolgenden Tabelle sind alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet. In dieser Tabelle ist die Zusammensetzung angegeben und teilweise kurz beschrieben, wie sie hergestellt wurden.

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
10x PCR-Reaktionspuffer	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH8,8; 0,1% Triton X-100
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 (bzw. pH 4,5)
50x TAE	2 M Tris-HCl, pH 8,0; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
6x DNA-Ladepuffer	50% Glycerin, 0,25% Orange G in 1x TAE
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC wurden in ddH <sub>2</sub> O angesetzt, danach über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert
4% PFA/PBS	4 g PFA auf 100 ml DEPC-H <sub>2</sub> O + ein paar Tropfen NaOH (10N); auf 55°C erhitzen bis PFA gelöst; auf Eis abkühlen und mit HCl auf pH 6-7 einstellen (Indikatorpapier)
10x PBS pro Liter:	80 g NaCl; 2 g KCl; 6,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,9 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; WISH: pH 7,3 bzw. IHC: pH 7,5 eingestellt
PBT	PBS + 0,1% Tween-20
1M Na-Phosphatpuffer	pH 6,7: 435 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 565 ml 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Church (Southern)	300mM NaP <sub>i</sub> ; 5mM EDTA; 7% (v/v) SDS
Wash II (Southern)	40mM NaP <sub>i</sub> ; 1% (v/v) SDS
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
10x TBS pro Liter	80 g NaCl; 2 g KCl; 250 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5
10x TBST	90 ml 10x TBS + 10 ml Tween-20
RNaseA	RNaseA in der Konzentration 10 µg/µl in 0,01 M NaAc, pH 5,2 lösen; 15 min auf 100°C aufkochen; langsam auf RT abkühlen lassen; pH mit 0,1 vol. 1 M Tris-HCl, pH 7,4 einstellen. → Aliquots bei -20°C
P1 Puffer (Plasmidpräp.)	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA
P2 Puffer (Plasmidpräp.)	200 mM NaOH; 1% (v/v) SDS im Plastikgefäß!
P3 Puffer (Plasmidpräp.)	3 M KAc; auf pH 5,5 mit konz. Essigsäure einstellen
Proteinase-Puffer (WISH)	20 mM Tris-HCl, pH 7; 1 mM EDTA

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
Alcian blau/ Alzarin Rot-Färbelösung für Skelettpräparationen	1vol 0,3% AlcianBlau8GX (Sigma #3157) / 70% Ethanol 1vol. 0,1% Alzarin Rot S (Sigma #5533) / 95% Ethanol; 1vol. Eisessig; 17 vol. 100% Ethanol
Proteinase-Puffer (WISH)	20 mM Tris-HCl, pH 7; 1 mM EDTA
Hybridisierungspuffer (WISH+ F-WISH)	50% Formamid; 5x SSC, pH 4,5; 1% (v/v) SDS; 50 µg/ml tRNA; 50 µg/ml Heparin
Waschlösung I (WISH)	50% Formamid, 5x SSC, pH 4,5; 1% SDS
Waschlösung II (WISH)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1% Tween-20
Waschlösung III (WISH)	50% Formamid; 2x SSC pH 4,5
Waschlösung III (F-WISH)	50% Formamid; 2x SSC pH 4,5; 1% SDS; 0,1% Tween-20; pH 7,5)
MABT (WISH)	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH7,5
MABTL (WISH)	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20; 2 mM Levamisol; pH 7,5
TNT (F-WISH)	0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween-20
Blocking-Lösung (WISH)	20% Schafserum in MABT/ 2% BBR (Roche #1096176)
Blocking-Lsg. (F-WISH)	20% Schafserum in TNT/ 2% BBR (Roche #1096176)
NTMT (WISH)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20
Proteinase K Puffer (DNA-Präp.)	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 0,5% (v/v) SDS; 200µg/ml Proteinase K
NTMT (WISH)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20
Wasch Puffer (IHC)	50 mM Tris-HCL, pH 7,5; 300 mM NaCl; 0,1% Tween-20

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
Eosin-Färbelösung für 180 ml	20 ml 2% Eosin G/ H <sub>2</sub> O; 150 ml Ethanol; 2 ml konz. Essigsäure; 8 ml H <sub>2</sub> O
Peroxidase Blocking Puffer (IHC)	120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 43 mM Zitronensäure; 30 mM NaN <sub>3</sub> ; 0,2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> frisch zugeben
0,2 M Cacodylat-Puffer	250 ml ddH <sub>2</sub> O + 20,15 g Natrium cacodylat trihydrat + 0,1 ml HCl (sollte pH 7,4 haben)

**Tabelle 5:** Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen.

### 2.1.10 Verwendete Antikörper für die Immunhistologie

Primärantikörper	Firma	Sekundärantikörper	Firma
Maus <b>anti-Ezrin/p81/80K Cytovillin Ab-1 (3C12)</b>	Lab Vision	Schaaf anti-Maus IgG-HRP	Amersham Biosciences
Kaninchen <b>anti-EBP50</b>	ABR Affinity BioReagents	Affe anti-Kaninchen IgG-HRP	Amersham Biosciences
Kaninchen <b>anti-phospho-Ezrin/ Radixin/Moesin</b>	Chemicon	Affe anti-Kaninchen IgG-HRP	Amersham Biosciences

**Tabelle 6:** Auflistung der Antikörper, die für die Immunhistologischen Analysen benutzt wurden und die benutzten Sekundärantikörper.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen – Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen binden spezifisch und schneiden doppelsträngige DNA an definierten Erkennungsstellen. Die Restriktionsenzyme wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden bei der empfohlenen Temperatur (meist 37°C) für ca. 1 h im Heizblock oder Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt



und analysiert (siehe 2.2.5). Gegebenenfalls wurden entsprechende DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.2.6).

### **2.2.2 Partieller Restriktionsverdau**

Für die Klonierung des *Noto*<sup>GFP</sup>(+neo)-Targeting-Konstrukts war ein partieller Restriktionsverdau notwendig. Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen ausgetestet. Dafür wurden 10 µg DNA des Ausgangsplasmids in einem 100 µl Ansatz bei 37°C inkubiert. Es wurden dabei 10 U Enzym benutzt. Nach 3, 5, 7 bzw. 9 min wurde jeweils ein Aliquot von ca. 15 µl in je ein auf 65°C erhitztes Reaktionsgefäß, zum Abstoppen der Enzymaktivität, gegeben. Es folgte die Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese wie beschrieben (siehe 2.2.5). Daran ließ sich erkennen nach welcher Inkubationszeit die meiste Menge des gewünschten Fragments auszuschneiden war.

### **2.2.3 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA**

Die alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Hydrolyse des 5'-Phosphatrestes von DNA, RNA und Nukleotidtriphosphaten. Das durch die Dephosphorylierung produzierte 5'-OH Ende kann nicht mehr mit dem 3'-OH Ende religieren. Die Dephosphorylierung wurde üblicherweise direkt im Anschluss an die Restriktionspaltung durch Zugabe von 1 µl Shrimps Alkaline Phosphatase (Roche, Mannheim) in den Restriktionsansatz für 1h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung des Enzyms (10 min, 65°C) gestoppt und danach wurden die dephosphorylierten Plasmide über ein Agarosegel elektrophoretisch gereinigt und für die Ligation (siehe 2.2.9) eingesetzt.

### **2.2.4 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden**

Falls die Enden von DNA-Fragmenten mit den gewünschten Restriktionschnittstellen im Vektor nicht kompatibel waren, wurden sie durch Behandlung mit der T4-DNA Polymerase aufgefüllt. Zu diesem Zweck wurde der Restriktionsansatz, nach der Spaltung mit den jeweiligen Enzymen, mit ca. 1 U T4-DNA-Polymerase von Roche und den Desoxyribonukleotiden (dNTPs, 1 mM Endkonzentration) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung der Enzyme (10 min, 70°C) abgestoppt und die DNA-Fragmente über ein Agarosegel elektrophoretisch gereinigt.

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente verschiedener Größen lassen sich durch Gelelektrophorese voneinander trennen. Die Art bzw. Konzentration der Agarose bestimmt das Auflösungsvermögen der zu trennenden DNA. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge der Agarose in Laufpuffer (1x TAE siehe Tabelle 5) unter Kochen in einem Mikrowellengerät gelöst, mit Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) versetzt und in eine Gelgießkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (siehe Tabelle 5) versetzt und in die Geltaschen hinein pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 80-140 V durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert während des Laufs in die DNA, weshalb die Auftrennung der DNA-Fragmente anschließend unter UV-Licht (254 nm oder 312 nm) sichtbar gemacht werden kann. Zur Größenbestimmung einzelner DNA-Fragmente dienen Standards definierter Fragmentlängen. Wenn nicht anders angegeben wurde die 1 kb DNA-Leiter (Fa. Invitrogen) verwendet.

### 2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde der „NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Das Prinzip dieses Reinigungsverfahrens beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran unter hohen Salzkonzentrationen. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (312 nm) ausgeschnitten. Das Agarosegelstück wurde zunächst im 2-fachen Überschuss (200 µl pro 100 mg Agarosegelstück) einer Salz-Lösung bei 50°C aufgelöst. Die Lösung mit der DNA und der solubilisierten Agarose wurde dann auf eine Säule gegeben und mittels Zentrifugation durch das Säulenmaterial gepresst, wobei die DNA an die Silikamembran bindet. Nach einem Waschschriff mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer wurde die DNA mit TE-Puffer von der Säule eluiert.

### 2.2.7 Phenol/Chloroform- Extraktion

Unerwünschte Verschmutzungen in Nukleinsäurelösungen und dabei insbesondere Verunreinigungen durch Proteine, wurden mit der klassischen Methode der Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die Nukleinsäurelösungen wurden mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1(v/v)) ausgeschüttelt, kurz mit maximaler

Drehzahl zentrifugiert und die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden durch Präzipitation der Nukleinsäuren (siehe 2.2.8) verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt und die Nukleinsäuren in Tris-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.8 Präzipitation von Nukleinsäuren (DNA oder RNA)**

Einer wässrigen Nukleinsäure-Lösung wurden 0,1 Volumenanteil einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2,5 Volumenanteile 100% Ethanol zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde die präzipitierte DNA/RNA abzentrifugiert (15 min; 13200 rpm). Das Nukleinsäure-Pellet wurde noch mind. einmal mit 70% Ethanol gewaschen, danach für ca. 10 min getrocknet und anschließend in Tris-Puffer (DNA) oder RNase-freiem (bei RNA) Wasser aufgenommen. Alternativ wurde bei zu großen Volumina mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol präzipitiert. Hierbei musste aber noch mindestens zweimal mit 70% Ethanol gewaschen werden. Bei geringen Mengen an zu fällenden Nukleinsäuren wurde durch die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Glycogenlösung die Effizienz der Präzipitation gesteigert.

### **2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA**

Die Ligation ist ein Verfahren bei dem das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit Hilfe eines Enzyms, der Ligase, verbunden werden. Sämtliche Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) durchgeführt. Für eine Standard-Ligation wurden, nach Kontrolle der Mengen der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese, ca. 25-50 ng Vektor- DNA und das zu klonierende DNA-Fragment im 3 bis 5 fachen Molaren Überschuss eingesetzt. Bei einem 10  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz wurden 1  $\mu\text{l}$  10x Ligasepuffer sowie 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (400 Einheiten/ $\mu\text{l}$ ) zugegeben und die Reaktion für 1-4 Stunden bei RT (für kohäsive Enden), oder ÜN bei  $16^{\circ}\text{C}$  (für glatte Enden) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde entweder ohne weitere Behandlung (je 2  $\mu\text{l}$ ) oder erst präzipitiert und dann komplett zur Transformation eingesetzt.

### **2.2.10 Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter Bakterien**

Elektrokompetente Zellen wurden mit verschiedenen Bakterienstämmen hergestellt. Hierbei wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer 20 ml ÜN-Bakterienvorkultur angeimpft (1:100 verdünnt) und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,9 geschüttelt. Alle

weiteren Schritte wurden in mit ddH<sub>2</sub>O gewaschenen, autoklavierten und auf Eis vorgekühlten Zentrifugenbechern im Kühlraum durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde 15 min auf Eis gekühlt, dabei mehrfach geschwenkt, um gleichmäßige Kühlung zu erreichen, anschließend auf zwei Zentrifugenbecher verteilt (2 x 250 ml) und bei 4500 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Bakterien in 2 x 10 ml eiskaltem Zellkulturwasser vorsichtig resuspendiert, auf je 400 ml aufgefüllt und anschließend auf vier 200 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und erneut abzentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4°C). Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Jedes Pellet wurde dann in 20 ml 10% (v/v) eiskaltem Glycerin resuspendiert und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dies wurde bei 4500 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und die erhaltenen Bakterienpellets zuletzt in je 2 ml 10% Glycerol resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots in auf Trockeneis vorgekühlte 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen portioniert und bei –80°C gelagert. Zur Transformation wurden Aliquots auf Eis aufgetaut und salzfreier (DNA-Präzipitation war teilweise notwendig) Ligationsansatz dazu pipettiert. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) gegeben. Die Elektroporation wurde in einem *MicroPulser* (Biorad) mit der Einstellung Ecl2 (2,5 kV) durchgeführt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 300 µl LB-Medium (bei transformierten Plasmiden, 900 µl) in die Elektroden-Küvette pipettiert, die Bakteriensuspension wieder entnommen und 1 h bei 37°C vorinkubiert (bei elektroporierten Plasmiden war keine Vorinkubation notwendig). Schließlich wurden verschiedene Verdünnungen des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert, die, je nach Plasmidtyp, Ampizillin oder Kanamycin zur Selektion enthielten.

### **2.2.11 Identifizierung rekombinanter Kolonien**

Um zu überprüfen ob eine Bakterienkolonie ein Plasmid mit dem richtigen Ligationsprodukt in der richtigen Orientierung trägt wurde das Plasmid isoliert (siehe 2.2.12) und durch einen Restriktionsverdau (siehe 2.2.1) und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.5) überprüft.

### **2.2.12 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation von Plasmiden im Mini-Ansatz wurden 3 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampizillin oder 25 µg/ml Kanamycin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie

angeimpft und in einem Reagenzglas über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde bei 5400 rpm für 7 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl P1-Puffer (siehe 2.1.9) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer (siehe 2.1.9) für 3-5 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl P3-Puffer (siehe 2.1.9) 10 min auf Eis neutralisiert. Das Präzipitat aus Zelltrümmern und genomischer DNA wurde durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 min) pelletiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit 450 µl Isopropanol versetzt, gemischt und abzentrifugiert (13200 rpm, 15 min). Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, für 10 min getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die DNA-Ausbeuten lagen zwischen 5 und 10 µg. Größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden mit „GenElute™ Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Sigma nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden bei diesen Methoden ebenfalls alkalisch lysiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt jedoch mit einer Anionen-Austauscher-Säule. Dieses Verfahren ermöglicht die schnelle Präparation homogener Plasmid-DNA bis zu einer Menge von ca. 50-75 µg (aus 5 ml Bakterienkultur).

### **2.2.13 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt. Das zu sequenzierende Plasmid wurde in der benötigten Menge als getrocknetes Pellet der Firma zugeschickt.

### **2.2.14 Southern-Blot Hybridisierung**

Zur Verifizierung der per PCR positiv detektierten, 3'-homolog rekombinierten ES-Zellklone (siehe 2.2.18) wurde eine Analyse mittels der Southern-Blot Hybridisierungs-Technik (Southern 1975; Chomczynski and Qasba 1984) durchgeführt. Die mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaute ES-Zell-DNA wurde auf Agarosegelen aufgetrennt und mit Längenstandards fotografiert. Das Gel wurde 15 min lang mit 0,2 M HCl behandelt. Diese Depurinierung verbessert die Effizienz, mit der große Fragmente auf die Membranen transferiert werden. Danach wurde das Gel zweimal für je 20 min in Denaturierungslösung (siehe Tabelle 5) behandelt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembranen (Hybond-N, Fa. Amersham) erfolgte in einem Transferstapel (Sambrook et al. 1989). Dieser bestand aus zwei Lagen Whatman 3-MM-Papier, die

in das Pufferreservoir eintauchten, drei weiteren Lagen Whatman 3-MM-Papier, gefolgt vom Agarosegel, der Nylonmembran und als oberste Schicht wieder drei Lagen Whatman 3-MM-Papier. Der Flüssigkeitsstrom erfolgte aus den unteren mit Denaturierungslösung durchtränkten Whatman-Papierlagen in einen oben aufliegenden Fließpapierstapel, der mit einem leichten Gewicht beschwert wurde. Der Transfer wurde nach ca. 13 h (über Nacht) beendet. Die Nylonmembranen wurden für 20 min in 50 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (siehe Tabelle 5) gespült und zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese in einem UV-Crosslinker (Fa. Stratagene) mit einer UV-Bestrahlung von 1200 J an die Nylonmembran quervernetzt.

#### **2.2.15 Herstellung radioaktiv (<sup>32</sup>Phosphor- $\alpha$ -dCTP) markierter DNA-Sonden**

Radioaktiv markierte DNA- Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein 1983) durch Einbau von  $\alpha$ -(<sup>32</sup>P)dCTP durch das Klenow-Fragment der DNA- Polymerase I bei der Synthese von zufällig geprimter DNA gewonnen. Es wurden die Komponenten des „Prime-It<sup>®</sup> II Random Primer Labeling Kits“ (Fa. Stratagene) folgendermaßen benutzt: 25 ng eines DNA-Fragments wurde mit 10  $\mu$ l der Lösung mit Zufallshexameren („Primer solution“) in einem Gesamtvolumen von 33  $\mu$ l (mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt) für 5 min gekocht. Dazu wurden 10  $\mu$ l Markierungspuffer, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -(<sup>32</sup>P)dCTP und 1  $\mu$ l Exo(-)Klenow- Enzym (5 Einheiten/ $\mu$ l) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1 h (meistens über Nacht) bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Fällung des Reaktionsansatzes (siehe 2.2.8) beseitigt. Das markierte DNA-Pellet wurde in 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 1  $\mu$ l davon in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (LS 6000SE; Fa. Beckman) gemessen. Die markierte DNA wurde direkt vor der Zugabe zu der Hybridisierungs-Lösung (siehe Tabelle 5) durch 5 minütiges Kochen denaturiert.

#### **2.2.16 Hybridisierung von Southern-Blot-Membranfiltern**

Die Membranfilter mit den immobilisierten Nukleinsäuren (siehe 2.2.14) wurden in Glasröhren überführt, ganz kurz bei 65°C im vorgewärmten Wash II (siehe Tabelle 5) inkubiert und anschließend für ca. 3 h bei 65°C mit ca. 20 ml vorgewärmter Vorhybridisierungslösung (Church-Lösung siehe Tabelle 5) unter ständiger Bewegung im Hybridisierungsöfen abgesättigt. Die Hybridisierungslösung (Church-Lösung) wurde mit  $2 \times 10^6$  cpm/ml radioaktiv markierter Sonde (siehe 2.2.15)

versetzt und für 10 min gekocht. Die Vorhybridisierungslösung wurde verworfen und der Membranfilter über Nacht bei 65°C bei ständiger Bewegung mit der vorbereiteten Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde der Filter 3 mal 20 min mit Wash II bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden mehrfach in Saranfolie eingewickelt und bei -80°C auf Röntgenfilmen mehrere Tage exponiert.

### **2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion („PCR“)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = „polymerase chain reaction“; (Saiki et al. 1985; Saiki et al. 1988) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz aus einem Nukleinsäuregemisch unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Chien et al. 1976), sowie eines sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaares. Standard PCR-Reaktionen wurden wie folgt ausgeführt. 1-50 ng template-DNA wurde mit jeweils 10 pmol der beiden Primer, 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 1 µl 10 mM Desoxyribonukleotidlösung (dNTPs), 1 µl (ca. 5 Einheiten/µl) *Taq* DNA Polymerase (selbst hergestellt oder von Fa. Sigma) und bidestilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt. Nach zweiminütiger Denaturierung bei 95°C in einer PCR-Maschine (Primus oder Primus 96; Fa. MWG) wurden die gewünschten DNA-Sequenzen über 18-35 Zyklen wie folgt amplifiziert:

1. Denaturierung 94°C, 30 s
2. Hybridisierung 50-65°C, 30 s
3. DNA-Synthese 72°C, 30-120s

Unvollständige Produkte wurden in einem Terminationsschritt aufgefüllt (72°C, 7 min). Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt. Ein Aliquot jedes PCR-Ansatzes wurde auf einem Agarosegel analysiert. Für manche nachfolgenden Anwendungen wurden die überflüssigen Nukleotide, Polymerase, Salze oder auch unspezifische Nebenprodukte mittels Gelextraktion aus dem PCR-Ansatz entfernt.

### **2.2.18 Amplifizierung langer DNA-Sequenzen („Long-range PCR“)**

Als Vorlage für die Amplifizierung langer DNA-Abschnitte diente in dem Fall dieser Arbeit genomische DNA von dem *129Sv/ImJ* Mausstamm. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des „Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) durchgeführt. Der Vorteil dieses Systems stellt das Enzymgemisch aus *Taq* DNA

Polymerase sowie *Pwo* DNA Polymerase dar. Die *Pwo* DNA Polymerase neben der prozessiven 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturlesefunktion), sodass man von einer geringen Fehlerhäufigkeit ausgehen kann. Die Fehlerrate der *Pwo* DNA Polymerase liegt bei nur  $8,5 \times 10^{-6}$ ; im Vergleich dazu liegt die Fehlerrate bei der normalen *Taq* DNA Polymerase bei  $2,6 \times 10^{-5}$ . Das Expand™ High Fidelity PCR System ist in erster Linie optimiert für die effiziente Amplifikation großer DNA Fragmente (um 5 kb) aus genomischer DNA. Die PCR wurde nach dem vom Hersteller vorgeschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei die  $MgCl_2$ -Konzentration auf 25 mM erhöht wurde. Die Durchführung der PCRs erfolgte ausschließlich in den MWG-Biotech PCR Maschinen „Primus 96 plus“. Als Synthesezeit (Elongation) wurde aufgrund der großen Produktgröße eine Zeit von 8 min angesetzt.

#### 2.2.19 Ortsgerichtete Mutagenese (PCR-basierend)

Für die Zielsequenz (DNA-Region um das Translationsinitiationskodon, ATG, von *Noto*) wurde ein 17-19 Basen langes Primerpaar (Nco-mut) bei der Firma MWG-Biotech bestellt (siehe Tabelle 2), dessen Rückwärtsprimer in seiner Mitte nicht exakt komplementär zu der Zielsequenz war, sondern eine 1-Basen Mutation enthielt. Diese Sequenzveränderung führte dazu, dass eine Nco I Restriktionsendonukleasen-Schnittstelle im ATG entstand. Als DNA-Polymerase wurde *Pwo*, eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion, verwendet.

#### 2.2.20 Subklonierung von PCR-Produkten

Das „pGEM®-T Easy Vector System“ (Promega) ist für die Subklonierung von kurzen PCR-Produkten (bis 1 kb) mit einem Einzel-Desoxyadenosin-Überhang, der von einigen thermostabilen Polymerasen am 3' Ende angehängt wird, gut geeignet. Der aufgeschnittene Vektor trägt einen Überhang eines Thymidins an beiden Enden. Ligationsansatz mit dem pGEM®-T Easy:

5 µl	2 x Ligationspuffer
0,5 µl	pGEMt-Vektor
1 - 3,5 µl	PCR-Produkt
1 µl	Ligase
0-2,5 µl	ddH <sub>2</sub> O



Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, Ethanol gefällt und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurden dann 10 µl für die Transformation (siehe 2.2.10) eingesetzt. Die vorinkubierte Transformation wurde dann auf IPTG (1 mM), X-Gal (50 µg/ml), Ampizillin (50 µg/ml) ausplattiert, sodass eine Blau-Weiß-Selektion stattfinden konnte. Sollten lange PCR-Fragmente (siehe 2.2.20) subkloniert werden, wurde das „TOPO<sup>®</sup>XL PCR Cloning Kit“ (Invitrogen) verwendet. Es basiert nicht auf einer Ligase-Reaktion, sondern auf der Aktivität der Topoisomerase, die kovalent an den Vektor gebunden ist. Das amplifizierte PCR-Produkt wird durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit Kristall-violett aufgereinigt, womit man einer UV-Licht Behandlung entgeht, die zerstörend auf die DNA einwirken kann. Die Durchführung erfolgte nach der im Kit enthaltenen Beschreibung.

### 2.2.21 Genotypisierung von Mäusen und Mausembryonen per PCR

Zum Nachweis des Genotyps der Embryonen und Mäuse standen PCRs zur Detektion der drei möglichen Allele zur Verfügung. Die PCRs wurden mit isolierter DNA aus Dottersäcken (siehe 2.4.3) oder Schwanzbiopsien (siehe 2.4.4) durchgeführt. Der *Noto*-Lokus wurde durch PCR-Reaktionen mit folgenden Primerpaaren analysiert. Zum Nachweis des +neo-allels, das bezeichnet das Allel, das noch die „geflochte“ (Doetschman et al. 1993) Neomycin-Resistenzkassette im *Noto*-Lokus enthält, wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

32,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
5 µl	10 x PCR- Reaktionspuffer (siehe Tabelle 5)
5 µl	15 mM MgCl <sub>2</sub>
2,5 µl	DMSO
1 µl	+neo-allel-F (siehe Tabelle 3)
1 µl	+neo-allel-B (siehe Tabelle 3)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Taq
1 µl	genomische DNA

PCR-Produkt: 630 bp

Zum Nachweis des  $\Delta$ neo-Allels (Allel mit mittels cre-Rekombinase rausre-kombinierter Neomycin-Resistenzkassette) wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

32,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
5 µl	10 x PCR- Reaktionspuffer (siehe Tabelle 5)
5 µl	15 mM MgCl <sub>2</sub>
2,5 µl	DMSO
1 µl	Δneo-allel-F (siehe Tabelle 3)
1 µl	Δneo-allel-B (siehe Tabelle 3)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Taq
1 µl	genomische DNA

PCR-Produkt: 450 bp

Beide Genotypisierungs-PCRs wurden mit dem folgenden Programm auf Primus 96 (MWG) PCR-Maschinen durchgeführt:

94°C	3 min	
94°C	30 s	30 x
54°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	5 min	

Embryonen ab dem Embryonaltag E12.5 sowie adulte Tiere konnten teilweise bereits anhand des Phänotyps voneinander unterschieden werden, wobei aber auch nicht alle homozygoten Tiere bzw. Embryonen auch einen Phänotyp haben mussten. Das *Noto*-Wildtyp-Allel wurde durch folgende PCR detektiert:

32,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
5 µl	10 x PCR- Reaktionspuffer (siehe Tabelle 5)
5 µl	15 mM MgCl <sub>2</sub>
2,5 µl	DMSO
1 µl	wt-allel-F (siehe Tabelle 3)
1 µl	wt-allel-B (siehe Tabelle 3)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Taq
1 µl	genomische DNA

PCR-Produkt: 450bp

Diese wt-Genotypisierungs-PCR wurde mit folgendem Programm auf Primus 96 (MWG) PCR-Maschinen durchgeführt:

94°C	3 min	
94°C	30 s	30 x
54°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	5 min	

### 2.2.22 „Gene Targeting“, die Generation einer „Knockout Maus“

Als „gene targeting“ wird die zielgerichtete Veränderung eines endogenen Gens mittels homologer Rekombination bezeichnet. Bei diesen Rekombinationsvorgängen wird mit Hilfe der zellulären Rekombinationsmaschinerie ein modifiziertes Gen homolog mit seinem chromosomalen Äquivalent ausgetauscht, so dass die Modifikation ins Chromosom eingeführt wird. Bei der homologen Rekombination handelt es sich um einen sequenzspezifischen Austausch. Dafür ist ein aufwendiges Verfahren erforderlich. ES-Zellen müssen mit einem DNA-Konstrukt transfiziert werden. In einem sehr geringen Prozentsatz dieser Zellen findet eine Rekombination statt. Anschließend muss man einzelne Klone amplifizieren und überprüfen, ob die Rekombination an der gewünschten Stelle im Genom stattgefunden hat. Eine solche Rekombination findet durchschnittlich in etwa einer von  $10^5$  bis  $10^9$  Zellen statt. Die Ursachen dieser Schwankungen sind nicht restlos geklärt (Doetschman et al. 1993). Unter anderem lassen sich exprimierte Gene leichter rekombinieren als nicht exprimierte, die Struktur des Vektors beeinflusst die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse ebenso wie die Wahl des homologen Bereiches. ES-Zellen können so in einem Allel mutiert und dann in Blastozysten injiziert werden. Nach Passage durch die Keimbahn vererbt sich das defekte (meist rezessive) Gen dann nach den Mendelschen Regeln. Wegen des komplizierten Verfahrens werden mit dieser Methode meistens nur solche Tiere hergestellt, bei denen ein Gen inaktiviert oder zerstört oder Teile des Gens analysiert werden sollen. Da es oft unmöglich ist, ein komplettes Gen zu zerstören, wählt man im Allgemeinen zur Inaktivierung einen Teil des Gens aus, der funktionell wichtig ist. Die charakteristischen Eigenschaften eines „Targeting Konstruktes“ sind die Homologie zum auszuschaltenden Gen in der Zielzelle (Target), ein positiver Selektionsmarker, eine Restriktionsschnittstelle

außerhalb des Homologiebereichs, an der man den Vektor linearisieren kann und häufig ein negativer Selektionsmarker. Die Länge der Homologie zwischen Vektor-DNA und Target-DNA beeinflusst erheblich die Frequenz eines Targeting-Ereignisses, das heißt, je länger die Homologie ist, desto häufiger tritt in der Regel ein Targeting-Ereignis auf. Optimale Bedingungen sind bei einer Homologie von etwa 5 bis 10 kb erreicht (Thomas and Capecchi 1987; Hasty et al. 1991). Der positive Selektionsmarker sollte im Targeting-Vektor so platziert sein, dass er durch die homologe Rekombination mit in das zu inaktivierende Genfragment integriert wird. Heterologe Sequenzen an den Enden des Vektors werden nicht stabil in das Wirtsgenom integriert. Rekombinationsereignisse sind selten. Außerdem ist die Integration an zufälligen Stellen häufiger als am gewünschten Locus. Deshalb muss man neben optimalen Vektoren geeignete Selektionsmethoden einsetzen, um zum gewünschten Ergebnis zu kommen. Des Weiteren spielen Länge und der Grad der polymorphen Variation zwischen Chromosom und Vektor eine Rolle. Daher wurde der Vektor mit Sequenzen vom Mausstamm konstruiert, in deren ES-Zellen später auch das Targeting-Experiment (siehe 2.3.3) ausgeführt wurde (im Falle dieser Doktorarbeit: 129/SvImJ). Nach der Transfektion mittels Elektroporation von ES-Zellen mit dem Vektor wurde ein großer Teil der Vektormoleküle statistisch im Genom integriert. Nur ein sehr kleiner Teil führt zu den gewünschten Rekombinationsereignissen. Wie oben beschrieben, gibt es experimentelle Möglichkeiten, die Häufigkeit der homologen Rekombination zu steigern. Ebenso besteht die Möglichkeit, die Zahl der Zellklone, die den Vektor an unerwünschter Stelle integriert haben, zumindest zu reduzieren. Um die Anzahl der korrekt homolog rekombinierten Zellklone zu erhöhen, wurde der positive Selektionsmarker verwendet (Neomycinresistenz-Kassette). Des Weiteren wurde die Möglichkeit der Verwendung einer Negative Selektion ausgenutzt. Zellklone, die an ungewünschter Stelle einen Vektor ins Genom integriert hatten, wurden mit dem Produkt negativer Selektionskassetten (Diphtherie-Toxin-Selektionskassette), die an einem oder beiden Enden des Vektors kloniert sind, selektiert. Bei homologer Rekombination an gewünschtem Locus fallen diese Sequenzen heraus, während Klone mit einer Integration des Vektors an unerwünschter Stelle sensitiv für die negative Selektion bleiben, da die Kassetten mitintegriert werden. Durch die negative Selektion erreicht man eine 2- bis 20-fache Anreicherung der gewünschten Klone. Da negative Selektionskassetten manchmal

mutieren und zu falsch positiven Klonen führen, ist das Einfügen von zwei negativen Selektionskassetten oft sinnvoll, was aber aus klonierungstechnischen Gründen in dieser Arbeit nicht möglich war.

### 2.2.23 DNA Aufbereitung für die Elektroporation in ES-Zellen

Für eine Elektroporation eines Targeting Konstruktes in ES-Zellen (siehe 2.3.3) muss eine ausreichend große Menge von sauberer und vor allem linearisierter DNA vorliegen. Dafür wurde eine ausreichende Menge des fertigen Konstrukts zum linearisieren in einem großen Restriktionsansatz verdaut: 30 µg DNA wurden mit 80-100 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 200-300 µl Gesamtvolumen für ca. 3h verdaut. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Verdau wurden 2 µl des Ansatzes auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Bei Unvollständigkeit wurde noch einmal 2 h mit zusätzlichen 50 U weiter verdaut und anschließend überprüft. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform- Extraktion (siehe 2.2.7) durchgeführt. Danach wurde die DNA gefällt (siehe 2.2.8) und das Pellet in 100 µl EP-PBS aufgenommen und für 15 min auf 65°C erhitzt. Zum checken der DNA-Konzentration wurde 1 µl Aliquot der DNA auf einem 0,7% Agarosegel im Vergleich mit einem λDNA/ EcoR I + Hind III-Marker (0,5 µg / Tasche) aufgetragen. Von der linearisierten und aufgereinigten DNA wurde 20 µg für eine Elektroporation benötigt.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

Die Elektroporation der ES-Zellen mit dem *Noto*<sup>GFP</sup>(+neo)-Targeting-Konstrukt, die komplette ES-Zellkultur sowie die spätere Injektion der positiv selektierten, richtigen ES-Zellklone in die Blastozysten und der anschließende Blastozystentransfer wurde freundlicherweise von Dr. Karin Schuster-Gossler durchgeführt. Bei der ES-Zellkultur hatte sie technische Unterstützung von Hannelore Burkhardt und bei der Mausearbeit von Anatoli Heiser.

### 2.3.1 Kulturbedingungen für ES-Zellen

ES-Zellen der Passage 13 wurden in ES-Zell-Medium mit hLIF (menschliches Leukemia Inhibitor Faktor, Invitrogen) (siehe Tabelle 6) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> auf Ø 60 mm Petrischalen mit Feeder-Zellen kultiviert. Das LIF wurde zugesetzt, weil ES-

Zellen in Kultur spontan zur Differenzierung neigen. LIF humanen Ursprungs besitzt die gleiche Aktivität bei Maus ES-Zellen. Jedes Trypsinisieren und neu Aussähen wurde als eine Passagennummer gezählt. Das ES-Zell-Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Entsprechend des individuellen Wachstums konnten die Zellen am darauf folgenden Tag 1:5 geteilt werden. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert, d. h. mit PBS gewaschen und mit 1-2 ml Trypsin / EDTA bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 20 min lang abgelöst. Zell-Aggregate wurden durch mehrmaliges Pipetieren gelöst. Mit zusätzlichen 3 ml Medium wurden die Zellen auf 5 neue 60 mm Platten verteilt. Für eine Elektroporation wurden 5 fast konfluent gewachsene 60 mm Platten verwendet (siehe 2.3.3). Zur Langzeitlagerung wurden ES-Zellen, nach der Behandlung mit Trypsin, in 1,5 bis 2 ml ES-Zell-Medium resuspendiert und zentrifugiert (3 min, 1000 rpm, RT). Das Pellet wurde in ES-Zell-Gefrier-Medium (siehe Tabelle 8) resuspendiert und in Einfrier-Gefäße gegeben und in einen vorgekühlten Gefrier-Container (Fa. Sarstedt) bei –80°C zwischengelagert. Am nächsten Tag wurden sie bei –150°C weggefroren

### 2.3.2 ES-Zell-Medien

#### 1x ES-Zell-Medium

Name	Konzentration	Menge für 500 ml (Stockkonz.)
DMEM	1x	400 ml
FCS= Kälberserum	15%	75 ml (100%)
β-Mercaptoethanol	100 µM	500 µl (100 mM)
Natrium Pyrovat	1 mM	5 ml (100 mM)
Glutamax	2 mM	5 ml (200 mM)
Nicht-essentielle AS	0,1 mM	5 ml (10 mM)
Pen/Strep	10000 U/ml	5 ml (100x)
LIF	10000 U/ml	5 µg

**Tabelle 6:** Zusammensetzung von dem verwendeten ES-Zell-Medium

**1x ES-Zell-Gefrier-Medium**

Name	Menge für 1 l
15% FCS ES-Zell-Medium	800 ml
FCS	100 ml
DMSO	100 ml

**Tabelle 8:** Zusammensetzung von dem ES-Zell-Gefrier-Medium**1x Feeder-Medium**

Name	Konzentration	Menge für 500 ml (Stockkonz.)
DMEM	1x	400 ml
FCS	10%	45 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	100 $\mu$ M	500 $\mu$ l (100 mM)
Natrium Pyrovat	1 mM	5 ml (100 mM)
Glutamax	2 mM	5 ml (200 mM)
Nicht-essentielle AS	0,1 mM	5 ml (10 mM)
Pen/Strep	10000 U/ml	5 ml (100x)

**Tabelle 7:** Zusammensetzung von dem Feeder-Medium**1x Elektroporations-Medium (EP-Medium)**

Name	Konzentration	Menge für 500 ml (Stockkonz.)
DMEM	1x	400 ml
FCS	10%	45 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	100 $\mu$ M	500 $\mu$ l (100 mM)
Natrium Pyrovat	1 mM	5 ml (100 mM)
Glutamax	2 mM	5 ml (200 mM)
Nicht-essentielle AS	0,1 mM	5 ml (10 mM)
Pen/Strep	10000 U/ml	5 ml (100x)

**Tabelle 9:** Zusammensetzung von dem Elektroporations-Medium

### 2.3.3 Elektroporation von ES-Zellen

Bei der Elektroporation werden biologische Membranen durch kurze elektrische Impulse vorübergehend permeabilisiert. Während dieser Phase kann ein Stoff (z.B. DNA) durch die Membran transportiert werden.

Zur Elektroporation wurden ES-Zellen von 5 konfluent bewachsenen 60 mm Platten trypsinisiert. Nach Resuspension in ES-Zell-Medium wurden sie für 20 min zurück in den Inkubator gestellt, damit sich die Feeder-Zellen wieder am Boden absetzen konnten. Die ES-Zellen von allen 5 Platten wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml PBS resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das neue Pellet wurde in 700 µl EP-PBS (siehe Tabelle 9) resuspendiert und mit den 20 µg linearisierter DNA (in 100 µl EP-PBS) in eine Elektroporations-Küvette (0,4 cm) gegeben. Die Suspension wurde bei 0,24 kV und 500 µF bei RT in einem Gene Pulser (Fa. Bio Rad) elektroporiert. Nach dieser Elektroporation wurde die ES-Zell-Suspension für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde sie dann in 10 ml EP-Medium resuspendiert und auf 10 gelatinisierte 90 mm Platten gegeben.

### 2.3.4 Identifikation, Anzucht und Auswahl von resistenten ES-Zell-Kolonien

Etwa 24h nach der Elektroporation wurde das EP-Medium gegen EP-Medium mit Selektionsdroge ausgetauscht. Zur Selektion wurde eine Konzentration von 125 µg G418 (Invitrogen) pro ml EP-Medium gewählt. Die Selektion wurde für 14 Tage aufrechterhalten, wobei das Selektions-Medium abhängig vom Grad der sterbenden und überlebenden Klone gewechselt wurde (etwa alle 2 Tage). Die resistenten Klone wurden nach 14 Tagen gepickt und analysiert. Hierzu wurden 480 Klone in fünf 96er Zellkulturplatten (96-well-Platte) mit Feeder-Zellen überführt. Dafür wurde das Feeder-Medium von der 96er Platte abgenommen, mit PBS gewaschen und 50 µl Trypsin pro well zugegeben. Die 90 mm Platten mit den ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Klone mit jeweils einer gelben Spitze aufgesogen und in das vorgelegte Trypsin in der 96er Platte gegeben. Nachdem alle 480 wells der 5 Platten befüllt waren wurden diese mit je 150 µl ES-Zell-Medium beschickt und 3 Tage kultiviert. Dann wurden zwanzig 24er Zellkulturplatten mit Feeder vorbereitet und die Klone der 96er Platten auf diese transferiert. Dafür wurde eine komplette 96er Platte zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin pro well versetzt



und für 15 min im Inkubator inkubiert. Das Feeder-Medium der 24er Platte wurde durch ES-Zell-Medium ersetzt. Anschließend wurden die einzelnen Klone der 96er Platte in ES-Zell-Medium resuspendiert und in die 24er Feeder-Platten überführt. Nach 3-tägiger Inkubation und Mediumwechsel wurden die Klone auf gelatinisierte 24er Platten dupliziert. Die Master-Platte wurde eingefroren, indem das Medium abgenommen wurde und pro well 300 µl Einfrier-Medium zugeben wurde. Von dem Duplikat wurde DNA für die Überprüfung eines richtig erfolgten Targeting-Ereignisses gemacht (siehe 2.2.14 und 2.2.18 und 2.3.6).

### **2.3.5 DNA Präparation aus ES-Zell Klonen**

Die ES-Zell Klone der Gelantineplatten wurden bis sie konfluent bewachsen waren inkubiert, wobei ein täglicher Mediumwechsel erforderlich war. Für die Lyse der Zellen wurde dann das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und anschließend 500 µl Proteinase K (100 µg / µl) zugegeben und ein weiterer Tag im Inkubator inkubiert. Für die Präparation der DNA aus den lysierten Zellen wurden 500 µl 100% Isopropanol pro well zugegeben und die Platten für einen Tag bei 4°C auf einen Schüttler stehen gelassen. Die ausgefallene DNA wurde in 70% Ethanol gewaschen, in 500 µl TE (pH 7,5) gelöst und für 30 min auf 65°C erhitzt. Nach ein paar Tagen bei Raumtemperatur hat sich die DNA dann komplett gelöst und kann für eine Analyse des Targeting-Erfolgs mittels PCR und anschließender Verifizierung mittels Southern-Blot Analyse eingesetzt werden.

### **2.3.6 Überprüfung des Targeting-Erfolgs der ES-Zell Klone mittels PCR**

Um zu überprüfen, ob die Rekombination an der gewünschten Stelle im Genom stattgefunden hat wurde mit den DNAs der ca. 480 ES-Zell Klone eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Diese PCR überspannte den kompletten 3'-Homologiearm, was ungefähr 4,2 kb ausmachten. Es wurde ein Primerpaar gewählt, dessen Vorwärtsprimer in der Neomycin-Selektionskassette und dessen Rückwärtsprimer im 3' externen Gebiet lag. Nur bei einem Rekombinationsereignis an der richtigen Stelle im Genom konnte ein PCR-Produkt entstehen. Diese „Long-range PCR“ (siehe 2.2.18) wurde mit Hilfe des „Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte anhand des vom Hersteller angegebenen Protokolls, wobei Puffer 2 und eine Primeranlagerungstemperatur von 55°C und eine Verlängerungszeit von 8 min zu einem guten PCR

Ergebnis führte. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide, mit dem Namen „ESsceen“ sind in Tabelle 2 angegeben.

## 2.4 Embryologische Methoden

### 2.4.1 Verwendete Mäuse

Die Mäuse wurden in dem Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten und gezüchtet. Es wurden für die vorliegende Arbeit Mäuse der Stämme 129/SvImJ, C57BL/6J, FVB/NJ und die einzelnen genetisch veränderten Stämme mit reinem bzw. gemischtem Hintergrund verwendet. Zur Kontrolle der über Nacht angesetzten Verpaarungen wurden die Weibchen auf einen Vaginalpfropf hin untersucht. Mittags am Tag des Vaginalpfropfs wurde als Tag 0,5 *p.c.* der Embryonalentwicklung gezählt (E0.5).

### 2.4.2 Isolation von Embryonen

Die Embryonen wurden zu den entsprechenden Zeiten entnommen und routinemäßig in kaltem PBS unter dem Stereomikroskop nach Standardtechnik frei präpariert (Hogan et al. 1994). Zur Präparation wurden Dymont Nr. 5 Standard-Pinzetten benutzt. Für die spätere Verwendung zur *in situ* Hybridisierung (siehe 2.4.7) wurden die Embryonen über Nacht in 4% Paraformaldehyd/PBS bei 4°C fixiert, 3-mal in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanol- oder Methanolreihe entwässert. Anschließend wurden sie in 75% Ethanol oder in 100% Methanol bei -20°C gelagert.

### 2.4.3 Präparation von genomischer DNA aus embryonalen Dottersäcken

Bei der Isolation von Embryonen (siehe 2.4.2) wurde der Dottersack entnommen und über Nacht in 200 µl Proteinase K Puffers (siehe Tabelle 5) mit 200 µg/ml Proteinase K bei 56°C inkubiert. Die verdauten Dottersäcke wurden abzentrifugiert (13200 rpm, 10 min) und der Überstand gefällt (siehe 2.2.8) und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Genotypisierung der Embryonen wurde 1 µl der Dottersack-DNA in der entsprechenden Genotypisierungs-PCR-Reaktion eingesetzt (siehe 2.2.21).

#### **2.4.4 Präparation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien**

Hierfür wurde eine ungefähr 0,2 bis 0,5 cm lange Schwanzprobe entnommen und ÜN in 500 µl Proteinase K Puffer (siehe Tabelle 5) bei 56°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die unlöslichen Bestandteile für 10 min bei 13200rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch die Zugabe von 450 µl Isopropanol wurde die genomische DNA gefällt (siehe 2.2.8) und entsprechend der Menge entweder erneut, wie oben abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen, oder mit einer Pipettenspitze aus dem Eppendorf-Gefäß entnommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 200 µl TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O transferiert. Durch erneutes Inkubieren bei 65°C für 20 min wurde die DNA vollständig gelöst. Die gewonnene DNA wurde für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

#### **2.4.5 Skelettpräparation**

Für die Skelettanalyse wurden die Skelette von neugeborenen Mäusen präpariert. Zuerst wurden die durch Schockfrostung getöteten Neugeborenen mit zwei feinen, spitzen Pinzetten (Dymont Nr. 5 Standard) vollständig gehäutet, wofür sie zuvor kurz in kochendes Wasser gehalten wurden. Anschließend wurden die Fettpolster besonders im Schulter- und Halsbereich und die inneren Organe des Brust- und Bauchraumes entfernt. Die Haut konnte ggf. für die Genotypisierung verwendet werden. Die Körper wurden ca. vier Tage lang in absoluten Ethanol auf einem Schwenktisch und bei RT fixiert. Alle zwei Tage wurde das Ethanol gewechselt. Danach erfolgte für drei Tage bei RT eine Inkubation in Aceton und anschließend eine kurze Waschung in deionisiertem Wasser. Daraufhin wurden die knorpeligen und knöchernen Anteile drei bis vier Tage im Dunkeln und unter Schwenken mit Alican Blau 8GX und Alizarin Rot S-Färbelösung (siehe 2.1.9) gefärbt. Nachdem die Färbelösung abgegossen war, wurden die weichen Gewebe für einige Stunden in einer 2%igen KOH-Lösung unter ständiger Kontrolle verdaut gefolgt von einer Behandlung mit einer 0,5%igen KOH-Lösung für ca. zwei Tage. Die Klärung der Skelette erfolgte in einer steigenden Glycerinreihe jeweils bis sie auf den Gefäßboden gesunken waren beginnend mit 10% und endend bei 70% Glycerin. Darin wurden die Präparate auch gelagert und mit einem Stereomikroskop (Zeiss) analysiert und anschließend fotografiert.

### 2.4.6 Herstellung von markierten RNA-Proben für die *in situ* Hybridisierung

Für den Nachweis von mRNA-Molekülen durch *in situ* Hybridisierung wurden komplementäre RNA-Proben hergestellt. Hierfür wurden cDNA-Fragmente möglichst aus dem offenen Leseraster des nachzuweisenden Transkripts in Plasmide kloniert, die flankierend zu dem Polylinker die Bakteriophagen-Promotoren (SP6, T3 oder T7) besitzen. Einige dieser Plasmide wurden freundlicherweise von anderen Laboren zur Verfügung gestellt (siehe 2.1.8). Die Plasmide mit den cDNA-Fragmenten wurden linearisiert. RNA-Sonden beider Stränge wurden *in vitro* hergestellt; der nicht kodierende Strang („anti-sense“) diente zum Nachweis der Transkripte, während der kodierende Strang („sense“) als

Kontrolle zur Einschätzung des unspezifischen Hintergrundes verwendet wurde. 10 µg DNA wurden mit ca. 20 U eines geeigneten Restriktionsenzym über Nacht verdaut und mit Natriumacetat pH 5,2 (Endkonzentration 0,3 M) gefällt, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. 1-4 µg des linearisierten Plasmids wurde für die *in vitro* Transkription eingesetzt (bis 13 µl). Der Ansatz wurde bei RT zusammen pipettiert und danach 2 h bei 37°C inkubiert:

- 1 µl Transkriptionspuffer (Roche)
- 1-6 µl linearisiert Plasmid-DNA
- 1 µl 10x DIG RNA Reaktions-Mix (Roche)
- 0,5 µl RNase Inhibitor (Roche)
- 0-5µl ddH<sub>2</sub>O
- 0,5 µl SP6-, T3-, oder T7-RNA-Polymerasen (Roche)

Nach der Inkubationszeit wurden 1 µl DNase I (10 U/µl Roche) zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgte unter Volumenerhöhung mit 90 µl DEPC-Wasser und Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 1 µl tRNA (10 µg/µl) und 300 µl Ethanol bei -80°C für 15 min. Die ausgefällte RNA wurde abzentrifugiert (10 min bei 13200 rpm und 4°C) und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete RNA wurde in 100 µl 50% Formamid aufgenommen, mit 1 µl RNase Inhibitor (RNasin von Fa. Roche) und 5 µl wurden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

### 2.4.7 Histochemische Ganzpräparat in situ Hybridisierung („Whole mount“ *in situ* Hybridisierung = WISH)

Die transkriptionelle Aktivität eines Genes wurde durch die *in situ* Hybridisierung am ganzen Mausembryo nachgewiesen. Die gleichzeitige Detektion der Expression zwei verschiedener Gene in ein und demselben Embryo wird unter 2.4.9) beschrieben. Die Expression einzelner Gene wurde, wie im Folgenden Abschnitt beschrieben, analysiert.

Alle Schritte wurden in 12- bzw. 24-well Zellkulturplatten mit passenden Siebchen durchgeführt. Die Lösungen RNase-frei in DEPC-Wasser angesetzt und soweit nicht anders angegeben wurden die Arbeiten bei RT durchgeführt. Die Embryonen für die Hybridisierungen wurden wie unter 2.4.2 beschrieben isoliert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 100% Methanol oder 75% Ethanol gelagert.

#### 1. Tag (RNA-Hybridisierung):

Zu Beginn wurden diese Embryonen in 100% Methanol überführt und 2-mal für 10 min mit diesem gewaschen. Die Embryonen wurden dann 1 h mit 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 100% Methanol bei RT gebleicht. Anschließend werden sie in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25% Methanol/PBT) und dann zweimal in PBT für jeweils 5-10 min rehydriert. Danach erfolgte ein Verdau mit Proteinase K. Hierfür wurde die Embryonen mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Proteinase K in PBT bei RT inkubiert (Inkubationszeiten: E7.5 bis 8.5, 4 min; E9.5, 5 min; E10.5, 6 min). Der ProteinaseK-Verdau wurde durch zweimaliges Waschen der Embryonen in PBT abgestoppt, anschließend wurden die Embryonen in 4% Paraformaldehyd/ 0,2% Glutaraldehyd in PBT für exakt 20 min nachfixiert und erneut weitere 3 mal für 5 min in PBT gewaschen. Nun wurden die Embryonen für ca. 2 h bei  $70^{\circ}\text{C}$  in einem Hybridisierungs-ofen (besser: Feuchtekammer im Wasserbad) im Hybridisierungspuffer (siehe Tabelle 5) inkubiert. Die Hybridisierung mit der RNA-Sonde erfolgte bei  $70^{\circ}\text{C}$  ÜN in neuem Hybridisierungspuffer mit ca. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  der DIG-markierten RNA-Probe (meistens zwischen 1 und 5  $\mu\text{l}$ ). Die verwendeten Proben sind in Tabelle 4 aufgelistet.

#### 2. Tag (Waschen und Inkubation mit dem anti-DIG Antikörper):

Nicht gebundene RNA-Probe wurde durch 2 x 30 min Waschen in Waschlösung I (siehe Tabelle 5) bei  $70^{\circ}\text{C}$  entfernt, anschließend einmal kurz in 50%Waschlösung I/ 50% Waschlösung II (siehe Tabelle 5) bei  $70^{\circ}\text{C}$  und dann 3 x 5 min Waschen in

Waschlösung II bei RT. Es folgte eine für 2 x 30 min Inkubation in Waschlösung II mit 100 µg/ml RNase A bei 37°C und erneutem 2 x 30 min Waschen in Waschpuffer III (siehe Tabelle 5) bei 65°C. Die Embryonen wurden dann für die Antikörper-Reaktion 3 x 5 min in MABT (siehe Tabelle 5) bei RT gewaschen und für 2 h mit Blocking-Lösung (siehe Tabelle 5) bei RT abgesättigt und zuletzt ÜN in Antikörper-Lösung bei 4°C unter Bewegung inkubiert. (Antikörperlösung: 1 ml Blocking-Lösung mit 0,5 µl Anti-DIG Alkaline Phosphatase-gekoppelt (1:2000))

### 3. Tag (Waschtag):

Am Anfang des Tages wurden die Embryonen 3 x 15 min in MABT bei 4°C gewaschen und dann über den ganzen Tag hinweg stündlich der MABT-Puffer gewechselt (bei RT). Zuletzt wurde ÜN bei 4°C in MAB gewaschen.

### 4. Tag (Entwicklung):

Die Embryonen wurden auf die Entwicklung durch 3x Waschen in NTMT (siehe Tabelle 5) vorbereitet und dann in auf RT vorgewärmtem BM Purple (Roche #1442074) bei 37°C inkubiert, bis die Färbung ausreichend stark war (ggf. ÜN langsames Weiterfärben bei 4°C). Die Reaktion wurde durch 3x Waschen in PBT pH 4,5 abgestoppt und die Embryonen in 4% Paraformaldehyd. Zum Fotografieren wurden die Embryonen in PBT überführt und schließlich in 4% Paraformaldehyd/PBS gelagert.

## **2.4.8 Fluoreszenz Ganzpräparat in situ Hybridisierung (Fluoreszenz „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung = F-WISH)**

Um schwache Färbungen besser sichtbar zu machen oder um Doppelfärbungen (siehe 2.4.9) durchzuführen wurden Fluoreszenzfarbstoffe benutzt. Im Gegensatz zu der histochemischen *in situ* Hybridisierungen (siehe 2.4.7) wurden Antikörper gegen Digoxigenin und Fluorescein verwendet, die mit einer Peroxydase (HRP= Horse Radish Peroxydase oder POD= Peroxydase) gekoppelt waren. Bei der Reaktion wird der Peroxydase ein Substrat (Tyramid®, gekoppelt mit Fluorochrom) angeboten, das zu einem kurzlebigen Produkt verstoffwechselt wird, welches unspezifisch an alle Proteine bindet (Zaidi et al. 2000). Aufgrund der Kurzlebigkeit des Produkts bindet es jedoch nur an den Stellen im Gewebe, an denen auch Peroxydase gebunden ist. Auf diesem Weg war eine akkurate und gezielte Färbung

einzelner Zellen möglich. Gefärbt wurden Embryonen im späten Kopffaltenstadium (E8.0) Diese wurden bis nach der Inkubation der *in situ* Sonden wie unter 2.4.7 beschrieben behandelt. Am 2. Tag (Waschen und Antikörperinkubation) nach der Hybridisierung wurde der RNase-Verdau und die Inkubationsschritte in Waschlösung II weggelassen und nach den Waschschritten in Waschlösung I folgte direkt eine Inkubation für 2 mal 20 min bei 65°C in Waschlösung III, die aber zusätzlich noch 1% SDS enthielt (siehe Tabelle 5). Die Embryonen wurden dann für die Antikörper-Reaktion 3 x 5 min in TNT (siehe Tabelle 5) bei RT gewaschen und für 2 h mit Blocking-Lösung in TNT (siehe Tabelle 5) bei RT abgesättigt und zuletzt ÜN in Antikörper-Lösung bei 4°C unter Bewegung inkubiert. (Antikörperlösung: 1 ml Blocking-Lösung mit 1 µl Anti-DIG Peroxydase-gekoppelt (1:1000). Am 3.Tag wurde ausführlich in TNT gewaschen (anstatt MABT; Vgl. 2.4.7)

#### 4. Tag (Entwicklung):

Die Embryonen wurden für die Fluoreszenzfärbung, die in einem möglichst kleinem Volumen stattfand, in eine 96-well Platte mit V-förmigem Boden überführt und für 20 min in 200 µl Amplifikationslösung aus dem „TSA™ Plus Fluorescence System“ (PerkinElmer) präinkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu vermeiden. Die Peroxydase-Reaktion erfolgte durch Zugabe von 4 µl des Tyramid-gekoppelten Fluorochroms in 100 µl Amplifikationslösung. Nach 8 minütiger Inkubation bei RT wurde sehr ausführlich mit PBT gewaschen. Die Embryonen konnten daraufhin in Gel Mount (Biozol) überführt und fotografiert werden.

### 2.4.9 Fluoreszenz/histochemische Doppel *in situ* Hybridisierung

Um Doppelfärbungen durchzuführen wurde eine Kombination aus histochemischer Standard BM-Purple Färbung und einer Fluoreszenz-Färbung mit Hilfe des Cy3-Tyramids benutzt. Der Vorteil dieser Kombination bestand darin, dass nicht nur beide RNA Sonden gleichzeitig im Hybridisierungsschritt zugegeben werden konnten, sondern auch beide Antikörper. Die Hybridisierungssonden waren unterschiedlich markiert. Die *gfp*-RNA Sonde war mit Fluorescein (FITC) markiert und die *dante*-RNA Sonde war mit DIG markiert. Beide Sonden wurden am ersten Tag gleichzeitig zugegeben und ÜN wie unter 2.4.8 beschrieben inkubiert. Auch der 2. Tag wurde wie unter 2.4.8 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass

nach dem Absättigungsschritt mit der Blocking-Lösung für 2 h, sowohl der anti-FITC Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben wurde als auch der anti-DIG Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000. Bei dem anti-DIG handelte es sich um einen Peroxydase gekoppelten Antikörper, der für die Fluoreszenz Cy3-Tyramid-Färbung notwendig war und der anti-FITC Antikörper war mit Alkaliner Phosphatase gekoppelt, die für die anschließende BM-Purple Standardfärbung notwendig war. Der 3. Tag wurde wie unter 2.4.8 beschrieben durchgeführt. Am 4. Tag erfolgte erst eine fluoreszenz Cy3-Tyramid-Färbung wie unter 2.4.8 beschrieben und im direkten Anschluss eine BM Purple Färbung. Diese beiden Färbungen erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Cy3-Fluoreszenz-Farbstoffes zu vermeiden. Fotografiert wurden die Embryonen mit dem DM5000B Mikroskop, einer DFC300FX Kamera und der FireCam Software (Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Bilder für die Doppel *in situ* Hybridisierung wurden mit dem Photoshop CS (Adobe, San Jose, CA) Bildbearbeitungsprogramm in sofern bearbeitet, dass eine Falschfarbendarstellung benutzt wurde. Dabei wurde ein invertiertes Hellfeldbild der BM purple Färbung (*gfp*-Probe) in den grünen Kanal des Cy3 (*dante*-Probe) Bildes eingefügt. Bei beiden Kanälen konnte dann noch getrennt voneinander die jeweiligen Einstellungen geändert werden.

## 2.5 Histologische Methoden

### 2.5.1 Paraffineinbettung von Embryonen

Frisch präparierte E8.0 (spätes Kopffaltenstadium) Embryonen wurden in PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 30 min bei RT fixiert. Die Embryonen wurden dann folgendermaßen weiterbehandelt:

Dehydrieren: Die Embryonen wurden nacheinander für jeweils 10 min in 25%, 50%, 75% und 100% Ethanol inkubiert. Danach wurde das 100% Ethanol noch einmal durch frisches 100% Ethanol ersetzt und dann in 100% Isopropanol überführt.



Embryonen, die nach der Isolation in 100% Methanol oder 75% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, wurden 1x kurz mit 100% Ethanol gewaschen und dann ebenfalls für 30 min in 100% Isopropanol überführt. Die Dehydrierung wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

Einbetten: Nachdem die Embryonen, die sich in kleinen Gläschen befanden, dehydriert waren, wurden sie von 100% Isopropanol für 30 min in das im Paraffinofen (Heraeus) auf  $65^{\circ}\text{C}$  vorgewärmte 50% Isopropanol/50% Paraffin (Roti<sup>®</sup>-Plast; Carl Roth)-Gemisch überführt und gelegentlich leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gemisch, durch flüssiges 100% Paraffin ersetzt und die Embryonen für weitere 30 min inkubiert. Nach abermaligen Paraffinwechsel und 30 minütiger Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  wurden die Embryonen dann in Einweg-Plastik-Gießförmchen (Polysciences, Inc.) mit flüssigem Paraffin überführt und, soweit möglich, ausgerichtet. Nach dem Aushärten der Blöcke wurden diese in Saranfolie gewickelt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zum Schneiden gelagert.

Schneiden: Von den Paraffin-Blöcken wurden 5-6  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte mit dem Ultramikrotom (RM 2155, Leica) angefertigt, auf Objektträger (SuperFrost<sup>®</sup>Plus, Menzel-Gläser) aufgezogen, in ein Streckbad mit  $37^{\circ}\text{C}$  überführt und bei  $42^{\circ}\text{C}$  ÜN getrocknet. Die Schnitte wurden bei RT gelagert und wie unter 2.5.3 beschrieben weiter prozessiert.

### 2.5.2 Gegenfärbung von Plastikpräparaten mit Eosin-Färbelösung

Die Objektträger mit den Plastikschnitten (siehe 2.5.2) wurden nach folgendem Protokoll mit Eosin G (#115935, Merck) gegen gefärbt:

1 min	ddH <sub>2</sub> O
6 min	Eosin G-Lösung (siehe Tabelle 5)
5 min	ddH <sub>2</sub> O
5 min	ddH <sub>2</sub> O
5 min	ddH <sub>2</sub> O
20 s	100% Ethanol
20 s	50% Ethanol/50% Roti <sup>®</sup> -Histol
20 s	100% Roti <sup>®</sup> -Histol

Nach dem letzten Roti<sup>®</sup>-Histol-Schritt wurden die Objektträger möglichst schnell in VectaMount<sup>™</sup> (Vector) eingedeckelt, weil sich sonst die Schnitte wieder ablösen.

### 2.5.3 Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Paraffinpräparaten

Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden nach folgendem Protokoll entparaffinisiert:

10 min	Roti®-Histol
10 min	Roti®-Histol
2 min	100% Ethanol
2 min	90% Ethanol
2 min	70% Ethanol
2 min	50% Ethanol
2 min	30% Ethanol
5 min	Wasch Puffer (siehe Tabelle 5)
20 min	Peroxidase Blocking Puffer (siehe Tabelle 5)

Bis zu diesem Schritt wurde bei RT gearbeitet. Anschließend folgte der Antigen-Präsentationsschritt. Dabei werden die Objektträger für 20 min in 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit 10 mM Na-citrat Puffer im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden diese ganz langsam für ca. 1 h im Na-citrat Puffer auf RT abkühlen lassen. Die Bereiche, wo sie geschnittene Embryonen auf dem Objektträger befanden wurden mit einem Wachsstift (Vector Laboratories) umrandet, damit in späteren Inkubationsschritten möglichst wenig Blocking- und Antikörper-Lösung benötigt wurde. Die Präparate wurden dann 30 min mit 10% Serum, das aus der Spezies ist, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde, geblockt und anschließend noch einmal 30 min mit 1% BSA in Wasch Puffer. Daraufhin wurden die Präparate mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper in 1% BSA/ Wasch-Puffer beschickt und bei 4°C ÜN in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurden sie mindestens 5x 10 min mit Wasch Puffer gewaschen und mit dem entsprechend gerichteten (gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper war) und HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Dieser wurde anschließend mit mindestens fünf 10 minütigen Waschschritten in Wasch Puffer runter gewaschen. Darauf folgte ein kurzer Inkubationsschritt mit dem Fluorescein-Tyramid (1:50 in Amplifikationslösung) aus dem „TSA™ Plus Fluorescence System“ (PerkinElmer). Die Behandlung der Objekte mit einem Tyramid-gekoppelten FITC Farbstoff diente der Signalverstärkung (TSA= Tyramid

signal amplification). Der Farbstoff wurde nach 6 minütiger Einwirkzeit mit Wasch-Puffer abgespült und die Objektträger wieder ausgiebig mit Wasch Puffer gewaschen (5x 10 min) und anschließend mit Gel mount (Biozol) eingedeckelt.

## **2.5.4 Elektronenmikroskopie**

### **2.5.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Für die Betrachtung eines Objekts im Raster-Elektronen-Mikroskop (Sulik et al. 1994) müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein: Die Probe muss a) trocken und z. T. fixiert und b) gut leitfähig sein. Beim Trocknen einer organischen Probe können durch den starken Wasserverlust Strukturartefakte entstehen. Um dem vorzubeugen werden die Präparate chemisch mit Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgt eine Entwässerung der Probe in einer aufsteigenden Aceton-Reihe. Der kritische Schritt der Präparation ist die Trocknung. Biologische Objekte sind in der Regel elektrisch schwach leitend oder sogar nicht leitend. Eine Leitfähigkeit lässt sich entweder während der Fixierung (mit  $\text{OsO}_4$ ) erreichen, oder die Oberfläche getrockneter Objekte wird mit leitenden Metallen beschichtet.

Die Embryonen von E7.5 bis E8.0 wurden wie gewohnt in PBS präpariert und anschließend direkt mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) (siehe Tabelle 5) für mindestens 3 h (bis ÜN) bei 4°C fixiert. Eine Fixierung mit Glutaraldehyd vernetzt hauptsächlich Proteine. Anschließend wurden die Embryonen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer mindestens 4-mal für 10 min (bis ÜN) bei 4°C gewaschen. Eine Nachfixierung mit 2% Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) erfolgte zur Vernetzung der Lipide für 90 min im Dunkeln bei RT. Der zelluläre Wasseranteil der Embryonen wurde dann durch Aceton als organisches Lösungsmittel ersetzt. Innerhalb der ersten 15 min wurde das 30% Aceton 7-mal ausgetauscht und darauf folgten jeweils zweimal 5 min Schritte mit 50%, 70% und 90% Aceton und mindestens sechs 5 minütige Inkubationsschritte in 100% Aceton. Darauf folgte eine Kritisch-Punkt-Gefriertrocknung mit dem CPD 030 („critical Point Dryer“) von Balzers. Das Aceton, das das Wasser in der Probe ersetzt hat, wird selbst durch flüssiges  $\text{CO}_2$  ersetzt, das schließlich durch kritische Punkt-Trocknung auch entfernt wird. Diese kritische Punkt-Trocknung ist eine Methode, bei der Artefakte, die beim Übergang von der feuchten zur gasförmigen Phase auftreten, vermieden werden. Die Durchführung erfolgt in der Kritischen-Punkt-Apparatur nach Anleitung. Die

getrockneten Embryo-Präparate wurden auf geeignete Präparathalter (Stiftprobenteller aus Aluminium) montiert. Sie ließen sich mit Hilfe leitender Kleber (Leitsilber) befestigen. Nach dem Aufbringen auf den Präparathalter wurden diese in einem Exsikkator über Nacht trocknen gelassen. Im REM wird die Oberfläche der Probe mit einem Elektronenstrahl abgetastet. Dadurch bekommt sie eine negative Ladung, die abgeleitet werden muss. Deswegen war es notwendig die Probe mit einer leitfähigen Schicht zu überziehen, die aber, um die feinen Strukturen gut erkennbar zu lassen, hauchdünn sein muss. Die Proben wurden mit einem ca. 20 nm dicken Überzug aus Gold-Palladium in einer Kathodenzerstäubungsanlage (Sputteranlage) beschichtet. Die Proben waren dann fertig zum Anschauen im Rasterelektronenmikroskop (SEM 505 von Fa. Philips). Die Proben sind lange haltbar, vorausgesetzt, sie werden vor der Luftfeuchtigkeit geschützt und im Exsikkator zur langfristigen Lagerung aufbewahrt.

#### **2.5.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

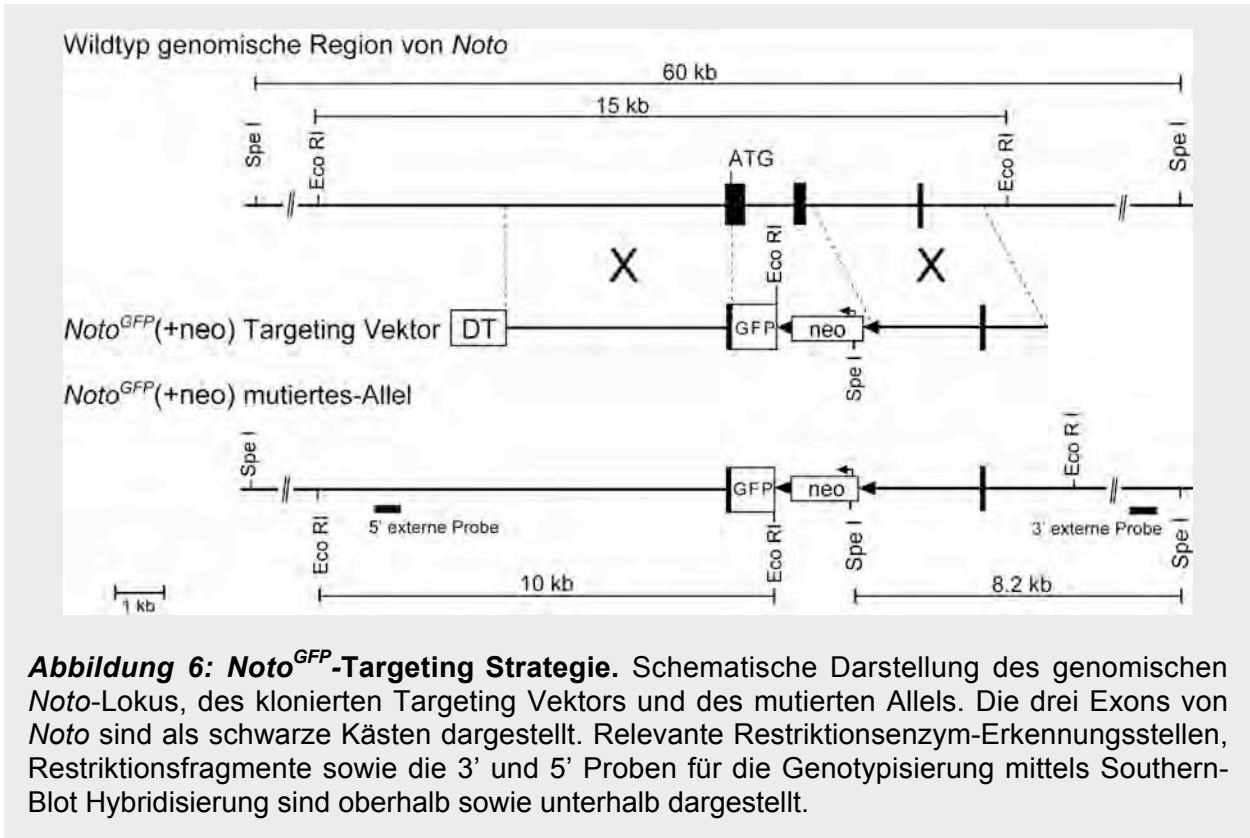
Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Christoph Viebahn (Abteilung Anatomie und Embryologie, Zentrum Anatomie der Universität Göttingen) durchgeführt. Die im späten Kopffaltenstadium präparierten Embryonen (E8.0, das heißt nachts zw. 22h und 2h hat man statistisch die größten Chancen dieses Stadium zu bekommen) wurden nach der Präparation in 4% PFA bei 4°C fixiert und nach ca. 8 h Fixierungszeit nach Göttingen gebracht um dort für die Transmissionselektronenmikroskopie weiter vorbereitet zu werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (Miething 1992).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Klonierungsstrategie für die Herstellung des *Noto* Knockouts

Die funktionelle Untersuchung des murinen Homeobox Transkriptionsfaktors *Noto* in der Notochord-, Skelett- und Achsenentwicklung wurde anhand einer Mauslinie mit einem generierten Null-Allel durchgeführt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der *Noto*-Targeting Vektor kloniert (siehe Abbildung 6), mit dem eine *Noto*-defiziente Mauslinie generiert (siehe 2.2.22) wurde. Bei der homologen Rekombination in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurde ein GFP-Reportergen (eGFP engl.: enhanced "Green Fluorescence Protein", aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*) in das Translationsinitiationskodon in Exon 1 des *Noto*-Lokus inseriert. Zugleich wurden der größte Teil des ersten Exons, das erste Intron und das komplette zweite Exon deletiert. Damit wurden ca. 80% des vorhergesagten ORFs, der fast die komplette funktionelle Homeodomäne von *Noto* beinhaltet, deletiert. Mit Hilfe der hergestellten Knockout-Maus sollte untersucht werden, ob *Noto* das Gen darstellt, das in der truncate Mutante betroffen ist. Zusätzlich sollte damit analysiert werden wie sich die Notochord- und Skelettdefekte sowie potentielle weitere Defekte im generierten GFP-Allel, das einem Null-Allel entspricht, im Vergleich zur spontanen truncate Mutante, die als Hypomorph gilt, darstellen.

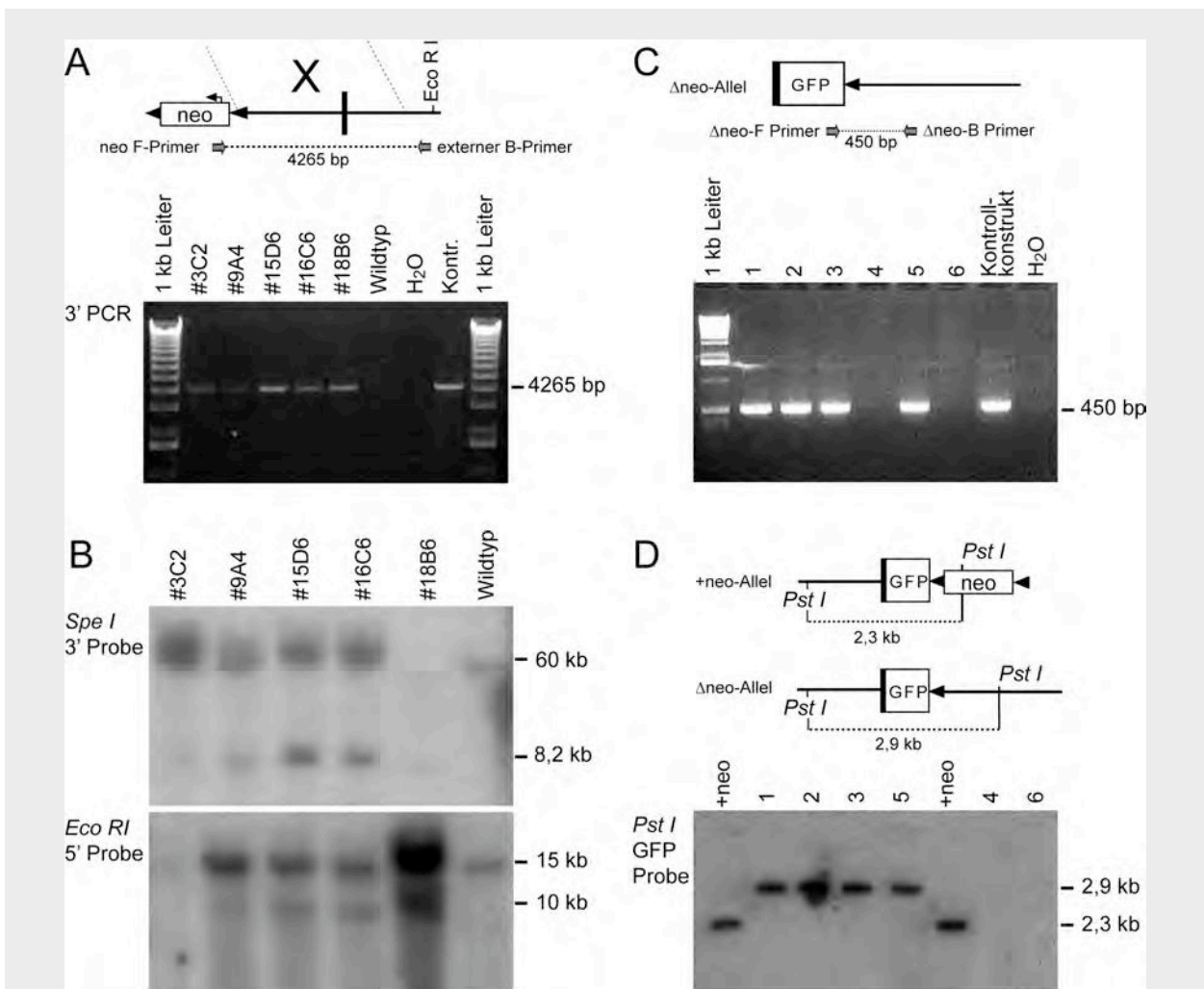
In der Abbildung 6, die die *Noto*-Targeting Strategie zeigt, ist das zu Beginn dieser Doktorarbeit klonierte *Noto*<sup>GFP</sup> (+neo)-Targeting-Konstrukt dargestellt. Die einzelnen Schritte der Klonierungsstrategie sind im Detail unter 2.2.22 des Material und Methoden-Teil dieser Doktorarbeit, beschrieben. Die Elektroporation der ES-Zellen, die gesamte ES-Zellkultur sowie die Herstellung der chimären Mäuse wurde freundlicherweise von Dr. Karin Schuster-Gossler, mit technischer Unterstützung von Hannelore Burkhardt und von Anatoli Heiser, durchgeführt.



**Abbildung 6: *Noto*<sup>GFP</sup>-Targeting Strategie.** Schematische Darstellung des genomischen *Noto*-Lokus, des klonierten Targeting Vektors und des mutierten Allels. Die drei Exons von *Noto* sind als schwarze Kästen dargestellt. Relevante Restriktionsenzym-Erkennungsstellen, Restriktionsfragmente sowie die 3' und 5' Proben für die Genotypisierung mittels Southern-Blot Hybridisierung sind oberhalb sowie unterhalb dargestellt.

Nach der Elektroporation der *129Sv/ImJ* ES-Zellen mit dem linearisierten Targeting Konstrukt wurden nach einer zweiwöchigen G418-Selektion (siehe auch unter Material und Methoden 2.2.22) 480 Neomycin-resistente ES-Zellklone expandiert und anschließend genomische DNA hergestellt. Parallel dazu wurde eine Genotypisierungs-PCR für die weitere Analyse der ES-Zellklone etabliert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass der Vorwärtsprimer in der Neo-Kassette und der Rückwärtsprimer außerhalb des Konstrukts (stromabwärts der benutzten 3'-Flanke) positioniert war (siehe Abbildung 7 A). Diese PCR sollte nur auf DNA von Klonen mit korrekter Integration und Rekombination ein Produkt von 4265 bp ergeben. Für die Etablierung der PCR-Konditionen wurde zuvor auch ein sog. Kontrollkonstrukt kloniert, das als Vorlage für die PCR diente. Dieses Plasmid, das das Kontrollkonstrukt enthielt, wurde entsprechend mit genomischer DNA verdünnt und als Positivkontrolle bei der PCR-Analyse der ES-Zellklone verwendet. Bei dieser PCR-Analyse konnten fünf verschiedene ES-Zellklone identifiziert werden, die auf der 3'-Seite homolog rekombiniert waren. Diese Klone wurden dann in einem zweiten Durchgang mittels Southern-Blot Hybridisierung (siehe Abbildung 7; B) für die 3'-Seite verifiziert und zusätzlich auf eine richtige Integration und zusätzlichen Rekombinationserfolg auf der 5'-Seite hin getestet. Die 3'-Sonde sollte für das

getargetete *Noto*-Allel bei einer enzymatischen Spaltung mit *Spe I* anstelle bei 60 kb bei 8,2 kb ein Hybridisierungssignal zeigen und die 5'-Sonde bei einer Spaltung mit *EcoR I* anstatt bei 15 kb ein Signal bei 10 kb. Letztendlich konnten per Southern Hybridisierung die fünf verschiedenen 3' PCR-positiven Klone als 3' und 5' homolog rekombinierte ES-Zellklone, aus den etwa 400 analysierten DNA-Präparationen der ES-Zellklone, identifiziert werden (siehe Abbildung 7; B und nicht gezeigte Daten). Das entsprach einer Targeting-Effizienz von ca. 1 in 80.



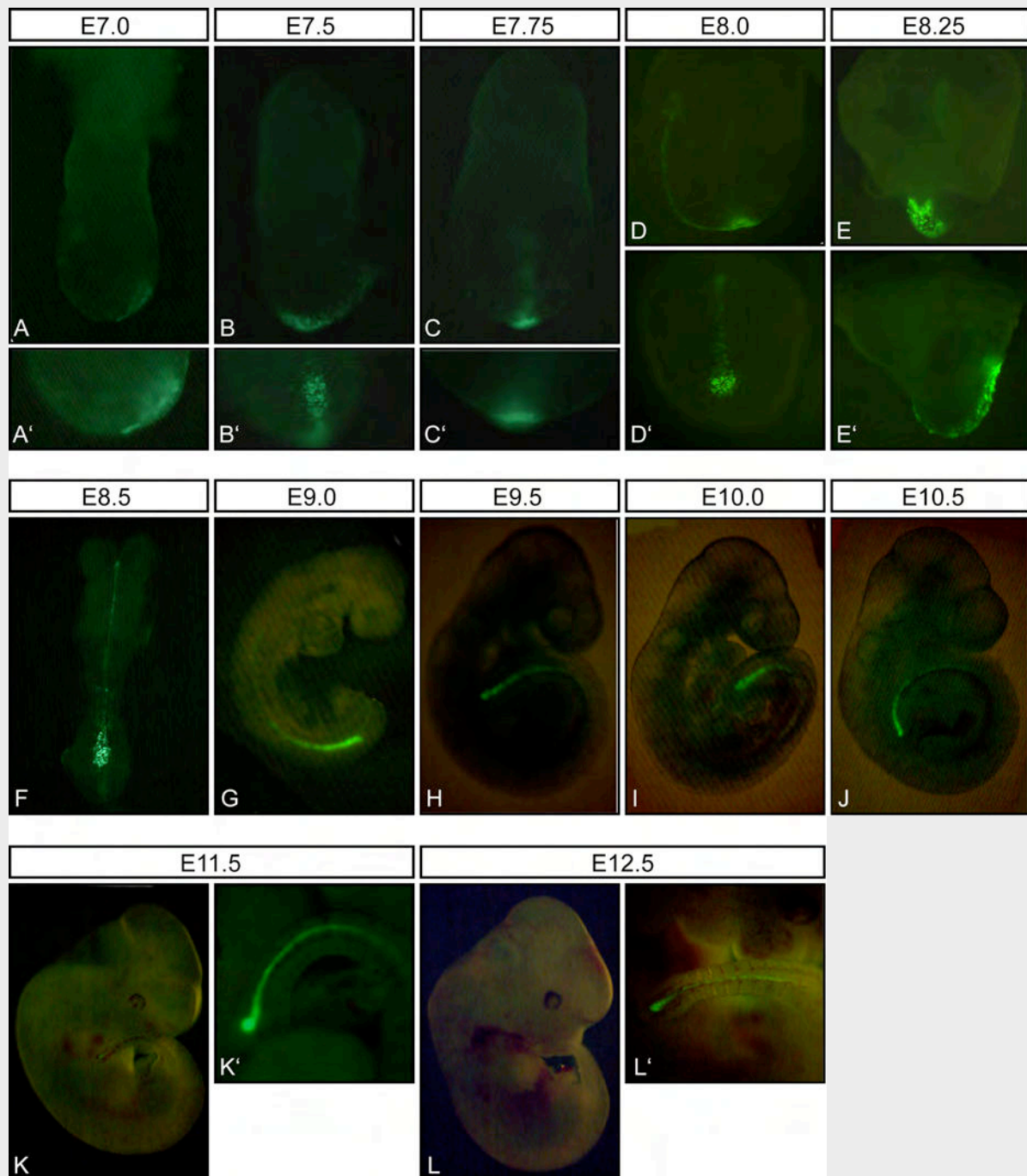
**Abbildung 7: Genotypisierung der mutierten ES-Zellklone sowie Überprüfung einer erfolgreichen Rekombination zwischen den loxP-Stellen, zur Entfernung der neo-Kassette, mittels PCR und Southern-Blot Hybridisierungs-Technik.** (A) Schematische Darstellung der Lokalisation der Primer im getargeteten *Noto*-Lokus und gelelektrophoretische Auftrennung der Genotypisierungs-PCR Produkte. (B) Verifizierung der PCR-positiven Klone mittels Southern-Blot Hybridisierung. Nähere Erläuterungen siehe Text. (C) Schematische Darstellung der Lokalisation der  $\Delta$ neo-Primer im getargeteten *Noto*-Lokus sowie gelelektrophoretische Auftrennung der  $\Delta$ neo-Genotypisierungs-PCR Produkte. (D) Verifizierung der PCR-positiven Tiere mittels Southern-Blot Hybridisierung sowie erklärende schematische Darstellung. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Mit zwei unterschiedlichen Klonen (15D6 und 16C6) wurden anschließend Chimären hergestellt. Diese transmittierten das GFP-Allel an ihre Nachkommen. Die neo-Kassette im *Noto*<sup>GFP</sup> (+neo)-Allel wurde mittels einer Passage durch die Keimbahn von ZP3::Cre Weibchen (de Vries et al. 2000) und Rückkreuzung auf *129 Sv/ImJ* entfernt. Der Erfolg dieser Entfernung wurde mit Hilfe einer PCR, die nur bei einer erfolgreichen Rekombination ein Produkt von 450 bp ergab (siehe Abbildung 7; C) überprüft. Zusätzlich wurde eine Southern Blot Hybridisierung durchgeführt, in dem bei erfolgreichem Herausrekombinieren der neo-Kassette bei der Verwendung einer GFP-Sonde ein Signal auf der Höhe von 2,9 kb entstehen sollte. Mäuse, die die neo-Kassette noch enthielten, wiesen ein Signal auf der Höhe von 2,3 kb auf (siehe Abbildung 7; D). Das Allel mit heraus rekombinierter neo-Kassette wurde als „ $\Delta$ neo“ bezeichnet. In diesem Allel ist neben dem GFP-Reportergen, das den größten Teil des *Noto*-Lokus ersetzte, nur eine loxP-Rekombinationsstelle verblieben, die aber nicht die GFP-Aktivität beeinflusste. Zwischen dem +neo-Allel und dem  $\Delta$ neo-Allel war kein Unterschied in der GFP-Expressionsstärke zu sehen (Daten nicht gezeigt).

### 3.2 Expressionsanalyse von *Noto* mit dem GFP Reporter

In heterozygoten Embryonen, in denen die neo-Kassette schon entfernt war, *Noto*<sup>GFP/+</sup> ( $\Delta$ neo), wurde im Zeitraum von E6.0 bis E12.5 der Embryonalentwicklung die Aktivität des GFP-Reportergens untersucht und dokumentiert (siehe Abbildung 8). Es wurde darauf geachtet, dass diese Expressionsanalyse nur mit Embryonen durchgeführt wurde, bei denen die neo-Kassette entfernt war, weil diese die GFP-Expression ggf. hätte stören könnte. Bei dieser direkten fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte beobachtet werden, dass das GFP-Signal größtenteils die, zuvor von der Kollegin Hanaa Ben Abdelkhalek beschriebene, endogene Expression von *Noto* widerspiegelte (Abdelkhalek et al. 2004; Plouhinec et al. 2004) (und Dissertation von Hanaa Ben Abdelkhalek, 2006). Am Embryonaltag 6.0, vor dem Entstehen des Primitivstreifens und dem Beginn der Gastrulation war noch keine GFP Expression zu erkennen (Daten sind nicht gezeigt). Die erste GFP Expression wiesen die analysierten Embryonen etwa am Embryonaltag 7.0 in der Region des Organisators (EGO; early gastrula organizer) auf (siehe Abbildung 8; A und A').





**Abbildung 8: GFP Expression in *Noto*<sup>GFP/+</sup> (Δneo) Embryonen.** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von heterozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen zwischen Embryonaltag 7.0 und 12.5 p.c.. Für A, C, K und L sind jeweils zwei verschiedene Vergrößerungen und für B, D und E sind zwei verschiedene Ansichten des Embryos gezeigt.

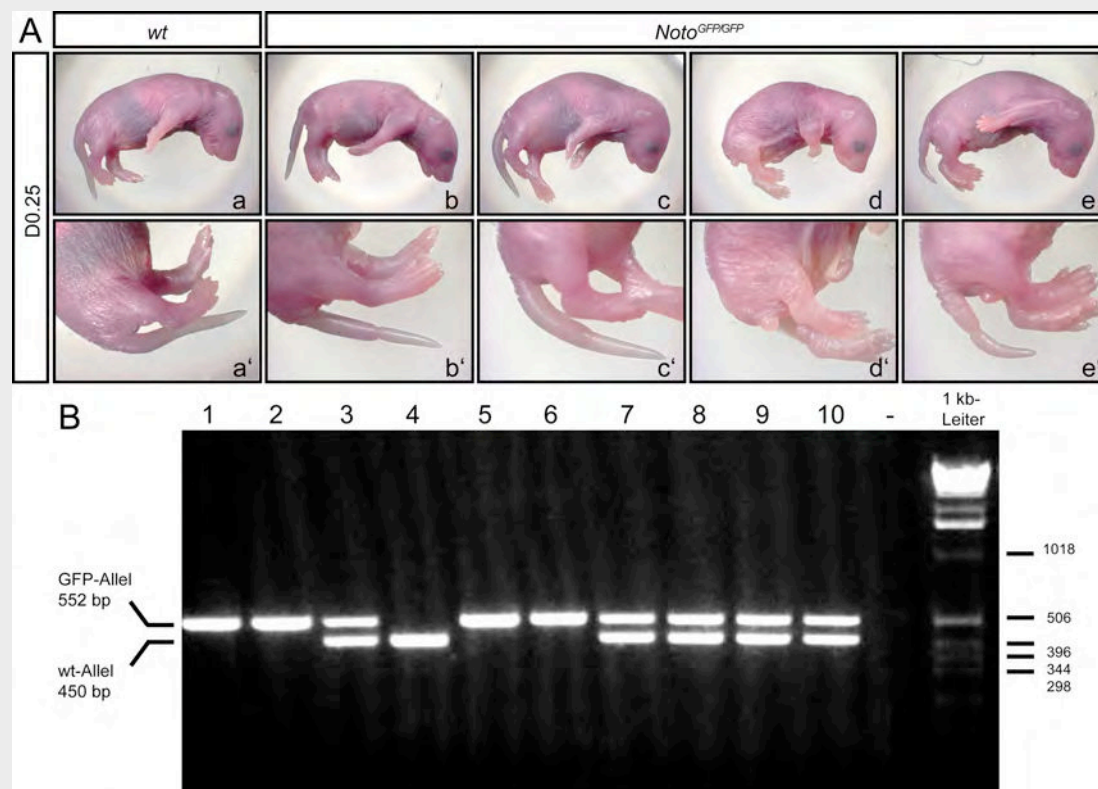
Der EGO befindet sich anterior zum Primitivstreifen. Ab E7.5, war eine konzentriertere und intensivere Expression im Primitivknoten, der das posteriore Notochord (PNC) darstellt, zu sehen (siehe Abbildung 8; B und B'). Diese Expressionsdomäne weitete sich wenig später, ab E7.75, in das naszierende Notochord

aus (siehe Abbildung 8; C, D und C', D'). Die Expression im Notochord reichte in diesen frühen Stadien in anteriore Richtung bis in die Region der Kopffalten, was sehr gut im Embryonalstadium E8.5 zu sehen ist. Zu diesem Zeitpunkt besitzt der Embryo etwa sieben Somiten (siehe Abbildung 8; F). Diese, bis anterior in die Kopffaltenregion reichende Expression, wurde zuvor nur für *Noto* in den truncate Mutanten beschrieben (Abdelkhalek et al. 2004) und Abdelkhalek, H (2006): Molecular genetic characterization of the mouse truncate (*tc*) mutation. Hannover, Univ., Diss.. In den späteren Stadien, E9.5 bis E12.5 (siehe Abbildung 8; G bis L') war nur im neu gebildeten, posterioren Notochord eine GFP Aktivität zu beobachten. Das ältere Notochord weiter anterior wies keinerlei GFP Aktivität auf. Zusätzlich zu der beschriebenen Expression im EGO, im Primitivknoten und im Notochord wurden keine weiteren ektopischen GFP-Expressionsdomänen festgestellt.

### 3.3 Morphologische Analyse von *Noto*<sup>GFP</sup> Nachkommen

Bei der Genotypisierung von Embryonen (aus einer heterozygoten Elternverpaarung) zwischen Tag 7.0 und 12.5 wurde ein Mendelsches Verteilungsverhältnis von 1:2:1 der Nachkommen beobachtet. Bei der Genotypisierung von Jungtieren beim Absetzen von der Mutter konnte aber unter den ersten vier Würfen kein homozygot mutantes Tier identifiziert werden. Daraufhin wurde ein Wurf direkt nach der Geburt (D0.25) analysiert und dokumentiert (siehe Abbildung 9) Unter den zehn Neugeborenen befanden sich vier Tiere mit einem mehr oder weniger starken Schwanzphänotyp, von denen drei schon tot waren oder kurz nach der Geburt starben. Die Neugeborenen b und e in Abbildung 9; A, wiesen Einschnürungen im Schwanz auf. Bei Tier c war eine Verdickung des Schwanzes erkennbar und Tier d besaß keinen Schwanz (Agenesie des Schwanzes). Diese beobachtete Varianz des Schwanzphänotyps deutete auf eine nicht komplette Penetranz des Phänotyps hin, der in der Vergangenheit auch schon bei den truncate Mutanten beobachtet wurde. Die Genotypisierung dieser Tiere, dessen Ergebnisse in Abbildung 9; B dargestellt sind, zeigte, dass es sich bei den vier teilweise toten Neugeborenen mit Schwanzphänotyp wie vermutet um homozygote Tiere handelte. Nur einer dieser homozygoten Neugeborenen überlebte letztendlich bis in das adulte Stadium. Weitere Analysen, über einen längeren Zeitraum, zeigten, dass lediglich ca. 10% der

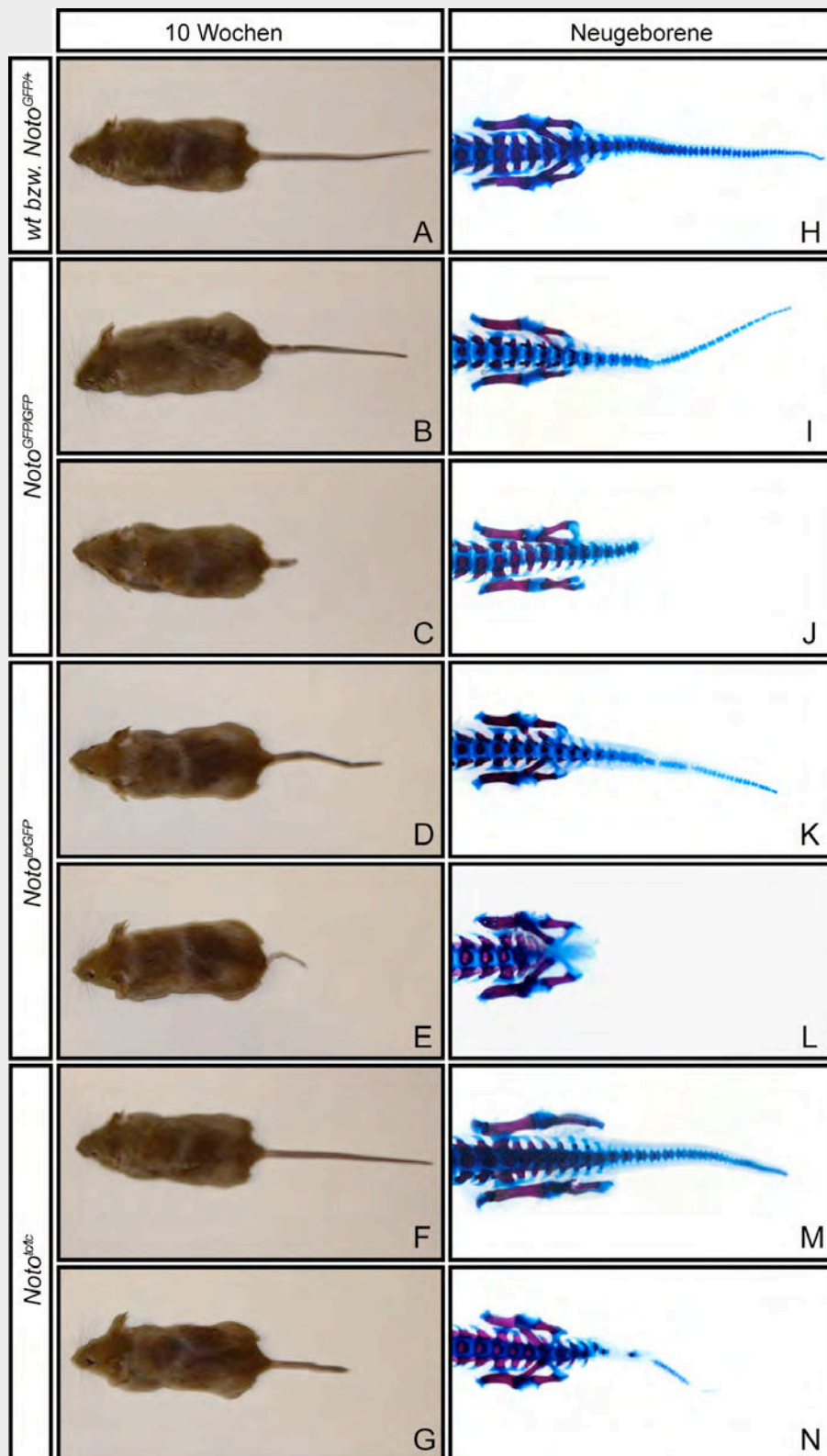
homozygoten Tiere überlebten. Die Würfe aus homozygoten Verpaarungen bestanden im Durchschnitt nur aus einem überlebenden Nachkommen. Im Vergleich dazu überleben ca. 80-90% der truncate Mäuse, die daher auch erfolgreich homozygot gehalten werden konnten.



**Abbildung 9: Neugeborene *Noto<sup>GFP</sup>* Mäuse mit Schwanzphänotyp und Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR.** A) a-e zeigen Ganzkörperaufnahmen und a'-e' zeigen jeweilige Vergrößerungen des Unterleibs inklusive Schwanzregion. Der Genotyp ist oberhalb angegeben. B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Genotypisierungs-PCR Produkte. Das GFP-Allel weist eine Größe von 552 bp auf und das Wildtyp-Allel eine Größe von 450 bp. Die Ladebezeichnung der einzelnen Taschen wurde von 1-10 durchnummeriert, wobei die PCR-Produkte in Tasche 1, 2, 5 und 6 auf der DNA der Tiere b bis e (siehe A) entstanden sind. Das PCR-Produkt in Tasche 4 ist auf der DNA des Tieres a (siehe A) entstanden. Rechts ist die Größenangabe (in bp) des Längenstandards (1 kb-Leiter) angegeben.

### 3.4 Analysen zu dem Skelettphänotyp *Noto* mutanter Mäuse- Vergleich des GFP-Null-Allels mit dem truncate Allel

Heterozygote Mäuse wiesen wie die Wildtyp (*wt*) Kontroll-Mäuse einen ganz normalen äußerlichen Phänotyp auf. Das axiale Skelett, die Wirbelsäule, war bis in die Schwanzspitze völlig normal entwickelt (siehe Abbildung 10; A).



**Abbildung 10: Äußerer Phänotyp sowie Skelettpräparationen von *Noto* mutanten Mäusen.** Repräsentative Beispiele äußerer Phänotypen von adulten Mäusen (A-G) der verschiedenen *Noto* Allel-Kombinationen sind links abgebildet. Beispiele von Knochen sowie Knorpel gefärbten Präparationen des kaudalen axialen Skeletts von Neugeborenen Mäusen (H-N) der verschiedenen *Noto* Allel-Kombinationen sind rechts abgebildet. Der Genotyp ist jeweils ganz links angegeben und das Alter oberhalb der Abbildung.

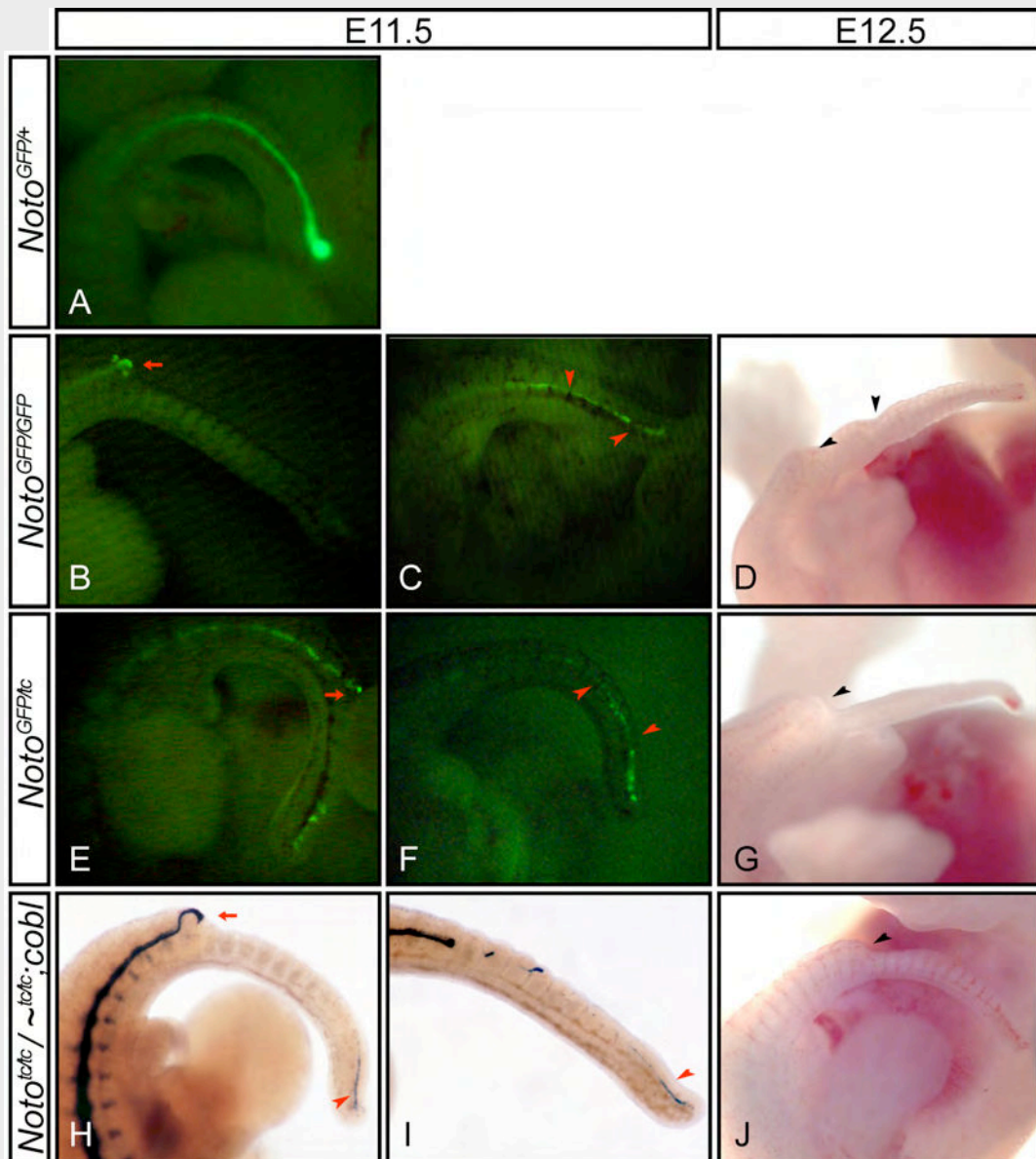
Auch eine Skelettanalyse von neugeborenen Mäusen mittels Knochen/Knorpel-Färbung zeigte, dass die Wirbelsäule der heterozygoten Mäuse nicht beeinträchtigt ist (siehe Abbildung 10; B). Heteroallelische *Noto*<sup>GFP/tc</sup> Mäuse wiesen im Gegensatz dazu eine nicht komplette Penetranz und eine variable Expressionsstärke einer Fehlentwicklung des axialen Skeletts auf (siehe Abbildung 10; D und E). Diese Defekte der Wirbelsäule waren mit denen der truncate Mutante vergleichbar. Dies deutete darauf hin, dass das GFP-Allel die *Noto* Funktion stört und war des Weiteren der Beweis dafür, dass es sich bei dem truncate Allel um ein *Noto* Allel handelt. Homozygote *Noto*<sup>GFP</sup> Mäuse wiesen ebenfalls Defekte in der Schwanzwirbelsäule auf, die genauso mehr oder minder stark ausgeprägt waren. In Abbildung 10 sind für jede Kombination der Allele (*Noto*<sup>GFP/GFP</sup>, *Noto*<sup>GFP/tc</sup> und *Noto*<sup>tc/tc</sup>) jeweils zwei unterschiedliche, repräsentative Beispiele adulter Mäuse (ungefähr im Alter von 10 Wochen, B-G), sowie je zwei Beispiele für Skelettpräparationen von Neugeborenen (I-N) gezeigt. Diese sowie weitere Mäuse, die analysiert wurden, wiesen größtenteils unterschiedlich starke Fehlentwicklungen der Wirbelsäule und eine kaudale Agenesie mit unterschiedlich starker Ausprägung auf. Der Schwanzphänotyp reichte von einer ganz normalen Schwanzwirbelsäule (M) über Knicke (I) oder Lücken (K und N) in der kaudalen Wirbelsäule bis hin zu einer verkürzten Schwanzwirbelsäule (J) oder einer Agenesie des kompletten Schwanzes. In allen drei Allel-Kombinationen konnte man die komplette Bandbreite des Phänotyps finden.

### **3.5 Vergleich des Notochordphänotyps des GFP-Null-Allels mit dem truncate Allel anhand der Aktivität von GFP bzw. lacZ**

Auch die Analysen von homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> und heteroallelischen *Noto*<sup>GFP/tc</sup> Embryonen am Embryonaltag 11.5 und 13.5 zeigten, dass diese Embryonen phänotypisch den homozygot *Noto*<sup>tc</sup> Embryonen entsprachen. Sie wiesen alle die für die truncate Mutanten typischen variablen Defekte des Schwanzes auf, die äußerlich erstmals am Embryonaltag 13.5 zu erkennen sind. Dabei handelt es sich um dünne oder eingeschnürte Schwänze, wie sie in Abbildung 10; D, G und J zu sehen sind (schwarze Pfeilköpfe). Des Weiteren sind zu einem früheren Entwicklungsstadium (E11.5) schon unterschiedlich stark ausgeprägte Defekte des Notochords zu



beobachten. Hierbei handelt es sich beispielsweise um ein vorzeitig abgebrochenes Notochord in und kaudal zu der Sakralregion (rote Pfeile in Abbildung 10; B, E und H) oder um ein diskontinuierliches kaudales Notochord oder auch nur um verstreute

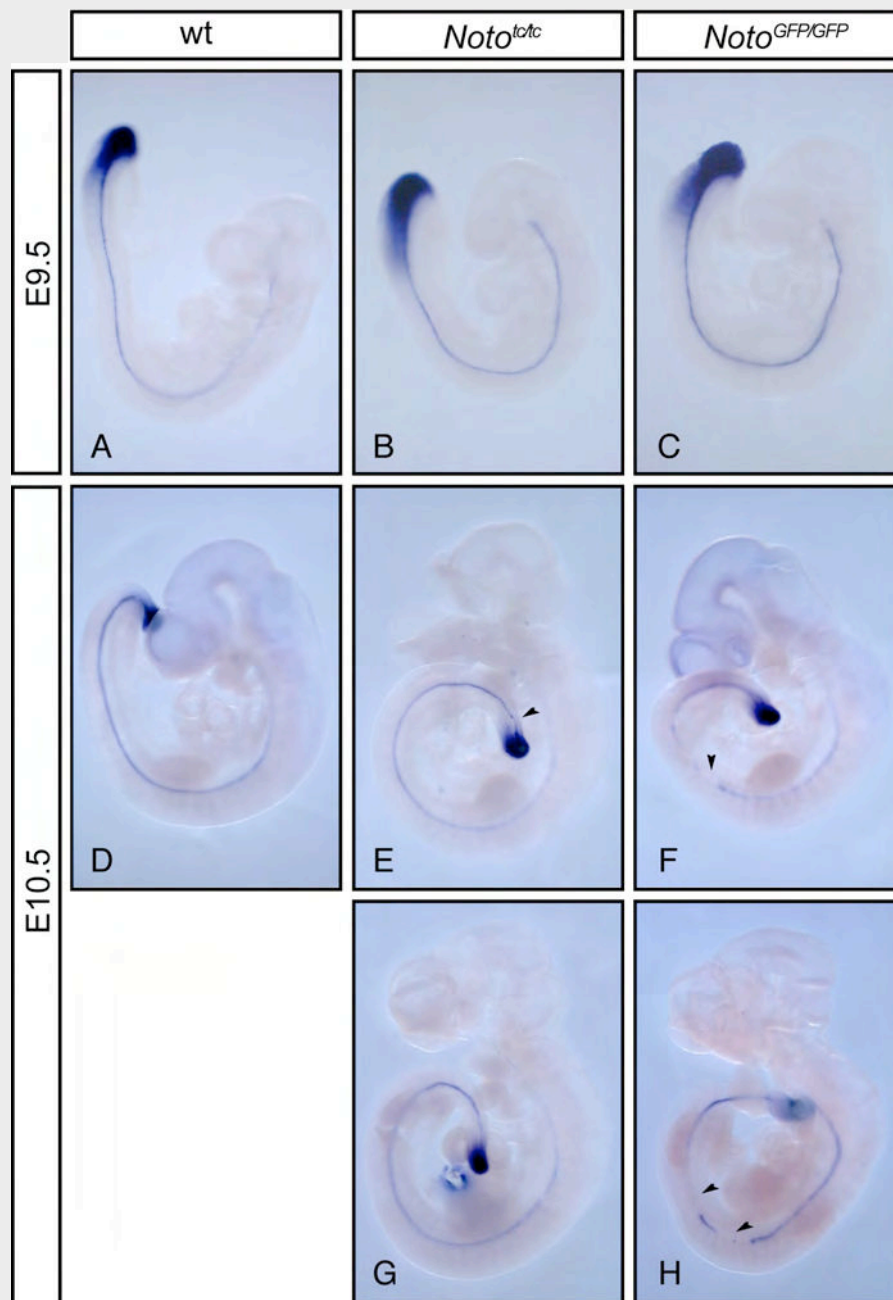


**Abbildung 11: Vergleich der Notochord- und Schwanzdefekte in *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* (B-D), *Noto<sup>GFP/tc</sup>* (E-G) und *Noto<sup>tc/tc</sup>* (H-J). Der normale Notochord- bzw. Schwanzphänotyp ist durch *Noto<sup>GFP/+</sup>* in A dargestellt. Die schwarzen Pfeilköpfe in D, G und J weisen auf Einschnürungen im Schwanz von E13.5 Embryonen. In den *Noto<sup>tc/tc</sup>* E11.5 Embryonen ist das Notochord durch eine *lacZ*-Färbung sichtbar gemacht. Es handelt sich dabei um Embryonen, die *lacZ* von einer „gene trap“ Insertion in den *Cobl*-Lokus tragen, der in den *tc* Hintergrund gekreuzt wurde. In Embryonen mit mindestens einem GFP-Allel wurde das Notochord durch die GFP Fluoreszenz sichtbar gemacht. In alle Genotypen konnte man Embryonen mit in der Sakralregion abgebrochenem Notochord (rote Pfeile in B, E und H), mit unterbrochenem kaudalen Notochord (rote Pfeilköpfe in C und F) oder mit verstreuten Überresten eines Notochords (rote Pfeilköpfe in E, H und I) finden.**

Überbleibsel vom Notochord im Schwanzende (rote Pfeilköpfe in Abbildung 10; C, F, H und I). Das Notochord der Embryonen mit mindestens einem GFP Allel war anhand der GFP Aktivität detektierbar. In den truncate Embryonen war das Notochord durch eine *lacZ*-Färbung sichtbar gemacht. Diese *lacZ*-Expression war hervorgerufen durch eine „gene trap“ Insertion des *lacZ*-Gens in den *Cobl*-Lokus (Gasca et al. 1995). Diese transgenen Mäuse waren in den mutanten truncate Hintergrund gekreuzt. Bei *Cobl*, *cordon-bleu*, handelt es sich um ein Gen, das in den axialen Strukturen des gastrulierenden Mausembryos exprimiert ist. Die beiden Bilder (Abbildung 11; H und I) der *lacZ*-gefärbten *Noto<sup>tc/tc</sup>;cobl* Embryonen wurden mir freundlicherweise von Achim Gossler für die Zusammenstellung der Abbildung zur Verfügung gestellt.

### 3.6 Molekulare Analyse des Notochords anhand der *Brachyury (T)* Expression

Um eine Idee davon zu bekommen, in welchem axialen Bereich die Notochordentwicklung gestört ist, wurde das Notochord von homozygoten E9.5 und E10.5 *Noto<sup>GFP</sup>* und *Noto<sup>tc</sup>* mit Hilfe einer Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung der RNA-Sonde für *Brachyury (T)*, ein Gen, das im sich entwickelnden Notochord exprimiert ist, sichtbar gemacht. In *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* (n=13) und *Noto<sup>tc/tc</sup>* (n=7) Embryonen konnten am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung (siehe Abbildung 12; B und C) keinerlei Defekte im Notochord festgestellt werden. Einen Tag später (E10.5) wiesen zwei von sechs analysierten *Noto<sup>tc/tc</sup>* Embryonen posterior zu den hinteren Extremitätenknospen Lücken im Notochord auf (siehe Abbildung 12; G). Weiter in anteriorer Richtung gelegene Defekte des Notochords wurden in zwei von neun homozygot *Noto<sup>GFP</sup>* Embryonen festgestellt (siehe Abbildung 12; H), während alle anderen analysierten Embryonen dieses Entwicklungsstadiums hauptsächlich normale Notochords entlang der gesamten Körperachse oder nur ganz leichte posteriore Defekte aufwiesen (siehe Abbildung 12; E und F). Die am weitesten anterior gelegene Unterbrechung des Notochords bei diesen Embryonen wurde kaudal zum 16 oder 17 Somiten (siehe Pfeilkopf in Abbildung 12; H) in einem *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* Embryo gefunden, was einem Defekt des Notochords entsprach, der fünf Somiten weiter kranial lag, als er für die truncate Mutante jemals beschrieben



**Abbildung 12: Brachyury (T) Expression** in E9.5 (A-C) und E10.5 (D-H) Wildtyp (A und D), *Noto<sup>tc/tc</sup>* (B, E, und G) und *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* (C, F und H) Embryonen. In E9.5 Embryonen wurden keinerlei Defekte des Notochords gefunden. In E10.5 Embryonen waren die Notochords vorwiegend normal (G) oder sie wiesen Lücken in der Schwanz- (E) oder Rumpfregeion (F und H) auf, die jeweils durch schwarze Pfeilköpfe angezeigt sind.

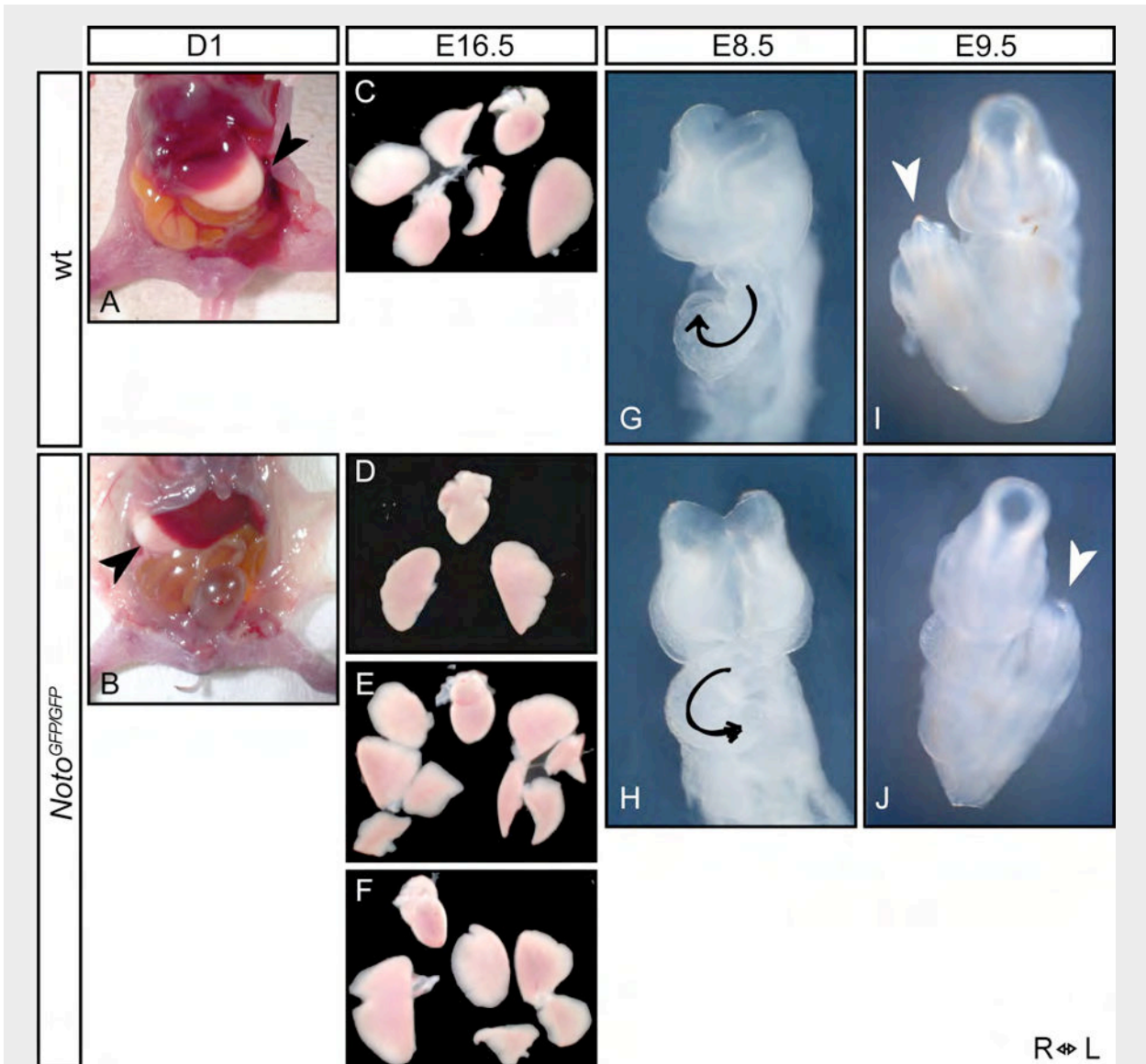
wurde (Theiler 1959; Theiler 1988). Die beobachtete höhere postnatale Sterberate, die höhere Penetranz von kaudaler Stützung bzw. Agenesie des Schwanzes und die weiter anterior lokalisierten Defekte in der Entwicklung des Notochords in *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* wiesen darauf hin, dass es sich bei der truncate Mutante nicht um ein Null-Allel handelt. Die im anterioren Abschnitt normale Entwicklung des Notochords



in truncate, wie auch im GFP-Null-Allel spricht dafür, dass die *Noto* Funktion entlang der Körperachse unterschiedlich gebraucht wird. Eine gestörte Notochordentwicklung sowie Verkürzungen des axialen Skeletts können oftmals auch mit Nierendefekten oder anderen Fehlfunktionen des Urogenitaltrakts oder anorektalen Fehlbildungen einhergehen, die wiederum zu einer postnatal erhöhten Sterberate führen (Gluecksohn-Schoenheimer 1943). Diese Defekte stellten aber sehr wahrscheinlich nicht den Grund für die hohe postnatale Sterberate beim Null-Allel dar, weil die analysierten homozygoten Föten kurz vor Geburt, E18.5 (n=12), sowie alle aufgefundenen toten Neugeborenen (n=10), äußerlich normale Nieren aufwiesen. Es wurde kein Tier gefunden, die dislozierte oder gar fehlende Nieren aufwiesen, was für offensichtliche Nierendefekte, wie man es von der „Danforth's short tail (*Sd*)“ Mutante her kennt (Maatman et al. 1997), gesprochen hätte. Des Weiteren gab es kein Tier, das auffällig abnormale anorektale Fehlbildungen aufwies.

### 3.7 Analysen zur Lateralität in den *Noto* Mutanten

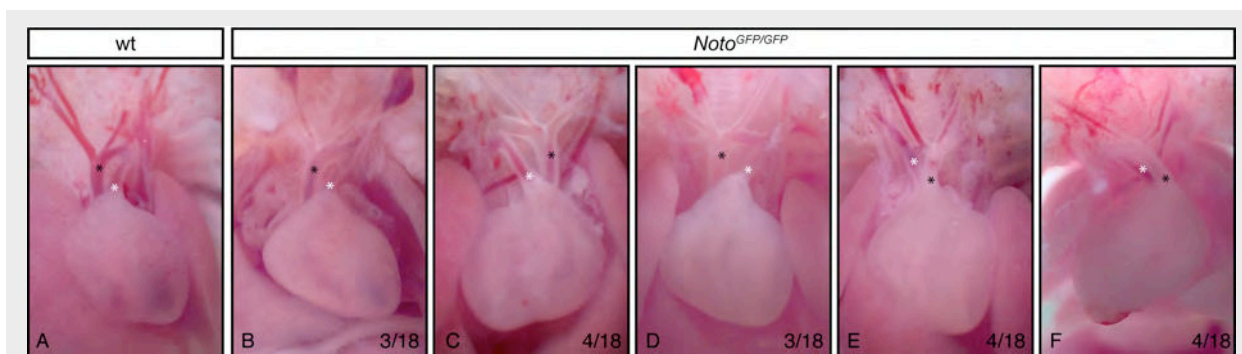
Eine genauere Inspektion der inneren Organe von homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung zeigte, dass der größte Teil der mutanten Embryonen Lateralitätsdefekte aufwies (siehe Abbildung 13) Makroskopische Analysen zeigten, dass homozygot mutante Embryonen (E16.5) neben Heterotaxie (n=2/32) auch Linksisomerie (n=11/32) (siehe Abbildung 13; D) und Rechtsisomerie (n=4/32) (siehe Abbildung 13; E) der Lungen, sowie eine auf den ersten Blick komplette Inversion der inneren Organe (*situs inversus totalis*) (n=9/32) (siehe Abbildung 13; F) oder einen auf den ersten Blick normalen Situs (*situs solitus*) (n=6/32) (wie in Abbildung 13; C) aufwiesen. Bei Mutanten mit Lateralitätsdefekten wie Heterotaxie oder Isomerismen war es wahrscheinlich, dass sie als Sekundäreffekte auch komplexe Herzfehler aufwiesen (Shiratori et al. 2006). Zusätzlich war es nahe liegend, dass auch bei einem Großteil der Mutanten mit makroskopisch erkennbarem *situs inversus* und *situs solitus*, Defekte im kardiovaskulären System festzustellen waren.



**Abbildung 13: Lateralitätsdefekte in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten.** Übersicht über die Positionierung der inneren Organe in Wildtyp (A) und *NotoGFP/GFP* (B) bei Neugeborenen. Der schwarze Pfeilkopf (in A und B) zeigt auf den mit Milch gefüllten Magen. (C-F) Bilder von auseinander präparierten Herzen und Loben der Lungenflügel beider Seiten von E16.5 Wildtyp (C) und drei verschiedenen mutanten (D-F) Embryonen. Invertierte Krümmung des Herzschlauches am Embryonaltag 8.5 (H) sowie Ergebnis einer invertierten embryonalen Drehung am Tag 9.5 (J) in mutanten Embryonen. G und I zeigen die jeweilige Situation in Wildtyp. „L ↔ R“ beschreibt die Orientierung der Embryonen, wobei L für links und R für rechts steht.

Aus diesem Grund wurde der Ausflusstrakt von einigen Mutanten kurz vor der Geburt (E18.5) analysiert und dokumentiert. Die Atrien wurden für eine bessere Dokumentation entfernt. In der Wildtypsituation (siehe Abbildung 14 A) entspringt die Pulmonalarterie (markiert durch einen weißen Stern) aus dem rechten Ventrikel und geht schräg nach links oben. Die Aorta (markiert mit dem schwarzen Stern) entspringt dahinter aus dem linken Ventrikel kommend und führt dann in einem

Bogen nach links. Unter den Mutanten waren Anordnungen dieser beiden Gefäße wie in Wildtyp (siehe Abbildung 14 B) zu finden, oder auch eine komplette Invertierung dieser Situation (siehe Abbildung 14 C). Des Weiteren gab es Herzen in denen die beiden Gefäße relativ zentral aber in der richtigen Anordnung aus dem Herzen entsprangen (siehe Abbildung 14 D) oder Herzen in denen die Gefäße genau nebeneinander aus einem zentral positionierten Herz entsprangen (siehe Abbildung 14 E). Und es gab auch Herzen, die auf den ersten Blick invertiert aussahen, bei denen aber die Aorta vor der Pulmonalarterie liegend, aus dem linken Ventrikel kommend, sich in einem Bogen nach rechts krümmte (siehe F). Die drei zuletzt beschriebenen Defekte des Ausflustrakts stellen eine plausible Erklärung für die hohe postnatale Sterberate dar.



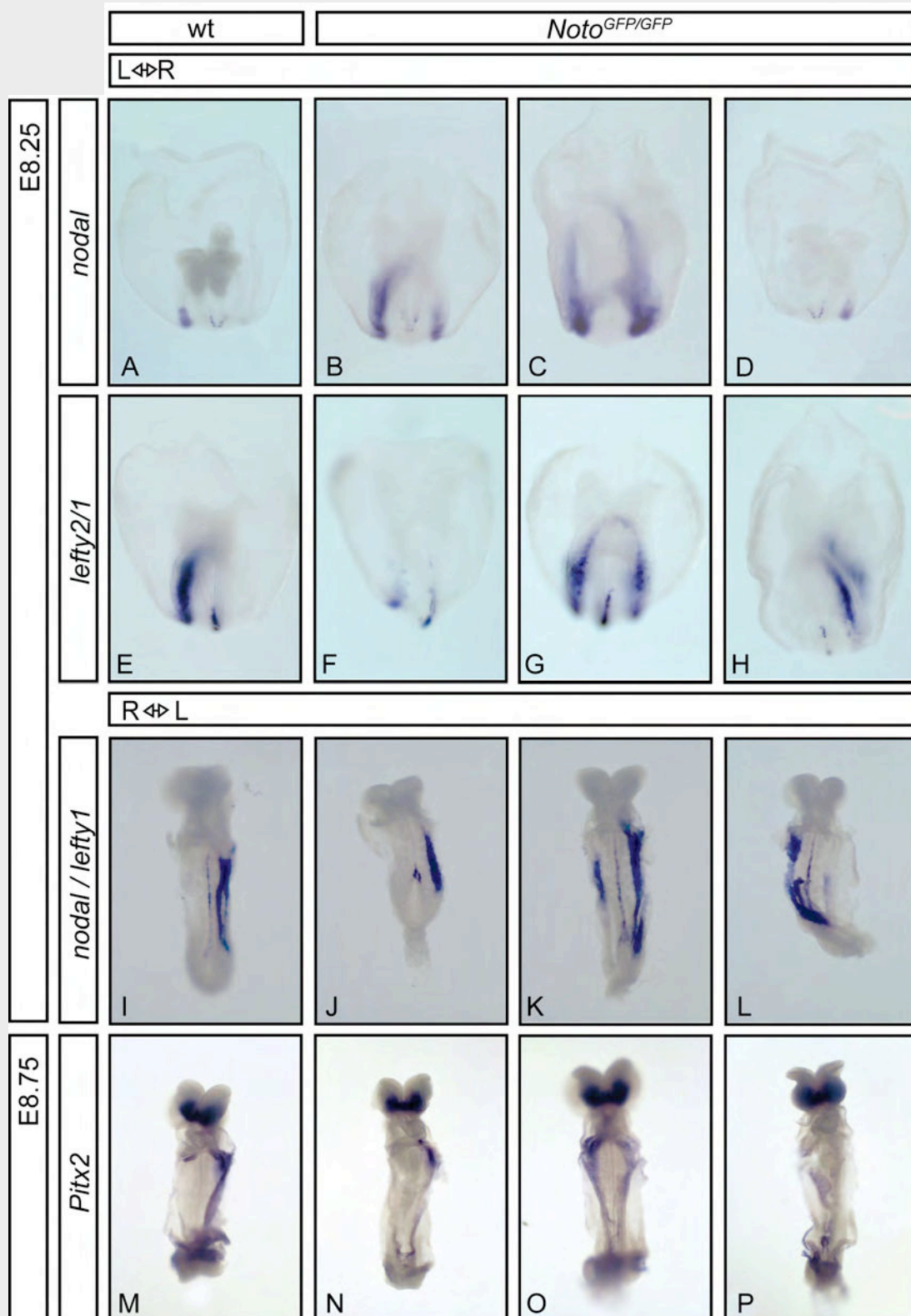
**Abbildung 14: Lage des Herzens und der großen Gefäße des Ausflustrakts in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten.** Übersicht über die unterschiedliche Positionierung der Herzen und der Hauptschlagader (*aorta*) sowie der Pulmonalarterie (*arteria pulmonalis*). Die Atrien wurden für eine bessere Dokumentation entfernt. (A) zeigt die Wildtypsituation, (B-F) die fünf verschiedenen Situationen, die bei den Mutanten gefunden werden konnten. In jedem Bild ist unten rechts die Häufigkeit angegeben, mit der genau diese Anordnung von Herz und Gefäßen beobachtet wurde. Die Pulmonalarterie ist durch einen weißen Stern markiert und die Aorta mit dem schwarzen Stern. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Zusätzlich sind auch Asplenie oder Polysplenie bei Lateralitätsdefekten sehr häufig beschrieben und meistens mit Rechts- bzw. Linksisomerie einhergehend. Diese Defekte konnten in den *Noto* Mutanten aber nicht entdeckt werden. Das erste morphologisch sichtbare Ereignis, bei dem während der Embryonalentwicklung eine Asymmetrie zwischen der rechten und der linken Körperhälfte erkennbar wird, ist die Krümmung des tubulären Herzschlauchs am Embryonaltag 8.5. Bei diesem Vorgang dreht sich der mittig positionierte Herzschlauch nach rechts. Einige mutante Embryonen wiesen aber im Gegensatz dazu eine Krümmung des Herzschlauches

nach links auf (siehe Abbildung 13; H). Dieser Prozess, der zu einer Herzschlauchkrümmung führt, wird in der Maus gefolgt von einer Rotation des Embryos entlang der anterior-posterioren (AP) Achse gegen den Uhrzeigersinn. Infolge dessen kommt der posteriore Teil des Embryos (der Schwanz) am Tag 9.5 rechterhand zu liegen. Dieser Vorgang der embryonalen Drehung findet bei einem Teil der homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen (siehe Abbildung 13; J) genau in entgegengesetzter Richtung statt.

### 3.8 Molekulare Analyse der Links-Rechts Determination in den *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten

Konsistent mit dem teilweise abnormalen Situs der Viszeralorgane, der in manchen analysierten Embryonen invertierten Krümmung des Herzschlauches und der invertierten embryonalen Drehung waren in vielen *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten auch die Expressionsmuster von normalerweise links-asymmetrisch exprimierten Genen verändert. Diese links-asymmetrische Expression von Genen, die für verschiedene Signalmoleküle kodieren, ist noch vor der ersten morphologisch sichtbaren Asymmetrie des Embryos am Embryonaltag 8.5, dem Herzlooping, detektierbar. *Nodal* ist während der Embryonalentwicklung, im späten Kopffaltenstadium (E8.0), das erste asymmetrisch aktive Gen. Dieses Signalmolekül der TGFβ-Familie (Zhou et al. 1993) ist zu diesem Zeitpunkt asymmetrisch um den Primitivknoten/PNC der Maus exprimiert. Kurze Zeit später, E8.25, ist *nodal* auffällig asymmetrisch im linken Seitenplattenmesoderm (SPM) exprimiert. In homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen zeigte ein Teil der Embryonen eine normale Expression von *nodal* (n=2/10), andere wiesen aber eine bilaterale Expression (n=4/10), eine Expression im rechten SPM (n=1/10) oder aber eine stark reduzierte bis abwesende Expression im linken SPM (n=3/10) auf (siehe Abbildung 15; A bis D, sowie nicht gezeigte Daten). Des Weiteren wurden für die *lefty2* und *lefty1* Expression ähnliche Abweichungen vom normalen Expressionsmuster festgestellt. Mutante Embryonen wiesen eine mehr oder weniger normale linkseitige Expression im SPM (n=1/8), eine bilaterale (n=3/8), eine rechtsseitige (n=3/8) oder eine klar runterregulierte (n=1/8) Expression auf (siehe Abbildung 15; E bis H, wie auch nicht dargestellte Daten). Die *lefty1* Expression in der Mittellinie, bzw. im linken Teil der Bodenplatte des



**Abbildung 15: Molekulare Analyse von Markern, die asymmetrisch im Mausembryo exprimiert sind.** Bilder von Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen von Wildtyp und jeweils drei repräsentativen mutanten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen. Die Genotypen sind oben angegeben und die verwendeten Proben bzw. Probenkombinationen (bei nicht überlappenden Expressionsdomänen) sind links angegeben. „L ↔ R“ beschreibt die Orientierung der Embryonen, wobei L für links und R für rechts steht.

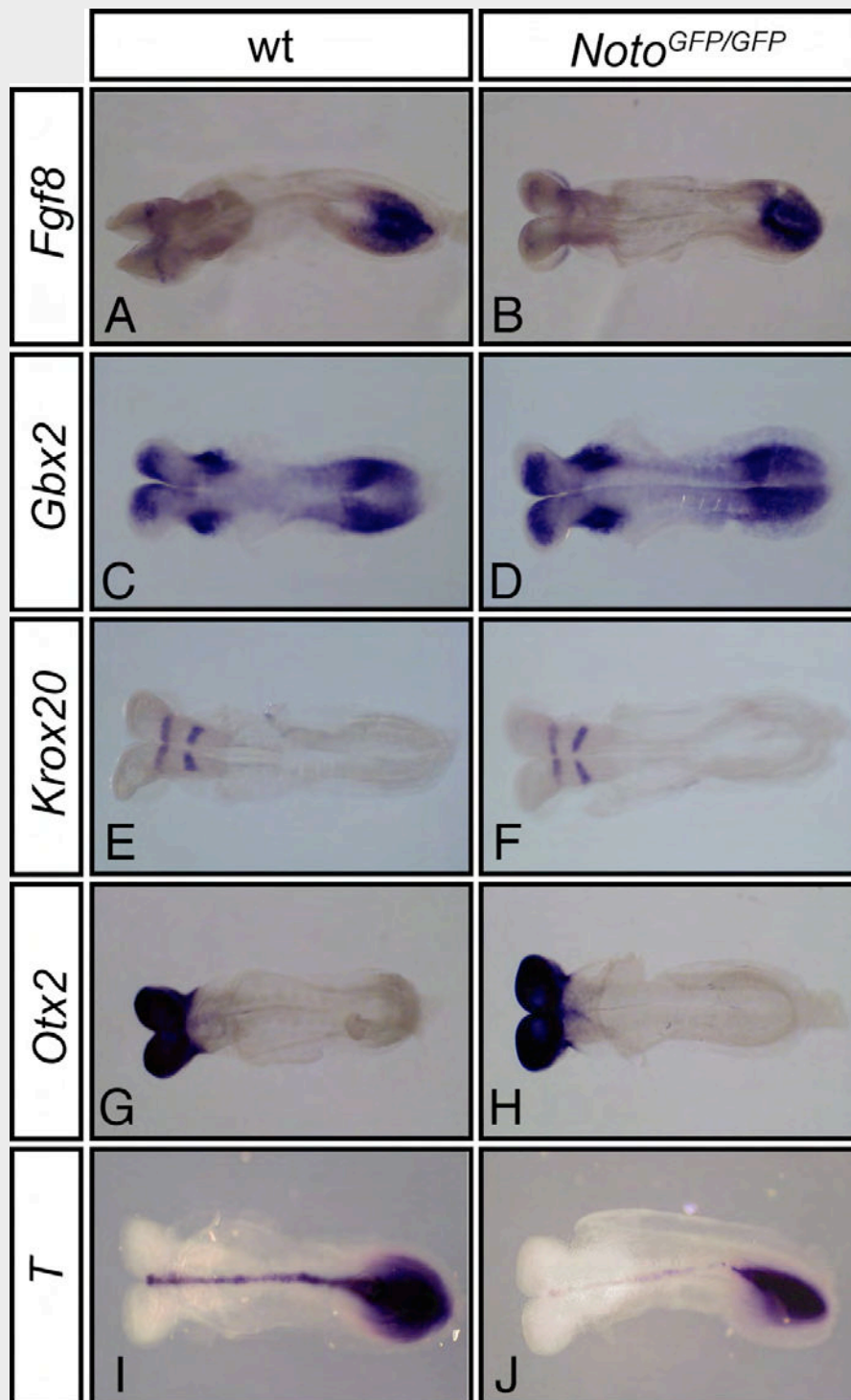
Neuralrohrs, war in der Mehrheit der analysierten Embryonen ( $n=5/8$ ) vorhanden. Diese Expression war aber in einer variierenden Stärke zu beobachten. Zusätzlich gab es Embryonen, bei denen die kontinuierliche Expressionsdomäne in der Mittellinie teilweise unterbrochen ( $n=2/8$ ) oder komplett verloren ( $n=1/8$ ) war (siehe Abbildung 15; E bis L, sowie nicht dargestellte Daten). Ebenso war die Expression von *Pitx2*, das ebenfalls ein Zielgen von *nodal* darstellt und wichtig für die asymmetrische Organentwicklung ist (Lin et al. 1999), kurze Zeit später in der Embryonalentwicklung (E8.75 bzw. 7-10 Somiten), in den Mutanten randomisiert. Einer von sieben mutanten Embryonen zeigte normale linksseitige Expression im SPM. Vier Embryonen hatten bilaterale, einer rechtsseitige und ebenfalls einer wies keinerlei Expression von *Pitx2* auf (siehe Abbildung 15; M bis P, sowie nicht dargestellte Daten).

### 3.9 Molekulare Analyse der anterior-posterior Determination in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten

Aufgrund der Wichtigkeit des frühen Gastrula Organisators (EGO) in der Festlegung der anterior-posterioren (AP) Körperachse (Ang and Rossant 1994; Klingensmith et al. 1999; Tam and Steiner 1999; Ang and Behringer 2002) sowie der Tatsache, dass *Noto* im frühen Organisator exprimiert ist (Abdelkhalek et al. 2004; Plouhinec et al. 2004) wurde die AP-Musterbildung in homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten im Vergleich zu Wildtyp überprüft. Es erfolgte eine Analyse in E8.5 Embryonen (entspricht 7-10 Somiten) mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen. Bei den Expressionsmustern von *Fgf8*, *Gbx2*, *Krox20* sowie *Otx2* (siehe Abbildung 16; A bis H) waren zwischen Wildtyp und Mutanten keinerlei Unterschiede feststellbar, was darauf hin deutete, dass die Musterbildung im Neuroektoderm entlang der AP-Achse ohne Probleme normal verläuft.

Eine Ausnahme stellte die Brachyury (*T*) Expression dar. Wie in Abbildung 16 I und J zu sehen ist, sind in den mutanten Embryonen die *T* Transkripte in der Schwanzknospe am posterioren Ende des Embryos zwar normal lokalisiert und auch in gleicher Stärke detektierbar, aber die Expression von *T* im Notochord war reduziert, obwohl das Notochord, wie schon gezeigt, im Rumpfbereich zu späteren Stadien (E9.5) völlig normal ist (siehe Abbildung 12).



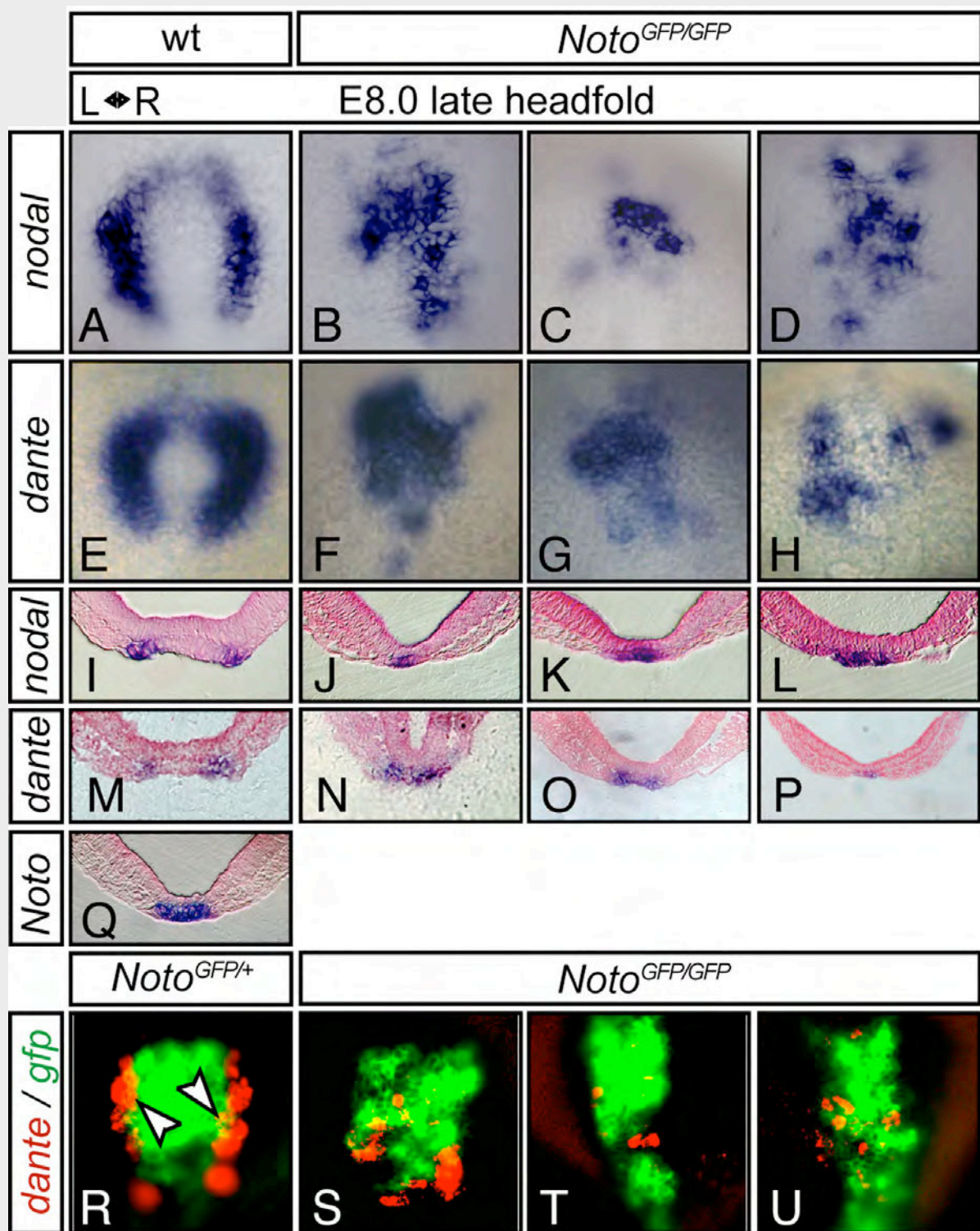


**Abbildung 16: Anterior-posteriore (AP) Musterbildung in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten.** Analyse mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen von Wildtyp und *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen am Embryonaltag 8.5 (7-10 Somiten) mit verschiedenen Markergenen, die auf die Festlegung der AP-Achse Rückschlüsse ziehen lassen. Der Genotyp ist oberhalb angegeben und die verschiedenen Markergene links.

### 3.10 Analyse der Primitivknotenregion in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten

Aufgrund der Tatsache, dass der Primitivknoten den entscheidenden Ort für den Bruch der Symmetrie darstellte, wurde dieser näher analysiert. Dafür wurde zuerst die Expression von *nodal* und *dante* (auch als *Cer12* bekannt) überprüft. Dafür wurden mit beiden Proben auf Embryonen des späten Kopffaltenstadiums (E8.0) Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung sind diese beiden Gene in Wildtyp Embryonen normalerweise asymmetrisch in zwei sichelförmigen Domänen rechts und links in den Kronenzellen um den Primitivknoten exprimiert, wobei für *nodal* eine stärkere Expression auf der linken Seite zu verzeichnen ist und für *dante* auf der rechten (siehe Abbildung 17; A bzw. E). Von jeweils ca. 10 analysierten *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen wies nur jeweils einer ein annähernd normales Expressionsmuster für *nodal* bzw. *dante* auf. In allen anderen mutanten Embryonen war die *nodal* und *dante* mRNA in einer irregulären Anordnung von Zellgruppen unterschiedlicher Größe lokalisiert und in verstreuten Zellgruppen im Bereich der zentralen Knotenzellen, den sog. Grubenzellen, erkennbar. Diese mit Zilien besetzten Grubenzellen stellen das Zentrum des posterioren Notochords dar und exprimieren normalerweise kein *nodal* oder *dante* sondern anstelle dessen *Noto*. In Abbildung 17; B bis D bzw. F bis H sind jeweils drei repräsentative Beispiele für die *nodal* bzw. *dante* Expression in den GFP-Mutanten gezeigt. Die darunter abgebildeten, mit Eosin gegengefärbten Schnitte von in Plastik eingebetteten Embryonen nach einer Hybridisierung mit *nodal* bzw. *dante*, zeigten, dass die jeweilige mRNA in den Mutanten nicht mehr wie in Wildtyp (Abbildung 17; I und M) im Bereich der Kronenzellen, rechts und links vom Knoten lokalisiert ist, sondern in der Region der Grubenzellen (Abbildung 17; J bis L sowie N bis P). Doppel (Fluoreszenz/Histochemisch) *in situ* Hybridisierungen ließen erkennen, dass in homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen die *dante* exprimierenden Zellen mit Zellen vermischt sind, die *gfp* aus dem *Noto* Locus exprimieren (Abbildung 17; R bis T). Diese Beobachtung legte nahe, dass die beiden verschiedenen Zellpopulationen der Gruben- und Kronenzellen zwar vorhanden sind, aber insgesamt die Struktur und die zelluläre Anordnung des Primitivknotens falsch organisiert sind.

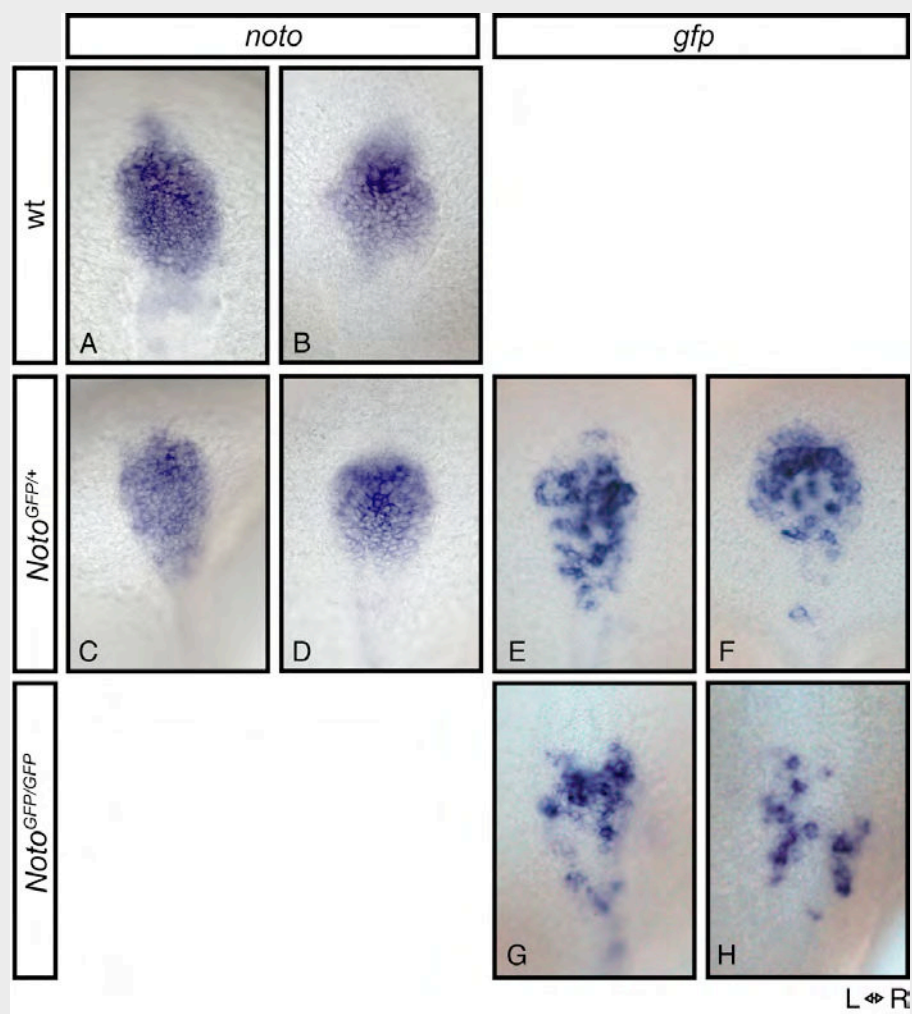




**Abbildung 17: Defekte der Primitivknotenmorphologie in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten.** Bilder von der Knotenregion nach Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen mit Proben für *nodal* (A-D) und *dante* (E-H). (I-Q) Mit Eosin gegen gefärbte Schnitte von in Plastik eingebetteten Embryonen nach der Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung. (R-U) Doppel *in situ* Hybridisierung (Fluoreszenz/Histochemisch) mit *dante* (in rot) und *gfp* (in grün - Falschfarbendarstellung). Die jeweiligen Genotypen sind oberhalb angegeben und „L ↔ R“ gibt die Orientierung der Embryonen an.

### 3.11 Vergleich der *Noto*-Expression mit der *gfp*-Expression in den Knotenzellen von heterozygoten *Noto*<sup>GFP/+</sup> Embryonen

Bei der Auswertung der Daten aus den Doppel *in situ* Hybridisierungen (Teildaten sind in Abbildung 17; Q bis T zu sehen) ist aufgefallen, dass die *gfp*-Expression nicht einheitlich auf alle Grubenzellen in der Primitivknotenregion der heterozygoten E8.0 Embryonen (siehe Abbildung 17; Q) verteilt war. Um das zu überprüfen wurde mittels *in situ* Hybridisierung von heterozygoten *Noto*<sup>GFP/+</sup> Embryonen die *Noto*-Expression mit der *gfp*-Expression in den Knotenzellen verglichen. Wie in der nachfolgenden Abbildung zu erkennen ist, ist die *Noto*-Expression in Wildtyp Embryonen (siehe Abbildung 18; A und B) wie auch die in den heterozygot mutanten Embryonen

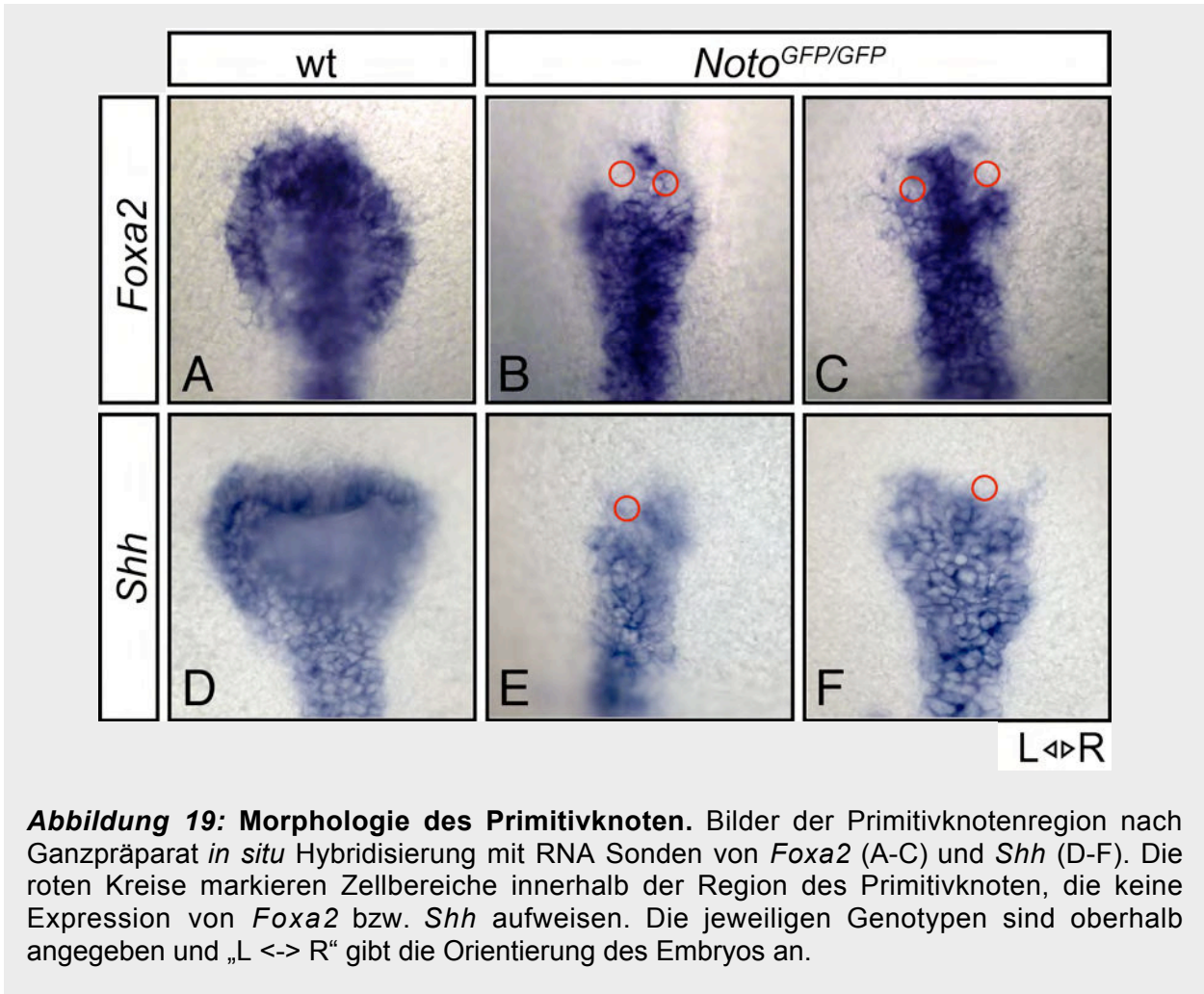


**Abbildung 18:** Vergleich von *Noto*-Expression und *gfp*-Expression in den Grubenzellen von *Noto*<sup>GFP/+</sup> (C-F) Embryonen. Zusätzlich wurde die *Noto*-Expression in Wildtyp Embryonen (A+B) und die *gfp*-Expression in *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> (G+H) Embryonen analysiert.

(siehe Abbildung 18; C und D) gleichmäßig auf alle Grubenzellen in der Primitivknotenregion verteilt. Bei der Analyse der *gfp*-Expression in den heterozygoten *Noto*<sup>GFP/+</sup> Embryonen (siehe Abbildung 18; E und F) ist aber zu erkennen, dass nicht alle Grubenzellen in der Primitivknotenregion eine *gfp*-Expression aufweisen. Die Expression gleicht einer zufälligen Verteilung, die man als „Salz & Pfeffer- Muster“ bezeichnen kann. Dieses Phänomen ließe sich damit erklären, dass in dem GFP-Allel im Gegensatz zum Wildtyp-Allel mögliche regulatorische Elemente, die sich im ersten Intron des *Noto*-Gens befinden, fehlen. Die *gfp*-Expression in den homozygoten *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen entspricht dann wiederum den Erwartungen, dass die Knotenmorphologie an sich gestört ist. Dort befinden sich Kronenzellen, die kein *gfp* exprimieren in der Region der Grubenzellen, sodass noch größere Bereiche ohne *gfp*-Expression zu erkennen sind.

### **3.12 Weitere Analysen zur Morphologie des Primitivknoten in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten**

Die Expression von *Foxa2* und *Shh*, die mit Hilfe einer Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung dargestellt wurde, zeigte ebenfalls, dass die Morphologie des Primitivknotens in den Mutanten extrem gestört ist. *Foxa2* sowie *Shh* sind in Mausembryonen des späten Kopffaltenstadiums im Primitivknoten/PNC, in der Bodenplatte des Neuralrohrs und im naszierenden Notochord exprimiert. In Wildtyp Embryonen sind die Knoten morphologisch als deutlich erkennbare Einbuchtungen am distalen Teil des Embryos zu sehen (siehe Abbildung 19; A und D). Der Primitivknoten/PNC selbst sowie das naszierende Notochord und die Bodenplatte sind durch die Expression von *Foxa2* und *Shh* klar zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist in den Mutanten die Expression der Markergene zwar noch vorhanden, wodurch sie die Region des Primitivknotens/PNC und das Notochord auch anzeigen, aber der Knoten tritt nicht als klar erkennbare Vertiefung am distalen Teil des Embryos in Erscheinung und er sieht kollabiert aus. Zusätzlich befinden sich Gruppen von „nicht-Knotenzellen“ in der Region des Primitivknoten (siehe die Zellbereiche, die in Abbildung 19; B, C, E und F mit roten Kreisen markiert sind).

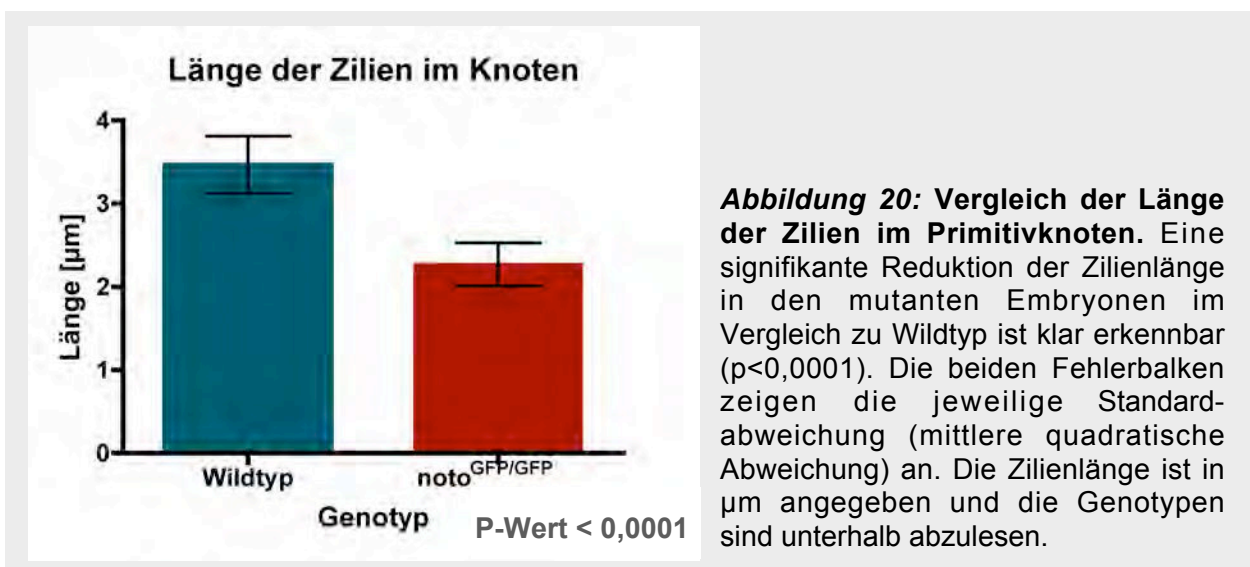


### 3.13 Analyse der Primitivknotenregion in *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten anhand von Elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Konsistent mit den oben beschriebenen Beobachtungen war es auch mit Hilfe einer rasterelektronenmikroskopischen Analyse der *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen (E7.5-8.0) in 12 der 21 analysierten Embryonen schwierig einen deutlich erkennbaren Primitivknoten ausfindig zu machen. In den restlichen Embryonen war der Knoten sehr klein und irregulär geformt. In keinem der analysierten Embryonen war am distalen Teil des Eizylinders die für den Primitivknoten charakteristische Einbuchtung zu erkennen. Im Gegensatz dazu war in der Kontrollgruppe der Wildtyp Embryonen in fast jedem Embryo auf den ersten Blick der Knoten als klar erkennbare Vertiefung ausfindig zu machen. In den *Noto*<sup>GFP</sup>-Mutanten war der Zellverband der Knotenzellen gestört. Die Grubenzellen bildeten keinen zusammenhängenden Zellverband, wie man ihn bei Wildtypembryonen vorfand. In

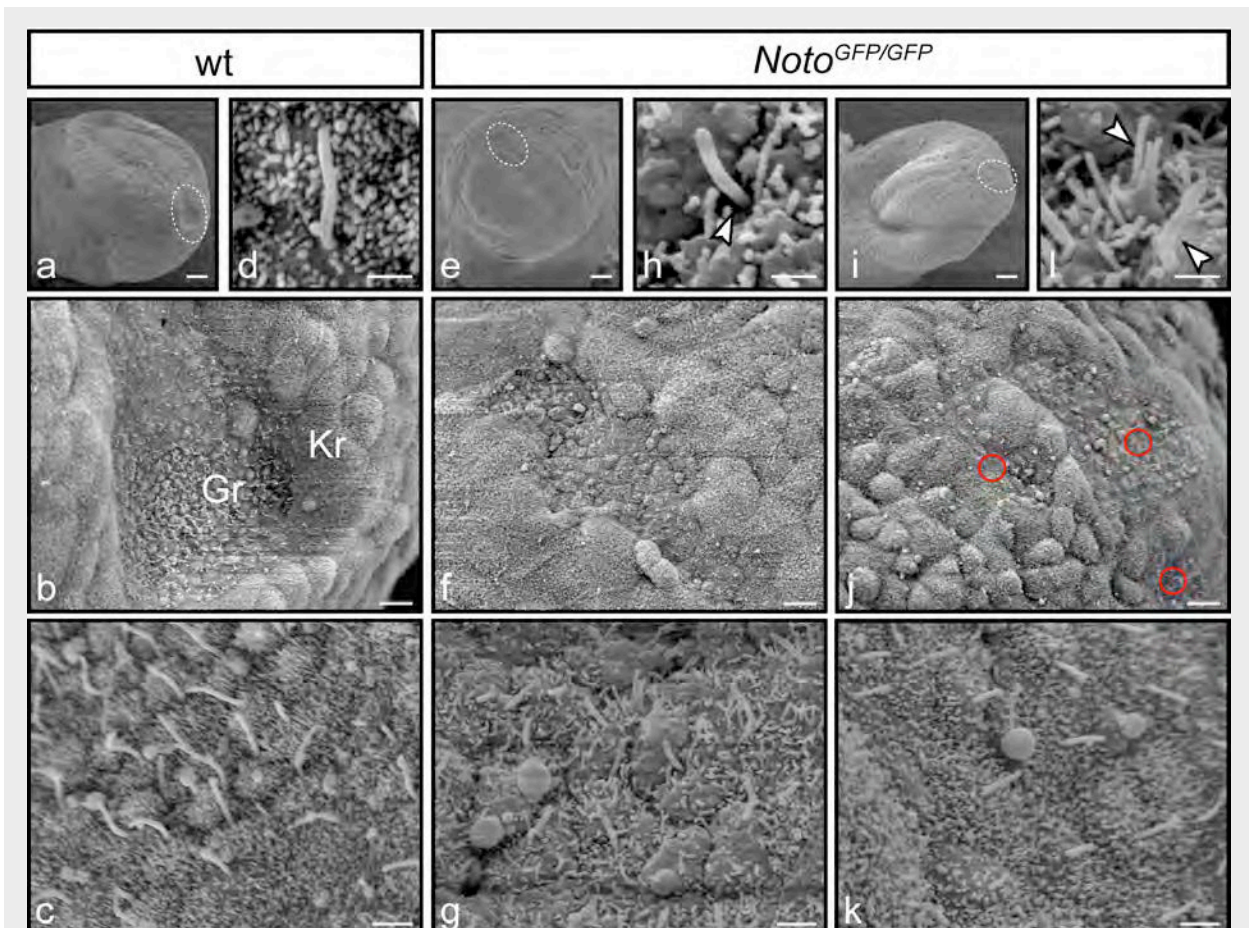


den mutanten Knotenregionen waren nicht zusammenhängende Gruppen von Grubenzellen erkennbar (rote Kreise in Abbildung 19; j). Zwischen den Kronen- und den Grubenzellen war keine scharfe Grenze auszumachen. In keinem der analysierten homozygot mutanten Embryonen war eine grubenähnliche Struktur zu sehen. Bei einer näheren Betrachtung der Knotenzellen war zu erkennen, dass diese Zellen Monozilien sowie Mikrovilli besaßen. Die Zilien der Mutanten sahen im Vergleich zu Zilien der Wildtypembryonen zu einem vergleichbaren Entwicklungsstadium (E8.0, kurz vor der Bildung des ersten Somiten) kürzer aus. Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (genutzt wurde die größte Vergrößerung; 6000fach) wurde die Länge der Zilien in einigen mutanten Embryonen (n=4) im Vergleich zu Wildtypembryonen (n=4) ausgemessen und ausgewertet. In der Gruppe der Mutanten wurden 93 Zilien vermessen und in der Wildtypgruppe waren es 109 verschiedene Zilien. Die Wildtyp-Zilien des späten Kopffaltenstadiums entsprachen durchschnittlich einer Länge von 3,48  $\mu\text{m}$ . Die Zilien von mutanten Embryonen vergleichbaren Alters wiesen im Gegensatz dazu eine durchschnittliche Länge von 2,51  $\mu\text{m}$  auf. Dieses Ergebnis ist in der nachfolgenden Abbildung in einem Säulendiagramm (siehe Abbildung 20) dargestellt. Die statistische Überprüfung mittels T-Tests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Vergleichsgruppen.



In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen war zusätzlich zu erkennen, dass einige Zilien aus Vertiefungen der Plasmamembran heraustreten (siehe

Abbildung 21; h). Einzelne Zilien waren von einer Art „Schlossgraben“ umgeben, der auf eine versenkte Lage dieser Zilien im Zytoplasma hindeutete. Zusätzlich traten die Mikrovilli der Zelloberflächen in den Mutanten teilweise gebündelt auf und besaßen eine sehr variable Länge (siehe Abbildung 21; l).



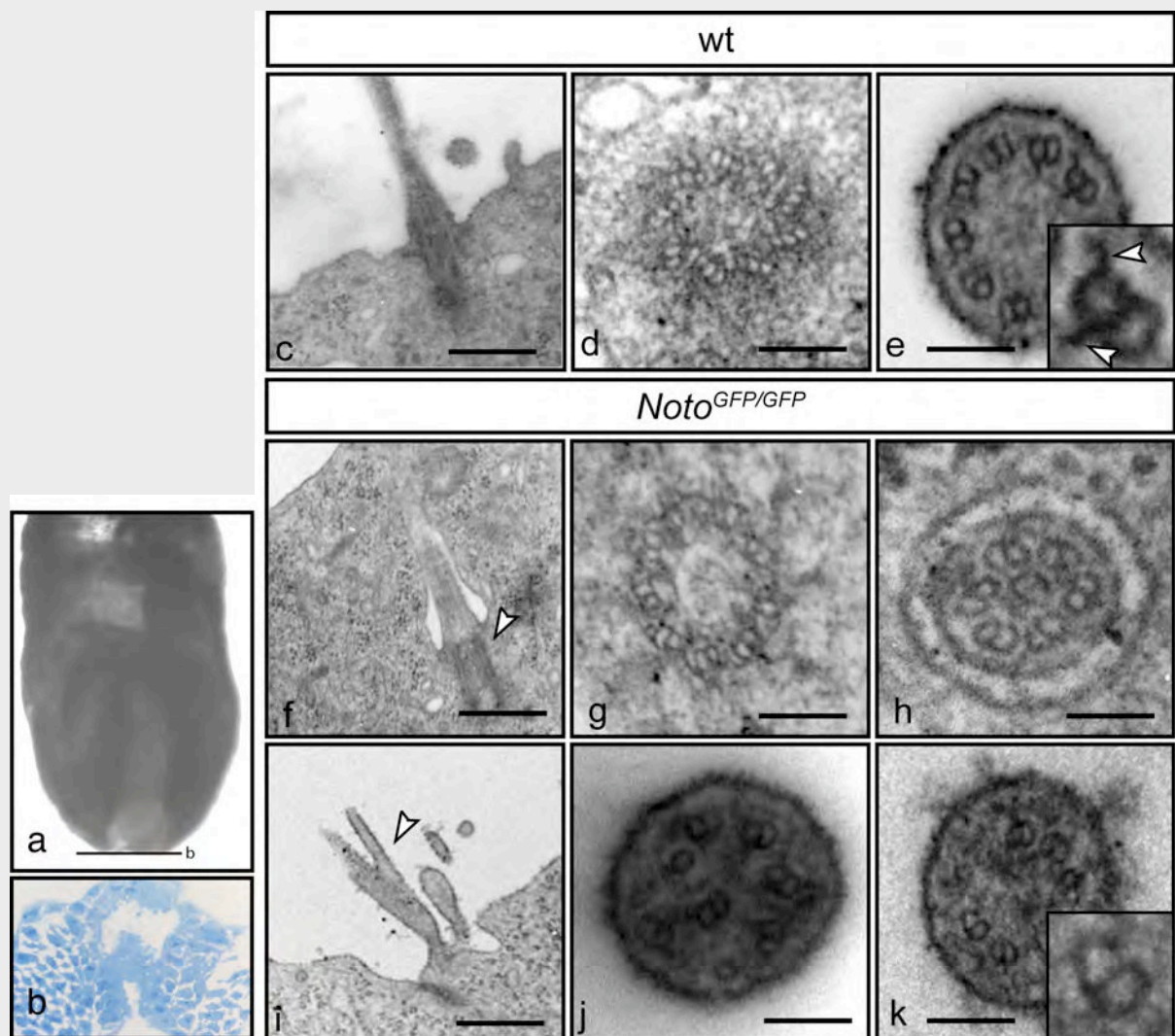
**Abbildung 21: Veränderte Knotenmorphologie in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten.** Rasterelektronenmikroskopische Bilder von E8.0 Wildtyp (a-d) und mutante (e-l) Embryonen. Die gepunkteten Kreise (in a, e und i) markieren die Knotenregion. Die roten Kreise in (j) markieren nicht zusammenhängende Gruppen von zilientragenden Grubenzellen. Der Pfeilkopf in (h) zeigt auf ein Zilium, das aus einer Vertiefung der Plasmamembran herauskommt. Die Pfeilköpfe in (l) zeigen auf gebündelt auftretende, verlängerte Mikrovilli sowie auf ein Zilium, das kürzer zu sein scheint. Der Maßstabsbalken in (d, h und l) entspricht 1  $\mu\text{m}$ ; in (c, g und k) 2  $\mu\text{m}$ ; in (b, f und j) 10  $\mu\text{m}$  sowie in (a, e und i) 50  $\mu\text{m}$ . Gr, Grubenzellen; Kr, Kronenzellen.

Insgesamt waren sie im Vergleich zu den Mikrovilli der Wildtyp Embryonen auch verlängert. Des Weiteren ließ sich anhand der 3000fachen Vergrößerung (dargestellt in Abbildung 21 c, g und k) feststellen, dass nicht jede Zelle in der Primitivknotenregion/PNC ein Zilium besaß. Insgesamt war festzuhalten, dass die

Anzahl der zilientragenden Knotenzellen reduziert war. Dies alles ließ vermuten, dass auch die Struktur der mutanten Zilien sowie Mikrovilli abweichend von der Wildtypsituation sein konnte.

In Kollaboration mit Prof. Dr. Christoph Viebahn (Zentrum Anatomie, Universität Göttingen) wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Noto*<sup>GFP/GFP</sup>-mutanten Embryonen am Embryonaltag 7.75 (spätes Kopffaltenstadium; n=11) gemacht. Im Vergleich zu Wildtypembryonen eines vergleichbaren Stadiums (n=4) wiesen die mutanten Embryonen längere Mikrovilli auf, die auch teilweise verzweigt sein konnten (weißer Pfeilkopf in Abbildung 22; i). Des Weiteren war klar zu sehen, dass die mutanten Zilien eine variierende Anzahl von teilweise völlig falsch arrangierten peripheren Mikrotubuli aufwiesen. Die Anzahl variierte von drei bis acht Doppeltubuli. Nur sehr selten waren Zilien mit den normalen neun Mikrotubuli zu finden. Diese peripheren Tubuli traten teilweise auch nicht mehr als Doppeltubuli (Dublets) mit einem A-Tubulus mit Dyneinarmen und dem B-Tubulus auf sondern es traten auch Mono-Tubuli auf, wie man sie aus dem Zentrum von beweglichen Zilien (z.B. des Respirationstrakts), her kennt. Diese von Zilium zu Zilium variierende Anzahl von Einzeltubuli und Dubletts schien ganz willkürlich über den gesamten Querschnitt des Ziliums verteilt zu sein. Des Weiteren zeigten vergrößerte Ausschnitte einzelner Tubuli oder Dubletts, dass keine Dyneinarme zu sehen waren (siehe vergrößerte Ausschnitte in Abbildung 22; k). Anhand von Sagitalschnitten durch ein Zilium eines *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> mutanten Embryos samt seines korrespondierenden Basalkörperchen (siehe Abbildung 22; f) war zu erkennen, dass das Zilium aus einem abnormal lokalisierten Basalkörperchen entsprang. Das Basalkörperchen befand sich nicht, wie man es von der Wildtypsituation her kennt, an der apikalen Zelloberfläche, sondern es war tief im Zytoplasma der Knotenzelle versunken (siehe Abbildung 22; c). Darüber hinaus zeigten einige Transversalschnitte von mutanten Zilien (siehe Abbildung 22; h), dass diese, zumindest teilweise, im Zytoplasma versunken sind. Unter den 41 Basalkörperchen, die in den Ultradünnschnitten gefunden wurden, waren nur 10 an der apikalen Zelloberfläche lokalisiert während sich 14 ganz offensichtlich abnormal tief im Cytoplasma befinden. Die Position der übrigen Basalkörperchen konnte in den zur Verfügung stehenden Schnitten nicht eindeutig festgestellt werden. Der Aufbau und die Struktur der Basalkörperchen in den *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> mutanten Embryonen schien aber nicht

betroffen zu sein. In Abbildung 22; g ist ein Transversalschnitt eines Basalkörperchens gezeigt, das sich nicht von dem Wildtyp Basalkörperchen (siehe Abbildung 22; d) unterscheiden lässt.



**Abbildung 22: Abnormale Struktur der Mikrovilli und Zilien in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten.**

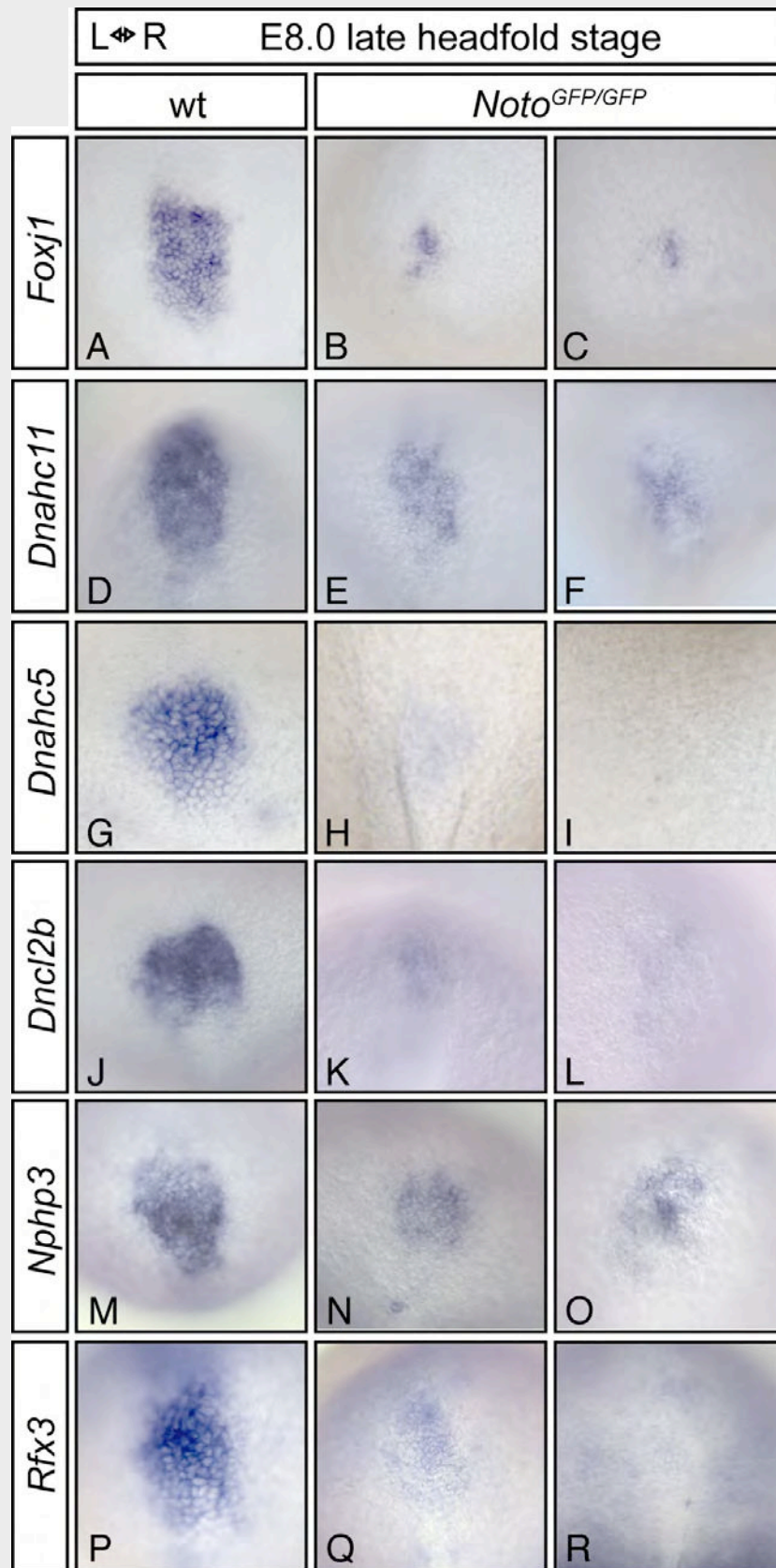
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von E7.5 Wildtyp (c-e) und mutanten (f-k) Embryonen. In (a) und (b) ist die Schnittebene dargestellt. (c) und (f) zeigen jeweils einen Sagittalschnitt durch ein Zilium und sein korrespondierendes Basalkörperchen. Der weiße Pfeilkopf in (f) zeigt auf ein unnormales, im Zytoplasma lokalisiertes mutantes Zilium (versunken im Zytoplasma). Mikrovilli in (i) sind verlängert und verzweigt (Pfeilkopf). Die Struktur der Basalkörperchen in Transversalschnitten (d und g) scheint normal zu sein. Transversalschnitte von mutanten Zilien (h, j und k) zeigen variabel arrangierte Mikrotubuli mit oder ohne zentrale mikrotubuläre Strukturen anstelle der normalen Wildtyp (e) 9+0 Tubuli Arrangement. Das Zilium in (h) entspringt aus einem falsch im Zytoplasma lokalisiertem Basalkörperchen. Der Maßstabsbalken in d, e, g, h, j und k entspricht 100 nm.



### 3.14 Analyse von Genen, die in dem Aufbau (Ziliogenese) oder in der Funktion der Knotenzilien involviert sind

Die abnormale Lokalisation der Basalkörperchen in den Knotenzellen der *Noto*-Mutanten erinnerte an eine Situation, wie sie schon in *Foxj1*-Mutanten beobachtet wurde. *Foxj1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem auch in den Grubenzellen der Primitivknotenregion/PNC exprimiert ist. In den *Foxj1*-defizienten Embryonen wurden Probleme in dem Verankerungsprozess der Basalkörperchen an die apikale Zelloberfläche in den Zellen des Lungenepithels beobachtet (Brody et al. 2000; Gomperts et al. 2004). Zusätzlich wurde in den *Foxj1* defizienten Embryonen auch ein Problem in der Determination der Links-Rechts Asymmetrie festgestellt, dessen Ausmaß mit dem der *Noto*-Mutanten einherging. In beiden Mutanten war die Herzschlauchkrümmung sowie die embryonale Drehung teilweise gestört und eine Randomisierung der Viszeralorgane zu beobachten. Auch die Expressionsdomänen von asymmetrisch exprimierten Markergenen (*nodal*, *lefty1/2*, *Pitx2*) war ähnlich wie in den homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Embryonen randomisiert (Chen et al. 1998). Auch veröffentlichte rasterelektronenmikroskopische Bilder von Primitivknotenregionen in *Foxj1*-Mutanten ließen eine leichte Störung der Knotenmorphologie erkennen, die denen der *Noto*-Mutanten ähneln (Brody et al. 2000). Eine Abwesenheit von Zilien wurde in den *Foxj1* defizienten Embryonen für die beweglichen 9+2 Zilien im Epithel des Respirationstrakts, des Gehirn und des Ovidukts beschrieben. Die oben beschriebene Fehllokalisierung der Basalkörperchen wurde im Respirationsepithel detailliert analysiert. Es wurde gezeigt, dass *Foxj1* während der späten Ziliogenese ganz spezifisch die apikale Lokalisation der Basalkörperchen bewirkt (You et al. 2004).

Die Expressionsanalyse von *Foxj1* in der Knotenregion der *Noto*<sup>GFP</sup> mutanten Embryonen zeigte, wie in Abbildung 23; A bis C zu sehen ist, dass diese Embryonen im Vergleich zu Wildtyp kaum *Foxj1* Transkripte aufweisen. Des Weiteren wurde die Expression des axonemalen Dyneins, *Dnahc11*, das auch unter dem Namen „*left-right dynein (Lrd)*“ bekannt ist, analysiert. *Lrd* wurde als das in der *inversus viscerum* (iv) Mausmutante mutierte (Supp et al. 1997) Gen identifiziert. Funktionell wird es für die Zilienbewegung gebraucht und ist in Zellen des Lungenepithels von *Foxj1* defizienten Embryonen nicht vorhanden (Chen et al. 1998), was zu den bekannten Dyneinarmdefekten führt. In den Primitivknoten von *Noto* defizienten



**Abbildung 23: Expression möglicher Zielgenen von *Noto*.** Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung von E8.0 Wildtyp sowie mutanten Embryonen. Oberhalb sind die Genotypen angegeben und die benutzten Proben sind links ausgewiesen. Die Bilder wurden von der Knotenregion gemacht.

Embryonen ist *Dnahc11* im Vergleich zur Wildtypsituation (siehe Abbildung 23; D bis F) ebenfalls stark herunter reguliert. Des Weiteren wurde die Expression von *Dnahc5*, ein weiteres axonemales Dynein, das normalerweise in der Knotenregion exprimiert (siehe Abbildung 23; G) ist, überprüft. *Dnahc5* wird, wie auch *Dnahc11*, für die Bildung der äußeren Dyneinarme gebraucht (Olbrich et al. 2002) und eine Mutation dieser Gene ist Mitverursacher für die Krankheit, die als PCD- primäre Zilien-Dyskinesie bekannt wurde. Bei dieser Krankheit sind sämtliche 9+2 Zilien bewegungslos, was unter anderem zu chronischer Bronchitis, Bronchiektasen und chronischer Sinusitis führt. Die Dyneinarme, die normalerweise in unbeweglichen 9+0 Zilien nicht vorhanden sind, sind aber für die motilen 9+0 Zilien im Primitivknoten, für ihre atypische Fähigkeit sich zu bewegen, unabdingbar. *Dnahc5* ist in den Primitivknotenzellen der *Noto* Mutanten nicht exprimiert (siehe Abbildung 23; G bis I).

Zusätzlich wurde auch die Expression eines zytoplasmatischen Dyneins, dem *Dncl2b*, im Primitivknoten von *Noto* mutanten Embryonen analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass auch dieses Dynein nicht exprimiert ist (siehe Abbildung 23; J bis L).

*Nphp3*, ein Gen, von dem bekannt war, dass es im Primitivknoten exprimiert ist und das für ein Protein kodiert, das für die Organisation der Mikrotubuli notwendig ist, wurde ebenfalls in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten analysiert. Von Nephronophtisis3 Patienten, die z.B. eine zystische Degeneration und Atrophie der Niere aufweisen können, war bekannt, dass *Nphp3* mutiert ist (Olbrich et al. 2003). In den homozygoten *Noto<sup>GFP</sup>* Embryonen konnte festgestellt werden, dass *Nphp3* Transkripte herunter reguliert waren (siehe Abbildung 23; M bis O), was vermuten ließ, dass die reduzierte *Nphp3* Expression mit der Fehlorganisation der Mikrotubuli in den Zilien des Primitivknoten zusammenhängen konnte. Ähnlich stark war auch die Expression von dem Transkriptionsfaktor *Rfx3* in den Primitivknoten der Mutanten herunter reguliert (siehe Abbildung 23; P bis R). Von *Rfx3*, einem Transkriptionsfaktor, der für ein normales Wachstum bzw. für einen normalen Aufbau der Knotenzilien unabdingbar ist, war bekannt, dass er die Expression eines weiteren Dyneins, dem *D2lic*, regulierte (Bonnafe et al. 2004). Im *Rfx3*-Knockout wurde beobachtet, dass die *Rfx3* defizienten Embryonen Lateralitätsdefekte aufwiesen, und dass die Knotenzilien von einem verzögerten Wachstum gezeichnet waren, was letztendlich in eine stark verkürzte Gesamtlänge der Zilien resultierte. Die Expression von *D2lic* konnte aber

im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht überprüft werden, weil es nicht möglich war eine funktionierende RNA-Sonde für eine *in situ* Hybridisierung herzustellen. Eine Überprüfung der Expressionsstärke dieses Dyneins wäre informativ gewesen, weil von *D2lic*-defizienten Embryonen ebenfalls Defekte in der Festlegung der Links-Rechts Asymmetrie bekannt waren und die Knotenzellen keinerlei Zilien mehr aufwiesen (Rana et al. 2004).

### **3.15 Videomikroskopische Analyse der Motilität von Zilien der PNCs in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten**

Durch die freundliche Unterstützung von Philipp Andre und mit Zuhilfenahme der technischen Ausrüstung in dem Labor von Prof. Dr. Martin Blum (Universität Hohenheim, Stuttgart) konnte eine videomikroskopische Analyse der *Noto<sup>GFP</sup>* mutanten PNCs durchgeführt werden. Dabei wurden in der PNC-Region in insgesamt 7 analysierten homozygoten Mutanten nur vereinzelt Zilien gefunden, die sich rotierend bewegten. Im Vergleich dazu rotierte die Mehrzahl aller beobachteten Zilien in den PNCs von Wildtypembryonen. In diesen PNCs war es mit Hilfe von fluoreszierenden Kügelchen auch möglich einen Nodal Flow sichtbar zu machen. Die analysierten Embryonen befanden sich in einem Alter von spätem Kopffaltenstadium bis 2-Somiten-Stadium. Von den motilen Wildtyp-Zilien und den hauptsächlich bewegungslosen mutanten Zilien wurden kurze Videosequenzen aufgenommen. Diese Videosequenzen sind am Ende dieser Arbeit auf einer CD oder unter <http://www.pnas.org/cgi/content/full/0704344104/DC1> zu finden.

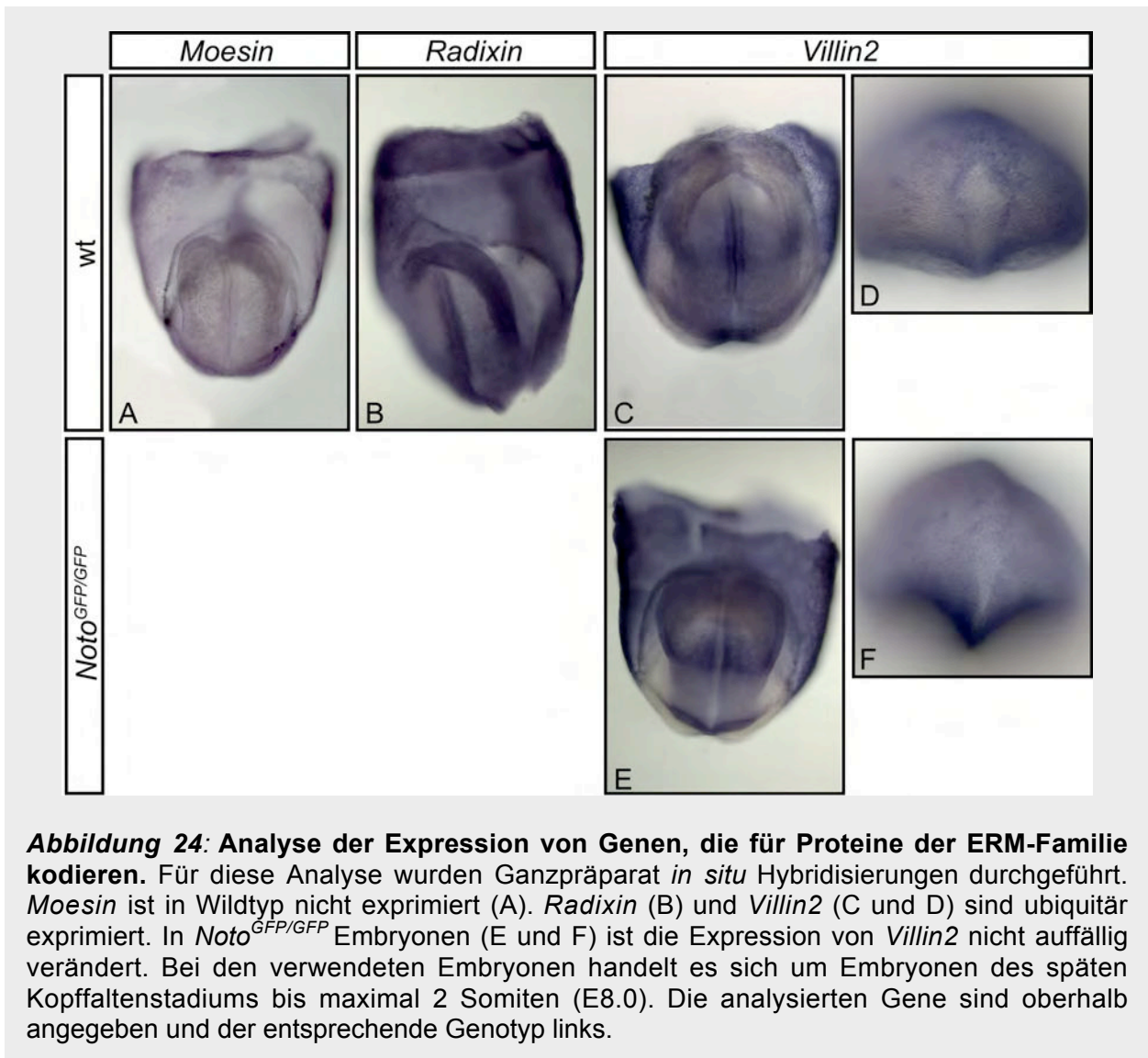
### **3.16 Analysen zur Lokalisation von Membranproteinen**

Da in *Noto<sup>GFP</sup>* Mutanten die *Foxj1* Expression herunter reguliert war und bekannt war, dass der Transkriptionsfaktor *Foxj1* eine allgemeine Funktion in der Regulation der Lokalisation von Membranproteinen an die apikale Seite von epithelialen Zellen besitzt, wurde in diese Richtung weitere experimentelle Analysen durchgeführt. Von anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass in ausdifferenzierten Epithelzellen des Respirationstrakts apikales Ezrin und Moesin nur in den zilientragenden Zellen exprimiert ist und nicht in den sekretorischen Epithelzellen,

und dass *Foxj1* ganz spezifisch für die apikale Lokalisierung von Ezrin, nicht aber von Moesin, gebraucht wird (Huang et al. 2003). Des Weiteren war bekannt, dass die *Foxj1*-defizienten Zellen des Respirationstrakts, die kein apikales Ezrin aufwiesen, auch kein ERM-assoziiertes EBP50 aufwiesen (Gomperts et al. 2004). *Foxj1* ist also notwendig für die apikale Lokalisation von Ezrin (kodiert von *Villin2*) und entscheidend für apikale Proteinkomplexe. Analysen zur Lokalisation von Proteinen der ERM-Familie oder ERM-assoziierten Proteinen in der mit Zilien besetzten Epithelschicht der Knotenregion wurde aber in *Foxj1*-Mutanten bislang nicht publiziert.

### 3.16.1 Expressionsanalysen von Genen, die für Proteine der ERM-Familie kodieren

Um Informationen über die Lokalisation von Proteinen der ERM-Familie im Primitivknoten von Mausembryonen zu bekommen, musste zuerst überprüft werden, ob und wenn ja, welche der „ERM-Protein-kodierenden“ Gene eine Expression zu dem relevanten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung aufweisen. Bei dem relevanten Zeitpunkt handelt es sich um das späte Kopffaltenstadium, etwa am Tag 8.0 der Embryonalentwicklung, wo ein gut ausgeprägter Primitivknoten am distalen Ende des Eizylinders zu erkennen ist. Die Genexpression der drei relevanten Gene, *Villin2*, das für das Ezrin der ERM-Familie kodiert, *Radixin* und *Moesin* wurde daher im ersten Schritt mit Hilfe einer Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung überprüft. Für *Moesin* (siehe Abbildung 24; A) wurde keine Expression im späten Kopffaltenstadium (E8.0) beobachtet. Wie in Abbildung 24; B bis D zu erkennen ist, sind aber *Villin2* wie auch *Radixin* im Mausembryo im relevanten Stadium exprimiert. Bei der beobachteten *Radixin*- und *Villin2*-Expression handelte es sich um eine ubiquitäre Expression. Zusätzlich wurde die Expression von *Villin2* in den *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Mutanten überprüft. In den analysierten Mutanten war aber kein auffälliger Unterschied zu der Expression in Wildtyp zu erkennen.

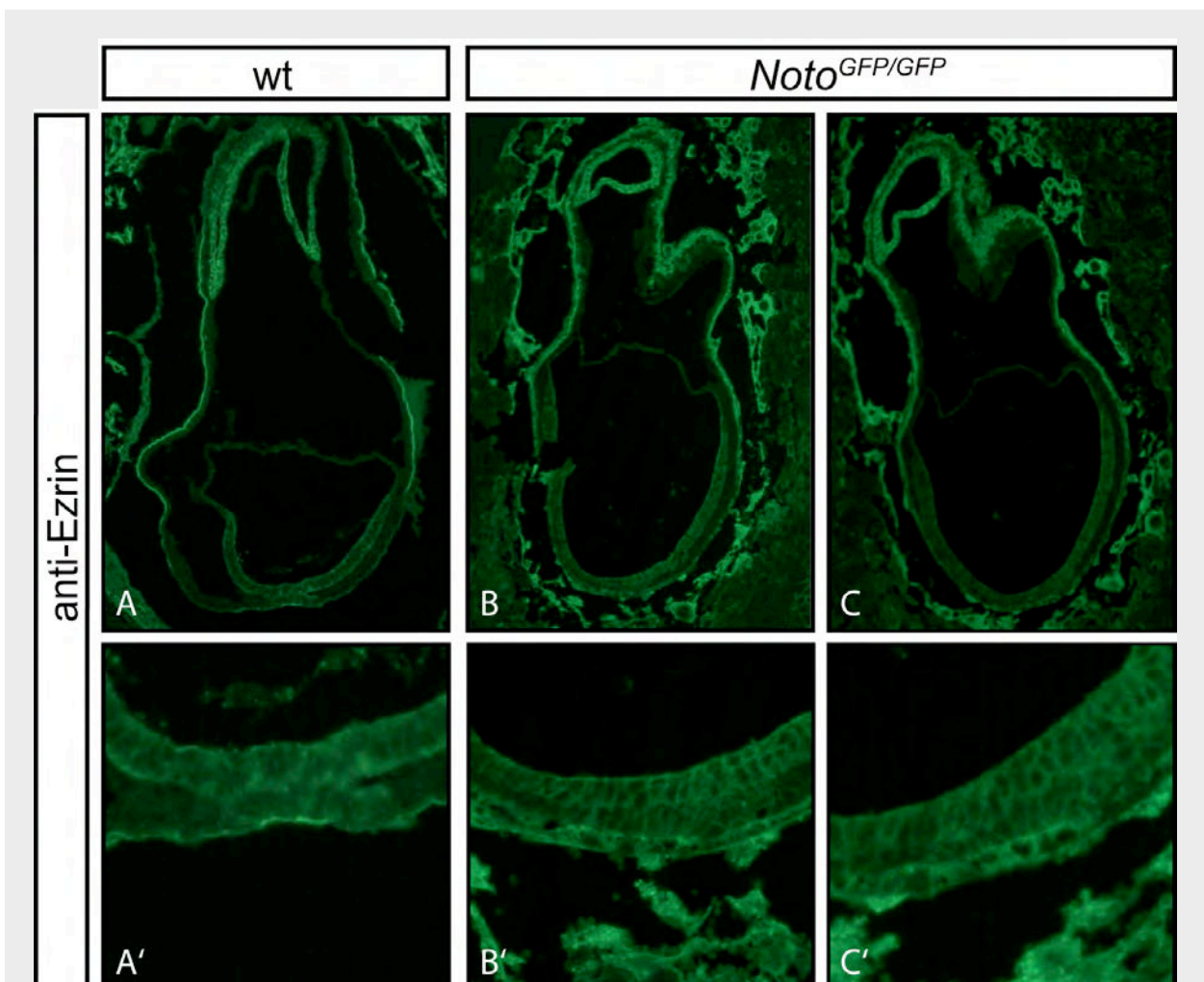


### 3.16.2 Analysen zur Lokalisation von inaktiven Ezrin in ventralen Primitivknotenzellen

Nachdem auf RNA Ebene sicher gestellt war, dass *Villin2* zum relevanten Zeitpunkt im Embryo exprimiert ist, wurde eine nähere Analyse auf Proteinebene durchgeführt. Für die immunhistologische Analyse zur Lokalisation von Ezrin in Zellen der Primitivknotenregion wurden die Wildtyp sowie *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> mutanten Embryonen E8.0 in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten. Die intakten Schnitte, die zusätzlich durch den Primitivknoten gingen wurden für die immunhistologische Fluoreszenzfärbung verwendet. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Maus anti-Ezrin Antikörper (siehe 2.1.10) verwendet, der inaktives Ezrin erkennt.



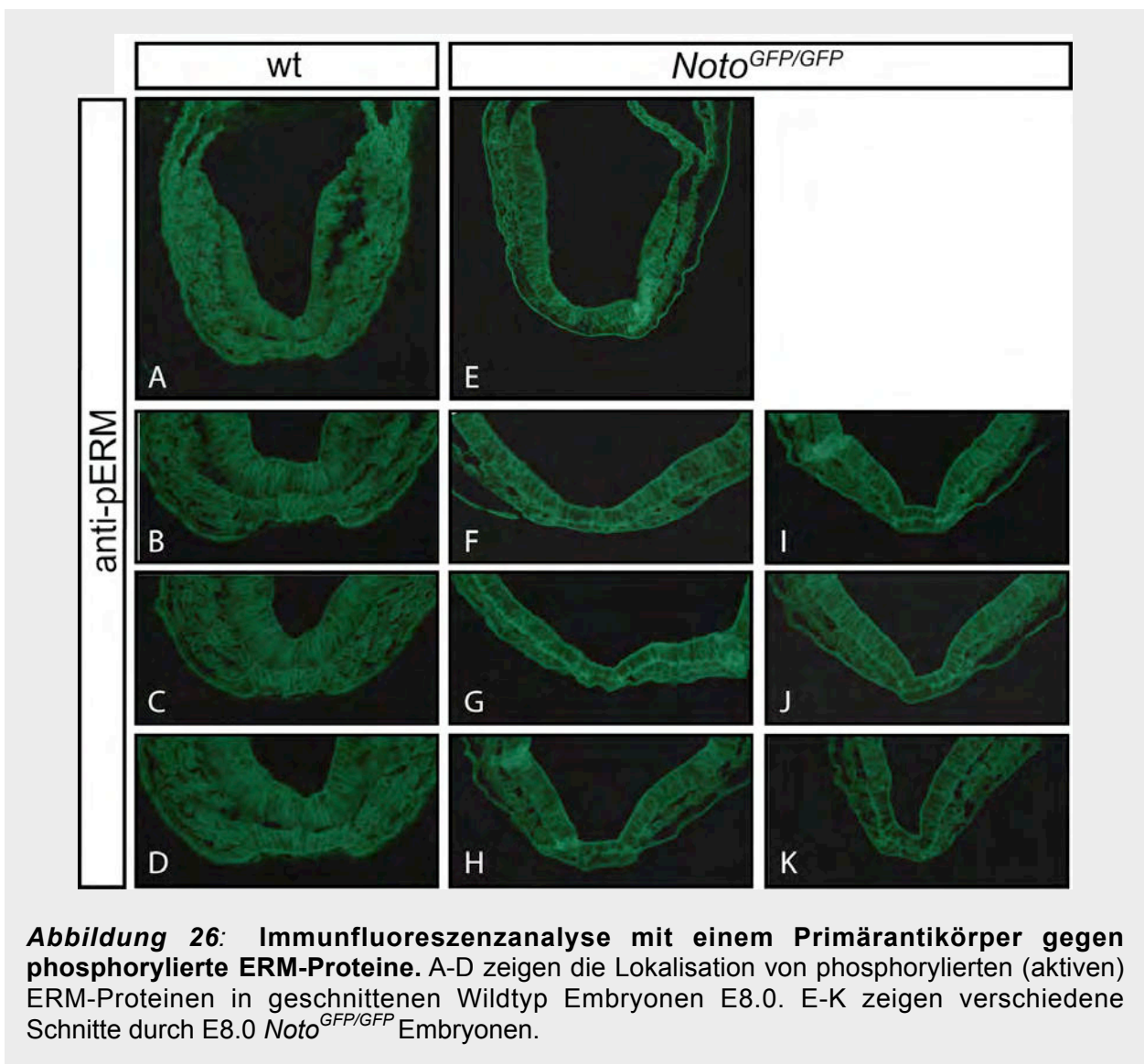
In Abbildung 25 sind Schnitte, die durch die Knotenregion gehen und zusätzlich eine gute Fluoreszenzfärbung aufweisen, zusammengestellt. Diese Schnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert. In diesen Schnitten ist zu sehen, dass Ezrin sowohl in den Wildtyp als auch in den mutanten Primitivknotenzellen lokalisiert ist, und dass in der Verteilung und der Menge von Ezrin in den Primitivknotenzellen zwischen Wildtyp und mutanten Embryonen kein auffälliger Unterschied auszumachen ist. Es ist zu beobachten, dass in beiden Genotypen Ezrin größtenteils diffus im Cytosol lokalisiert ist. Eine weitere, detailliertere Analyse an einem konfokalen Mikroskop wurde bislang nicht durchgeführt.



**Abbildung 25: Immunfluoreszenzanalyse mit einem Primärantikörper gegen Ezrin.** A und A' zeigen die Lokalisation von inaktiven Ezrin in einem Paraffinschnitt von einem Wildtyp Embryo E8.0 nach immunhistologischer Fluoreszenzfärbung. B und B' sowie C und C' zeigen zwei unterschiedliche Schnitte durch einen E8.0 *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryo.

### 3.16.3 Lokalisation von aktivem Ezrin in den ventralen Primitivknotenzellen

Um die Lokalisation von aktivem Ezrin zu analysieren wurde anstatt des oben verwendeten Primärantikörpers ein anderer gegen die phosphorylierten ERM-Proteine verwendet. Die Fähigkeit von Ezrin, sich an Membranen zu binden, korreliert mit der Phosphorylierung spezifischer Threoninreste in der C-terminalen Domäne. Der verwendete polyklonale Antikörper, Kaninchen anti-phospho-Ezrin/Radixin/Moesin (siehe 2.1.10) würde neben dem phosphorylierten Ezrin (Thr567) auch, falls vorhanden, phosphoryliertes Radixin (Thr564) und Moesin (Thr558) erkennen. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, ist in Wildtyp wie auch in den mutanten Embryonen aktives, phosphoryliertes Ezrin vorhanden, was auch in beiden Fällen membranständig, apikal lokalisiert ist.

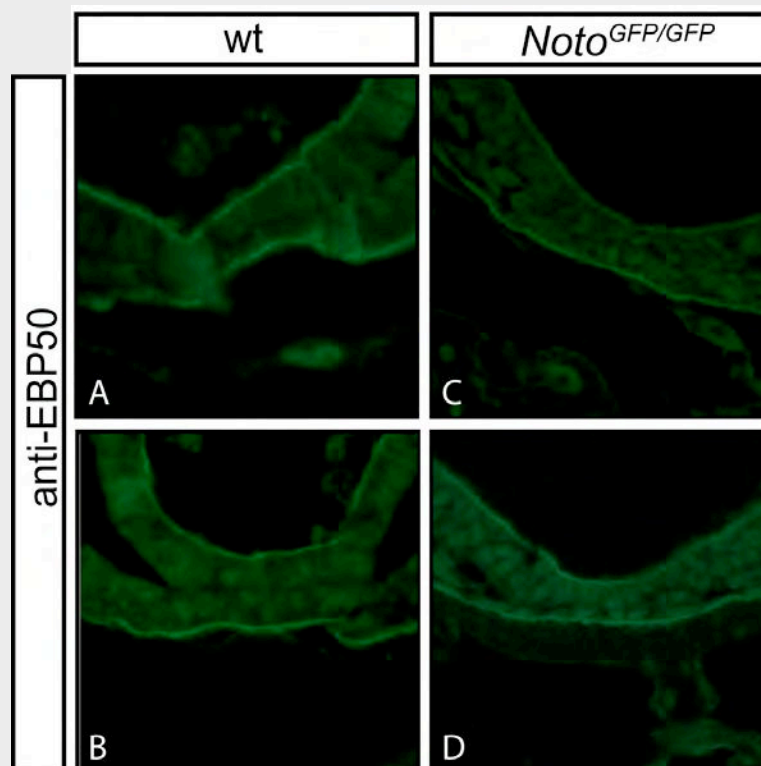


**Abbildung 26:** Immunfluoreszenzanalyse mit einem Primärantikörper gegen phosphorylierte ERM-Proteine. A-D zeigen die Lokalisation von phosphorylierten (aktiven) ERM-Proteinen in geschnittenen Wildtyp Embryonen E8.0. E-K zeigen verschiedene Schnitte durch E8.0 *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* Embryonen.



### 3.16.4 Analysen zur Lokalisation von EBP50 in den ventralen Zellen des Primitivknoten/PNC

Nach der Aktivierung von Ezrin durch Phosphorylierung geht das phospho-Ezrin in eine entfaltetet Konformation über und bildet Kopf-Schwanz Dimere, wobei die Kopfdomäne eine Wechselwirkung mit dem ERM bindenden Phosphoprotein von 50kDa (EBP50 genannt) eingeht, während die Schwanzdomäne an Aktin bindet. EBP50 sollte daher auch apikal in der Epithelzelle lokalisiert sein, was durch eine immunhistologische Fluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper gegen EBP50 auf Paraffinschnitten (Kaninchen anti-EBP50; siehe Abbildung 27) durch den Primitivknoten von Wildtyp sowie mutanten Embryonen E8.0 überprüft wurde. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, ist im Wildtyp wie auch in dem mutanten Embryo EBP50 vorhanden. In beiden Fällen ist dieses Ezrin-bindende Phosphoprotein, wie Ezrin selbst membranständig, apikal lokalisiert.



**Abbildung 27:** Immunfluoreszenzanalyse mit einem Primärantikörper gegen ERM bindendes Phosphoprotein von 50kDa (EBP50). A und B zeigen die Lokalisation von EBP50 in geschnittenen Wildtyp Embryonen E8.0. C und D zeigen Schnitte von E8.0 *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen.

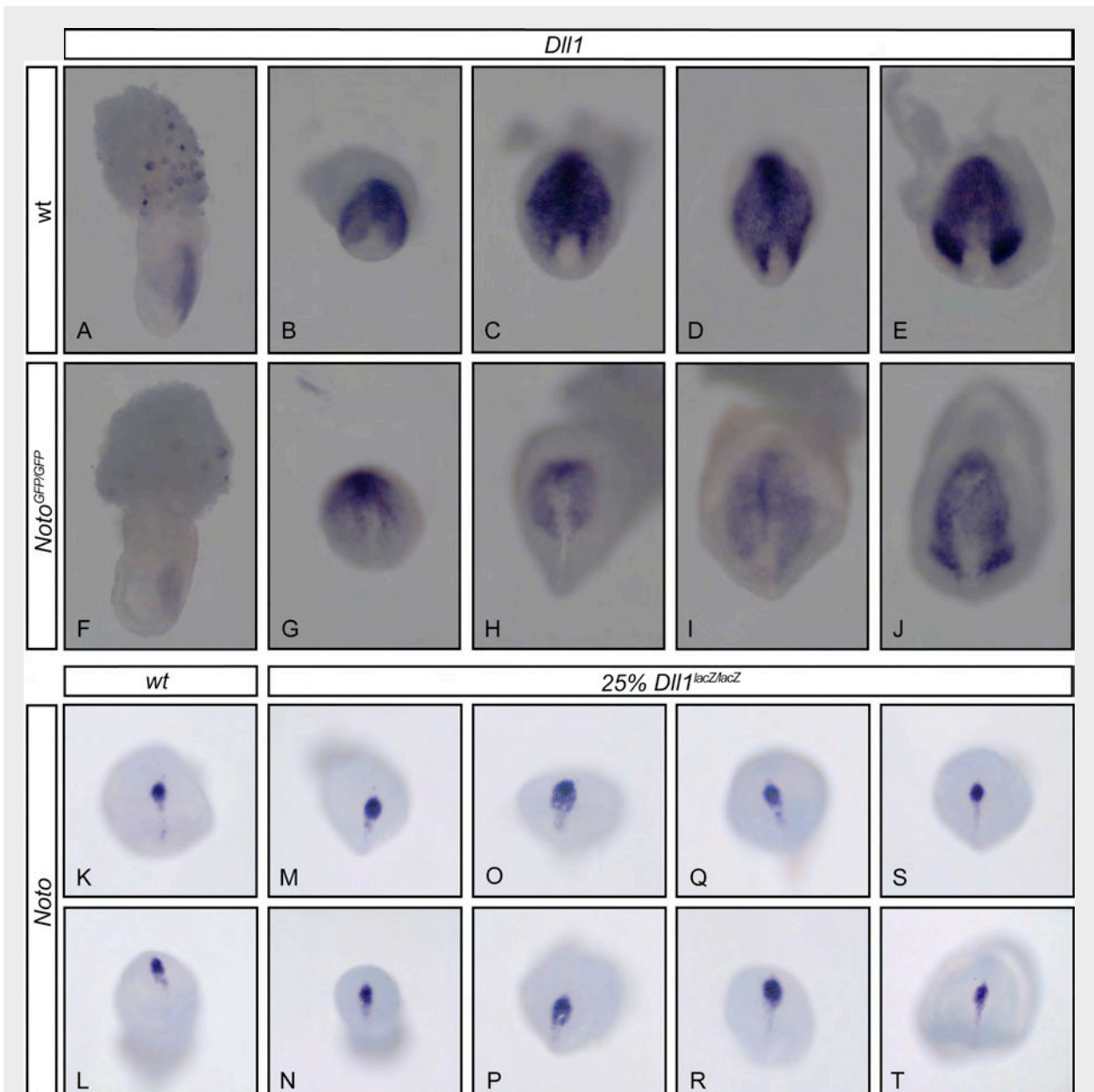
### **3.17 Analysen zur *Dll1* Expression in *Noto*<sup>GFP</sup> mutanten Embryonen sowie *Noto* Expression in *Delta*<sup>lacZ</sup> Mutanten.**

Der Notch-Signalübertragungsweg ist, wie gezeigt wurde (Przemeck et al. 2003), an der unterschiedlichen Entwicklung der linken und rechten Körperhälften entscheidend beteiligt. Die *Delta*-Mutanten (*Dll1*<sup>lacZ/lacZ</sup>) besitzen ähnlich wie die *Noto*-Mutanten (*Noto*<sup>GFP/GFP</sup>) Entwicklungsstörungen der Mittellinienstrukturen. Diese Strukturen gehen bekanntlich aus Zellen des Primitivknoten/PNC hervor, der ebenfalls Differenzierungsstörungen aufweist (Przemeck et al. 2003).

Des Weiteren sind viele Gene des Notch-Signalübertragungsweges zum Zeitpunkt der Entstehung des Primitivknotens in ihm oder um ihn herum angeschaltet. Dies kann für eine Beteiligung dieser Gene an der Entstehung des Primitivknotens sprechen. Aus diesem Grund wurde die Expression von *Dll1* in den *Noto*-Mutanten analysiert sowie zusätzlich die *Noto* Expression in *Delta*-Mutanten (siehe Abbildung 28).

Bei der *Dll1* Expression in den *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen zwischen Embryonaltag 7.0 und 8.0 war in einer ersten Analyse mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung zu erkennen, dass die *Dll1* Expression in den *Noto*-Mutanten um den Primitivknoten leicht reduziert ist. Die Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit noch nicht verifiziert.

Für die Analyse der *Noto* Expression in *Dll1*-mutanten Embryonen mittels *in situ* Hybridisierung, wurden zwei Würfe aus einer Verpaarung von heterozygoten Elterntieren eingesetzt (24 Embryonen), in denen statistisch 25% der Embryonen (ca. 6) homozygot sein müssten. Die Expression von *Noto* in allen für diese Analyse eingesetzten Embryonen wiesen keine Unterschiede im Hinblick auf Ausmaß oder Intensität der Expression auf. Da man *Noto* als einen Marker für die Grubenzellen sehen kann, lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die Grube in den *Dll1* Mutanten zu den analysierten Stadien vermutlich nicht verändert ist. Eine abschließende Aussage lässt sich hier aber noch nicht treffen, weil die analysierte Embryonenanzahl ggf. zu klein war.



**Abbildung 28: Analyse der *Dll1* bzw. *Noto* Expression in *Noto*- bzw. *Dll1*-defizienten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp** mittels Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung. A-E zeigen die *Dll1* Expression in Wildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen E7.0 und E8.0. F bis J zeigen die *Dll1* Expression in *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt. K und L zeigen die *Noto* Expression in Wildtyp E7.5-E8.0 Embryonen und M bis T eine Auswahl von acht Embryonen im vergleichbaren Stadium, von denen statistisch 25% der Embryonen *Dll1*-defizient sein sollten.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, dass der Homeobox-Transkriptionsfaktor *Noto*, der den murinen Vertreter der *Not* Genfamilie der Vertebraten repräsentiert, das in der truncate Mutante betroffene Gen ist. Mit Hilfe eines Komplementationstests unter Verwendung der hergestellten *Noto*-Null-Allels, *Noto*<sup>GFP</sup>, konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Noto* um das Gen handelt, das in der spontan entstandenen truncate Mutante verändert ist. Es wurde gezeigt, wo *Noto* entlang der anterior-posterioren Körperachse während der Entwicklung des Notochords eines Mausembryos eine wichtige Funktion übernimmt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der generierten Knockout Maus weitere wichtige Funktionen von *Noto* gefunden und analysiert werden. *Noto* trägt entscheidend zu einer richtigen Morphogenese des Primitivknotens/PNC und zur Ziliogenese innerhalb der Region dieses murinen Organisators bei. *Noto* ist folglich ein wichtiger Faktor für die Etablierung einer korrekten Links-Rechts Asymmetrie in der Maus.

### 4.1 Die Rolle von *Noto* in der Entwicklung des Notochords und der Wirbelsäule

Der Phänotyp des Null-Allels bewies, dass während der Embryonalentwicklung der Maus die Funktion von *Noto* für die anteriore Notochordbildung nicht gebraucht wird. Es wurde gezeigt, dass in den *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten, genau wie in der truncate Mutante (tc), nur das posteriore Notochord Defekte in einem variierenden Ausmaß aufweist. Ein Verlust der *Noto* Funktion in Zebrafisch Embryonen (*floating head-flh* genannt) führte, wie vor Beginn dieser Doktorarbeit bekannt war, zu einer Abwesenheit eines vollständig ausdifferenzierten Notochords entlang der kompletten anterior-posterioren Körperachse (Halpern et al. 1995; Talbot et al. 1995). In *flh* mutanten Embryonen exprimierten die Zellen in der Region, in der in Wildtypembryonen das Notochord positioniert ist, also in einem stabförmigen Bereich unterhalb des Neuralrohrs, paraxiale Muskelgene statt axiale Gene. Dies war zu beobachten obwohl diese mutmaßlichen Notochordzellen zu Beginn ihrer Entwicklung noch viele Eigenschaften von axialen Zellen aufwiesen (Amacher and Kimmel 1998). Das legt den Schluss nahe, dass *flh* eher benötigt wird um die Notochordidentität aufrecht zu

erhalten, als diese Zellstruktur *de novo* zu etablieren (Halpern et al. 1995). Ähnliche Entdeckungen wurden zusätzlich auch für *Xnot1* und *Xnot2* in *Xenopus laevis* gemacht (Yasuo and Lemaire 2001). Zusammenfassend legten diese Studien in *Xenopus* und Zebrafisch nahe, dass die *Not* Gene in diesen Spezies notwendig sind um die Identität des Notochords zu sichern, und dass sie zusätzlich entlang der kompletten anterior-posterioren Körperachse diese Funktion innehaben. In der Maus weicht die Rolle von *Noto*, einem Gen der *Not*-Familie, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, davon ab. Ein Verlust der *Noto* Funktion betrifft die Bildung des Notochords in anterioren Körperregionen nicht, sondern resultiert lediglich in einer abnormalen Bildung des Notochords in und kaudal zu der posterioren Rumpfregeion. Das legt den Schluss nahe, dass die Funktion von *Noto* im Mausembryo nur für die Notochordentwicklung kurz bevor und nach der Entwicklung der Schwanzknospe unentbehrlich ist. Dies weist darauf hin, dass die genetische Kontrolle der Notochordentwicklung zwischen verschiedenen Vertebratenspezies entschieden voneinander abweicht.

Die Notochorddefekte im posterioren Bereich des Embryos wurden wie unter 3.5 gezeigt ist vergleichend in der truncate Mutante, welches das hypomorphe Allel darstellt, und dem generierten Null-Allel analysiert. Diese Analysen zeigten, dass im Hinblick auf den Notochord- bzw. Schwanzphänotyp zwischen den beiden Allelen keine Unterschiede zu finden sind. In homozygoten *Noto<sup>tc/tc</sup>* Tieren wie auch in der heteroallelischen Kombination *Noto<sup>tc/GFP</sup>* und den homozygoten *Noto<sup>GFP/GFP</sup>* ist bei den überlebenden Mäusen ein stark variierender Schwanzphänotyp zu beobachten. Dieser Phänotyp variiert von völlig intakten Schwänzen, über geknickte und verkürzte Schwänze sowie Stummelschwänze, bis hin zu einer kompletten Abwesenheit eines Schwanzes (Agenesie). Die Skelettanalysen, die zusätzlich durchgeführt wurden, zeigten, dass unter allen Allelkombinationen neugeborene Tiere zu finden waren, die eine normale Schwanzwirbelsäule aufweisen. Zusätzlich gab es Tiere, die eine verkürzte posteriore Wirbelsäule hatten, andere die Lücken in der Schwanzwirbelsäule zeigten, wo einige Wirbel fehlten, oder aber auch Tiere, die ab dem Beckenknochen keinerlei Wirbel mehr aufwiesen. Diese Wirbelsäulendefekte sind darauf zurück zu führen, dass die Integrität des Notochords in den meisten Mutanten gestört ist, was nachfolgende Analysen auch zeigten (siehe 3.5). Mit Hilfe des GFP Reporter-Gen-Allels war es möglich das

Notochord durch direkte Fluoreszenzanalyse sichtbar zu machen. Hierbei war zu erkennen, dass die homozygoten *Noto*<sup>GFP/GFP</sup> Embryonen sowie die Embryonen mit heteroallelischer Kombination *Noto*<sup>tc/GFP</sup> unterschiedlich stark variierende Defekte im posterioren Notochord aufwiesen. Hierbei handelte es sich beispielsweise um vorzeitig abgebrochene Notochords in und kaudal zu der Sakralregion oder aber um diskontinuierliche kaudale Notochords, die Lücken mit unterschiedlichem Ausmaßes aufwiesen. Des Weiteren waren Embryonen zu finden, die lediglich verstreute Überbleibsel des Notochords im Schwanzende besaßen.

Während der Entwicklung des axialen Skeletts ist das Notochord für die Induktion des Sklerotoms und für die anschließende Differenzierung von Knorpel und Knochen, die die Wirbelkörper und die Zwischenwirbelscheiben (Bandscheiben) bilden, essentiell notwendig. Diese Funktionen des Notochords werden hauptsächlich durch das diffusionsfähige Signalmolekül Sonic hedgehog (SHH) vermittelt. Die Strukturen der Wirbelsäule selbst gehen, aus dem somitischen Mesoderm, als eine Konsequenz der Interaktion zwischen paraxialem Mesoderm und dem umgebenden Gewebe, hervor (Christ and Ordahl 1995). Nach der Segmentierung des paraxialen Mesoderms differenzieren die epithelialen Somiten in das ventral gelegene mesenchymale Sklerotom und das dorsal gelegene epitheliale Dermomyotom. Die SHH-Signale, die dem Notochord und dem ventralen Neuralrohr (der Bodenplatte) entspringen, sind entscheidend für die Differenzierung des Sklerotoms und somit essentiell für die Bildung der Wirbelsäule (Fan and Tessier Lavigne 1994; Chiang et al. 1996; Teillet et al. 1998). Ist also entlang der anterior-posterioren Körperachse stellenweise kein Notochord vorhanden, kann an diesen Stellen auch keine Wirbelsäule entstehen. Lücken im Notochord führen zu fehlenden Wirbelkörpern und Zwischenwirbelscheiben, was wiederum zu einem Knick im Schwanz führt. Und ein Abbruch des Notochords in Höhe der Hinterbeine führt zu einer Agenesie des kompletten Schwanzes.

Die Defekte des Notochords und folglich die Wirbelsäulenfehlentwicklungen sind aber nicht als der Grund für den postnatalen Verlust des Hauptteils der homozygoten *Noto*<sup>GFP</sup> Mäuse zu betrachten. Wie während der Analysen des Knockouts festgestellt wurde überlebt nur ca. 10% der homozygoten Tiere bis ins fortpflanzungsfähige Alter.

## 4.2 Die Rolle von *Noto* in der Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie

Eine Analyse der Viszeralorgane von Knockout-Embryonen kurz vor der Geburt zeigte, dass diese variable Lateralitätsdefekte aufwiesen. Diese reichten von einem komplett invertierten Situs (*situs inversus*), über Rechts sowie Links Isomerismus oder Heterotaxie. Zusätzlich waren aber auch Embryonen mit einem makroskopisch normalen Situs (*situs solitus*) zu finden. Konsistent mit diesen Defekten der Positionierung der Viszeralorgane war auch die Expression von frühen Lateralitätsmarkern in den *Noto*-Null Embryonen randomisiert. Da es unter anderen auch Embryonen gab, bei denen neben einer bilateralen Expression von *nodal* auch gleichzeitig eine Expression von *lefty1* in der Mittellinie detektiert werden konnte (siehe Abbildung 15, K und L), lag der Schluss nahe, dass sehr früh, beim Bruch der Symmetrie in der Primitivknotenregion, also bei der Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie, *Noto* eine entscheidende Rolle spielt. Für *lefty1* wurde gezeigt, dass dieses Signalmolekül eine Diffusion von links-asyymmetrisch exprimiertem *nodal* über die Mittellinie hinaus verhindert (Meno et al. 1998). *Lefty* hat somit eine antagonistische Funktion auf den Nodal-Signalübertragungsweg, indem es als Rückkopplungs Inhibitor wirkt (Meno et al. 1999; Cheng et al. 2000; Sakuma et al. 2002).

Die Analyse der Primitivknotenregion/PNC mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte, dass hier massive Probleme bei der Herstellung einer funktionsfähigen Knotenmorphologie (siehe auch 4.6) auftreten. Zusätzlich zeigten diese Analysen, dass es in den *Noto* Mutanten zu Problemen während der Ziliogenese kommt. Aus diesem Grund wurden auch einige weitere Gene, von denen bekannt war, dass sie eine wichtige Funktion in der Ziliogenese übernehmen, analysiert.

## 4.3 Der Transkriptionsfaktor *Noto* reguliert die Ziliogenese im Primitivknoten/PNC und wirkt den Transkriptionsfaktoren *Foxj1* und *Rfx3* vorgeschaltet

Ein auffälliges und besonderes Merkmal des *Noto* Phänotyps ist die hoch variable und abnormale Struktur der Monozilien im Primitivknoten/PNC, die mit Hilfe von

transmissionselektronischenmikroskopischen Untersuchungen detektiert wurden. Diese Abnormalitäten werden vermutlich von einer reduzierten oder fehlenden Expression von verschiedensten Genen hervorgerufen. Diese Gene kodieren für unterschiedliche Proteine, die letztendlich für den Aufbau eines Ziliums (Axonem) notwendig sind oder aber auch für einen Prozess gebraucht werden, den man als Intraflagellaren-Transport (IFT) bezeichnet. Des Weiteren handelt es sich um Proteine, die für Strukturen notwendig sind, die für eine Beweglichkeit der Zilien unabdingbar sind.

Es ist bekannt, dass Mutationen, die einzelne Komponenten, die für den Zilienaufbau benötigt werden, betreffen (Nonaka et al. 1998; Marszalek et al. 1999; Takeda et al. 1999; Murcia et al. 2000; Taulman et al. 2001; Huangfu et al. 2003; Houde et al. 2006) oder die sensorische Funktion (Pennekamp et al. 2002) oder die Motilität (Supp et al. 1997; Watanabe et al. 2003) der Zilien im PNC beeinflussen, gleichzeitig auch eine normale Entwicklung der Link-Rechts Asymmetrie stören oder verhindern. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Zilien in den *Noto* Mutanten nicht voll funktionsfähig sind, was die videomikroskopischen Analysen auch bestätigten. Die Zilien in den *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten waren fast ausnahmslos unbeweglich, was dementsprechend dazu führte, dass kein "Nodal Flow" zu detektieren war. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit weisen darauf hin, dass *Noto* eine entscheidende Rolle für die koordinierte Expression von essentiellen Komponenten eines voll funktionsfähigen axonemalen Komplexes spielt.

Bei der Suche nach Zielgenen, die von *Noto* möglicherweise reguliert werden, wurde sich in erster Linie auf Gene konzentriert, für die zuvor schon beschrieben war, dass sie eine Rolle in der Ziliogenese spielen und ihr Fehlen ebenfalls Lateralitätsdefekte hervorruft. Die unter 3.14 (siehe auch Abbildung 23) aufgeführten Gene zeigen in den *Noto* Mutanten alle eine klare Deregulation in der Region des Primitivknotens/PNC. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, dass *Noto* als ein direkter Regulator aller gezeigten und herunter regulierten Gene wirkt. Von *Foxj1* war durch frühere Forschungen anderer Arbeitsgruppen bekannt, dass der Forkheadbox (F-box)-Familie angehörende Transkriptionsfaktor in den zilientragenden Zellen des Respirationsepithels die Expression eines axonemalen Dyneins, dem *Dnahc11*, aktiviert (Chen et al. 1998). *Foxj1* defiziente Mäuse weisen im Respirationstrakt dementsprechend keine *Dnahc11* Expression auf und haben wenn überhaupt nur



sehr wenige Zilien pro Zelle (Brody et al. 2000). Das *Dnahc11* ist auch unter „*left-right dynein (Ird)*“ bekannt und ist das Gen, das in der „*inversus viscerum (iv)*“ Maus spontan mutiert ist. Diese Mutanten können neben Lateralitätsdefekten auch eine abnormale Morphologie des kardiovaskulären Systems und der Nieren oder ein abnormales Arrangement der Leber aufweisen. Und da *Foxj1* sowie *Dnahc11* in den Primitivknoten der *Noto* defizienten Embryonen beide herunter reguliert sind, legt das den Schluss nahe, dass *Foxj1* als ein Vermittler der *Noto* Funktion wirkt. Diese Ansicht wird zusätzlich noch dadurch unterstützt, dass die Basalkörperchen in den *Noto* mutanten Knotenzellen teilweise abnormal tief im Zytoplasma positioniert sind. Diese Tatsache spiegelt den Phänotyp in epithelialen Zellen der Lunge von *Foxj1* Mutanten wieder (Gomperts et al. 2004). Hier wurde gezeigt, dass die *Foxj1* die Verankerung der Basalkörperchen an das apikale Zytoskelett von zilientragenden Zellen im Respirationstrakt reguliert. Die stark verminderte Expression von *Foxj1* in *Noto* defizienten Knotenzellen ist ein Indiz dafür, dass *Foxj1* unterhalb von *Noto* wirkt, obgleich eine verbleibende *Foxj1* Expression nahe legt, dass zusätzlich ein anderer Faktor bzw. andere Faktoren *Foxj1* aktivieren.

Im Gegensatz dazu ist die Expression des Transkriptionsfaktors *Rfx3* in der Knotenregion von mutanten Embryonen nahezu vollständig verschwunden. Das spricht dafür, dass *Noto* einen Hauptaktivator der *Rfx3* Expression in der Region des PNCs darstellt. Zusätzlich war von *Rfx3* defizienten Embryonen bekannt, dass diese nur verstümmelte Zilien in der Primitivknotenregion aufweisen, und dass in diesen Embryonen zusätzlich in dieser Region die Expression eines zytoplasmatischen Dyneins, nämlich die des *D2lic*, fehlte (Bonnafe et al. 2004). *D2lic* stellt in der Maus das Ortholog zu dem *Caenorhabditis elegans* Gen, das in den Intraflagellaren-Transport (IFT) involviert ist, dar. Zusätzlich wurde bei der Überprüfung der Expression von *Dnahc5*, einem weiteren axonemalen Dynein, festgestellt, dass auch dieses Dynein in den *Noto*-mutanten Knoten nicht exprimiert ist. *Dnahc5* wird, wie auch *Dnahc11*, für die Bildung der äußeren Dyneinarme gebraucht (Olbrich et al. 2002) und eine Mutation dieser Gene sind ein Verursacher für die Krankheit, die als PCD- „primäre Zilien-Dyskinesie“ bekannt ist. Die PCD stellt, wie schon lange bekannt war, eine heterogene Gruppe von Krankheiten mit chronischer Bronchitis, Bronchiektasen und chronischer Sinusitis dar (Afzelius 1976; Eliasson et al. 1977). Die Assoziation mit einem kompletten *situs inversus*, der bei der Hälfte der

Krankheitsfälle besteht, wird darüber hinaus als Kartagener-Syndrom bezeichnet. Verschiedene strukturelle Anomalien der Zilien, z.B. Dynein-Arm- sowie Speichen-Defekte oder Transposition der peripheren Mikrotubuli wurden für diese Krankheit beschrieben. Das Fehlen der Dyneinarme in den Knotenzilien der *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten ließe sich also auf das Fehlen bzw. die reduzierte Expression von *Dnahc5* sowie *Dnahc11* zurückführen.

Des Weiteren konnte in den *Noto* Mutanten gezeigt werden, dass auch *Nphp3*, ein Gen, von dem bekannt war, dass es für ein Protein kodiert, das für die Organisation der Mikrotubuli notwendig ist, ebenfalls in stark herunter reguliert ist. Von Nephronophthise-3 Patienten, die an polyzystischer Nierendegeneration leiden, war bekannt, dass *Nphp3* mutiert ist (Olbrich et al. 2003). Die in diesen Patienten beobachtete zystische Degeneration und Atrophie der Niere kann isoliert aber auch kombiniert mit Erkrankungen anderer Organe, z.B. der Netzhaut auftreten. Die Zilien der Stäbchen und Zapfen in der Netzhaut haben im Wesentlichen eine Stützfunktion und weisen eine Innenstruktur von 9+0 Mikrotubuli auf. Zusätzlich ist erwähnenswert, dass Nephronophthise-Patienten auch einen *situs inversus* aufweisen können, womit wieder eine direkte Verbindung zu Defekten in der Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie gefunden ist.

#### **4.4 Untersuchungen zu möglichen Ursachen für die fehlerhafte Verankerung der Basalkörperchen an das apikale Zytoskelett der ventralen Knotenzellen**

Wie von Studien an *Foxj1*-defizienten Mäuse bekannt war, wird *Foxj1* essentiell für die Bildung der Zilien im Respirationstrakt und für die Determination der Links-Rechts Achse gebraucht (Chen et al. 1998). Eine weitere Studie berichtete detaillierter über die regulatorische Funktion von *Foxj1* bei der Verankerung der Basalkörperchen an das apikale Zytoskelett von zilientragenden Epithelzellen des Respirationstrakts (Gomperts et al. 2004). Hier wurde gezeigt, dass FOXJ1 die Stabilität des Zytoskeletts in zilientragenden Zellen aufrecht erhält indem es die Expression des *calpastatin* Gens aktiviert. Calpastatin ist ein spezifischer, endogener Inhibitor von Calpain, der durch die Bindung an diese Protease wirkt (Sorimachi et al. 1997). Der Ausgleich zwischen der Proteolyse durch Calpain und seiner Inhibition durch Calpastatin reguliert die Stabilität des Zytoskeletts (Dwyer-

Nield et al. 1996; Barnoy et al. 1998; Potter et al. 1998; Croce et al. 1999; Barnoy et al. 2000; Kosower and Barnoy 2000). Da Calpain und Calpastatin ubiquitäre Proteine sind und da die Stabilität und Organisation des Zytoskeletts zwischen den verschiedenen Zelltypen variiert, ist es nahe liegend, dass zelltypspezifische Regulationsmechanismen, die die Aktivität von Calpain steuern, gebraucht werden. Die Regulation der *calpastatin* Genexpression durch *Foxj1* in zilientragenden Zellen ist ein solcher Mechanismus. Eine in *Foxj1* Mutanten reduzierte Expression des Inhibitors Calpastatin führt zu einer erhöhten Proteolyseaktivität von Calpain. Ein potentielles Substrat für die Proteolyse durch Calpain stellt das Ezrin Protein dar. Aus Studien in anderen Zelltypen war bekannt (Potter et al. 1998; Shcherbina et al. 1999; Aono et al. 2001; Ariyoshi et al. 2001), dass die Calpain vermittelte Proteolyse von Ezrin mit Veränderungen des Zytoskeletts verbunden sind. Ezrin ist in zilientragenden Zellen mit den Basalkörperchen assoziiert und in *Foxj1* defizienten Respirationsepithelzellen ist Ezrin aufgrund erhöhter Proteolyse durch Calpain reduziert. Das gleiche gilt für EBP50, einem Protein, das in die Ezrin vermittelte Bindung von apikalen Proteinen ans Zytoskelett involviert ist.

Da in den Primitivknoten/PNCs der *Noto* Mutanten die Expression von *Foxj1* fast vollständig abwesend ist, wurde hier auch die Anwesenheit bzw. Verteilung von Ezrin und EBP50 analysiert. Nach ersten immunhistologischen Analysen von Paraffinschnitten durch die Knotenregion von Wildtyp und mutanten Embryonen konnte in der Intensität und der Lokalisation der Proteine kein Unterschied festgestellt werden. Somit ist festzuhalten, dass es in den zilientragenden Zellen der Knotenregion/PNC vermutlich einen anderen Regulationsmechanismus geben wird, über den die Organisation des Zytoskeletts gesteuert ist. Wobei an der Stelle auch erwähnt werden sollte, dass eine Analyse der Lokalisation des aktiven Ezrins, dem phospho-Ezrin, in den *Noto*-Mutanten noch nicht durchgeführt wurde. Im inaktiven Zustand lagern sich die N-terminale und die C-terminale Domäne eines Ezrin Moleküls aneinander, sodass die Bindungsstellen für die Membran und die Mikrofilamente verdeckt sind. Wenn Ezrin die geschlossene und inaktive Konformation aufweist, kann das Protein keine Bindung mit dem Zytoskelett eingehen und befindet sich größtenteils im Zytosol.

Es besteht also noch die Möglichkeit, dass durch ein Fehlen von *Noto* sowie *Foxj1* doch die Aktivität oder Lokalisation des aktiven Ezrins und somit auch die

Organisation des Zytoskeletts, bzw. die Verankerung der Basalkörperchen an die apikale Zelloberfläche, gestört ist.

#### **4.5 Erste Analysen bzgl. eines Zusammenhangs zwischen *Noto* und dem Notch-Signalübertragungsweg**

Von Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass der Notch-Signalübertragungsweg die Links-Rechts Determination mit reguliert. Embryonen, die mutant für den Notch Ligand Delta1 sind, oder Doppelmutanten der Rezeptoren Notch1 und Notch2 weisen Defekte in der Festlegung der Links-Rechts Asymmetrie auf (Krebs et al. 2003). Von dieser Arbeitsgruppe wurde aber auch gezeigt, dass alle getesteten *Dll1*<sup>-/-</sup> Embryonen einen normal nach links gerichteten “Nodal Flow” aufweisen. Daher scheinen hier die Defekte im “Nodal Flow” nicht zu den, in den *Dll1*<sup>-/-</sup> Embryonen beobachteten, Lateralitätsdefekten beizuragen.

Andere Arbeitsgruppen sagen, dass die wahrscheinlichste Ursache des Links-Rechts-Asymmetriedefektes in den *Dll1*-mutanten Embryonen eine fehlerhafte Entwicklung der Mittellinienstrukturen ist. Diese Störung nimmt ihren Ursprung im Primitivknoten/PNC, der bei *Dll1*-Embryomutanten deformiert und aufgebrochen ist. Basierend auf Expressionsanalysen bei normalen Embryonen und Mutanten, schlagen sie ein Modell vor, bei dem Notch-Signale für eine fehlerfreie Differenzierung der Zellen des Primitivknotens und seiner Morphologie notwendig sind. Sie beobachteten, dass die Oberfläche der Primitivknoten von homozygoten *Dll1* Mutanten deformiert ist und aufgrund gestörter Differenzierung der Mesentoderm-Zellen aufgebrochen ist. Nur wenige der mutanten PNC-Zellen entwickeln eine Monozilie auf ihrer apikalen Oberfläche (Przemeck et al. 2003). Dieser Phänotyp ist dem der *Noto* mutanten Embryonen sehr ähnlich, weshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression von *Noto* in den *Dll1*-mutanten Embryonen mittels eine Ganzpräparat *in situ* Hybridisierung überprüft wurde. Bei dieser Analyse war kein Unterschied zwischen der Expression von *Noto* in Wildtyp bzw. heterozygoten *Dll1* Embryonen und den homozygoten *Dll1* Mutanten zu erkennen. Aufgrund dieser Beobachtung ist auszuschließen, dass *Noto* durch den Delta-Notch-Signalübertragungsweg reguliert bzw. beeinflusst wird.

Es war bekannt, dass eine asymmetrische *Nodal* Expression in den Kronenzellen um den Primitivknoten/PNC der Maus entscheidend für die Etablierung einer

asymmetrischen Genexpression im linken SPM ist, was auch die von *Nodal* selbst beinhaltet (Brennan et al. 2002; Saijoh et al. 2003). Zusätzlich wurde aber von Raya et al. gezeigt, dass die Aktivität von Notch notwendig und auch ausreichend ist, um die Expression von *Nodal* um den Primitivknoten zu induzieren. Des Weiteren wurde in dem knotenspezifischen Enhancerelement (NDE) des *Nodal* Promoters Bindungssequenzen für RBP-J, einem Effektor des Notch-Signalübertragungswegs, gefunden (Krebs et al. 2003; Raya et al. 2003). Somit scheint die Notchaktivität ein Schlüsselregulator für die Links-Rechts Determination zu sein. Zusätzlich ist *Notch* eins der ersten Gene, das der Expression von *Nodal* vorgeschaltet wirkt. Raya et al. zeigten zusätzlich auch, dass die Expression von *Dll1* in zwei Zilienmutanten (*Kif3a*<sup>-/-</sup> und *iv*) unverändert ist. Wenn man die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bzgl. der leicht reduzierten *Dll1* Expression in den *Noto* Mutanten mit den *Dll1*-Expressionsdaten in diesen anderen beiden Zilienmutanten vergleicht, müsste man bei den Ergebnissen dieser Arbeit auch von einer unveränderten Expression sprechen. Das legt somit den Schluss nahe, dass der Mechanismus durch den der Notch-Signalübertragungsweg die Determination der Links-Rechts-Asymmetrie beeinflusst, nicht ausschließlich auf eine richtige Funktion der Zilien innerhalb der Knotenregion zurück zu führen ist.

Eine durch den Notch-Rezeptor vermittelte Induktion von *Nodal* in den Organisatorstrukturen der Vertebraten ist insgesamt ein kritischer Schritt in der Initiation der Links-Rechts-Asymmetrie. Die aktuelle Publikation von Takeuchi et al. (Takeuchi et al. 2007) zeigte, dass Baf60c in der Maus und in Zebrafisch für die Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie gebraucht wird. Baf60c, kodiert von *Smarcd3*, ist eine Untereinheit des dem Swi/Snf ähnlichen BAF-Chromatin-Restrukturierungskomplex. Chromatin-Restrukturierungskomplexe sind für die Aktivierung einiger Promotoren erforderlich. Baf60c mutante Mausembryonen sind nicht in der Lage *nodal* um den Primitivknoten zu aktivieren (primärer Effekt). Des Weiteren weisen sie eine abnormale Knotenmorphologie auf, bei der eine Vermischung der Kronen- und Grubenzellen festzustellen ist (sekundärer Effekt). In Zellkulturexperimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Baf60c für die Notch-abhängige transkriptionelle Aktivierung notwendig ist. Baf60c stabilisiert die Interaktion zwischen dem aktivierten Notch (Notch intrazelluläre Domäne-NICD) und seinem DNA-Bindepartner RBP-J. BAF-Komplexe stellen somit Schlüsselkompo-

zenten für eine Notch-Signalübertragung dar und Baf60c hat eine wichtige Funktion in der Notch-abhängigen Transkription und in der Links-Rechts Asymmetrie.

#### **4.6 Eine konservierte Funktion von *Noto* in der Bildung des Primitivknotens, als „Organ der Asymmetrie“**

Eine Mehrheit der *Noto*<sup>GFP</sup> Mutanten im Kopffaltenstadium (E7.5 bis E8.0) wies erkennbar, variable Defekte in der Region des Primitivknotens auf. Die Region des Primitivknotens entspricht dem posterioren Notochord (PNC) (Blum et al. 2007) und stellt letztendlich das „Organ der Asymmetrie“ dar. Die Defekte im PNC reichten von einer fast kompletten Abwesenheit über eine variable Größe und Form dieser Zellstruktur. Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte nur in seltenen Fällen (1 in 12) eine annähernd normale Knotenmorphologie gefunden werden. In den meisten Embryonen war mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen eine falsch organisierte Verteilung von Kronen- und Grubenzellen im PNC zu beobachten. *Nodal* exprimierende Zellen, die sich normalerweise in zwei sichelförmigen Regionen linksseitig und rechtsseitig der PNC-Region in den sog. Kronenzellen des PNCs befinden, waren in den Mutanten auch in der Region der zentral lokalisierten Grubenzellen detektierbar. Auch eine Analyse der mutanten PNCs mit Proben für *Foxa2* und *Shh* zeigte, dass es in der „Grubenregion“ des Knotens auch Zellbereiche gab, die keine Expression von diesen beiden Genen aufwiesen. Zusätzlich ist an dieser Stelle auch festzuhalten, dass man bei den mutanten Knoten auch nicht mehr von einer wirklichen „Grube“, wie man sie von der Wildtyp-Situation her kennt, sprechen kann.

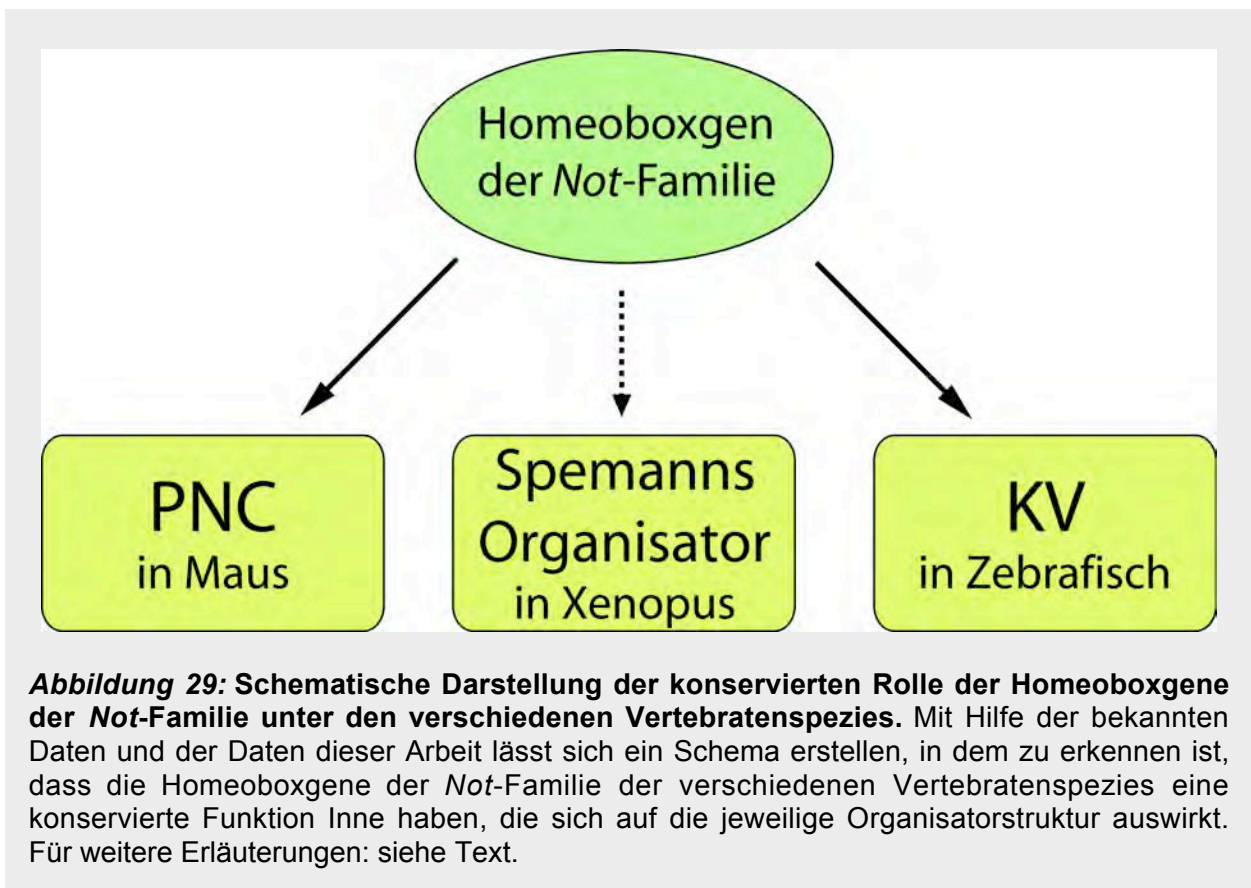
Diese Untersuchungsergebnisse deuteten auf eine hauptsächliche Funktion von *Noto* in der Morphogenese des Primitivknotens/PNC hin und legen eine essentielle Rolle in der Regulation von Migration, Positionierung und Separation der Gruben- und Kronenzellen innerhalb der Knotenregion nahe. Zusätzlich ist hier auch zu erwähnen, dass ähnliche bzw. gleiche Funktionen von *Noto* bzgl. einer normalen Migration und Positionierung von Notochord-Vorläuferzellen auch für die korrekte Integrität des Notochords gebraucht wird. Ein Fehlen der *Noto*-Funktion könnte somit zu einem gestörten Zusammenhalt der Notochordzellen untereinander führen, was anschließend zu Lücken im Notochord führt.

Die Funktion von *Noto* scheint zwischen Säugetieren, Amphibien und dem Teleost

Fisch (Zebrafisch und Medaka) konserviert zu sein. In Medaka fungiert eine transiente, kugelförmige, mit Zilien besetzte Zellstruktur, der sog. Kupffer's vesicle (KV), als der Ort für die Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie. Der KV stellt das Äquivalent zu dem Spemann-Organisator in den Amphibien, dem Hensenschen Knoten im Hühnchen und dem MGO der Säugetiere dar (Essner et al. 2002b; Essner et al. 2005; Kramer-Zucker et al. 2005; Schweickert et al. 2007). Für Medaka wurde vor kurzem erst publiziert, dass die erste asymmetrische Genexpression, die rechtsseitig verstärkte Expression von *charon* (Mitglied der Cerberus/DAN-Familie), durch den "Flow" im KV reguliert wird (Hojo et al. 2007). Mutanten mit gestörtem "Flow", der entweder durch unbewegliche Zilien oder durch eine gestörte Morphologie des KVs selbst hervorgerufen wird, weisen eine symmetrische und hoch regulierte Expression von *charon* auf.

In Zebrafisch Embryonen, die mutant für das *Noto* Homolog *flh* sind, sind die KVs ebenfalls unnormale klein und irregulär geformt (Melby et al. 1996), was vermutlich dazu führt, dass der Flow beeinflusst wird und somit die Links-Rechts-Musterung. Der KV wird aus einer Population von Zellen gebildet (die sog. "dorsal forerunner cells" DVC), die an die Vorderkante des Embryonalschildes wandern (Cooper and D'Amico 1996; Shih and Fraser 1996). Vergleichbar repräsentieren auch Vorläuferzellen des Primitivknotens und des Notochords in der Maus eine klare Zellpopulation, die sich im Embryo am Embryonaltag 7.0 posterior zu dem MGO befindet (Kinder et al. 2001), einer Region, in der *Noto* bereits exprimiert ist (Vgl. GFP Expressionsdaten in 3.2 und Abbildung 8). Es scheint also so, als reguliere *Noto/flh* in Säugetieren und im Teleost Fisch/Zebrafisch Aspekte des Zell-Verhaltens innerhalb einer Gruppe von Zellen, die mit dem Organisator assoziiert sind und die das Schicksal haben eine funktionell analoge spezialisierte Struktur zu bilden, die für die Links-Rechts Musterung benötigt wird. Auch in den floating head Mutanten in Zebrafisch wurden Lateralitätsdefekte beschrieben (Danos and Yost 1996), die zu dem Zeitpunkt aber auf das komplette Fehlen des Notochords zurückgeführt wurden. Die Daten dieser Arbeit, bezüglich einer veränderten Morphologie des Primitivknotens/PNC in *Noto* defizienten Mausembryonen, und die abnormalen KVs, die Melby et al. in den floating head Mutanten beschrieben hat (Melby et al. 1996), deuten aber eher darauf hin, dass die abnormale Bildung des KVs zu den Defekten in der Etablierung der Links-Rechts Asymmetrie in den *flh* Mutanten beiträgt.

Die Wichtigkeit von *Not* Homeoboxgenen bezüglich der Regulation der Ziliogenese in Amphibien-, Vogel- und Zebrafisch-Embryonen ist derzeit noch unklar. Allerdings sind in Zellen des Henschen Knotens der Hühnchen, in Zellen des Kupffer's vesicle (KV) im Zebrafisch, in Zellen des Spemanns Organisator der Amphibien (Bsp. *Xenopus*) und in PNC-Zellen der Säuger sowohl Zilien zu finden als auch die Expression von einem für die Bewegung der Zilien unabdingbarem Dynein, dem sog. *left-right dynein (Ird)* (Essner et al. 2002a). Darüber hinaus ist die Expression von *Not* Homeoboxgenen in den verschiedenen Organisatorstrukturen zu finden. *Gnot1/Gnot2* (Knezevic et al. 1995; Stein and Kessel 1995; Stein et al. 1996) in den Zellen des Henschen Knotens der Hühnchen, *flh* (Talbot et al. 1995) in Zellen des Kupffer's vesicle (KV) im Zebrafisch und *Xnot1/Xnot2* (von Dassow et al. 1993) im Spemanns Organisator von *Xenopus*. Das spricht für eine konservierte Funktion der Knoten-Zilien und der *Not*-Homeoboxgene zwischen verschiedenen Vertebratenspezies.

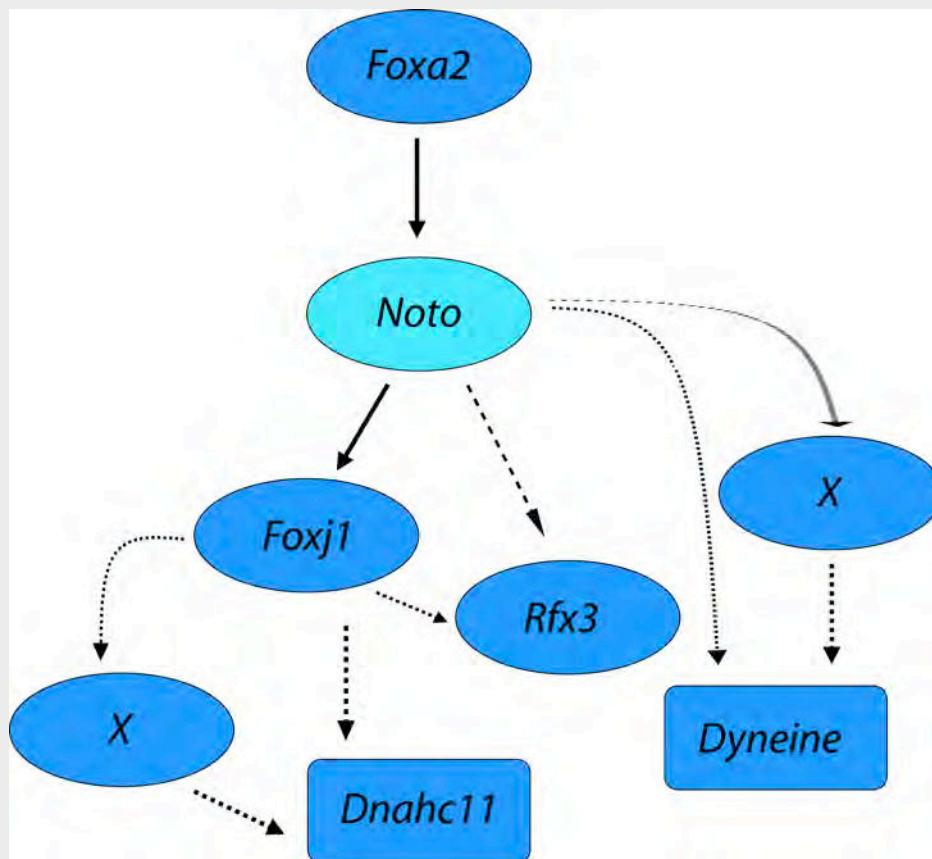




#### **4.7 *Noto* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der genetischen Hierarchie, der die Knotenmorphologie, die Ziliogenese sowie Zilienbewegung und somit auch die Links-Rechts Determination kontrolliert**

Die gestörte Knotenmorphologie und die Fehlorganisation der Mikrotubuli in den Zilien der *Noto*-mutanten Primitivknotenzellen, die durch die transmissionselektronenmikroskopischen Analysen sichtbar wurden, kann auf eine Fehlexpression verschiedener Gene zurückgeführt werden. Es könnte auch mit der Kombination der Fehlexpression von mehreren, der oben erwähnten Gene zusammenhängen.

Zusammenfassen kann man festhalten, dass *Noto* dem Transkriptionsfaktor *Foxa2* nachgeschaltet wirkt (Abdelkhalek et al. 2004). *Foxa2* wird für die Bildung von Primitivknoten und Notochord benötigt (Ang and Rossant 1994; Weinstein et al. 1994). Die Daten dieser Doktorarbeit identifizierten *Noto* zusätzlich als eine Komponente in einer genetischen Hierarchie, die die Bildung und Funktion des murinen PNCs kontrolliert. In dieser Hierarchie befindet sich *Noto* den beiden Transkriptionsfaktoren *Foxj1* und *Rfx3* vorgeschaltet. Eine generelle Notwendigkeit von *Noto* für einen normalen Aufbau von axonemalen Strukturen und für die Funktion der Zilien in dem „Organ der Asymmetrie“, dem PNC der Vertebraten, ist somit nahe liegend. Was klar gezeigt werden konnte ist die Tatsache, dass *Noto* die Expression einiger Dyneine aktiviert bzw. mit aktiviert. Ob dieses direkt oder indirekt erfolgt ist aber unklar. Im Fall des *left-right Dyneins Dnahc11* scheint diese Aktivierung aber über *Foxj1* zu erfolgen. Die Aktivierung von *Foxj1* selbst wird vermutlich auch nicht nur von *Noto* hervorgerufen, da trotz Abwesenheit dieses Transkriptionsfaktors in den Knotenzellen teilweise noch eine schwache *Foxj1* Expression zu beobachten ist, was dafür spricht, dass es noch Kofaktoren geben wird, die gemeinsam mit *Noto* *Foxj1* aktivieren. Für die Aktivierung von *Rfx3* ist anzumerken, dass diese auch indirekt über *Foxj1* erfolgen kann, wie es für *Dnahc11* in Lungenepithelzellen der Fall ist.



**Abbildung 30: Einordnung von *Noto* in eine mögliche genetische Hierarchie.** Gestrichelte Linien wurden verwendet, wenn für die Interaktion nicht klar feststeht, ob sie direkt oder indirekt ist. Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, sind mit einem ellipsenförmigen Feld unterlegt und Gene, die Dyneine kodieren, mit einem rechteckigen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abdelkhalek, H.B., Beckers, A., Schuster-Gossler, K., Pavlova, M.N., Burkhardt, H., Lickert, H., Rossant, J., Reinhardt, R., Schalkwyk, L.C., Muller, I., Herrmann, B.G., Ceolin, M., Rivera-Pomar, R., and Gossler, A. 2004. The mouse homeobox gene *Not* is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation. *Genes Dev* **18**(14): 1725-1736.
- Afzelius, B.A. 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**(4250): 317-319.
- . 1995a. Role of cilia in human health. *Cell motility and the cytoskeleton* **32**(2): 95-97.
- . 1995b. Situs inversus and ciliary abnormalities. What is the connection? *Int J Dev Biol* **39**(5): 839-844.
- Alarcon, V.B. and Marikawa, Y. 2003. Deviation of the blastocyst axis from the first cleavage plane does not affect the quality of mouse postimplantation development. *Biol Reprod* **69**(4): 1208-1212.
- . 2005. Unbiased contribution of the first two blastomeres to mouse blastocyst development. *Mol Reprod Dev* **72**(3): 354-361.
- Amacher, S.L. and Kimmel, C.B. 1998. Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm. *Development* **125**(8): 1397-1406.
- Ang, S.-L. and Behringer, R.R. 2002. Anterior-posterior patterning of the mouse body axis at gastrulation. in *Mouse Development* (ed. J. Rossant and P.P.L. Tam), pp. 37-53. Academic Press, San Diego.
- Ang, S.L. and Rossant, J. 1994. HNF-3b is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**(4): 561-574.
- Aono, Y., Ariyoshi, H., Tsuji, Y., Ueda, A., Tokunaga, M., Sakon, M., and Monden, M. 2001. Localized activation of m-calpain in human umbilical vein endothelial cells upon hypoxia. *Thrombosis research* **102**(4): 353-361.
- Ariyoshi, H., Yoshikawa, N., Aono, Y., Tsuji, Y., Ueda, A., Tokunaga, M., Sakon, M., and Monden, M. 2001. Localized activation of m-calpain in migrating human umbilical vein endothelial cells stimulated by shear stress. *J Cell Biochem* **81**(1): 184-192.

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. 1999. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770-776.
- Awgulewitsch, A. and Jacobs, D. 1992. Deformed autoregulatory element from *Drosophila* functions in a conserved manner in transgenic mice. *Nature* **358**(6384): 341-344.
- Barnoy, S., Glaser, T., and Kosower, N.S. 1998. The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim Biophys Acta* **1402**(1): 52-60.
- Barnoy, S., Supino-Rosin, L., and Kosower, N.S. 2000. Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. *Biochem J* **351 Pt 2**: 413-420.
- Beddington, R.S. 1994. Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* **120**(3): 613-620.
- Beddington, R.S. and Robertson, E.J. 1998. Anterior patterning in mouse. *Trends Genet* **14**(7): 277-284.
- . 1999. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* **96**(2): 195-209.
- Blatt, E.N., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Hamilos, D.L., and Brody, S.L. 1999. Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**(2): 168-176.
- Blum, M., Andre, P., Muders, K., Schweickert, A., Fischer, A., Bitzer, E., Bogusch, S., Beyer, T., van Straaten, H.W., and Viebahn, C. 2007. Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation* **75**(2): 133-146.
- Bonnafe, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruille, R., Couble, P., Collignon, J., Durand, B., and Reith, W. 2004. The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol* **24**(10): 4417-4427.
- Bowers, P.N., Brueckner, M., and Yost, H.J. 1996. The genetics of left-right development and heterotaxia. *Semin Perinatol* **20**(6): 577-588.
- Brennan, J., Norris, D.P., and Robertson, E.J. 2002. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes Dev* **16**(18): 2339-2344.

- Brody, S.L., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Song, S.K., and Shapiro, S.D. 2000. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(1): 45-51.
- Brown, N.A., McCarthy, A., and Wolpert, L. 1990. The development of handed asymmetry in aggregation chimeras of situs inversus mutant and wild-type mouse embryo. *Development* **110**: 949-954.
- Bumcrot, D.A. and McMahon, A.P. 1995. Somite differentiation. Sonic signals somites. *Curr Biol* **5**(6): 612-614.
- Burn, J. 1991. Disturbance of morphological laterality in humans. *Ciba Found Symp* **162**: 282-296; discussion 296-289.
- Camus, A. and Tam, P.P. 1999. The organizer of the gastrulating mouse embryo. *Curr Top Dev Biol* **45**: 117-153.
- Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-1292.
- Chen, J., Cohn, J.A., and Mandel, L.J. 1995. Dephosphorylation of ezrin as an early event in renal microvillar breakdown and anoxic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7495-7499.
- Chen, J., Knowles, H.J., Hebert, J.L., and Hackett, B.P. 1998. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* **102**(6): 1077-1082.
- Cheney, C.M. and Lash, J.W. 1981. Diversification within embryonic chick somites: differential response to notochord. *Dev Biol* **81**(2): 288-298.
- Cheng, A.M., Thisse, B., Thisse, C., and Wright, C.V. 2000. The lefty-related factor Xatv acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in xenopus. *Development* **127**(5): 1049-1061.
- Cheng, H.T., Kim, M., Valerius, M.T., Surendran, K., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., McMahon, A.P., and Kopan, R. 2007. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* **134**(4): 801-811.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**(6599): 407-413.

- Chien, A., Edgar, D.B., and Trela, J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology* **127**(3): 1550-1557.
- Chomczynski, P. and Qasba, P.K. 1984. Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **122**(1): 340-344.
- Christ, B. and Ordahl, C.P. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol Berl* **191**(5): 381-396.
- Chroscicka, A., Komorowski, S., and Maleszewski, M. 2004. Both blastomeres of the mouse 2-cell embryo contribute to the embryonic portion of the blastocyst. *Mol Reprod Dev* **68**(3): 308-312.
- Ciemerych, M.A., Mesnard, D., and Zernicka-Goetz, M. 2000. Animal and vegetal poles of the mouse egg predict the polarity of the embryonic axis, yet are nonessential for development. *Development* **127**(16): 3467-3474.
- Collignon, J., Varlet, I., and Robertson, E.J. 1996. Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* **381**(6578): 155-158.
- Cooper, M.S. and D'Amico, L.A. 1996. A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev Biol* **180**(1): 184-198.
- Croce, K., Flaumenhaft, R., Rivers, M., Furie, B., Furie, B.C., Herman, I.M., and Potter, D.A. 1999. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J Biol Chem* **274**(51): 36321-36327.
- Danos, M.C. and Yost, H.J. 1996. Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev Biol* **177**(1): 96-103.
- de Vries, W.N., Binns, L.T., Fancher, K.S., Dean, J., Moore, R., Kemler, R., and Knowles, B.B. 2000. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. *Genesis* **26**(2): 110-112.
- Deftos, M.L. and Bevan, M.J. 2000. Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol* **12**(2): 166-172.
- Dietrich, S., Schubert, F.R., and Gruss, P. 1993. Altered Pax gene expression in murine notochord mutants: the notochord is required to initiate and maintain ventral identity in the somite. *Mech Dev* **44**(2-3): 189-207.

- Doetschman, T., Shull, M., Ormsby, I., Pawlowski, S., Eis, M., Kier, A., and Diebold, R. 1993. Targeted mutation of *tgf-beta-1* in the mouse germline. *J Cell Biochem* **1993**: 189-189.
- Dwyer-Nield, L.D., Miller, A.C., Neighbors, B.W., Dinsdale, D., and Malkinson, A.M. 1996. Cytoskeletal architecture in mouse lung epithelial cells is regulated by protein-kinase C-alpha and calpain II. *Am J Physiol* **270**(4 Pt 1): L526-534.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**(7): 1417-1430.
- Edlund, H. 2002. Organogenesis: Pancreatic organogenesis developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* **3**(7): 524-532.
- Eliasson, R., Mossberg, B., Camner, P., and Afzelius, B.A. 1977. The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility. *The New England journal of medicine* **297**(1): 1-6.
- Episkopou, V., Arkell, R., Timmons, P.M., Walsh, J.J., Andrew, R.L., and Swan, D. 2001. Induction of the mammalian node requires Arkadia function in the extraembryonic lineages. *Nature* **410**(6830): 825-830.
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. 2005. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* **132**(6): 1247-1260.
- Essner, J.J., Vogan, K.J., Wagner, M.K., Tabin, C.J., Yost, H.J., and Brueckner, M. 2002a. Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* **418**(6893): 37-38.
- . 2002b. Left right development: Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* **418**(6893): 37-38.
- Fan, C.M. and Tessier Lavigne, M. 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* **79**(7): 1175-1186.
- Feinberg, A. and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.

- Gardner, R.L. 1997. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* **124**(2): 289-301.
- . 2001. The initial phase of embryonic patterning in mammals. *Int Rev Cytol* **203**: 233-290.
- . 2002. Asymmetry and prepattern in mammalian development. in *Mouse Development* (ed. J. Rossant and P.P.L. Tam), pp. 21-35. Academic Press, San Diego.
- Gardner, R.L., Meredith, M.R., and Altman, D.G. 1992. Is the anterior-posterior axis of the fetus specified before implantation in the mouse? *J Exp Zool* **264**(4): 437-443.
- Gasca, S., Hill, D.P., Klingensmith, J., and Rossant, J. 1995. Characterization of a gene trap insertion into a novel gene, cordon-bleu, expressed in axial structures of the gastrulating mouse embryo. *Dev Genet* **17**(2): 141-154.
- Gee, M.A., Heuser, J.E., and Vallee, R.B. 1997. An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature* **390**(6660): 636-639.
- Gluecksohn-Schoenheimer, S. 1943. The morphological manifestations of a dominant mutation in mice affecting tail and urogenital system. *Genetics* **28**: 341-348.
- Gomperts, B.N., Gong-Cooper, X., and Hackett, B.P. 2004. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1329-1337.
- Griffin, K., Patient, R., and Holder, N. 1995. Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development* **121**(9): 2983-2994.
- Guidos, C.J. 2002. Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol* **14**(6): 395-404.
- Hackett, B.P., Brody, S.L., Liang, M., Zeitz, I.D., Bruns, L.A., and Gitlin, J.D. 1995. Primary structure of hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 and characterization of gene expression in the developing respiratory and reproductive epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4249-4253.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S., and Lefkowitz, R.J. 1998. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* **392**(6676): 626-630.



- Halpern, M.E., Thisse, C., Ho, R.K., Thisse, B., Riggleman, B., Trevarrow, B., Weinberg, E.S., Postlethwait, J.H., and Kimmel, C.B. 1995. Cell-autonomous shift from axial to paraxial mesodermal development in zebrafish floating head mutants. *Development* **121**(12): 4257-4264 Issn: 0950-1991.
- Hanzel, D., Reggio, H., Bretscher, A., Forte, J.G., and Mangeat, P. 1991. The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. *Embo J* **10**(9): 2363-2373.
- Hanzel, D.K., Urushidani, T., Usinger, W.R., Smolka, A., and Forte, J.G. 1989. Immunological localization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells. *Am J Physiol* **256**(6 Pt 1): G1082-1089.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. 1991. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **11**(11): 5586-5591.
- Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., and Carpen, O. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* **273**(34): 21893-21900.
- Herrmann, B.G. 1991. Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* **113**(3): 913-917.
- . 1995. The mouse Brachyury (T) gene. *Seminars in Developmental Biology* **6**: 385-394.
- Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., and Lehrach, H. 1990. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **343**(6259): 617-622.
- Hirragi, T. and Solter, D. 2004. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature* **430**(6997): 360-364.
- Hirashima, M. and Suda, T. 2006. Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. *Endothelium* **13**(2): 137-145.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. 1994. *Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Hojo, M., Takashima, S., Kobayashi, D., Sumeragi, A., Shimada, A., Tsukahara, T., Yokoi, H., Narita, T., Jindo, T., Kage, T., Kitagawa, T., Kimura, T., Sekimizu, K., Miyake, A., Setiamarga, D., Murakami, R., Tsuda, S., Ooki, S., Kakihara, K., Naruse, K., and Takeda, H. 2007. Right-elevated expression of charon is regulated by fluid flow in medaka Kupffer's vesicle. *Dev Growth Differ* **49**(5): 395-405.
- Hoodless, P.A., Pye, M., Chazaud, C., Labbe, E., Attisano, L., Rossant, J., and Wrana, J.L. 2001. FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev* **15**(10): 1257-1271.
- Houde, C., Dickinson, R.J., Houtzager, V.M., Cullum, R., Montpetit, R., Metzler, M., Simpson, E.M., Roy, S., Hayden, M.R., Hoodless, P.A., and Nicholson, D.W. 2006. Hippo is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling. *Dev Biol* **300**(2): 523-533.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* **386**(6626): 717-721.
- Huang, T., You, Y., Spoor, M.S., Richer, E.J., Kudva, V.V., Paige, R.C., Seiler, M.P., Liebler, J.M., Zabner, J., Plopper, C.G., and Brody, S.L. 2003. Foxj1 is required for apical localization of ezrin in airway epithelial cells. *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 4935-4945.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**(6962): 83-87.
- Itasaki, N., Nakamura, H., Sumida, H., and Yasuda, M. 1991. Actin bundles on the right side in the caudal part of the heart tube play a role in dextro-looping in the embryonic chick heart. *Anat Embryol (Berl)* **183**(1): 29-39.
- Itasaki, N., Nakamura, H., and Yasuda, M. 1989. Changes in the arrangement of actin bundles during heart looping in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* **180**(5): 413-420.
- Johnson, D.R. 1986. *The genetics of the skeleton*. Clarendon Press, Oxford.
- Jurand, A. 1974. Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* **32**: 1-33.
- Kinder, S.J., Tsang, T.E., Wakamiya, M., Sasaki, H., Behringer, R.R., Nagy, A., and Tam, P.P. 2001. The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* **128**(18): 3623-3634.

- Klingensmith, J., Ang, S.-L., Bachiller, D., and Rossant, J. 1999. Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. *Dev Biol* **216**: 535-549.
- Knezevic, V., Ranson, M., and Mackem, S. 1995. The organizer-associated chick homeobox gene, *Gnot1*, is expressed before gastrulation and regulated synergistically by activin and retinoic acid. *Dev Biol* **171**(2): 458-470.
- Kondo, T., Takeuchi, K., Doi, Y., Yonemura, S., Nagata, S., and Tsukita, S. 1997. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol* **139**(3): 749-758.
- Kosaki, K. and Casey, B. 1998. Genetics of human left-right axis malformations. *Semin Cell Dev Biol* **9**(1): 89-99.
- Kosower, N.S. and Barnoy, S. 2000. Calpastatin (the endogenous calpain inhibitor) and membrane protein degradation in cell fusion. *Methods Mol Biol* **144**: 181-194.
- Kramer-Zucker, A.G., Olale, F., Haycraft, C.J., Yoder, B.K., Schier, A.F., and Drummond, I.A. 2005. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* **132**(8): 1907-1921.
- Krebs, L.T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I.C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T.P., Hamada, H., and Gridley, T. 2003. Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* **17**(10): 1207-1212.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., and Gridley, T. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* **14**(11): 1343-1352.
- Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., and Fujimori, T. 2007. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* **316**(5825): 719-723.
- Lawson, K.A., Meneses, J.J., and Pedersen, R.A. 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**(3): 891-911.
- Lehar, S.M. and Bevan, M.J. 2002. T cell development in culture. *Immunity* **17**(6): 689-692.
- Lemaire, P. and Kodjabachian, L. 1996. The vertebrate organizer: structure and molecules. *Trends Genet* **12**(12): 525-531.

- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M., and Tabin, C. 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**(5): 803-814.
- Lim, L., Zhou, H., and Costa, R.H. 1997. The winged helix transcription factor HFH-4 is expressed during choroid plexus epithelial development in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3094-3099.
- Lin, C.R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J.C., and Rosenfeld, M.G. 1999. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**: 279-282.
- Lobe, C.G. and Nagy, A. 1998. Conditional genome alteration in mice. *Bioessays* **20**(3): 200-208.
- Louvet-Vallee, S., Vinot, S., and Maro, B. 2005. Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Curr Biol* **15**(5): 464-469.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., and Kuehn, M.R. 1996. Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus [see comments]. *Nature* **381**(6578): 158-161.
- Maatman, R., Zachgo, J., and Gossler, A. 1997. The Danforth's short tail mutation acts cell autonomously in notochord cells and ventral hindgut endoderm. *Development* **124**: 4019-4028.
- Maclean, K. and Dunwoodie, S.L. 2004. Breaking symmetry: a clinical overview of left-right patterning. *Clin Genet* **65**(6): 441-457.
- Malicki, J., Cianetti, L.C., Peschle, C., and McGinnis, W. 1992. A human HOX4B regulatory element provides head-specific expression in Drosophila embryos. *Nature* **358**(6384): 345-347.
- Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* **9**(5): 187-192.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. 1999. Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5043-5048.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., and Tsukita, S. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* **140**(3): 647-657.

- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., and Brueckner, M. 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**(1): 61-73.
- Melby, A.E., Warga, R.M., and Kimmel, C.B. 1996. Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Development* **122**(7): 2225-2237.
- Meno, C., Gritsman, K., Ohishi, S., Ohfuji, Y., Heckscher, E., Mochida, K., Shimono, A., Kondoh, H., Talbot, W.S., Robertson, E.J., Schier, A.F., and Hamada, H. 1999. Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* **4**(3): 287-298.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., and Hamada, H. 1998. lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* **94**(3): 287-297.
- Miething, A. 1992. Ultrathin sectioning of different areas of the same semithin section. *Microsc Res Tech* **21**(1): 73-74.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P.A., Hamada, H., and Yokoyama, T. 1998. Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* **395**(6698): 177-181.
- Morgan, D., Turnpenny, L., Goodship, J., Dai, W., Majumder, K., Matthews, L., Gardner, A., Schuster, G., Vien, L., Harrison, W., Elder, F.F., Penman-Splitt, M., Overbeek, P., and Strachan, T. 1998. *Inversin*, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse. *Nat Genet* **20**(2): 149-156.
- Motosugi, N., Bauer, T., Polanski, Z., Solter, D., and Hiiragi, T. 2005. Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* **19**(9): 1081-1092.
- Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., and Woychik, R.P. 2000. The Oak Ridge Polycystic Kidney (*orpk*) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* **127**(11): 2347-2355.
- Nakamura, H. and Ozawa, H. 1996. Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae. *J Bone Miner Res* **11**(11): 1715-1722.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. 2002. Determination of left right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**(6893): 96-99.

- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**(6): 829-837.
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J.C., and Hirokawa, N. 2005. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* **121**(4): 633-644.
- Olbrich, H., Fliegau, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M.T., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt, R., Sudbrak, R., Antignac, C., Gretz, N., Walz, G., Schermer, B., Benzing, T., Hildebrandt, F., and Omran, H. 2003. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* **34**(4): 455-459.
- Olbrich, H., Haffner, K., Kispert, A., Volkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zariwala, M., Noone, P.G., Knowles, M., Mitchison, H.M., Meeks, M., Chung, E.M., Hildebrandt, F., Sudbrak, R., and Omran, H. 2002. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* **30**(2): 143-144.
- Oshiro, N., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. 1998. Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem* **273**(52): 34663-34666.
- Pavlova, M.N., Clark, A.M., and Gossler, A. 1998. High-resolution mapping of the truncate (tc) locus on mouse Chromosome 6. *Mamm Genome* **9**(10): 843-845.
- Pelletier, G.J., Brody, S.L., Liapis, H., White, R.A., and Hackett, B.P. 1998. A human forkhead/winged-helix transcription factor expressed in developing pulmonary and renal epithelium. *Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): L351-359.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. 2002. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* **12**(11): 938-943.
- Piotrowska, K., Wianny, F., Pedersen, R.A., and Zernicka-Goetz, M. 2001. Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* **128**(19): 3739-3748.
- Piotrowska, K. and Zernicka-Goetz, M. 2001. Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* **409**(6819): 517-521.

- Plouhinec, J.L., Granier, C., Le Mentec, C., Lawson, K.A., Saberan-Djoneidi, D., Aghion, J., Shi, D.L., Collignon, J., and Mazan, S. 2004. Identification of the mammalian Not gene via a phylogenomic approach. *Gene Expr Patterns* **5**(1): 11-22.
- Plusa, B., Hadjantonakis, A.K., Gray, D., Piotrowska-Nitsche, K., Jedrusik, A., Papaioannou, V.E., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. 2005. The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature* **434**(7031): 391-395.
- Potter, D.A., Tirnauer, J.S., Janssen, R., Croall, D.E., Hughes, C.N., Fiacco, K.A., Mier, J.W., Maki, M., and Herman, I.M. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* **141**(3): 647-662.
- Pourquié, O., Coltey, M., Teillet, M.A., Ordahl, C., and Le Douarin, N.M. 1993. Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11): 5242-5246.
- Price, R.L., Chintanowonges, C., Shiraishi, I., Borg, T.K., and Terracio, L. 1996. Local and regional variations in myofibrillar patterns in looping rat hearts. *Anat Rec* **245**(1): 83-93.
- Przemeck, G.K., Heinzmann, U., Beckers, J., and Hrabe de Angelis, M. 2003. Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* **130**(1): 3-13.
- Rana, A.A., Barbera, J.P., Rodriguez, T.A., Lynch, D., Hirst, E., Smith, J.C., and Beddington, R.S. 2004. Targeted deletion of the novel cytoplasmic dynein mD2LIC disrupts the embryonic organiser, formation of the body axes and specification of ventral cell fates. *Development* **131**(20): 4999-5007.
- Raya, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., Buscher, D., Koth, C.M., Itoh, T., Morita, M., Raya, R.M., Dubova, I., Bessa, J.G., de la Pompa, J.L., and Belmonte, J.C. 2003. Notch activity induces Nodal expression and mediates the establishment of left-right asymmetry in vertebrate embryos. *Genes Dev* **17**(10): 1213-1218.
- Reczek, D., Berryman, M., and Bretscher, A. 1997. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* **139**(1): 169-179.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., and et al. 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**(4): 761-76

- Rubio-Aliaga, I., Soewarto, D., Wagner, S., Klaffen, M., Fuchs, H., Kalaydjiev, S., Busch, D.H., Klempt, M., Rathkolb, B., Wolf, E., Abe, K., Zeiser, S., Przemeck, G.K., Beckers, J., and de Angelis, M.H. 2007. A genetic screen for modifiers of the delta1-dependent notch signaling function in the mouse. *Genetics* **175**(3): 1451-1463.
- Saijoh, Y., Oki, S., Ohishi, S., and Hamada, H. 2003. Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev Biol* **256**(1): 160-172.
- 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**(4839): 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sakuma, R., Ohnishi Yi, Y., Meno, C., Fujii, H., Juan, H., Takeuchi, J., Ogura, T., Li, E., Miyazono, K., and Hamada, H. 2002. Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes Cells* **7**(4): 401-412.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Satir, P. and Christensen, S.T. 2006. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu Rev Physiol*.
- Schaart, G., Viebahn, C., Langmann, W., and Ramaekers, F. 1989. Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos. *Development* **107**(3): 585-596.
- Schuster-Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. 2007. Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2): 537-542.
- Schweickert, A., Weber, T., Beyer, T., Vick, P., Bogusch, S., Feistel, K., and Blum, M. 2007. Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr Biol* **17**(1): 60-66.
- Serrador, J.M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F., and Sanchez-Madrid, F. 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* **138**(6): 1409-1423.



- Shaw, R.J., McClatchey, A.I., and Jacks, T. 1998. Localization and functional domains of the neurofibromatosis type II tumor suppressor, merlin. *Cell Growth Differ* **9**(4): 287-296.
- Shawlot, W. and Behringer, R.R. 1995. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**(6521): 425-430.
- Shcherbina, A., Bretscher, A., Kenney, D.M., and Remold-O'Donnell, E. 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett* **443**(1): 31-36.
- Shiba, D., Takamatsu, T., and Yokoyama, T. 2005. Primary cilia of inv/inv mouse renal epithelial cells sense physiological fluid flow: bending of primary cilia and Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell Struct Funct* **30**(2): 93-100.
- Shih, J. and Fraser, S.E. 1996. Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* **122**(4): 1313-1322.
- Shiratori, H. and Hamada, H. 2006. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* **133**(11): 2095-2104.
- Shiratori, H., Yashiro, K., Shen, M.M., and Hamada, H. 2006. Conserved regulation and role of Pitx2 in situs-specific morphogenesis of visceral organs. *Development* **133**(15): 3015-3025.
- Smith, J.L., Gesteland, K.M., and Schoenwolf, G.C. 1994. Prospective fate map of the mouse primitive streak at 7.5 days of gestation. *Dev Dyn* **201**(3): 279-289.
- Smith, L.J. 1980. Embryonic axis orientation in the mouse and its correlation with blastocyst relationships to the uterus. Part I. Relationships between 82 hours and 4 1/4 days. *J Embryol Exp Morphol* **55**: 257-277.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328 ( Pt 3)**: 721-732.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**(3): 503-517.
- Srivastava, D., Cserjesi, P., and Olson, E.N. 1995. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* **270**(5244): 1995-1999.

- Stein, S. and Kessel, M. 1995. A homeobox gene involved in node, notochord and neural plate formation of chick embryos. *Mech Dev* **49**(1-2): 37-48.
- Stein, S., Niss, K., and Kessel, M. 1996. Differential activation of the clustered homeobox genes CNOT2 and CNOT1 during notogenesis in the chick. *Dev Biol* **180**(2): 519-533.
- Sulik, K., Dehart, D.B., Inagaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K., and Schoenwolf, G.C. 1994. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* **201**: 260-278.
- Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., and Brueckner, M. 1997. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**(6654): 963-966.
- Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. 1999. Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A<sup>-/-</sup> mice analysis. *J Cell Biol* **145**(4): 825-836.
- Takeuchi, J.K., Lickert, H., Bisgrove, B.W., Sun, X., Yamamoto, M., Chawengsaksophak, K., Hamada, H., Yost, H.J., Rossant, J., and Bruneau, B.G. 2007. Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 846-851.
- Talbot, W.S., Trevarrow, B., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, G., Postlethwait, J.H., Jowett, T., Kimmel, C.B., and Kimelman, D. 1995. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* **378**(6553): 150-157.
- Tam, P.P.L. and Beddington, R.S.P. 1987. The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* **99**(1): 109-126.
- Tam, P.P.L. and Steiner, K.A. 1999. Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development* **126**: 5171-5179.
- Taulman, P.D., Haycraft, C.J., Balkovetz, D.F., and Yoder, B.K. 2001. Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* **12**(3): 589-599.
- Teillet, M., Watanabe, Y., Jeffs, P., Duprez, D., Lapointe, F., and Le Douarin, N.M. 1998. Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development* **125**(11): 2019-2030.

- Theiler, K. 1957. Boneless tail, ein rezessives autosomales Gen der Hausmaus. *Archiv der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene* **32**: 474-481.
- . 1959. Anatomy and development of the "truncate" (boneless) mutation in the mouse. *Am J Anat* **104**(3): 319-343.
- . 1988. *Vertebral Malformations*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**: 503-512.
- Tichelaar, J.W., Wert, S.E., Costa, R.H., Kimura, S., and Whitsett, J.A. 1999. HNF-3/forkhead homologue-4 (HFH-4) is expressed in ciliated epithelial cells in the developing mouse lung. *J Histochem Cytochem* **47**(6): 823-832.
- Tsuda, T., Philp, N., Zile, M.H., and Linask, K.K. 1996. Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev Biol* **173**(1): 39-50.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., and Tsukita, S. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* **126**(2): 391-401.
- Tsukita, S., Yonemura, S., and Tsukita, S. 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci* **22**(2): 53-58.
- van Straaten, H.W. and Hekking, J.W. 1991. Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient chick embryo. *Anat Embryol Berl* **184**(1): 55-63.
- Viebahn, C. 2001. Hensen's node. *Genesis* **29**(2): 96-103.
- von Dassow, G., Schmidt, J.E., and Kimelman, D. 1993. Induction of the *Xenopus* organizer: expression and regulation of *Xnot*, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. *Genes Dev* **7**(3): 355-366.
- Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. 2003. The left-right determinant *Inversin* is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* **130**(9): 1725-1734.

- Weber, R.J., Pedersen, R.A., Wianny, F., Evans, M.J., and Zernicka-Goetz, M. 1999. Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation. *Development* **126**(24): 5591-5598.
- Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., and Darnell, J.E., Jr. 1994. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**(4): 575-588.
- Williams, R.W. 1998. Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* **20**(4): 280-282.
- Wolberger, C., Vershon, A.K., Liu, B., Johnson, A.D., and Pabo, C.O. 1991. Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**(3): 517-528.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T.M. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**(3): 635-647.
- Yamamoto, M., Meno, C., Sakai, Y., Shiratori, H., Mochida, K., Ikawa, Y., Saijoh, Y., and Hamada, H. 2001. The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev* **15**(10): 1242-1256.
- Yasuo, H. and Lemaire, P. 2001. Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. *Development* **128**(19): 3783-3793.
- Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F., and Overbeek, P.A. 1993. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. *Science* **260**(5108): 679-682.
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* **140**(4): 885-895.
- You, Y., Huang, T., Richer, E.J., Schmidt, J.E., Zabner, J., Borok, Z., and Brody, S.L. 2004. Role of fox box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *American journal of physiology* **286**(4): L650-657.

---

Zaidi, A.U., Enomoto, H., Milbrandt, J., and Roth, K.A. 2000. Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem* **48**(10): 1369-1375.

Zernicka-Goetz, M. 2002. Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* **129**(4): 815-829.

-. 2005. Developmental cell biology: cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(12): 919-928.

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L., and Kuehn, M.R. 1993. Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**(6412): 543-547.

## 6. Lebenslauf

Name: Beckers  
Vorname: Anja  
Geburtsdatum: 20.08.1977  
Geburtsort: Aachen  
Eltern: Dr. rer. nat. Klaus-Arno Beckers und  
Anne-Gretel Beckers; geb. Sticker († 16.01.2007)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1984-1986 Grundschule Weetzen (Region Hannover)  
1986-1988 Grundschule Wennigsen (Region Hannover)  
1988-1990 Orientierungsstufe Wennigsen (Region Hannover)  
1990-1997 Matthias-Claudius Gymnasium Gehrden (Region Hannover)  
1997 Abitur

### Hochschulstudium:

1997-2002 Studium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Fach: Biologie auf Diplom  
1999 Diplom-Vorprüfung  
März 2002 Diplom-Hauptprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Molekularbiologie und Immunologie

- April bis Dez. 2002   Anfertigung der Diplomarbeit „Isolierung und Charakterisierung der Promotorregion des *pMesogenin1*-Gens der Maus“ am Institut für Molekularbiologie, Medizinischen Hochschule Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Gossler
- Dezember 2002       Diplom
- 2003-2007           Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. Achim Gossler am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover; Anfertigung dieser Doktorarbeit unter der Anleitung von Achim Gossler.

## 7. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**The mouse homeobox gene *Not* is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation.**

Hanaa Ben Abdelkhalek\*, **Anja Beckers\***, Karin Schuster-Gossler\*, Maria N. Pavlova, Heiko Lickert, Janet Rossant, Richard Reinhardt, Leonard C. Schalkwyk, Ines Müller, Bernhard G. Herrmann, Marcelo Ceolin, Rolando Rivera-Pomar and Achim Gossler

\* gleichberechtigte Erstautoren

*Genes Dev.* 2004 Jul 15;18(14):1725-36. Epub 2004 Jul 1.

**Expression of *Msgn1* in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signaling and *Tbx6***

Lars Wittler, Eun-ha Shin, Phillip Grote, Andreas Kispert, **Anja Beckers**, Achim Gossler, Martin Werber, and Bernhard G. Herrmann

*EMBO reports* 2007 Aug;8(8):784-789. Epub 2007 Jul 13.

**The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left-right patterning**

**Anja Beckers**, Leonie Alten, Christoph Viebahn, Philipp Andre, Achim Gossler

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 2;104(40):15765-70. Epub 2007 Sep 20.

**Live Imaging and Genetic Analysis of Mouse Notochord Formation Reveals Regional Morphogenetic Mechanisms**

Yojiro Yamanaka, Owen J. Tamplin, **Anja Beckers**, Achim Gossler, Janet Rossant

*Dev. Cell* 2007 Dec; 13(6):884-896.