

Regulation und Effektoren des Transkriptionsfaktors *Noto*

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

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Leonie Alten

geboren am 24. April 1980, in Hannover

2009

Referent: Prof. Dr. Achim Gossler
Koreferent: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Tag der Promotion: 13. August 2009

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Achim Gossler für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen. Durch die Bereitstellung dieses interessanten Projekts, seine Anregungen und engagierte Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Institut hat er diese Arbeit erst ermöglicht.

Ich danke Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Mein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie für ihre stete Bereitschaft zur Diskussion, ihre Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Dies hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders danke ich Dr. Karin Schuster-Gossler für ihre fachkundige Einweisung in die Stammzellkultur und alle Zeit, die sie dafür und für die Herstellung aller transgenen Tiere aufgewendet hat.

Dr. Anja Beckers gilt mein tief empfundener Dank für die tolle Zusammenarbeit in den letzten viereinhalb Jahren am „*Noto*-Projekt“. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Familie für ihren immerwährenden Rückhalt, ihre Unterstützung und alles was sie für mich getan haben.

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

Noto codiert für einen Homeobox-Transkriptionsfaktor, der nur im Primitivknoten und im neu gebildeten Notochord exprimiert wird (Abdelkhalek et al., 2004). Durch ein *knock-out* Allel von *Noto* zeigte sich, dass *Noto* notwendig ist für die Morphogenese des Primitivknotens, die Ziliogenese im Knoten und die Entwicklung des kaudalen Notochords (Beckers et al., 2007). Zur weiteren Aufklärung, wie *Noto* in diese Prozesse involviert ist, erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der Regulation von *Noto*. Darüber hinaus wurden Zielgene von *Noto* identifiziert und untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Einzelkopie-Transgen-Analysen (Bronson et al., 1996) NOCE, eine bislang unbeschriebene Enhancer-Region im *Noto*-Lokus, lokalisiert und charakterisiert. NOCE aktiviert robuste Reporterexpression im Primitivknoten und Notochord. Diese Enhancer-Region ist nur in Plazentatieren konserviert und wird durch die kombinatorische Funktion mehrerer Faktoren reguliert, von denen einige in dieser Arbeit untersucht wurden. NOCE spiegelt die endogene Expression von *Noto* wieder und ist notwendig und hinreichend für Reporterexpression im Primitivknoten und Notochord.

Weiterhin gelang im Rahmen dieser Arbeit die Identifizierung von *Noto*-Zielgenen im Primitivknoten. Dadurch wird ein tieferer Einblick in die Funktion von *Noto* möglich. Die Funktion einiger Zielgene ist bislang noch nicht bekannt. Die Charakterisierung dieser Zielgene trägt dazu bei, neue Faktoren in der Ziliogenese und Morphogenese im Knoten zu identifizieren. Einer der Effektoren von *Noto* ist *Foxj1*. Die Untersuchungen zu *Foxj1* in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *Foxj1* notwendig ist für die Ziliogenese im Primitivknoten. Zur weiteren Differenzierung der spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* wurde ein neues Allel von *Noto* hergestellt, in welchem *Foxj1* bei gleichzeitiger Ausschaltung von *Noto* im *Noto*-Lokus exprimiert wird. Durch dieses Transgen wird die Expression von Zielgenen von *Foxj1* im Primitivknoten wieder hergestellt.

1.2 Abstract

Noto encodes a homeobox transcription factor that is expressed in the node and nascent notochord (Abdelkhalek et al., 2004). Loss of *Noto* disrupts ciliogenesis in the embryonic node and node morphology (Beckers et al., 2007). To further investigate the mechanisms that regulate ciliogenesis and node morphology, *Noto* was analysed with respect to its regulation, as well as identification of downstream effectors.

To identify relevant regulatory sequences we used single copy insertions of promoter-reporter constructs into ES cells (Bronson et al., 1996) and analysed these in chimeric embryos.

Those analyses led to the localisation of a novel enhancer region (NOCE, node and notochord-specific enhancer) in the *Noto* locus that resembles the expression of endogenous *Noto*. NOCE activates robust reporter gene expression in the node and notochord. This enhancer region is only conserved in higher mammals and is regulated by the combinatorial action of several factors. Some of these are analysed in this PhD thesis. NOCE resembles endogenous *Noto* expression and is necessary and sufficient to activate reporter gene expression in node and notochord.

Furthermore several target genes of *Noto* were identified. Some are not yet characterised and should help to get better insights into ciliogenesis and morphogenesis of the node. *Foxj1* was identified to be an important downstream effector of *Noto*. In this thesis *Foxj1* has been shown to be essential for ciliogenesis in the node. By comparative analyses of *Noto* and *Foxj1* mutants, as well as gene replacement, the specific functions of *Noto* and *Foxj1* in the node are currently being delineated.

1.3 Schlagworte

Schlagworte: Notochord, Primitivknoten, Ziliogenese

Key words: notochord, embryonic node, ciliogenesis

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNGEN.....	4
1.1	ZUSAMMENFASSUNG	4
1.2	ABSTRACT	5
1.3	SCHLAGWORTE	6
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
3	EINLEITUNG	13
3.1	DIE LINKS-RECHTS-ASYMMETRIE	13
3.2	DER EMBRYONALE PRIMITIVKNOTEN UND DAS NOTOCHORD	14
3.3	DER AUFBAU VON ZILIEEN	18
3.4	ZILIOGENESE UND IFT	20
3.5	DIE FESTLEGUNG DER LINKS-RECHTS-ACHSE	21
3.6	BEDEUTUNG DER ZILIEEN IN DER ENTWICKLUNG UND BEI KRANKHEITEN	24
3.7	DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG UND DER PCP-SIGNALWEG	26
3.8	DAS HOMEBOXGEN NOTO	28
3.9	DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR FOXJ1.....	31
4	ZIELSETZUNG.....	33
5	MATERIAL UND METHODEN.....	34
5.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
5.1.1	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	<i>34</i>
5.1.2	<i>Herstellung von kompetenten Bakterien.....</i>	<i>34</i>
5.1.3	<i>Transformation von elektrokompenten Bakterien</i>	<i>35</i>
5.1.4	<i>Plasmidisolierung aus Bakterien.....</i>	<i>35</i>
5.1.4.1	Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation).....	35
5.1.4.2	Präparative Plasmidisolierung (Mini-Spinpräparation).....	36
5.1.4.3	Präparative Plasmidisolierung (Maxi)	36
5.1.5	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....</i>	<i>36</i>
5.1.5.1	Taq-Polymerase	36
5.1.5.2	Expand High Fidelity Kit	37
5.1.6	<i>Klonierungstechniken</i>	<i>38</i>
5.1.6.1	Restriktionsverdau	38
5.1.6.2	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	38

5.1.6.3	Dephosphorylierung	39
5.1.6.4	Gelextraktion.....	39
5.1.6.5	Präzipitation von Nukleinsäuren (DNA oder RNA).....	39
5.1.6.6	Ligation.....	39
5.1.7	<i>Langzeitlagerung von Plasmiden</i>	40
5.1.8	<i>Sequenzierungen</i>	41
5.1.9	<i>Zielgerichtete Mutagenese</i>	41
5.1.10	<i>BAC recombineering</i>	41
5.1.10.1	BAC-Isolierung durch alkalische Lyse	41
5.1.10.2	BAC-Isolierung für Pronukleus-Injektionen.....	42
5.1.10.3	BAC recombineering	42
5.1.11	<i>Southern Blot-Hybridisierung</i>	44
5.1.11.1	DNA-Transfer auf Nylonmembranen	44
5.1.11.2	Herstellung radioaktiv (³² Phosphor- α -dCTP) markierter DNA-Sonden	45
5.1.11.3	Hybridisierung.....	45
5.1.12	<i>RNA-Isolierung und Mikroarray-Hybridisierungen</i>	46
5.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	46
5.2.1	<i>Methoden mit differenzierten Säugerzellen</i>	46
5.2.1.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	46
5.2.1.2	Transfektion	47
5.2.1.3	Luciferase-Reporter-Assay.....	47
5.2.2	<i>Techniken mit murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)</i>	47
5.2.2.1	Gene targeting.....	47
5.2.2.2	Einzelkopie-Transgen-Analyse im <i>Hprt</i> -Lokus	49
5.2.2.3	Aufbereitung der Targeting-Konstrukte für die ES-Zell-Elektroporation	51
5.2.2.4	Kultivierung von embryonalen Stammzellen	51
5.2.2.5	Elektroporation von Stammzellen	52
5.2.2.6	Selektion von Neomycin-resistenten ES-Zellen	53
5.2.2.7	DNA-Extraktion aus ES-Zellen.....	54
5.2.2.8	Überprüfung der resistenten Klone nach Neomycin-Selektion.....	54
5.2.2.9	Selektion von <i>Hprt</i> -positiven ES-Zellen	54
5.2.2.10	Herstellung von Chimeren.....	55
5.3	EMBRYOLOGISCHE METHODEN.....	55
5.3.1	<i>Genotypisierung von Mausmutanten</i>	55
5.3.1.1	DNA-Präparation von Schwanzbiopsien.....	55
5.3.1.2	Genotypisierung von Mausmutanten	55
5.3.2	<i>Ganzpräparat in situ Hybridisierungen</i>	57
5.3.2.1	Präparation und Fixierung von Mausembryonen	58
5.3.2.2	Herstellung von RNA-Sonden	58
5.3.2.3	WISH.....	59
5.3.3	<i>lacZ-Reportergenanalyse in Embryonen</i>	61
5.3.4	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i>	62
5.4	MATERIAL.....	63

5.4.1	<i>Chemikalien und Geräte</i>	63
5.4.1.1	Chemikalien	63
5.4.1.2	Computerprogramme und Datenbanken	65
5.4.1.3	Geräte	65
5.4.2	<i>Medien</i>	66
5.4.2.1	Bakterienmedien	66
5.4.2.2	Zellkulturmedien	66
5.4.3	<i>Plasmide</i>	66
5.4.4	<i>Primer</i>	67
5.4.5	<i>Plasmide und Bakterien</i>	67
5.4.6	<i>Whole mount in situ-Proben</i>	67
6	ERGEBNISSE	69
6.1	PROMOTERANALYSE VON NOTO	69
6.1.1	<i>Eingrenzung regulatorischer Elemente im Noto-Lokus</i>	69
6.1.1.1	Untersuchung großer Fragmente des <i>Noto</i> -Lokus.....	69
6.1.1.2	Eingrenzung einer Knoten-spezifischen Enhancer-Region	73
6.1.1.3	Untersuchung der Sequenz von NOCE.....	75
6.1.1.4	Unterteilung von NOCE in weitere Abschnitte.....	77
6.1.2	<i>Analyse möglicher Regulatoren von NOCE</i>	79
6.1.2.1	Untersuchung der Aktivierung von NOCE durch den Wnt-Signalweg.....	79
6.1.2.2	Untersuchung der Aktivierung von NOCE durch TEAD Proteine	82
6.1.2.3	Untersuchung der Regulation von NOCE durch Homeobox-Proteine	85
6.1.2.4	Untersuchung eines möglichen additiven Effekts von Wnt-Signalweg, Tead und Homeobox Transkriptionsfaktoren.....	87
6.1.2.5	Untersuchung der Regulation von NOCE durch FOXA2	89
6.1.2.6	Bedeutung einer potentiellen Bindestelle für einen unbekanntem Faktor	91
6.1.3	<i>Analyse von NOCE ohne heterologen Minimalpromoter</i>	94
6.2	UNTERSUCHUNGEN ZU NOTO-ZIELGENEN.....	95
6.2.1	<i>Differentielle RNA-Hybridisierung von Noto-defizienten Embryonen</i>	95
6.2.1.1	Untersuchung von <i>0710001D07Rik</i>	98
6.2.1.2	Untersuchung der Expression von potentiellen <i>Noto</i> -Zielgenen mit unbekannter Funktion....	98
6.2.1.3	Untersuchung der Expression potentieller <i>Noto</i> -Zielgene mit teilweise bekannter Funktion 100	100
6.3	ANALYSE VON FOXJ1 IM PRIMITIVKNOTEN DER MAUS	102
6.3.1	<i>Expression von Foxj1 im Primitivknoten</i>	102
6.3.2	<i>Untersuchung der Knotenmorphologie und Ziliogenese in Foxj1- Mutanten</i>	104
6.3.3	<i>Expressionsanalyse von potentiellen Zielgenen von Noto in Foxj1-Mutanten</i>	106
6.3.3.1	Analyse von Zielgenen mit teilweise bekannter Funktion	106
6.3.3.2	Analyse von potentiellen Zielgenen mit unbekannter Funktion	109
6.4	DIFFERENZIERUNG DER FUNKTION VON NOTO UND FOXJ1	109
6.4.1	<i>Strategie zur Expression von Foxj1 unter der Kontrolle des Noto-Lokus</i>	110

6.4.2	<i>Generation der Noto^{Foxj1^{Ki}} Mauslinie</i>	111
6.4.3	<i>Überprüfung der Transgenexpression in Noto^{Foxj1^{Ki}}</i>	112
6.4.4	<i>Beschreibung des Phänotyps von Noto^{Foxj1^{Ki}}</i>	113
6.4.5	<i>Beschreibung der Knotenmorphologie in Noto^{Foxj1^{Ki}/Foxj1^{Ki}}-Embryonen</i>	114
6.4.6	<i>Analyse der Funktionalität des Noto^{Foxj1^{Ki}}-Allels</i>	115
7	DISKUSSION	117
7.1	NOCE, EIN NEUER KNOTEN-SPEZIFISCHER ENHANCER	117
7.1.1	<i>Reporteranalyse im Hprt-Lokus</i>	117
7.1.2	<i>Die Reporterexpression von Fragmenten aus dem Noto-Lokus ist abhängig von der Kopienzahl</i>	118
7.1.3	<i>Identifikation einer neuen Knoten- und Notochord-spezifischen Enhancer-Region</i>	119
7.1.4	<i>Die Bedeutung ektopischer Expressionsdomänen durch verschiedene Konstrukte</i>	120
7.1.5	<i>Regulation von NOCE, einem Säugetier-spezifischen Enhancer</i>	124
7.1.5.1	Die Bedeutung von konservierten potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen in NOCE	125
7.1.5.2	FOXA2 beeinflusst die Aktivität von NOCE	127
7.1.5.3	Die Funktion von UFO für die Regulation von NOCE	128
7.1.5.4	FOXA2 und UFO wirken kooperativ auf NOCE	130
7.2	IDENTIFIZIERUNG VON NOTO- ZIELGENEN	131
7.3	SPEZIFISCHE FUNKTIONEN VON NOTO UND FOXJ1 IM KNOTEN	134
7.3.1	<i>Die Funktion von Foxj1 in der Ziliogenese im Knoten</i>	135
7.3.2	<i>Foxj1 in der Kontrolle der Zellzahl im Knoten</i>	136
7.3.3	<i>Noto und Foxj1 in Knotenmorphogenese und PCP</i>	137
7.3.4	<i>Differenzierung der Funktionen von Noto und Foxj1 im Primitivknoten der Maus</i>	139
8	ANHANG	140
8.1	LITERATURVERZEICHNIS	140
8.2	LEBENS LAUF	148
8.3	WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	148

2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (bei Angabe von Nukleotidsequenzen)
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
C	Cytosin (bei Angabe von Nukleotidsequenzen)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
G	Guanin (bei Angabe von Nukleotidsequenzen)
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneinstiegsstelle
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
LB	Vollmedium (Luria-Bertani-Medium)
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
M	molar (mol/l)
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> (offenes Leseraster)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potentia hydrogenii
POD	Horseradish peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHK	Schwanzhälftenkulturen
T	Thymin (bei Angabe von Nukleotidsequenzen)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetracyclin
U	Unit = Einheit der biologischen Aktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

WISH hybridisation)	Ganzpräparat <i>in situ</i> Hybridisierung (whole mount <i>in situ</i>)
w/v	Gewicht/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

3 Einleitung

Die meisten Tiere haben eine äußerlich bilateral symmetrische Erscheinung. Dies gilt auch für den Menschen und Säugetiere. Viele Merkmale, wie Augen, Gliedmaßen und Hände, werden symmetrisch angelegt. Dennoch sind die inneren Organe beim Menschen und auch bei der Maus asymmetrisch verteilt. Die asymmetrische Entwicklung ist in einigen Fällen wichtig für die Funktion der Organe. Wie diese asymmetrische Verteilung auf die immer wiederkehrende Art und Weise reguliert wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Die Links-Rechts-Asymmetrie der inneren Organe wird früh während der Embryonalentwicklung festgelegt. Möglich ist das nur durch die strikte Regulation von Genen, die Entwicklungsprozesse seitenspezifisch regulieren. Es ist bekannt, dass an der Festlegung der Links-Rechts-Achse Zellfortsätze beteiligt sind, die als Zilien bezeichnet werden. Diese Zilien üben auch in anderen Organen wichtige, unterschiedliche Funktionen aus. Sie sind beispielsweise auch in Lunge, Niere und Gehirn unverzichtbar. Daher ist die Analyse der Ziliogenese im Zusammenhang mit der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie ein wichtiges Ziel der Entwicklungsbiologie.

3.1 Die Links-Rechts-Asymmetrie

Nach der anterior-posterioren Achse und der dorso-ventralen Achse ist die Links-Rechts-Achse die letzte Körperachse, die festgelegt wird. Dieser Prozess ist genetisch streng reguliert, so dass die visceralen Organe immer auf die selbe Art und Weise im Körper verteilt sind (Lopez-Gracia and Ros, 2007).

Beim Menschen lokalisieren das Herz, der Magen und die Milz auf der linken Seite, während Leber und Galle rechts liegen. Auch die Lunge entwickelt sich nicht symmetrisch, sie hat beim Menschen rechts drei Lungenlappen und links zwei. In der Maus sind die inneren Organe ähnlich verteilt wie beim Menschen, sie besitzt aber rechts vier Lungenlappen und links einen. Diese „normale“ Verteilung der inneren Organe bezeichnet man als *Situs solitus*.

In seltenen Fällen sind die inneren Organe genau spiegelverkehrt angeordnet. Beim Menschen tritt diese Spiegelung etwa mit einer Frequenz von 1:8500 auf. Die spiegelverkehrte Anordnung der inneren Organe wird als *Situs inversus*, bzw. *Situs inversus totalis*, bezeichnet. Durch die vollständige Spiegelung der inneren Organe beim *Situs inversus* sind diese nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt. Der *Situs inversus totalis* hat daher keinen Einfluss auf Lebensspanne und Gesundheit des Trägers.

Sind Fehler in der Anlage der Links-Rechts-Achse aufgetreten, kann es zu vielen unterschiedlichen Konfigurationen der visceralen Organe kommen. Dabei sind nur der *Situs solitus* und der *Situs inversus totalis* ohne Beschwerden mit dem Leben vereinbar. Alle anderen Verteilungen der inneren Organe werden unter dem Begriff *Situs ambiguus* zusammengefasst. Ein Zustand in dem einige Organe dem *Situs solitus* entsprechen, andere aber nicht wird *Heterotaxie* genannt. Der *Isomerismus* bezeichnet Formen, bei denen Organe symmetrisch angeordnet sind, die ansonsten eine einseitige oder bilateral asymmetrische Verteilung ausweisen. Es kann so zu vielen unterschiedlichen Formen des *Situs ambiguus* kommen, da bei Verlust der Links-Rechts-Achse jedes Organ zufällig seine Lateralität festlegt, ohne Koordination mit den anderen.

Die meisten Formen des *Situs ambiguus* sind nicht mit dem Leben vereinbar, da auch das Herz asymmetrisch entwickelt wird. Wird die Links-Rechts-Achse nicht richtig festgelegt, entwickelt sich kein leistungsfähiges Herz. Dies führt zu einer hohen perinatalen Sterblichkeit (Franco and Campione, 2003).

In der Maus beginnt die Festlegung der Links-Rechts-Achse etwa am Tag 8 der Embryonalentwicklung (E8), also etwa 12 Tage vor der Geburt. Das erste morphologische Zeichen der Asymmetrie ist in der Maus am Tag E8,5 erkennbar. Die ursprünglich symmetrische Herzhöhle beginnt sich einzudrehen und biegt sich zur rechten Seite, um eine initiale Schlaufe zu bilden. Dieser Prozess ist in vielen Tieren konserviert, unabhängig von Variationen in der Morphologie des Herzens. Daher wurde angenommen, dass es sich um ein Zeichen gemeinsamen, evolutionären Ursprungs handelt (Hamada et al., 2002).

Gesteuert wird die Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie von Strukturen entlang der Mittellinie des Embryos. Diese Strukturen sind der Primitivknoten und das Notochord.

3.2 Der embryonale Primitivknoten und das Notochord

Zur Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie sind der Primitivknoten und das Notochord von sehr großer Bedeutung. Beides sind transiente Strukturen, die nur eine kurze Zeit während der Embryonalentwicklung bestehen und ihre Funktion ausüben. Ihre Entwicklung beginnt mit der Ausbildung des Primitivstreifens.

Der Primitivstreifen entsteht am Tag 6,5 und kennzeichnet den Beginn der Gastrulation. In der Maus beginnt der Primitivstreifen als Verdickung an einer Seite am Rand des Eizylinders, diese Stelle ist das spätere posteriore Ende des Embryos.

Während der Gastrulation wird das Mesoderm, das dritte Keimblatt, gebildet. Proliferierende Zellen wandern durch den Primitivstreifen lateral und anterior zwischen Ektoderm und viscerales Endoderm, um das Mesoderm zu bilden. Währenddessen ersetzen weitere Zellen das viscerales Endoderm und bilden das definitive Endoderm.

Nach seiner Bildung am Rande des Eizylinders verlängert sich der Primitivstreifen nach anterior, bis er etwa E7,5 das distale Ende des Embryos erreicht hat. Am anterioren Ende des Primitivstreifens liegt der Organizer, ein wichtiges Signalzentrum in der Embryonalentwicklung. Der Maus-Organizer ist keine starre Population von Zellen, sondern verändert sich mit der Ausdehnung des Primitivstreifens. Hierbei werden je nach Ausdehnung des Primitivstreifens drei Organisations-Zentren unterschieden, früher und mittlerer Gastrula-Organizer und Primitivknoten. Der frühe Organizer liegt am anterioren Ende des neu gebildeten Primitivstreifens, am Ende des halb ausgedehnten Primitivstreifens liegt der mittlere Organizer und am anterioren Ende des voll ausgedehnten Primitivstreifens liegt der Primitivknoten. Die unterschiedlichen Organizer gehen zum Teil in einander über. Sie unterscheiden sich allerdings durch ihre Funktion und die Expression unterschiedlicher Organizer-spezifischer Gene (Kinder et al., 2001).

Mit Erreichen des späten Primitivstreifen-Stadiums beginnt also die Morphogenese des Knotens. Durch Experimente mit Embryonen, die eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) im Primitivknoten und neu gebildeten Notochord exprimieren (*Noto^{GFP}*), konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die zum Knoten beitragen schon vor seiner Ausbildung unter der Schicht endodermaler Zellen am distalen Ende des Embryos angeordnet sind (Yamanaka et al., 2007) (Abbildung 1A). Darauf folgt das anfänglich lückenhafte Hervortreten der Zilien-tragenden Zellen an die ventrale Oberfläche. Dies geschieht durch ein schrittweises Verschwinden der darüber liegenden, endodermalen Zellen durch Migration oder Zelltod (Abbildung 1B). Nach der vollständigen Ausdehnung des Primitivstreifens ist am posterioren Ende des Embryos die Allantoisknospe (*allantoic bud*) zu erkennen, dieses Stadium wird *zero bud*-Stadium genannt. Im *zero bud*-Stadium erscheint der Knoten als zusammenhängendes Feld von Zilien-tragenden Zellen (Abbildung 1C). Das Feld von Zilien-tragenden Zellen ist allerdings noch flach bis konvex und gegenüber den umliegenden Zellen nur schwach abgesenkt. Bis zum frühen Kopffaltenstadium bildet sich eine Grube aus, in der die Zilien-tragenden Grubenzellen liegen.

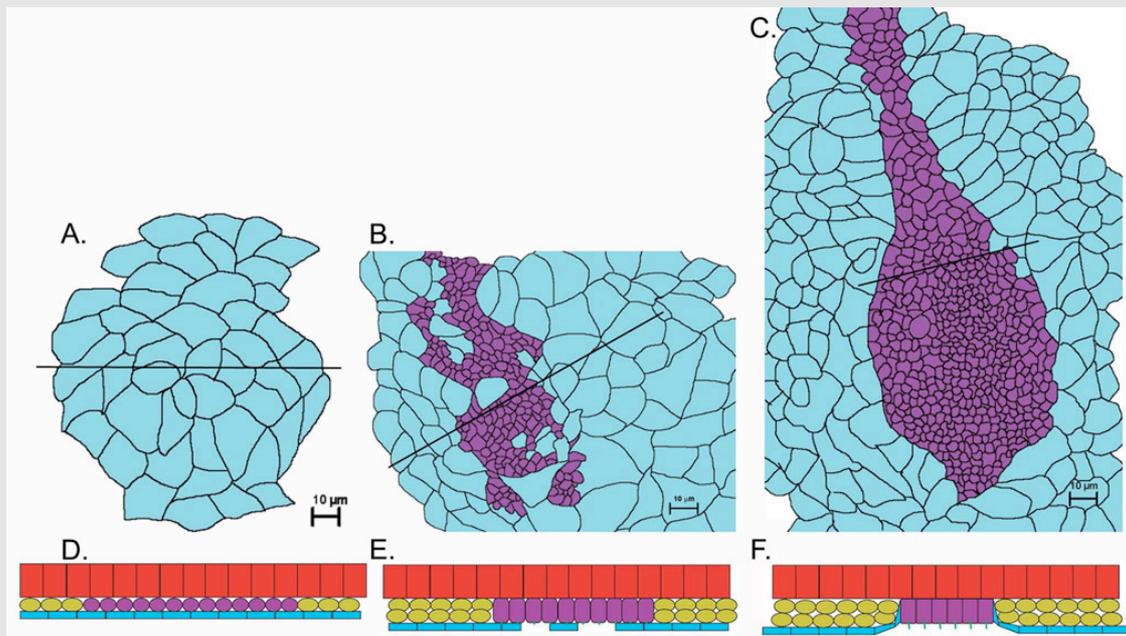


Abbildung 1: Der Primitivknoten entsteht am distalen Ende des Embryo durch Verdrängung von Plattenepithelzellen

(A,D) zeigen den Knoten im mittleren Primitivstreifen-Stadium, (B,E) zeigen den Knoten im späten Primitivstreifen-Stadium, C,F zeigen den Knoten im *zero bud*-Stadium; A-C distale Ansicht, D-F sagittale Schnittebene durch den Organizer; in hellblau sind die Plattenepithelzellen markiert, in violett die Grubenzellen (Figur übernommen von (Lee and Anderson, 2008))

Der ausgereifte Primitivknoten ist im mittleren Kopffaltenstadium mit Hilfe von Raster-Elektronenmikroskopie gut zu erkennen. Er ist als deutliche tropfenförmige bis dreieckige Vertiefung, oder auch „Grube“, erkennbar. Der Knoten besteht aus etwa 250 Zellen und ist 50-60µm breit, 70-80µm lang und 50µm tief (Lee and Anderson, 2008; Yamanaka et al., 2007) (Kinder et al., 2001). 20-30 Plattenepithelzellen umgeben die Grube, diese werden als Kronenzellen bezeichnet. Über dem Knoten, und dem gesamten Embryo, liegt die Reichertsche Membran. Durch die Reichertsche Membran bildet sich ein geschlossener Flüssigkeits-gefüllter Raum über dem Primitivknoten. In diesem Raum entsteht durch die Zilien-tragenden Grubenzellen der „*nodal flow*“. Obwohl sich die Strukturen in verschiedenen Wirbeltieren morphologisch unterscheiden, so ist der Mechanismus der Festlegung der Links-Rechts-Achse wenigstens teilweise erhalten geblieben. Mit Hilfe eines Monozilien-tragenden Epithels wird ein links-gerichteter Flüssigkeitsstrom erzeugt, der die linke Seite definiert. Die Ausbildung einer, mit dem Primitivknoten vergleichbaren Struktur, wurde beispielsweise auch für *Xenopus*, Medaka, Zebrafisch und Kaninchen gezeigt.

Das Notochord entwickelt sich aus Zellen aller drei Stufen des Organizers. Die prächordale Platte stellt den anteriorsten Teil des Notochord dar und geht aus Zellen des frühen Gastrula-Organizers hervor, kurz nach Beginn der Gastrulation. Darauf folgt das anteriore Notochord, es wird aus Zellen des mittleren Gastrula-Organizers gebildet. Das anteriore Notochord folgt auf die prächordale Platte und erstreckt sich posterior durch den Kopf bis etwa zu den ersten 2 Somiten. Durch den gesamten Körper und den Schwanz der Maus erstreckt sich das posteriore Notochord. Es geht aus dem Primitivknoten hervor.

Die Zellen im Organizer proliferieren kaum, obwohl anterior das Notochord gebildet wird. Dies ist möglich, da das Notochord zum Teil durch konvergente Ausdehnung gebildet wird. Darüber hinaus werden Zellen aus dem anterioren Ende des Primitivstreifens rekrutiert, um zum Organizer beizutragen und die Zellen zu ersetzen, die weiter anterior das Notochord bilden (Kinder et al., 2001).

Bis E9 besteht das Notochord aus einer flachen epithelialen Schicht entlang der ventralen Mittellinie. Erst danach formt sich daraus eine seilartige Struktur, die den gesamten Embryo durchzieht. Die Verlängerung des Notochord endet mit der Verlängerung der Körperachse etwa E13,5. Das Notochord verliert im weiteren Verlauf der Entwicklung seine Identität und trägt später zur Ausbildung des *Nucleus pulposus* bei, dem Gallertkern von Bandscheiben (Choi et al., 2008).

Das Notochord ist ein wichtiges Signalzentrum während der Embryonalentwicklung. Es hat eine wichtige Funktion bei der Musterbildung in den Somiten und im Neuralrohr. Bei der Verlängerung der Körperachse werden im Rahmen der Somitogenese, beidseits von Neuralrohr und Notochord, die Somiten angelegt. Aus den Somiten bilden sich die Dermis, die Skelettmuskulatur und die Wirbelkörper und Rippen. Zu Beginn ihrer Entstehung sind die Somiten gleichförmig und werden durch äußere Signale zur Differenzierung angeregt. Eines dieser Signale stammt aus dem Notochord. Das Notochord und die ventralen Bodenplatte des Neuralrohrs setzen *sonic hedgehog* (SHH) frei. Dies induziert in den ventromedialen Anteilen der Somiten das Sklerotom, aus dem die Wirbelknochen und Rippen entstehen. Das Notochord trägt durch SHH auch zur Musterbildung im Neuralrohr bei. Durch SHH aus dem Notochord entwickelt sich die ventrale Bodenplatte des Neuralrohrs, die wiederum SHH exprimiert. Ein SHH-Gradient, der nach dorsal abnimmt, induziert im Neuralrohr unterschiedliche neuronale Schicksale (Jeong and Epstein, 2003).

Durch den Verlust des Notochord kommt es zu Defekten bei der Musterbildung in den Somiten und dem Neuralrohr.

Das Notochord hat auch während der Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie eine wichtige Funktion. Es wurde gezeigt, dass es nicht ausreichend ist, die Links-Rechts-Achse zu induzieren, sie muss aufrechterhalten werden. Während der Festlegung der Links-Rechts-Achse wird die Expression von Genen Seiten-spezifisch im linken Seitenplattenmesoderm aktiviert. Darunter sind auch Gene von sezernierten Signalproteinen, diese diffundieren unter anderem zur Mitte. Dort aktivieren die links-spezifischen Signalproteine die Expression von sezernierten Antagonisten in der linken Seite der Bodenplatte des Neuralrohrs. Diese neutralisieren das von links kommende Signal, wodurch es auf die linke Seite begrenzt wird (Yamamoto et al., 2003). Das Notochord induziert die Bodenplatte des Neuralrohrs und ist dadurch unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der Links-Rechts Asymmetrie.

Primitivknoten und Notochord sind kritisch für die korrekte Anlage der inneren Organe. Der Knoten ist notwendig zur Induktion, während das Notochord indirekt zur Aufrechterhaltung der Links-Rechts-Achse benötigt wird. Wie bereits erwähnt tragen die Zellen in der Grube des Primitivknotens Zilien, die wichtig sind für die Funktion des Knotens.

3.3 Der Aufbau von Zilien

Zilien sind Mikrotubuli-basierte Zellfortsätze, die sich auf vielen Zellen finden. Ihre Anwesenheit ist für viele Prozesse kritisch, so auch für die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie.

Obwohl Zilien unterschiedliche Funktionen ausüben können und sich daher im Detail auch unterscheiden, so sind doch allen Zilien einige Merkmale gemein. Der Basalkörper bildet die Basis aller Zilien. Darauf folgt die Übergangszone, in der die Verbindungen zur Zellmembran liegen. Nachfolgend ragt das Axonem aus der Zelle. Der Basalkörper basiert auf einem Zentrosom mit Mutter- und Tocherzentriol. Zur Ausbildung der Zilien sind aber nur Mutterzentriolen in der Lage (Dawe et al., 2007). Beide Zentriole haben als Grundstruktur neun Mikrotubuli-Triplets, die zirkulär angeordnet sind. Diese Grundstruktur ist aufgebaut aus Tubulin-Untereinheiten, an die Proteine assoziieren, wie beispielsweise TEKTIN2, die zur Stabilisierung der Mikrotubuli im Basalkörper beitragen. Darum herum wird die perizentrioläre Matrix (PCM) aufgebaut. Sie trägt weiter zur außergewöhnlichen Stabilität der Basalkörper bei. Wahrscheinlich trägt die Komposition der PCM zur Fähigkeit der Mutterzentriolen

bei, Zilien zu bilden. An die PCM assoziieren die Partikel des intraflagellaren Transports (IFT), die hier ihre Ladung aufnehmen oder wieder abgeben.

Der Basalkörper geht über in die Übergangszone. Hier befinden sich die Verbindungsfasern zur Membran. In der Übergangszone findet die Kontrolle statt, welche Proteine in das Zilium transportiert werden.

Danach folgt das Axonem der Zilien, anhand dessen Zilien im Wesentlichen in zwei Gruppen eingeteilt werden, „klassische“ 9+2 Zilien und „primäre“ 9+0 Zilien. Die Bezeichnung 9+2 und 9+0 bezieht sich auf den Aufbau des Axonems. In der Maus sind bisher zwei Konfigurationen bekannt. Das Axonem besteht aus neun äußeren Mikrotubuli-Dublets, die zirkulär angeordnet sind. In der Mitte sind entweder zwei („9+2“), oder keine Monotubuli („9+0“) angelegt.

Die neun äußeren Mikrotubuli-Dublets aller Zilien bestehen jeweils aus einem vollständigen A-Tubulus und einem unvollständigen B-Tubulus, die aus dem Basalkörper hervorgehen. Die Dubletts sind mit Nexin-Brücken verbunden. Dazu kommen bei motilen Zilien noch die inneren und äußeren Dynein-Arme, die Motoren für die Bewegung (Dawe et al., 2007). Die Dyneine, die an den Dynein-Armen der Zilien beteiligt sind, werden als axonemale Dyneine bezeichnet. Bei klassischen Zilien sind die inneren Mikrotubuli-Singlets durch so genannte Speichen mit den äußeren Dublets verbunden. Lange war die Meinung verbreitet, dass primäre Zilien grundsätzlich keine Dyneinarme besitzen und daher ohne zentrales Paar und Speichen auch nicht motil sein können. Es wurde aber gezeigt, dass im Primitivknoten primäre, motile 9+0 Zilien existieren. Im Knoten gibt es zwar auch 9+2 Zilien, aber auch bei 9+0 Zilien werden Dyneinarme beobachtet. Weiterhin unterscheidet sich die Bewegung von Knoten-spezifischen Zilien von der Bewegung klassischer Zilien. Klassische 9+2 Zilien bewegen sich in einer Ebene in einem Kraftschlag nach vorne und mit einem langsamen Erholungsschlag wieder zurück, vergleichbar mit der Bewegung einer Peitsche (Nonaka et al., 1998). Knoten-spezifische Zilien zeigen im Gegensatz dazu eher eine rotierend Bewegung mit einem linksgerichteten Kraftschlag und dem langsameren rechtsgerichteten Erholungsschlag (Buceta et al., 2005), so dass sie als eigenständige Gruppe von Zilien betrachtet werden können. Die Knoten-spezifischen Zilien ähneln bei genauerem Hinsehen eher den klassischen Zilien, als den typischen primären Zilien, aber vereinen doch Merkmale von beiden in sich.

Primäre Zilien sind auf fast allen Zelltypen zu finden. Während der G1 Phase der Zellen dienen primären Zilien die Zentrosome als Basalkörper. Primäre Zilien werden während der Zellteilung wieder resorbiert. Zellen, die viele klassische Zilien tragen, enthalten viele Basalkörper und sind nicht in der Lage wieder in den Zellzyklus einzutreten, um Fehler in der Ausbildung der Spindeln zu vermeiden (Bettencourt-Dias and Glover, 2007).

Da bisher noch nicht alle Bausteine, die zur Bildung und Funktion von Zilien beitragen, gefunden wurden, ist dies Inhalt vieler Untersuchungen. Einige Gruppen versuchen durch den Genom-Vergleich von Zilien-tragenden Spezies mit nicht Zilien-tragenden Spezies neue Faktoren zu entdecken (Inglis et al., 2006). Andere analysieren eine Vielzahl von Genen mit Hilfe ihrer Expressionsprofile. Gene mit verstärkter Expression in Zilien-tragenden Geweben könnten auch direkt an Aufbau und Funktion der Zilien beteiligt sein (McClintock et al., 2008). Die resultierenden Datenbanken tragen zur weiteren Auflösung der strukturellen und funktionellen Details von Zilien bei.

3.4 Ziliogenese und IFT

Der Aufbau von Zilien, die Ziliogenese, kann in unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden. Am Beginn steht der Transport des Zentriols an die apikale Zelloberfläche und die Reifung zum Basalkörper. An der Oberfläche wird er durch Ausbildung der Verbindungsfasern an der Membran befestigt (Dawe et al., 2007). Die Mikrotubuli-Dublets des Zilien-Axonems schließen an die Triplets des Basalkörpers, genau genommen des Mutterzentriols, an. Dadurch gibt der Basalkörper Anzahl und Position der Dublets vor. Das Zilienaxonem wird auf den Basalkörper aufgebaut und an seinem distalen Ende verlängert. Das Minus-Ende der Mikrotubuli ist am Basalkörper befestigt und das Plus-Ende bildet die Zilienspitze (Marshall, 2008). Die Verlängerung des Axonems wird durch den aktiven Transport von Bausteinen an die Spitze reguliert. Dieser Transport wird als intraflagellarer Transport bezeichnet.

Der intraflagellare Transport (IFT) bezeichnet den Transport von Kargo entlang der äußeren Mikrotubuli in das Zilium hinein und aus dem Zilium heraus. Der IFT wird in zwei Abschnitte unterteilt. Zum einen in den anterograden IFT vom Basalkörper zur Zilienspitze, und dem retrograden IFT von der Zilienspitze zum Basalkörper. Die Begriffe anterograder, also von minus zu plus am Mikrotubulus entlang, und retrograder Transport, also von plus zu minus, werden auch für den Transport entlang von Mikrotubuli innerhalb der Zelle verwendet.

Anterograder und retrograder IFT unterscheiden sich durch die Komplexe von Motorproteinen und weiterer assoziierter Proteine von einander.

Der Motor für den anterograden Transport bildet sich aus einem heterotrimeren Komplex von Proteinen der Kinesin-2 Familie. Der Komplex besteht aus zwei Motoruntereinheiten und einer Nicht-Motoreinheit. Die beiden Motoruntereinheiten sind bekannt als KIF3A und KIF3B. Das dritte Protein wird als Kinesin assoziiertes Protein (KAP) bezeichnet. Diese drei Proteine stellen das Zentrum des anterograden IFT Motors dar. Der Verlust von KIF3A oder KIF3B führt zum Verlust der Zilien.

Der Motor für den retrograden IFT wird zytoplasmatisches Dynein 2 genannt. Dieser Komplex besteht aus wenigstens vier unterschiedlichen Einheiten. Eine davon ist DYNC2H1. Der Verlust von DYNC2H1 führt zu gestauchten Zilien, an denen auch blasenförmige Ansammlungen von IFT Partikeln zu finden sind (Huangfu and Anderson, 2005).

An die jeweiligen Motorkomplexe assoziieren weitere Proteine, die zur Regulation des IFT notwendig sind. Die beiden Motoren assoziieren jeweils mit einem spezifischen Komplex, Komplex A oder Komplex B. Komplex A assoziiert mit dem retrograden Dyneinmotor. Er ist an der Auswahl von Kargo aus dem Zilium hinaus beteiligt. Bislang wurden mindestens sechs Untereinheiten von Komplex A identifiziert. Der Komplex B scheint vielfältiger aufgebaut zu sein und assoziiert mit dem anterograden Kinesin-Motor. Komplex B reguliert damit auch den Transport von Kargo in das Zilium hinein. Der IFT entlang dem Axonem ist ein stetiger Prozess. Das Laden und Entladen der Partikel findet nur an der Basis oder der Spitze statt (Pedersen and Rosenbaum, 2008).

3.5 Die Festlegung der Links-Rechts-Achse

Die Festlegung der Links-Rechts Asymmetrie ist ein strikt regulierter Prozess. Die Links-Rechts-Achse wird als letzte nach antero-posteriorer und dorso-ventraler Achse festgelegt. Die Links-Rechts-Achse wird orthogonal zu diesen beiden angelegt. Allerdings muss die Orientierung noch festgelegt werden. Man kann die Festlegung der Links-Rechts-Achse in drei Phasen unterteilen. Zu Beginn liegt die Information über die Orientierung der Links-Rechts-Achse im Primitivknoten vor. In der zweiten Phase wird die Information an das Seitenplattenmesoderm weitergegeben. Dies kann mit Hilfe von Expressionstudien zu links spezifisch exprimierten Genen gezeigt werden. Letztendlich folgt darauf die asymmetrische Morphogenese der visceralen Organe (Shiratori and Hamada, 2006). Wie genau die

Links-Rechts-Achse festgelegt wird, ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Basierend auf einer Vielzahl experimenteller Daten wurden Modelle entwickelt, wie die Weitergabe und Verarbeitung des Signals stattfinden könnte.

Wie bereits erwähnt ist der Knoten das Organisationszentrum, das die Festlegung der Links-Rechts-Achse induziert. Die Grubenzellen im Knoten tragen ein motiles Monozilium. Dieses Zilium ist nach posterior geneigt und schlägt im Uhrzeigersinn. Durch das synchrone Schlagen der Zilien entsteht ein konstanter Fluss von extraembryonaler Flüssigkeit. Dieser „*nodal flow*“ ist zur linken Seite gerichtet. Der *nodal flow* ist ausreichend stark um sogar Vesikel zu transportieren.

Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass Mutationen in Komponenten der Kinesin Motorkomplexe, die zum Aufbau von Zilien unentbehrlich sind, zu Defekten des Organ-*Situs* führen (Nonaka et al., 1998). Diese und weitere Daten führten zur Entwicklung des *nodal flow*-Modells. Das Modell postuliert, dass der *nodal flow* ein bislang unbekanntes Morphogen auf die linke Seite transportiert (Hirokawa et al., 2006). Durch die Akkumulation des Morphogens auf der linken Seite wird das asymmetrische Signal in das Seitenplattenmesoderm transferiert. Im Primitivknoten wurden sogenannte *nodal vesicular parcels* (NVPs) nachgewiesen. Dabei handelt es sich um vesikuläre Strukturen, die im Knoten freigesetzt werden und unter anderem SHH und Retinsäure transportieren (Tanaka et al., 2005). Möglicherweise stellen diese NVPs das unbekannte Morphogen dar. Das *nodal flow*-Modell wird auch dadurch unterstützt, dass Mutationen, wie *iv* (*inversus viscerum*), die die Motilität der Zilien behindern, zu Defekten in der Links-Rechts-Achse führen. *Iv* ist eine Mutation in *Dnahc11*, einem axonemalen Dynein. *Dnahc11* hatte auch den Namen *left-right* Dynein, passend zu den Defekten im Organ-*Situs* durch immotile Zilien im Knoten (Brueckner et al., 1989). Eine Unterstützung für das *nodal flow*-Modell besteht darin, dass eine künstliche Umkehrung des Stroms von außen zur Inversion der Lateralität ausreicht (Nonaka et al., 2002).

Im Gegensatz zum *nodal flow*-Modell stehen Mausmutanten, bei denen es zu keiner Randomisierung des *Situs* kommt, sondern zu einer 100%igen Umkehrung. Die *inversion of embryonic turning* (*inv*) Mutation führt immer zum *Situs inversus*, ebenso wie der Verlust von *Nphp3*. In diesen Mausmutanten besteht noch immer ein schwacher, turbulenter links-gerichteter *nodal flow* und nicht, wie das *nodal flow*-Modell verlangen würde, ein rechts-gerichteter *nodal flow* (Okada et al., 1999).

Darüber hinaus gibt es Unterschiede zwischen Mutationen ohne Zilien oder nur immotilen Zilien. Im Fall von beispielsweise *iv* sind die Zilien nur paralytisch und es kommt zu vielen unterschiedlichen Konfigurationen der inneren Organe. Asymmetrische Markergene werden zufällig links- oder rechtsseitig, bilateral oder gar nicht exprimiert. Im Falle des Verlustes von *Kif3a* oder *Kif3b*, und der daraus folgenden Abwesenheit der Zilien, kommt es zu einer geringeren Varianz (Nonaka et al., 1998; Takeda et al., 1999). Die Marker werden entweder bilateral oder gar nicht exprimiert. Das *nodal flow*-Modell würde allerdings den gleichen Effekt vorhersagen, da in beiden Fällen kein Fluss erzeugt wird.

Aufgrund dieser Unklarheiten wurde das *two cilia*-Modell entwickelt. Es könnte erklären, warum nicht nur die Motilität der Zilien zur Festlegung der Links-Rechts-Achse benötigt wird, sondern auch ihre Anwesenheit.

Lange wurde im Knoten nur eine Art von Zilien beobachtet. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei allen Zilien im Knoten um motile 9+0 Zilien handelt. Aber manche Zilien im Primitivknoten enthalten *Dnahc11* und sind motil. Andere enthalten kein *Dnahc11* und bleiben immotil. Zusätzlich wurden 9+2 Zilien im Knoten entdeckt (Caspary et al., 2007). Dies unterstützt das *two cilia*-Modell, das davon ausgeht, dass es motile Zilien gibt, die den Strom erzeugen und immotile, mechanosensorische Zilien, durch die er wahrgenommen wird. Dieses Modell verlangt kein Morphogen. Das *two cilia*-Modell geht davon aus, dass die Zilien für beides benötigt werden. Motile Zilien zur Erzeugung des Flusses und mechanosensorische Zilien, die den Fluss wahrnehmen. Dadurch gibt es einen Unterschied zwischen den Phänotypen von *Dnahc11* und *Kif3a/b*. Bei den *Dnahc11*-Mutanten sind die Zilien nicht mehr motil, aber noch vorhanden. Dadurch entsteht kein konstanter links-gerichteter *nodal flow*, aber die sensorische Funktion der Zilien bleibt erhalten. Bei den Kinesin-Mutanten kommt es zum Verlust der Zilien. Daher werden beide Funktionen verhindert, Erzeugung und Wahrnehmung des *nodal flow*. Dies wird dadurch unterstützt, dass eine Mutation in *Pkd2* zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie der Verlust der Zilien. *Pkd2* (*polycystic kidney disease 2*) kodiert für PC2, einen Kalzium-Kanal. PC2 lokalisiert in Zilien und kann einen mechanischen Reiz in einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration übersetzen. Dies kann über *gap-junctions* an benachbarte Zellen weitergegeben werden. Der Verlust von *Pkd2* führt also zum Verlust der Fähigkeit den mechanischen Reiz

wahrzunehmen und hat daher denselben Effekt wie der Verlust der Zilien insgesamt. (Hirokawa et al., 2006)

Die Tatsache, dass die asymmetrische Genexpression in Fröschen und Hühnchen schon vor der Etablierung der Zilien im Knoten, oder seinen äquivalenten Strukturen, nach zu weisen ist (Levin and Palmer, 2007), rückt einen intrazellulären Mechanismus über *gap junctions* weiter in den Vordergrund. Auch für den Menschen ist bekannt, dass eine Mutation in *Connexin43*, einem Bestandteil von *gap junctions*, Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie nach sich zieht (Britz-Cunningham et al., 1995). Zur vollständigen Aufklärung des Mechanismus der Festlegung der Links-Rechts-Achse sind aber noch weitere experimentelle Daten notwendig.

3.6 *Bedeutung der Zilien in der Entwicklung und bei Krankheiten*

Der Basalkörper stellt praktisch ein modifiziertes Zentrosom dar und bildet die Basis aller Zilien. Die Funktion von Zentriolen im Zusammenhang mit ihrer Funktion als Zentrosome in der Mitose wurde lange und intensiv diskutiert. Dabei wurde in jüngerer Vergangenheit gezeigt, dass der Zellzyklus auch ohne Zentrosome durchlaufen werden kann (de Saint and Sullivan, 1998). In höheren Pflanzen, die keine Zilien kennen, gibt es auch keine Zentrosome. Der Zellzyklus funktioniert trotzdem (Marshall, 2008). Allerdings haben die Zentrosome in manchen Geweben nicht nur die Aufgabe, als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, die Spindel mit zu bilden. Wichtiger in diesem Zusammenhang ist, dass sie festlegen, wo die Spindeln lokalisieren. Denn die Ebene der Zellteilung ist für einige Prozesse von großer Bedeutung, beispielsweise bei der Tubulogenese in der Niere. Die Mutation von NPHP-Genen führt durch die Ausbildung von Zysten in den Nieren zu einer Nierenerkrankung. Als Ursache dafür wurde eine Beeinträchtigung der sensorischen Zilien in der Niere durch die Mutation angenommen. Das *Polycystic Kidney Disease* (PKD), das durch Mutationen in den NPHP-Genen (z.B. *Nphp3*) entsteht (Keller et al., 2005), könnte aber auch unabhängig sein von Defekten in den sensorischen Zilien. Stattdessen könnte eine Störung der Zentrosome die Festlegung der Achse der Zellteilung beeinträchtigen. Dadurch kommt es zur falschen Morphogenese der Nierenkanäle und damit zu Zysten (Fischer and Pontoglio, 2006). Es handelt sich möglicherweise also eher um eine zentrosomal bedingte Krankheit, als eine Zilien-assoziierte. Dies verdeutlicht den engen Zusammenhang von intrazellulären Vorgängen, wie der Zellteilung mit der Bildung und Funktion von Zilien.

Primären Zilien wurden sehr lange keine Funktionen zugeschrieben. Erst in den 1970ern zeigt unter anderem Björn Afzelius, dass es Zusammenhänge gibt, zwischen Defekten in den Zilien und pathologischen Phänotypen (Afzelius, 1976; Afzelius, 1982). Beim Verlust der Aktivität der Zilien kann es zu einer Vielzahl von Krankheiten kommen. Darunter sind Links-Rechts-Defekte, Polydactyly, Degeneration der Retina und einige andere. Je nachdem, welches Gen durch eine Mutation betroffen ist, können sich Krankheiten auf einzelne Organe beschränken und mit dem Leben vereinbar sein, oder zu schwerwiegenden Entwicklungs- oder Funktionsstörungen führen, die mit dem Leben nicht vereinbar sind. Diese große Spannbreite an Krankheitsbildern ist aber nicht nur auf die Expression unterschiedlicher Faktoren in verschiedenen Geweben zurück zu führen, sie ist auch ein Spiegel für die vielfältigen Funktionen, die Zilien ausüben können. Im Lungenepithel können beispielsweise Zellen gefunden werden, die Dutzende motile Zilien tragen, mit dem Zweck, den Mukus aus den Bronchien abzutransportieren. Ohne die Zilien in den Atemwegen können Krankheitserreger und Fremdkörper nicht mehr aus den Atemwegen entfernt werden, was zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt. Die Degeneration der Retina kann durch eine Schädigung des verbindenden Ziliums oder der IFT Partikel in Photorezeptorzellen verursacht werden. Durch eine Schädigung des verbindenden Ziliums wird der Transport zwischen dem äußeren, sensorischen Teil der Zellen und dem weiterleitenden, inneren Teil gestört. Dieser ist jedoch notwendig, um die ständige Erneuerung des Rhodopsin im äußeren Segment zu gewährleisten. Die Akkumulation von Proteinen auf einer Seite des Zilium oder der Verlust des Zilium führen daher zur Degeneration der Retina. (Fliegau et al., 2007; Bergmann et al., 2008)

Viele andere Erkrankungen werden durch Störung einer anderen Funktion der Zilien verursacht. Es ist die Wahrnehmung und Weiterverarbeitung äußerer Signale. Dazu gehören mechanische Signale, wie ein Strom externer Flüssigkeiten, so wie die Wahrnehmung von Signalmolekülen. (Eggenchwiler and Anderson, 2007; Gerdes et al., 2009)

Zilien haben eine wichtige Funktion für die Hedgehog-Signalübertragung (Ocbina and Anderson, 2008; Simons et al., 2005). Dies zeigt sich auch daran, dass beispielsweise Polydactyly als Konsequenz von Mutationen in Komponenten des Hedgehog-Signalweges auftritt. Einige Komponenten des Hedgehog-Signalweges sind in den Zilien lokalisiert. Eine Unterbrechung des IFT oder der Verlust der Zilien

führt dazu, dass Hedgehog-Signale nicht mehr verarbeitet werden und resultiert in Defekten der Musterbildung. Dies ist nicht nur bei Polydactyly zu beobachten, sondern auch im Neuralrohr. Wie bereits erwähnt induziert *Sonic Hedgehog* aus dem Notochord im Neuralrohr unterschiedliche neuronale Schicksale. Der Verlust der Zilien hat zur Folge, dass SHH die Bodenplatte des Neuralrohrs nicht mehr induzieren kann und auch sonst die Induktion der neuronalen Schicksale gestört ist, die sonst abhängig von einem SHH-Konzentrationsgradienten induziert werden würden. Es zeigte sich, dass mehrere Komponenten des Hedgehog-Signalweges in den Zilien lokalisieren. So kommt es durch den Verlust von IFT-Proteinen, oder Zilienkomponenten, auch zu Defekten in der Weiterleitung von SHH-Signalen. (Huangfu and Anderson, 2005; Caspary et al., 2007). Die Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 werden im Zilium abhängig von SHH prozessiert. Ohne SHH wird GLI3 als Repressor aus dem Zilium freigesetzt und inhibiert die Transkription der Zielgene. Mit SHH werden GLI2 und GLI3 in ihre aktivierende Form überführt und aktivieren die Transkription der Zielgene. Dazu wird aber der IFT benötigt, um die GLI-Proteine in und aus dem Zilium zu transportieren. Bei Defekten im IFT kommt es daher zu einem Ungleichgewicht von Gli-Aktivator und Repressor und zu veränderter Weiterleitung des SHH-Signals.

3.7 Der kanonische Wnt-Signalweg und der PCP-Signalweg

Die Wnt-Signalwege sind eng mit Zilien verbunden. Der kanonische Wnt-Signalweg ist an der Regulation von Genexpression im Primitivknoten beteiligt (Nakaya et al., 2005). Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg, oder *Planar Cell Polarity* (PCP)-Signalweg, ist an der Bildung von Zilien beteiligt. Komponenten des Wnt-Signalweges werden zum Andocken der Basalkörper an die Membran benötigt (Park et al., 2008). Gleichzeitig lokalisieren Komponenten des PCP-Signalweges am Basalkörper und üben von dort aus ihre Funktion aus, z.B. *Nphp3*, ein Zielgen von *Noto* (Beckers et al., 2007; Gerdes and Katsanis, 2008). Der PCP-Signalweg ist wichtig für die Ziliogenese und gleichzeitig sind Zilien notwendig für den PCP-Signalweg.

Die Expression von *Brachyury*, einem Gen, das in Primitivknoten und Notochord exprimiert ist, wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert (Yamaguchi et al., 1999).

Der kanonische Wnt-Signalweg ist abhängig von betaCATENIN. Ohne Wnt-Signale liegt DISHEVELLED (DVL) im Zytosol vor. betaCATENIN wird von einem

Degradationskomplex gebunden, phosphoryliert und durch das Proteasom degradiert. Durch Bindung eines kanonischen Wnt-Liganden an den Rezeptor FRIZZLED, bildet dieser ein Heterodimer mit dem LRP5 oder LRP6 Korezeptor. Dieser Komplex rekrutiert DVL und einen Teil des Degradationskomplexes. Dadurch wird der betaCATENIN-Degradationskomplex zerstört und nicht-phosphoryliertes betaCATENIN wandert zusammen mit DVL in den Kern. Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs werden dort durch die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF1 erkannt. Ohne Wnt-Signale werden TCF/LEF1 durch TLE/GROUCHO komplexiert und die Expression der Zielgene wird reprimiert. Durch den Transfer von betaCATENIN in den Zellkern wird dieser Komplex gelöst, betaCATENIN bindet TCF/LEF1 und aktiviert die Transkription der Zielgene (Gerdes and Katsanis, 2008).

Der PCP-Signalweg, ist an der Polarisierung von Epithelien beteiligt, und zwar orthogonal zu ihrer apikal-basalen Achse. Ein Beispiel dafür sind die parallel ausgerichteten Borsten auf den Flügeln von *Drosophila melanogaster*. Außerdem werden PCP Signale benötigt um Migrationsrichtungen, die Richtung für konvergente Ausdehnung oder Zellteilungsebenen vorzugeben. Ein weiteres Beispiel ist im Primitivknoten der Maus zu finden. Die Zilien sind alle nach posterior geneigt. Dies ist notwendig, damit die Rotation der Zilien einen links-gerichteten Strom erzeugen kann. (Lawrence et al., 2007; Jones and Chen, 2007; Jones et al., 2008)

Durch einen nicht-kanonischen Wnt-Liganden, der an FRIZZLED bindet, werden die Korezeptoren nicht gebunden, sondern nur DVL, das dann an der Zellmembran verankert wird. Nachfolgend werden mögliche Komponenten des PCP-Signalwegs wie die RhoA/ROCK, JNK, G Protein oder Ca^{2+} -Signalwege aktiviert (Veeman et al., 2003). Wie genau die Signalübertragung durch den PCP-Signalweg abläuft, ist aber noch nicht voll verstanden. Bekannt ist aber, dass primäre Zilien eine wichtige Funktion bei der Übertragung von Wnt-Signalen haben. Die Anwesenheit eines primären Ziliums stärkt den PCP-Signalweg und inhibiert den kanonischen Signalweg. Dies ist notwendig, da die Liganden zwar tendenziell einen Weg aktivieren, aber so die Stringenz verbessert wird (Mikels and Nusse, 2006). Die meisten Daten hat bisher die Analyse von *Inversin/Nphp2* geliefert, das für ein Protein kodiert, das am Basalkörper der Zilien lokalisiert und an der Modulation des Niveaus von DVL in den Zellkompartimenten beteiligt ist (Otto et al., 2003; Simons et al., 2005). Dadurch sind *Inversin* und auch andere Faktoren an der Regulation des Gleichgewichts von kanonischem zum nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt. Die Unterdrückung

von *Inversin* führt in *Xenopus* zur Beeinträchtigung von konvergenter Ausdehnung, was auf eine Störung der PCP-Signalübertragung hindeutet. Der Verlust von *Inversin* führt zu extensiver kanonischer Wnt-Signalübertragung (Habas and Dawid, 2005; Wallingford and Habas, 2005). INVERSIN wird als Schalter zwischen kanonischem und nicht-kanonischem Wnt-Signalweg betrachtet.

Inversin wurde identifiziert, da eine Mutation in *Inversin* NPHP, eine autosomal rezessive Nierenerkrankung, verursacht. Bisher gelang die Identifikation von insgesamt neun NPHP-Genen (*Nphp1* – *Nphp9*) (Hildebrandt and Zhou, 2007), die zu einem vergleichbaren Phänotyp führen. Dies legt nahe, dass auch sie eine Funktion im Zusammenhang mit dem Wnt Signalweg haben. Möglicherweise sind die NPHP-Gene keine zentralen Komponenten des PCP Signalweges, sondern an der Übersetzung der Signale in asymmetrische Eigenschaften beteiligt (Gerdes and Katsanis, 2008).

Während sich scheinbar Faktoren aus den Zilien/Basalkörpern an der Übersetzung der PCP-Signale beteiligen, sind die Zilien selbst auch Ziele der PCP-Signale. Das Andocken der Basalkörper und die Ausrichtung in eine bestimmte Richtung werden unter anderem durch DVL gesteuert (Park et al., 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Erzeugung eines externen Stromes zu einer positiven Rückkopplung führt. Die einmal geschaffene Polarisierung erhält sich beispielsweise im Respirationstrakt dadurch selbst (Mitchell et al., 2007).

3.8 Das Homeoboxgen *Noto*

Noto wurde identifiziert als das Gen, welches von der *truncate* Mutation betroffen ist. Bei *truncate* handelt es sich um eine spontane Mutation, die äußerlich an Verkürzungen und Knicken im Schwanz der Maus zu erkennen ist. Dies beruht auf Lücken in der Schwanzwirbelsäule, die auf Lücken im Notochord während der Entwicklung zurück zu führen sind. Die molekulargenetische Analyse der *truncate* Mutation führte zur Identifizierung von *Noto*, einem Gen, das für einen Homeobox-Transkriptionsfaktor kodiert. Bei *truncate* ist es zu einem Basenaustausch gekommen, der zu einem Aminosäure-Austausch in einer Helix der DNA-bindenden Domäne von NOTO führt. *Truncate* ist kein Null-Allel von *Noto*. Die Punktmutation verringert die Stabilität des Proteins, so dass sich die Aktivität von *Noto* verringert. Die Untersuchung der Expression von *Noto* ergab, dass *Noto* während der Embryonalentwicklung sehr spezifisch im embryonalen Primitivknoten und im neugebildeten Notochord exprimiert wird (Abbildung 2) (Abdelkhalek et al., 2004).

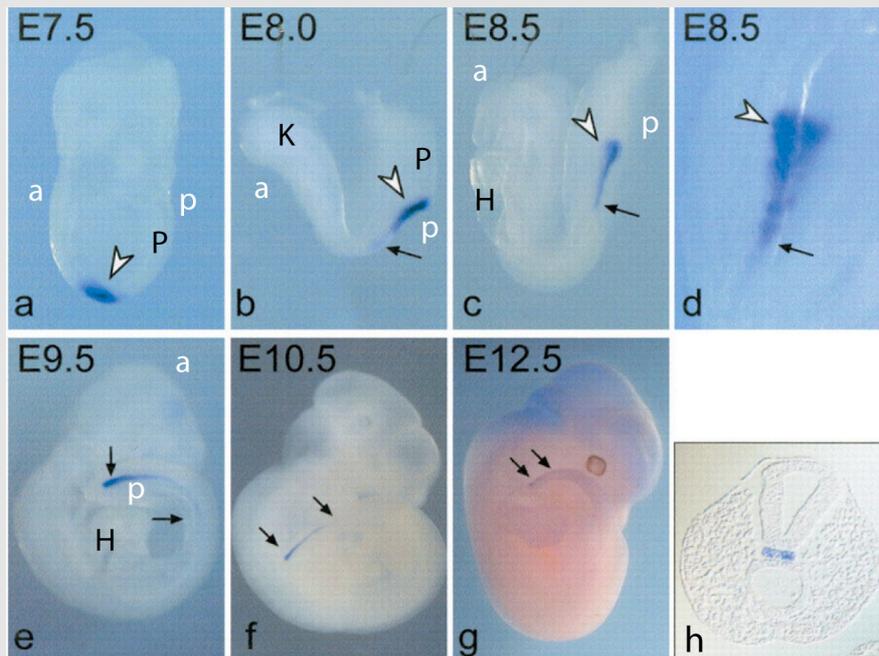


Abbildung 2: *Noto* ist im Primitivknoten und posterioren Notochord exprimiert

RNA *in situ*-Hybridisierung (WISH) mit einer *Noto*-Probe in verschiedenen Embryonalstadien von E7,5 (a) bis E12,5 (g), die Expression von *Noto* wurde zuerst im Knoten detektiert (a-d, Pfeilspitzen), darüber hinaus ist die Expression auf das posteriore Notochord beschränkt (b-g, Pfeile), (h) zeigt in einem transversalen Schnitt die *Noto*-Expression im Notochord eines E10 Embryos. Zur Orientierung sind anterior und posterior markiert (weiß a/p), der Primitivstreifen (P), die Kopffalten (K) und das Herz (H) (Fotos übernommen von Hanaa ben Abdelkhalek).

Darüber hinaus sind keine Expressionsdomänen bekannt. Zur weiteren Analyse wurde *Noto* gezielt ausgeschaltet. Dadurch tritt ein weiteres Merkmal zu Tage. Ein großer Teil der Homozygot mutanten Nachkommen (*Noto*^{GFP/GFP}) stirbt perinatal. Dies beruht auf Defekten in der Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie. Durch den Verlust von *Noto* kommt es zur zufälligen Festlegung von Links und Rechts. Es treten viele unterschiedliche Konformationen der visceralen Organe auf, die zum großen Teil nicht mit dem Leben vereinbar sind. Nur wenige Mäuse, die zufällig einen *Situs solitus* oder *Situs inversus totalis* entwickeln, können überleben. Eine genaue Untersuchung des Primitivknotens ergab eine wichtige Funktion von *Noto* in der Morphogenese der Primitivknotens und in der Ziliogenese im Knoten. Die Knotenmorphologie in *Noto*-defizienten Embryonen ist wesentlich gestört. Anstatt in einer Grube angeordnet, sind die „Grubenzellen“ mit umliegenden Kronenzellen in Gruppen durchmischt (Abbildung 3f,j). Die vollständige Ausbildung des Knotens findet nicht statt.

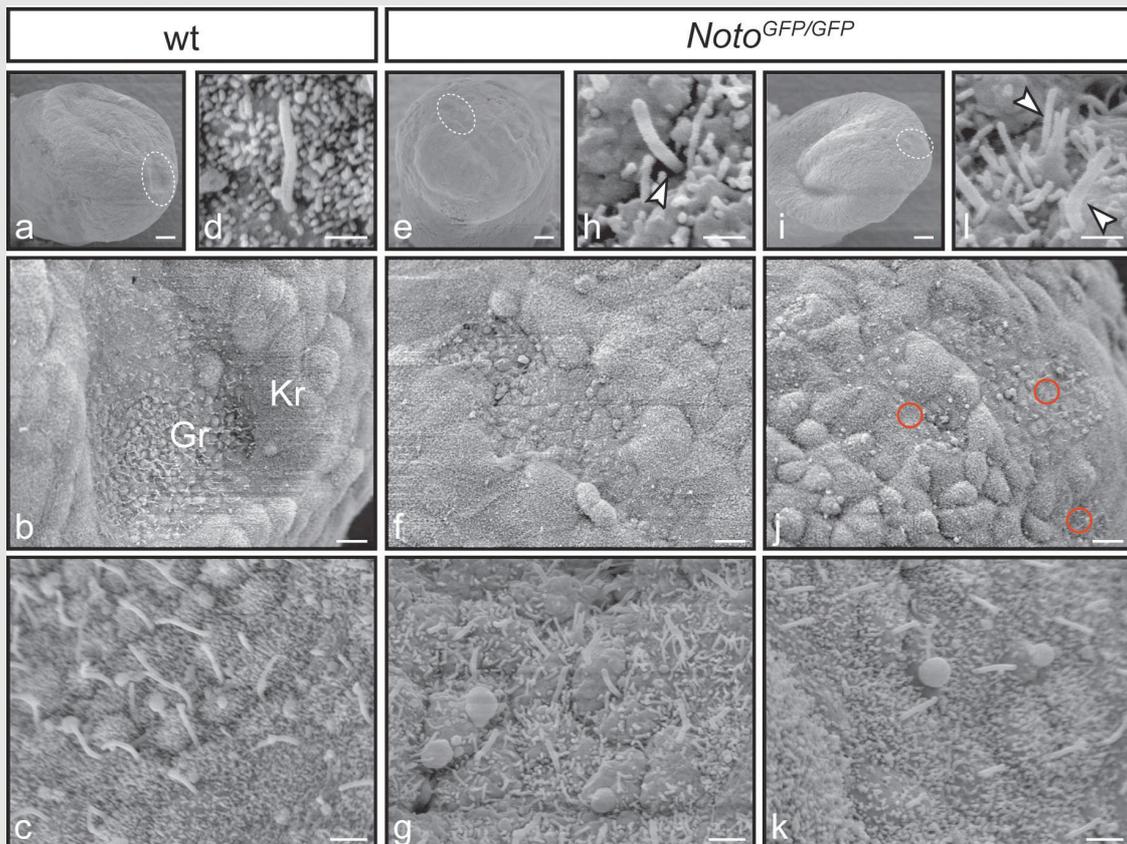


Abbildung 3: Die Morphologie des Primitivknotens ist in *Noto*^{GFP/GFP}-Mutanten verändert

Raster-Elektronenmikroskopie von E8 Embryonen, distale Ansicht von Wildtyp (WT) (a-d) und *Noto*^{GFP/GFP}-Mutanten (e-k), die gepunkteten Kreise markiert den Knoten (a,e,i), die Pfeilspitzen markieren deformierte Zilien in den Mutanten (h,l), die roten Kreise markieren Felder von Zilien-tragenden Zellen in *Noto*-Mutanten (j). (Die Bilder wurden zur Verfügung gestellt von Anja Beckers).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass auch die Zilien der Grubenzellen nicht normal gebildet werden. Sie sind verkürzt (Abbildung 3 g,h) und nicht mehr beweglich. Durch Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde außerdem gezeigt, dass die Struktur der Zilien verändert ist. Die Basalkörper sind teilweise in das Zytosol eingesunken (Abbildung 4f). Für normale Zilien im Knoten wird eine 9+0 (Abbildung 4e), oder auch eine 9+2, Organisation der Mikrotubuli erwartet. Also in jedem Fall neun Dublets in einem äußeren Ring und kein oder zwei Singlets in der Mitte. Bei den *Noto*-Mutanten traten jedoch viele unterschiedliche Konfigurationen auf, wie z.B. 6+2 (Abbildung 4h,j,k). Daher kann festgestellt werden, dass *Noto* sowohl für die Primitivknoten-Morphogenese, als auch die Ziliogenese im Knoten essentiell ist (Beckers et al., 2007).

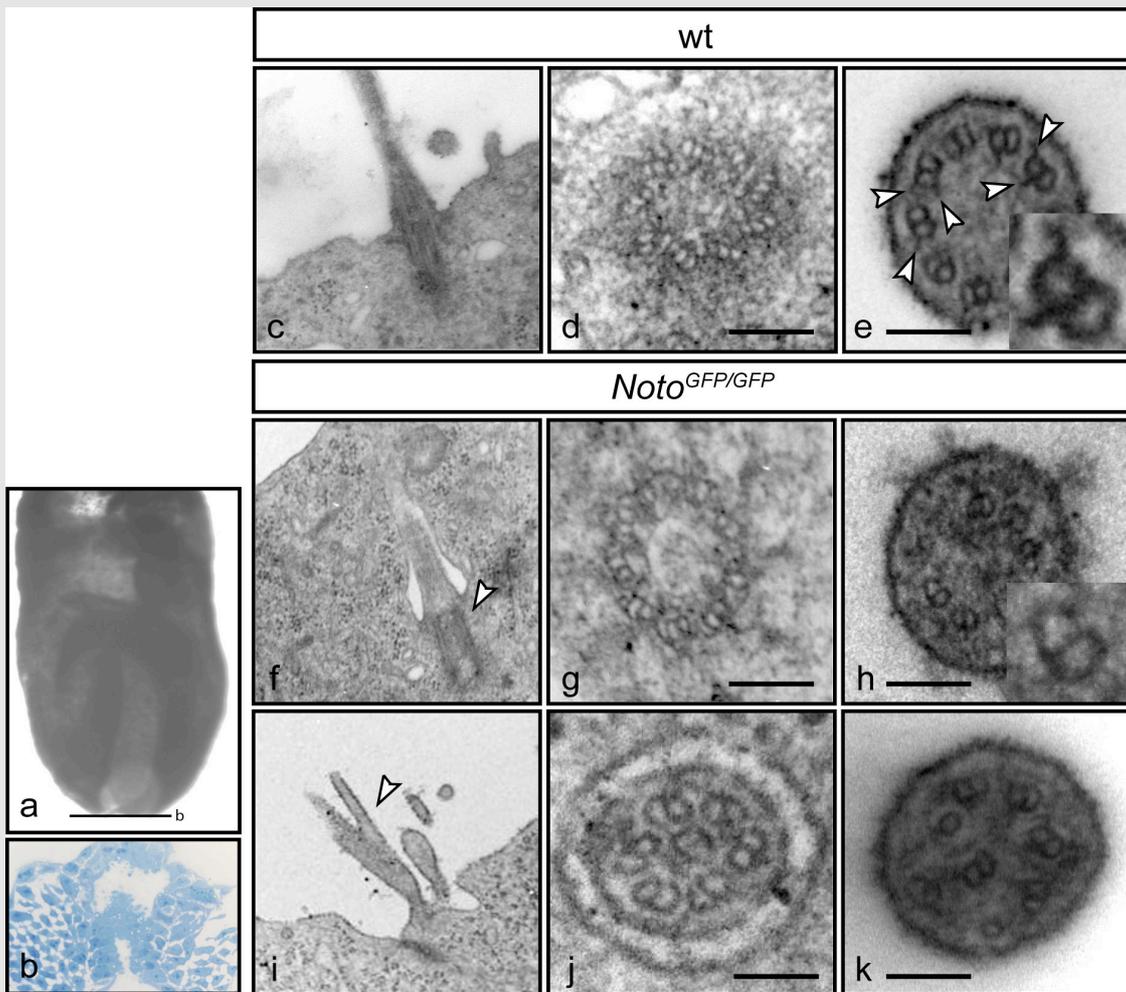


Abbildung 4: Die Zilien in *Noto*^{GFP/GFP}-Mutanten sind verändert

Transmissionselektronenmikroskopie von E8 Wildtyp (c-e) und *Noto*^{GFP/GFP}-Mutanten (f-k), (a,b) zeigen die Schnittenebene, (c,f) zeigen sagittale Schnitte durch Zilien, (d,g) zeigen Schnitte durch Basalkörper, (e,h,j,k) zeigen transversale Schnitte durch Zilien. Die Pfeile in (e) markieren Dyneinarme im Wildtyp, die in der Mutante abwesend sind. Der Pfeil in (f) markiert ein versunkenes Zilium, in (i) wird ein verzweigter, abnormaler Microvillus gezeigt. (Die Bilder wurden zur Verfügung gestellt von Anja Beckers)

3.9 Der Transkriptionsfaktor Foxj1

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wird, ist *Foxj1* einer der Effektoren von *Noto*. *Foxj1* kodiert für einen *winged helix/forkhead* Transkriptionsfaktor. *Foxj1* wird in allen bislang untersuchten Geweben mit Zilien-tragenden Zellen exprimiert, beispielsweise in Zellen des proximalen Lungeneithels, dem Oviduct, den Hoden, dem Plexus choroideus und dem Primitivknoten. Der Verlust von *Foxj1* führt zur Randomisierung der Links-Rechts-Achse und dem Verlust der Zilien in den Atemwegen. Des Weiteren entwickeln *Foxj1*-defiziente Mäuse einen Hydrozephalus (Wasserkopf). Durch die Summe der Defekte stirbt ein großer Teil der Tiere perinatal, alle anderen überleben

maximal bis P40 (Tag 40 nach der Geburt). Gleichzeitig erschienen allerdings die Zilien im Knoten und der Primitivknoten selbst völlig normal zu sein, obwohl Links-Rechts-Defekte einen großen Teil der perinatalen Sterblichkeit der *Foxj1*-defizienten Tiere verursachen. Die sensorischen Zilien in der Niere und im olfaktorischen Epithel in *Foxj1*-Mutanten bleiben erhalten. Dies impliziert, dass *Foxj1* nur zur Ausbildung von klassischen, motilen 9+2 Zilien benötigt wird. (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998; Zhang et al., 2004)

Es gibt Homologe zu *Foxj1* auch in anderen Spezies, wie *Xenopus* und Zebrafisch. Diese besitzen äquivalente Strukturen zum Primitivknoten, in denen ein linksgerichteter Strom erzeugt wird, die *gastrocoel roof plate* (GRP) in *Xenopus* und das *Kupffer's vesicle* (KV) in Zebrafisch (Schweickert et al., 2007; Essner et al., 2005). In jüngerer Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Überexpression von *Foxj1* in *Xenopus* und Zebrafisch ausreichend ist, um die Ausbildung ektopischer Zilien zu induzieren. Diese Zilien ähneln den Zilien im Knoten. In Zebrafisch und *Xenopus* ist *Foxj1* darüber hinaus auch notwendig zur Ausbildung von Zilien in GRP und *Kupffer's vesicle* (Stubbs et al., 2008).

Die Zilien-tragenden Zellen im Lungenepithel haben normalerweise 200-300 Zilien. *Foxj1*-Mutanten bilden zwar ausreichend Basalkörperchen, aber diese werden nicht im apikalen Zytoskelett verankert (Gomperts et al., 2004). Dies ist aber die Voraussetzung zur Ausbildung und Erhaltung von Zilien. *Foxj1* wird zur apikalen Lokalisierung von EZRIN, einem Protein der ERM Familie, benötigt (Huang et al., 2003). Die ERM Proteine dienen als Anker von Aktin-Filamenten an die kortikale Membran und organisieren ebenfalls die apikale Lokalisierung anderer Proteine und Proteinkomplexe. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *left-right* Dynein in *Foxj1*-defizienten Lungen herunter reguliert wird (Chen et al., 1998). *Foxj1* reguliert also sowohl die Verankerung der Basalkörper an der apikalen Membran, als auch die Expression von Komponenten des motilen Zilien-Axonems.

4 Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit können in zwei Abschnitte unterteilt werden. Bei *Noto* handelt es sich um einen zentralen Faktor in der Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie und der Aufrechterhaltung des Notochord. Wie bereits gezeigt wurde, ist *Noto* an der Morphogenese des Primitivknotens und an der Ziliogenese im Knoten beteiligt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von *Noto* zu untersuchen. Dabei sollte die Promoterregion von *Noto* analysiert werden, um regulatorische Elemente zu lokalisieren. Weiterhin sollten Faktoren identifiziert und untersucht werden, die an der Regulation von *Noto* beteiligt sind.

Das zweite Ziel war die Untersuchung von Faktoren und Mechanismen, die *Noto* nachgeschaltet sind. Dies umfasste die Identifizierung potentieller Zielgene von *Noto*. Als ein Faktor, der *Noto* nachgeschaltet ist, wurde *Foxj1* identifiziert und in Bezug auf seine Funktion im Primitivknoten hin untersucht. Um die spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* weiter differenzieren zu können, sollte eine transgene Mauslinie etabliert und untersucht werden, in der *Foxj1* bei gleichzeitiger Ausschaltung von *Noto* im Kontext des *Noto*-Lokus exprimiert wird.

5 Material und Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung, Reinigung und Isolierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Dazu wurde Agarose durch aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Die Konzentration betrug dabei zwischen 0,7 und 2% mit etwa 0,5mg/l Ethidiumbromid. Der TAE-Puffer diente auch als Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 5V/cm durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Ladepuffer versetzt, damit sie besser in die Taschen des Gels absinken. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein Größenmarker mit Fragmenten von bekannter Länge aufgetragen. Durch den Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid werden die Fragmente unter UV-Licht sichtbar und können so dokumentiert werden.

Verwendete Lösungen	
TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
5x Ladepuffer	50% Glycerin 0,25% (w/v) Orange G in TAE

5.1.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung kompetenter E. coli vom Stamm TOP10 wurden die Bakterien auf einer LB-Platte mit Streptomycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie in 20ml LB-Medium mit Streptomycin überimpft und erneut über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500ml LB-Medium mit 10ml dieser Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD600 von 0,7-0,9 heranwachsen gelassen. Die Bakterien wurden danach für 15min auf Eis gekühlt, mehrfach geschwenkt und 15min bei 4.500 Upm und 2°C in der Zentrifuge (Beckmann J-6B, Rotor TYJ-3) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20ml eiskaltem Zellkulturwasser resuspendiert und auf zwei Zentrifugengefäße aufgeteilt. Nach Zugabe von je 200ml eiskaltem Zellkulturwasser wurden die Bakterien erneut sedimentiert. Der Überstand wurde abgossen, die Pellets in 10ml eiskaltem Zellkulturwasser resuspendiert, mit weiteren 200ml aufgefüllt und zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in je 20ml eiskaltem 10% Glycerin

in Zellkulturwasser resuspendiert, die Bakteriensuspension in zwei 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut wie oben sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in je 1ml 10% eiskaltem Glycerin resuspendiert und in 50µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.1.3 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Für die Transformation wurden auf Eis zu 50µl kompetenten, salzfreien Bakterien 1µl (20-50ng) Plasmid-DNA gegeben und eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine eisgekühlte 2mm-Küvette (GenePulser, BioRad) überführt und in einem BioRad Micro Pulser elektroporiert. Direkt danach wurden 500µl LB-Medium ohne Antibiotikum zu den Bakterien in die Küvette gegeben, alles in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Abhängig vom transformierten Plasmid, bzw. des Ligationsansatzes, wurden 10-100% der transformierten Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.1.4 Plasmidisolierung aus Bakterien

5.1.4.1 Analytische Plasmidisolierung (Minipräparation)

Die Minipräparation dient vor allem dazu Plasmid-DNA schnell und einfach zu isolieren, allerdings enthält sie immer noch Verunreinigungen. Die Bakterien werden dazu nacheinander in drei Puffern inkubiert. Der erste Puffer enthält RNase, um bakterielle RNA abzubauen. Mit Hilfe des zweiten Puffers wird die alkalische Lyse der Bakterien erreicht und anschließend werden chromosomale DNA, Proteine und andere Zelltrümmer abgetrennt.

Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 2ml einer Bakterienübernachtskultur in ein 2ml-Reaktionsgefäß überführt und 10min bei 2500 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl Puffer P1 resuspendiert. Dazu wurden 200µl Puffer P2 und geschwenkt. Nach 3min bei RT wurden 200µl Puffer P3 zugegeben und geschwenkt. Danach wurde 10min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 750µl Isopropanol versetzt. Nach 15-20 min bei RT wurde die gefällte DNA 15min bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert und mit 70% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 100µl Wasser aufgenommen.

Verwendete Lösungen	
Puffer P1	50mM TRIS pH8,0 10mM EDTA 100µg/ml RNase
Puffer P2	200mM NaOH 1% SDS
Puffer P3	3M KAc

5.1.4.2 Präparative Plasmidisolierung (Mini-Spinpräparation)

Im Gegensatz zur Minipräparation liefert die Spinpräparation reinere Plasmid-DNA. Die Spinpräparation wurde mit Hilfe des DNA-Aufreinigungs-Kits GeneElute HP Plasmid Minikit von Sigma durchgeführt. Die Durchführung entsprach dem mitgelieferten Protokoll.

5.1.4.3 Präparative Plasmidisolierung (Maxi)

Zur Elektroporation von embryonalen Stammzellen wird besonders reine DNA benötigt. Daher wurde die DNA dafür mit Hilfe des Endofree Plasmid Maxi Kits von Qiagen entsprechend dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

5.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch eine PCR ist es möglich sehr geringe Mengen eines DNA-Fragments (Template) *in vitro* selektiv zu vermehren. Dabei werden die zu vermehrenden Sequenzen mit Hilfe eines Sequenz-spezifischen Starteroligonukleotids enzymatisch amplifiziert.

5.1.5.1 Taq-Polymerase

Die PCR wurde häufig mit im Labor isolierter Taq-Polymerase und einem im Labor etabliertem Puffersystem durchgeführt. Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus *Thermus aquaticus*. Sie amplifiziert Stränge, die häufig einen A-Überhang tragen. Eine Variante dieser PCR ist die *colony*-PCR, die hier zur Untersuchung größerer Mengen von Bakterien-Klonen verwendet wurde. Dabei wird eine Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt und auf einer Masterplatte ausgestrichen, mit demselben Zahnstocher wird die PCR „angeimpft“.

Die 50µl Reaktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

Template-DNA (ggf. Verd.)	1µl
10x PCR buffer (KSG)	5µl
25mM MgCl ₂	3µl
Primer 1 (10 µM)	1µl
Primer 2 (10 µM)	1µl
dNTPs (each 10 mM)	1µl

Taq 1µl
H 2O bidest. Add to 50µl

Die Proben wurden mit Hilfe folgender Temperaturabfolge amplifiziert:

1x	2min	95°C
30x	30sec	95°C
	30sec	Annealing-Temp. (abhängig von Primern)
	59sec	72°C (1min je 1kb Template-Länge)
1 x	1min	72°C
1x	oo	8°C

Verwendete Lösungen	
10x PCR buffer (KSG)	500mM KCl 100mM TRIS pH8,8 0,1% Triton X-100

5.1.5.2 Expand High Fidelity Kit

Die PCR wurde mit Hilfe des Expand™ High Fidelity PCR Systems von Boehringer durchgeführt. Dabei entstehen Produkte mit blunt ends und Fragmente mit einem 3' Single A-Überhang, da es sich bei der Polymerase um ein Gemisch aus thermostabiler Taq- und Pfu-Polymerase handelt. Die Pfu DNA-Polymerase besitzt eine höhere Temperaturstabilität als die Taq DNA-Polymerase, außerdem besitzt sie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrektur erlaubt (Proofreading).

50µl-Reaktionsansätze setzen sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Template	2 µl
dNTPs (each 10 mM)	1 µl
forward-Primer (10 µM)	2 µl
reverse-Primer (10 µM)	2 µl
Puffer + 15mM MgCl ₂	5 µl
Enzym-Mix	0,75 µl
Wasser	37,5 µl

Um eine Variation der PCR zu ermöglichen war es möglich die MgCl₂-Konzentration zu variieren, da das Kit auch einen Puffer ohne MgCl₂ enthält und außerdem zusätzliches MgCl₂, dabei musste entsprechend die Wassermenge angepasst werden.

Die Temperatur wurde folgendermaßen eingestellt:

1x	2 min	94°C
10x	15 sec	94°C
	30 sec	45-65°C
	45 sec	72°C
20x	15 sec	94°C
	30 sec	45-65°C
	45sec + 5 sec	72°C

1x	7 min	72°C
1x	∞	4°C

Das Ergebnis einer PCR wurde durch ein Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht, um das Ergebnis der Reaktion zu überprüfen.

Verwendete Lösungen	
Expand PCR Puffer	20mM TRIS pH7,5 100mM KCl 1 mM DTT 0,5% Tween20 0,5% NP40 50% Glycerol

5.1.6 Klonierungstechniken

5.1.6.1 Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2–1µg Plasmid-DNA eingesetzt und für einen präparativen Restriktionsverdau 5-10µg Plasmid-DNA.

Der Restriktionsverdau wurde häufig in einem Reaktionsvolumen von 20µl durchgeführt. Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Lsg.	xµl	
10x Puffer	2µl	
BSA (10x)	2µl	
Wasser		add to 20 µl
Restriktionsenzym	0,7µl	

Der Ansatz wurde ca. 1-2h bei 37°C inkubiert. Für unterschiedliche Enzyme wurden die Puffer je nach Herstellerangaben variiert, um die optimalen Salzkonzentrationen für jedes Enzym zu erreichen. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und gegebenenfalls das gewünschte Fragment aus dem Gel extrahiert.

In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme von Roche und New England Biolabs (NEB) verwendet.

5.1.6.2 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Falls die Enden von DNA-Fragmenten mit den gewünschten Restriktions-Schnittstellen 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.

5.1.6.3 Dephosphorylierung

Um die Wahrscheinlichkeit der Religation eines Vektors zu minimieren wurde dieser dephosphoryliert. Dies wurde meist mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Roche) durchgeführt. Nach dem Restriktionsverdau wurde 1 µl SAP zugegeben und weitere 60-120min bei 37°C inkubiert. Die SAP wurde anschließend durch 15min bei 75°C inaktiviert.

5.1.6.4 Gelextraktion

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des NucleoSpin Extract von Macherey-Nagel durchgeführt. Dazu wurde das entsprechende Fragment auf einem UV-Tisch (366 nm) mit einer Skalpellklinge aus dem Gel herausgeschnitten und entsprechend der vom Hersteller mitgelieferten Beschreibung aus dem Gelstück extrahiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 10-50 µl Elutionspuffer. Die Qualität und die Konzentration des Fragments wurden anschließend durch analytische Agarosegelelektrophorese überprüft.

5.1.6.5 Präzipitation von Nukleinsäuren (DNA oder RNA)

Einer wässrigen Nukleinsäure-Lösung wurden 0,2 Volumenanteile einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2,5 Volumenanteile 100% Ethanol zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei -80°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 µl Glycogenlösung die Effizienz der Präzipitation gesteigert.

5.1.6.6 Ligation

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft. Dazu werden kompatible Enden der Stränge benötigt. Es müssen also beide Stränge entweder glatte Enden oder „klebrige“ Enden mit komplementärem Überhang haben. Für DNA-Fragmente mit A-Überhang aus PCRs gibt es Ligationssysteme.

5.1.6.6.1 Ligation von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau

Diese Ligation wurden ebenfalls mit der T4 DNA Ligase von Fermentas entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Vektor und Insert wurden dazu im Mengenverhältnis 1:3 bis 1:5 eingesetzt und über Nacht bei 16°C ligiert.

5.1.6.6.2 TOPO XL Kloning Kit

Das TOPO XL Kloning Kit von Invitrogen ermöglicht die Ligation von PCR-Produkten mit A-Überhang. Das Kit beinhaltet einen geschnittenen Vektor mit T-Überhang, der durch Kopplung mit Vaccinia Topoisomerase I aktiviert worden ist. Das TOPO XL Cloning Kit eignet sich besonders für die Klonierung größerer Fragmente > 3 kb.

Für die Ligation mit TOPO XL wurde folgender Ansatz pipettiert:

PCR-Produkt	4µl
pCR-XL-TOPO-Vektor	1µl

Der Ansatz wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde 1µl 6x *stop solution* zugegeben und der Ansatz wurde auf Eis gestellt.

2µl des Ligationsansatzes wurden direkt für die Transformation mit den zum Kit gehörenden *One shot competent TOP10 E.coli* eingesetzt.

Verwendete Lösungen	
pCR-XL-TOPO	10 ng/µl Plasmid-DNA 50% Glycerol 50mM TRIS pH7,4 1mM EDTA 2mM DTT 0,1% Triton X-100 100µg/ml BSA phenol red
6x TOPO Cloning Stop Solution	0,3M NaCl 0,06M MgCl ₂

5.1.6.6.3 TOPO TA Kloning Kit

PCR-Produkte <3kb wurden mit Hilfe des TOPO TA Kloning Kit von Invitrogen entsprechend dem Protokoll subcloniert.

5.1.7 Langzeitlagerung von Plasmiden

Einige Plasmide von besonderer Bedeutung werden für längere Zeit gelagert. Dazu wurde Plasmid-DNA nach einer Spinpräparation mit Ethanol versetzt, so dass die Plasmid-DNA in 70-90% Ethanol bei 4°C gelagert werden kann.

5.1.8 Sequenzierungen

Für Sequenzierungen wurde Plasmid DNA aus analytischen Präparationen verwendet. Damit wurde die Sequenzierung mit Hilfe des *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* von Applied Biosystems durchgeführt.

Ansatz:	Template	1µl (100-160 ng)	
	Ready Reaction Premix	1µl	
	Sequencing buffer	1,5µl	
	Primer(10µM)	0,5µl	
	Wasser		6µl

Programm:	96°C	1'	
	96°C	10sec	
	50°C	5sec	25x
	60°C	4min	
	8°C	∞	

Nach der PCR Reaktion werden die Ansätze durch Zugabe von 10µl Wasser, 2µl 3M NaAc und anschließend 50µl Ethanol gefällt. Vor der Zentrifugation wurden die Ansätze 30min bis 16h bei -20°C inkubiert. Nachdem die gefällte DNA mit 75% Ethanol gewaschen wurde, wird sie in 30µl MilliQ Wasser aufgenommen und mit Hilfe eines Kapillarsequenzers ausgelesen.

5.1.9 Zielgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Die Primer wurden entsprechend dem Protokoll durchgeführt, mit den Basenfehlpaarungen in der Mitte und 15-18 Basen links und rechts. Die Mutagenese wurde entsprechend dem Protokoll von Stratagene durchgeführt.

5.1.10 BAC recombineering

5.1.10.1 BAC-Isolierung durch alkalische Lyse

Zur Isolierung der BAC-DNA wurde ein Protokoll angewendet, das auf der alkalische Lyse beruht. Bei BACs muss besonders darauf geachtet werden, sie nicht durch vortexen, andere schnelle Bewegungen oder Pipettieren geschert werden.

2ml über Nacht-Kultur werden abzenrifugiert. Pellet in 100µl GTE resuspendieren. Nach 5min bei RT werden 200µl P2 zugegeben, 3x schwenken, 5min auf Eis. Danach 150µl P3 zugeben, 3x schwenken, 5min auf Eis. 5min bei 10.000xg abzentrifugieren. Überstand in neues Reaktionsgefäß mit 1ml 100% Ethanol überführen, schwenken, 10min bei 10.000xg abzentrifugieren. Pellet mit 500µl

70%Ethanol waschen. Überstand vollständig abnehmen und antrocknen lassen. Auf keinen Fall vollständig eintrocknen lassen. Pellet in 20µl TE mit RNaseA (50µg/ml) aufnehmen. Die Ausbeute beträgt etwa 0,5 – 1µg.

5.1.10.2 BAC-Isolierung für Pronukleus-Injektionen

Für die DNA-Mikro-Injektion in den Pronukleus von befruchteten murinen Eizellen wurde die BAC-DNA mit Hilfe des Large-Construct Kits von Qiagen aufbereitet. Die BAC-Isolierung wurde gemäß dem Protokoll durchgeführt.

5.1.10.3 BAC recombineering

Das *BAC recombineering* ist eine Technik zur Veränderungen von BAC (Liu et al., 2003), da sie zu groß sind für konventionelle Klonierungstechniken. Sie basiert auf der homologen Rekombination in Bakterien. Genauere Informationen werden auf der Seite <http://recombineering.ncifcrf.gov/> gegeben. Das *BAC recombineering* wurde exakt nach den Protokollen der *Recombineering website* durchgeführt, auf dieser Seite sind auch detaillierte Informationen zu den hier verwendeten Plasmiden und Bakterien zu finden.

Das *BAC rekombineering* ist eine einfache, effektive Methode zur Modifikation von BACs durch homologe Rekombination. Dazu werden nur etwa 50 bp lange Homologie-Arme benötigt. Die *targeting*-Konstrukte werden per PCR hergestellt, in dem Primer designt werden, die die Homologie-Region, so wie etwa 20bp überlappend mit dem *targeting*-Konstrukt enthalten. Das Konstrukt wird mit Hilfe einer PCR amplifiziert. In dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase verwendet, die im Labor von Achim Gossler aus Bakterien aufbereitet wird. Da die Primer sehr lang sind (etwa 70 bp) ist die Zugabe von 1M Betain in die PCR-Reaktion notwendig. Die PCR wurde ansonsten durchgeführt entsprechend dem Protokoll in 5.1.5.1. Zur Selektion der rekombinierten Klone wird im *targeting*-Konstrukt eine Kasette zur Positiv-Selektion eingebracht, die von FRT oder loxP-Stellen umgeben ist. Diese Selektions-Kasette kann in Bakterien wieder entfernt werden, um sie im nächsten Schritt erneut verwenden zu können. Hier wurde eine Kanamycin-Resistenz-Kasette verwendet, die vom FRT-Stellen umgeben ist. Das hier verwendete Plasmid PL451 (Liu et al., 2003) enthält eine Kasette, die zur Selektion in Bakterien und Zellen geeignet ist, da die kodierende Sequenz der Kanamycin-Resistenz und der Neomycin-Resistenz identisch ist. Durch die Verwendung zweier Promotoren ist die Selektion in Bakterien und Zellen mit derselben Kasette möglich. Für das BAC-Transgen wurde ein lacZ-Reporter gen vor die Resistenz-Kasette kloniert. An dieses

Konstrukt wurden die Homologie-Regionen mit der PCR angefügt. Das PCR Produkt wurde direkt für die Rekombination mit dem BAC (108j02) eingesetzt. Dadurch konnte für die Integration mit der zusätzlichen Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Vor der Pronukleus-Injektion wurde die Kanamycin-Resistenz in Bakterien wieder entfernt. Alle Schritte wurden mit Hilfe von PCRs über die Homologie-Regionen verifiziert. Zusätzlich wurde durch einen Verdau mit einem selten schneidenden Enzym überprüft, dass keine großen Deletionen im BAC entstanden sind (*fingerprint*-Verdau).

Für die homologe Rekombination wurden SW102-Bakterien verwendet, diese haben Temperatur-induzierbare Rekombinase stabil integriert. Für die Entfernung der Resistenz-Kassette wurden SW105-Bakterien verwendet, die zusätzlich zu den Temperatur-induzierbaren Rekombinasen die Arabinose-induzierbare FRT-Rekombinase enthalten. Alle Bakterien müssen immer unter 32°C gehalten werden, um keine unerwünschte Rekombinase-Aktivität zu induzieren!

Durchführung:

Vorbereitungen:

- Design von Starteroligonukleotiden mit 50 bp Homologie-Region zur Amplifikation des *targeting*-Konstrukts.
- PCR mit diesen Starteroligonukleotiden, anschließender Dpn1-Verdau, zum Abbau des verbliebenen Templates, Gelextraktion des *targeting*-Konstrukts
- Es werden 100-300ng in 1-5µl H₂O *targeting*-Konstrukt pro Reaktion benötigt.
- Transformation des BAC in SW102-Bakterien (in manchen Fällen können auch *targeting*-Konstrukt und BAC gleichzeitig transformiert werden. Die Effizienz ist dann geringer.)
- 10% Glycerin in MilliQ-Wasser kaltstellen.

Durchführung:

- 5ml über Nacht-Kultur bei 32°C der SW102 Bakterien mit BAC mit entsprechender Selektion. Die Zellen dürfen nicht wärmer als 32°C sein!
- Verdünnung der Kultur, 500µl auf 25ml LB mit Selektion, Inkubation bei max. 32°C bis OD₆₀₀ 0,6 (3-4h)
- Hitzeschock zur Aktivierung der Rekombinasen mit einer Hälfte der Kultur: genau 15min bei 42°C im Wasserbad, regelmäßig schwenken, die andere Hälfte bleibt bei 32°C

- Beide Kulturen auf Eis abkühlen für 1-2min. Die Bakterien ab jetzt immer auf Eis, zusätzlich im Kühlraum verarbeiten!
- Bakterien 5min bei 5.000xg bei 4°C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen,
- 1ml eiskaltes 10% Glycerin zugeben, Pellet vorsichtig resuspendieren, danach weitere 10ml 10%Glycerin zugeben, schwenken, erneut abzentrifugieren (5min, 5.000xg, 4°C)
- Waschschrift wiederholen
- Überstand vollständig abnehmen durch Abtropfen auf einem Papiertuch
- Pellet in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendieren (~50µl)
- Jeweils 25µl elektrokompetente Bakterien mit *targeting*-Konstrukt versetzen und transformieren (Elektroporation)
- Bakterien in 1ml LB ohne Antibiotika aufnehmen und 1h bei 32°C inkubieren
- Bakterien auf LB-Platte mit entsprechender Selektion ausstreichen, zur Abschätzung der Effizienz 10µl, 100µl und den Rest.
- Inkubation 18-24h bei 32°C

Auf der nicht induzierten Kontrollplatte sollten erheblich weniger Kolonien wachsen, als auf der induzierten Platte.

Zur Entfernung des Resistenzgens werden SW105-Bakterien verwendet. Die Bakterien werden ebenso kompetent gemacht, wie die SW102, allerdings ohne Hitzeschock. Stattdessen wird bei einer OD₆₀₀ von 0,4 0,1% Arabinose zugegeben. Nach einer Stunde werden die Bakterien kompetent gemacht und mit dem BAC transfiziert. Nach Inkubation über Nacht werden die Kolonien durch Ausstreichen auf einer Platte mit Kanamycin auf den Verlust der Resistenz überprüft (dazu muss parallel eine Master-Platte angelegt werden, um die Klone zu erhalten!). Darauf folgt die Verifizierung durch *colony*-PCR und Kontroll-Verdau.

5.1.11 Southern Blot-Hybridisierung

Zur Verifizierung der rekombinierten ES-Zellklone wurde eine Analyse mittels der Southern-Blot Hybridisierungs-Technik (Southern, 1975; Chomczynski and Qasba, 1984) durchgeführt.

5.1.11.1 DNA-Transfer auf Nylonmembranen

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 behandelt. Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembranen (Millipore) erfolgte in einem Transferstapel. 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 wurde für 20 min in 50 mM NaP_i-Puffer 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.

5.1.11.2 Herstellung radioaktiv (³²Phosphor- α -dCTP) markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA- Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) durch Einbau von α -(³²P)dCTP durch das Klenow-Fragment der DNA- Polymerase I bei der Synthese von zufällig gepimter DNA gewonnen. Es wurden die Komponenten des „Prime-It®II Random Primer Labeling Kits“ (Fa. Stratagene) folgendermaßen benutzt: 25 ng eines DNA-Fragments wurde mit 10 μ l der Lösung mit Zufallshexameren („Primer solution“) in einem Gesamtvolumen von 33 μ l (mit ddH₂O aufgefüllt) für 5 min gekocht. Dazu wurden 10 μ l Markierungspuffer, 5 μ l α -(³²P)dCTP und 1 μ l Exo(-)Klenow- Enzym (5 Einheiten/ μ l) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Fällung des Reaktionsansatzes beseitigt. Das markierte DNA-Pellet wurde in 100 μ l ddH₂O aufgenommen und 1 μ l davon in einem Flüssigkeits-Szintillations-zähler (LS 6000SE; Fa. Beckman) gemessen. Die markierte DNA wurde direkt vor der Zugabe zu der Hybridisierungslösung durch 5 minütiges Kochen denaturiert.

5.1.11.3 Hybridisierung

Die Membranfilter mit den immobilisierten Nukleinsäuren wurden in Glasröhren überführt, ganz kurz bei 65°C im vorgewärmten Wash II inkubiert und anschließend für ca. 3 h bei 65°C mit ca. 20 ml vorgewärmter Vorhybridisierungslösung (Church-

Lösung) unter ständiger Bewegung im Hybridisierungssofen abgesättigt. Die Hybridisierungslösung (Church-Lösung) wurde mit 2×10^6 cpm/ml radioaktiv markierter Sonde 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 und anschließend entwickelt.

5.1.12 RNA-Isolierung und Mikroarray-Hybridisierungen

Für den Mikroarray wurden die Gewebe in RNAlater (Ambion) gesammelt und bei 4°C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

Zur RNA-Isolierung wurde das *RNeasy Micro Kit* von Qiagen verwendet. Die RNA-Extraktion wurde entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

Die Vorbereitung der RNA-Proben und Hybridisierung der Mikroarray-Chips (*whole mouse genome chip* von Agilent) wurde durchgeführt von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und PD Dr. Michael Kracht, Institut für Pharmakologie, MHH.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Methoden mit differenzierten Säugerzellen

5.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Für diese Arbeit wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese Zellen wachsen adhärent in beschichteten Petrischalen (Gibco) und werden in DMEM-Medium mit 10% FCS, Pen/Strep, NEAA, Glutamax und Natrium-Pyruvat gehalten. Zur Vermehrung werden die Zellen gesplittet, das heißt mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin behandelt bis sich alle Zellen gelöst haben. Die Zellen werden erneut mit Nährmedium aufgenommen und suspendiert und anschließend in neuen Schalen mit Nährmedium ausgesät.

Medium	Name	Konzentration	Menge für 500 ml
HeLa-Medium	DMEM	1x	400 ml
	FCS	10%	45 ml

	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)

5.2.1.2 Transfektion

Die Transfektionen wurden mit Hilfe vom PerFectin Transfection Reagent von GTS (Gene Therapy Systems) durchgeführt. Dazu wurden etwa 300.000 Zellen auf 30mm Petrischalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wird jede Schale mit 1,2µg DNA transfiziert. Die Transfektion wurde durchgeführt wie im Protokoll beschrieben, allerdings werden die Zellen OptiMEM transfiziert und nicht im normalen Nährmedium. Nach der Transfektion wird das Medium wieder gegen normales Nährmedium ausgetauscht.

5.2.1.3 Luciferase-Reporter-Assay

Der Luziferase-Reporter-Assay ist eine Möglichkeit den Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf unterschiedliche Enhancer-Regionen zu untersuchen. Dazu wurde die potentielle Enhancer-Region in einen *firefly*-Luziferase-Vektor kloniert (pGL4.15[luc2P/Hygro] pGL4.27[luc2P/minP/Hygro] Vector von Promega). Die zu testenden Transkriptionsfaktoren wurden in Expressionsvektoren kloniert (pCS2+). Alle zu testenden Plasmide wurde kotransfiziert (0,5µg Reporter, 0,1µg phRL-TK und je 0,2µg Aktivator, bei weniger als 3 Aktivatoren wurde mit leerem pCS2+ auf 1,2µg aufgefüllt) und die Luziferaseaktivität mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde der Vektor phRL-TK kotransfiziert. Die Aktivität der Renilla-Luziferase dient zur Normalisierung der Transfektions-Effizienz. Gemessen wurden die Proben im Glomax96 Luminometer.

5.2.2 Techniken mit murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

5.2.2.1 Gene targeting

Als „*gene targeting*“ wird die zielgerichtete Veränderung eines endogenen Gens mittels homologer Rekombination bezeichnet. Bei diesen Rekombinationsvorgängen

wird ein modifiziertes Gen homolog mit seinem chromosomalen Äquivalent ausgetauscht, so dass die Modifikation ins Genom 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 Zellklone 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 Transmission durch die Keimbahn vererbt sich das defekte 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* Konstrukts“ 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). 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 ausgeführt wurde. 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 (Neomycin-resistenz-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. Für die Herstellung des *Noto*^{Foxj1^{Ki}}-Allels wurden als Selektionsmarker eine Neomycin-Resistenzkassette und eine Diphtherie-Toxin-Kassette verwendet.

5.2.2.2 Einzelkopie-Transgen-Analyse im *Hprt*-Lokus

Für die Promoteranalyse von *Noto* wurde die Möglichkeit angewendet die Transgene als Einzelkopie-Transgene in den *Hprt*-Lokus zu integrieren. Dieser Locus bietet mehrere Vorteile. Zum einen wurde gezeigt, dass Transgenexpression in diesem Locus möglich ist, da es sich um „offenes“ Chromatin handelt. Die Transgenexpression wird ausschließlich durch die eingebrachten Enhancer reguliert. Des Weiteren bietet der *Hprt*-Lokus praktische Vorteile. Die Hypoxanthinphosphoribosyltransferase ist am *Salvage*-Weg zur Regeneration von Nukleinsäuren beteiligt. Hier wird angesetzt um die Selektion zu ermöglichen, sowohl von Zellen, die einen funktionellen *Hprt*-Lokus besitzen, als auch von Zellen, die

keinen funktionellen *Hprt*-Lokus besitzen. Da *Hprt* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und die verwendeten embryonalen Stammzellen männlich sind, liegt nur eine Kopie dieses Gens vor und die Rekombination in einem Locus ist ausreichend für die erfolgreiche Selektion. Hier wurde die *Hprt*-defiziente ES-Zelllinie E14tg2a (Doetschman et al., 1987) verwendet, die eine große Deletion im *Hprt*-Lokus trägt. Etwa 35kb aus dem Locus wurde deletiert, darin enthalten der Promoter und das erste Exon. Durch das *Targeting*-Konstrukt wird neben dem Zielkonstrukt auch die Promoterregion und das erste Exon aus dem humanen Locus wieder in den Locus eingebracht. Dadurch wird die Funktion der HPRT wiederhergestellt und mit Hilfe von HAT kann auf diese Wiederherstellung selektioniert werden. HAT ist eine Kombination von drei Chemikalien. A steht für Aminopterin, welches die *de novo*-Synthese der Nukleinsäuren inhibiert. Durch die Zugabe von Hypoxanthin (H) und Thymidin (T) wird der *Salvage*-Weg aufrechterhalten. (Hooper et al., 1987; Reid et al., 1990; Bronson et al., 1996) Durch diese Möglichkeit wird die Anzahl der Klone in Zellkultur unter Selektion drastisch reduziert. Bei der traditionellen Selektion mit Hilfe einer Neomycin-Resistenz-Kassette erwartet man einige Hundert resistenter ES-Zellklone, die alle auf die korrekte Integration des Transgen untersucht werden müssen, da die gesamte Selektionskassette an einem Stück eingeführt wird. Dadurch werden auch solche Zellen resistent, die das Transgen unspezifisch an einem anderen Ort integriert haben. Im Fall der HAT/*Hprt*-Selektion wird der Selektionsmarker zu einem Teil vom Ziellokus und zum anderen durch das „*Targeting*“-Konstrukt bereitgestellt. Eine erfolgreiche Selektion ist also nur möglich, wenn beide Teile korrekt zusammen gefügt werden. Dadurch wird die Anzahl der Klone drastisch reduziert. Unter idealen Bedingungen werden etwa 50 Klone erzeugt, von denen 90% die korrekte Integration des Transgens tragen. Für die nachfolgende Analyse in chimären Embryonen wurden jeweils zwei unabhängige Klone verwandt. Als Chimäre werden Embryonen bezeichnet, die direkt aus Präimplantationsembryonen hervorgehen, in die die transgenen ES-Zellen injiziert wurden. Diese Embryonen bestehen also aus einem Mosaik aus Wildtyp und transgenen Zellen. Dennoch können durch die Herstellung von Chimären mit einem großen Anteil von transgenen Zellen alle Expressionsdomänen optimal beobachtet werden.

5.2.2.3 Aufbereitung der Targeting-Konstrukte für die ES-Zell-Elektroporation

Für eine Elektroporation eines Targeting Konstruktes in ES-Zellen muss eine ausreichend 20-25µg von sauberer und linearisierter DNA vorliegen. Die DNA für die Elektroporationen wurde mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* von Qiagen aus den Bakterien isoliert. Dann wurde eine ausreichende Menge des fertigen Konstrukts zum linearisieren in einem großen Restriktionsansatz verdaut: 30-35 µg DNA wurden mit 80-100 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 200µl Gesamtvolumen über Nacht verdaut. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Verdaus 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. Die Enzyme wurden mit Hilfe der *Micropure EZ*-Säulen von Millipore von der DNA-Lösung abgetrennt. Danach wurde die DNA gefällt 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.

5.2.2.4 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Die ES-Zellen wurden in ES-Zell-Medium mit hLIF (menschliches Leukemia Inhibitor Faktor) bei 37°C, 5 % CO₂ auf Ø 60 mm Petrischalen mit Feeder-Zellen kultiviert. Das LIF wurde zugesetzt, weil ES-Zellen in Kultur spontan differenzieren. LIF humanen Ursprungs besitzt die gleiche Aktivität bei Maus ES-Zellen. Das ES-Zell-Medium wurde jeden 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% CO₂ 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. 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 resuspendiert und in Einfrier-Gefäße gegeben und in einen vorgekühlten Gefrier-Container bei -80°C zwischengelagert. Am nächsten Tag wurden sie bei -150°C weggefroren.

Medium	Name	Konzentration	Menge für 500 ml
--------	------	---------------	------------------

ES-Zell-Medium	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	25 µl
Gefrier-Medium	15% FCS ES-Zell- Medium		800 ml
	FCS		100 ml
	DMSO		100 ml

5.2.2.5 Elektroporation von Stammzellen

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 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. Durch die Verteilung auf eine größerer Oberfläche sollte die Ausbildung von Einzelklonen gefördert werden.

Medium	Name	Konzentration	Menge für 500 ml
---------------	-------------	----------------------	-------------------------

EP-Medium	DMEM	1x	400 ml
	FCS	10%	45 ml
	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)

5.2.2.6 Selektion von Neomycin-resistenten ES-Zellen

Für die Herstellung des *Noto*^{Foxj1^{Ki}}-Allels wurde etwa 24h nach der Elektroporation der 762 oder 129cast#3-Zellen 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 12 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 12 Tagen gepickt und analysiert. Hierzu wurden 480, bzw. 384 Klone in 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 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.

5.2.2.7 DNA-Extraktion aus ES-Zellen

Die ES-Zell Klone auf den 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 über Nacht bei 37°C 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.

5.2.2.8 Überprüfung der resistenten Klone nach Neomycin-Selektion

Um zu überprüfen, ob die Rekombination an der gewünschten Stelle im Genom stattgefunden hat wurde mit den DNAs der 480/384 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“ wurde mit Hilfe des „ExpandTM High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte anhand des vom Hersteller angegebenen Protokolls, wobei Puffer 2 und eine Primeranlagerungs-temperatur von 55°C und eine Verlängerungszeit von 8 min zu einem guten PCR Ergebnis führte. Die Überprüfung der ES-Zellklone für die Herstellung des *Noto*^{Foxj1^{Ki}}-Allels konnte durchgeführt werden, wie für das *Noto*^{GFP}-Allel. Es wurden die selben Primer und Southern Blot-Sonden verwendet (Abdelkhalek et al., 2004).

5.2.2.9 Selektion von Hprt-positiven ES-Zellen

Für die Herstellung der Allele für die Promoteranalyse wurde etwa 48h nach der Elektroporation der E14tg2a-Zellen das EP-Medium gegen EP-Medium mit Selektionsdroge ausgetauscht. Zur Selektion wurde HAT (HAT supplement (100x, lyophilized) von Gibco (10mM na-Hypoxanthin, 40µM Aminopterin, 1,6mM Thymidin)) gewählt. Es wurden 3ml je 1000ml Kulturmedium zugegeben. Die Selektion wurde für 14-20 Tage aufrechterhalten, wobei das Selektions-Medium abhängig vom Grad

der sterbenden und überlebenden Klone gewechselt wurde (zu Beginn jeden Tag, später alle 3-4 Tage). Die resistenten Klone wurden nach 14-20 Tagen gepickt und analysiert. Hierzu wurden 12 Klone in 96er Zellkulturplatten (96-well-Platte) mit Feeder-Zellen überführt. Die weitere Vorgehensweise entspricht der für die Neomycin-resistenten Klone. Für die Verifizierung der korrekten homologen Rekombination wurden beide Seiten der Integration mit Hilfe von *long-range* PCR überprüft.

5.2.2.10 Herstellung von Chimeren

Zur Herstellung von chimären Mäusen und Embryonen wurden die entsprechenden Zelllinien einige Tage vor der Injektion kultiviert und dann in Mausembryonen im Morula-Stadium injiziert, selten auch in Blastozysten. Dies wurde freundlicherweise von Dr. Karin Schuster-Gossler durchgeführt.

5.3 Embryologische Methoden

5.3.1 Genotypisierung von Mausmutanten

5.3.1.1 DNA-Präparation von Schwanzbiopsien

Die Gewebeprobe wurde über Nacht in 500µl Proteinase K-Puffer mit 10µl Proteinase K (10mg/ml) bei 55°C inkubiert. Danach wurden 250µl 5M NaCl zugegeben und nach vortexen 10min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500µl Isopropanol versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde so lange geschwenkt, bis die DNA sichtbar wurde. Die DNA wurde dann 2min bei maximaler Drehzahl in der Zentrifuge sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 300µl TE Puffer aufgenommen. Um die DNA zu lösen wurde 1h bei 65°C 4°C inkubiert. Von dieser DNA wurde je 1µl für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

Verwendete Lösungen	
Proteinase K Puffer	100mM TRIS pH8,0 5mM EDTA 0,2% SDS 200mM NaCl

5.3.1.2 Genotypisierung von Mausmutanten

Zur Genotypisierung von Mausmutanten wurde jeweils eine PCR mit spezifischen Primern zur Detektion des Wildtyp und des mutierten Allels durchgeführt. Diese PCRs wurden mit Hilfe der Labor-eigenen Taq-Polymerase und dem schon

beschriebenen Protokoll durchgeführt, dem zusätzlich noch 5% DMSO zugesetzt wurden.

5.3.1.2.1 Noto wt-Typisierung

Primer: mnot1-GFP-F1 TGA CCA CCT CTC TCT CTC CCA TTG
 mnot1-wt-B1 CCA CCG CTT CCA TAC TGA TAC C

Programm: 94°C 3min
 94°C 30sec |
 60°C 30sec | 30x
 72°C 45sec |
 72°C 5min
 8°C ∞

Das erwartete Produkt hat eine Größe von 450bp.

5.3.1.2.2 Noto GFP Δ Neo -Typisierung

Primer: Δ Neo-F GAG CAA AGA CCC CAA CGA GAA G
 Δ Neo-B GCA ACC CAC ACA CAT AAA AAG GAG

Programm: 94°C 3min
 94°C 30sec |
 54°C 30sec | 30x
 72°C 45°C |
 72°C 5min
 8°C ∞

Das Produkt hat eine Größe von 650bp.

5.3.1.2.3 Noto Foxj1Ki-Typisierung

Primer: mnot-GFP-F1 siehe oben
 FjORF-B3 GAT GAG AGT GGC ATA GGA GTA GGG

Programm: 94°C 4min
 94°C 30sec |
 55°C 30sec | 40x
 72°C 45sec |
 72°C 5min
 8°C ∞

Das Produkt hat eine Größe von 500bp.

5.3.1.2.4 Noto Foxj1Ki Δ Neo-Typisierung

Primer: Foxj1KI-Neo-F1 AGA CCG AGA TAG GGT TGA GTG TTG
 Δ Neo-B siehe oben

Programm: 94°C 4min
 94°C 30sec |
 50°C 30sec | 40x

72°C	30sec
72°C	5min
8°C	∞

Das Produkt ist 250bp groß.

5.3.1.2.5 Foxj1 wt-Typisierung

Primer:	HGT1	TTC AAG GGC AGA TGG AGA GAG G
	HGT4	AGC CGT GGG GGT CTG TGC

Programm:	94°C	3min	
	94°C	30sec	
	55°C	30sec	50x
	72°C	45°C	
	8°C	∞	

Das Produkt ist 519bp groß.

5.3.1.2.6 Foxj1 lacZ-Typisierung

Primer:	HGT1	siehe oben
	HGTlacZ	CTC TTC GCT ATT ACG CCA GCT GG

Programm: siehe Foxj1 wt-Typisierung

Das Produkt hat eine Größe von 416bp.

5.3.1.2.7 Flp-Typisierung

Primer:	Flp se	CTA ATG TTG TGG GAA ATT GGA GC
	Flp as	CTC GAG GAT AAC TTG TTT ATT GC

Programm:	94°C	3min	
	94°C	30sec	
	57°C	30sec	40x
	72°C	35sec	
	8°C	∞	

Das Produkt ist 500bp groß.

5.3.2 Ganzpräparat in situ Hybridisierungen

(*Whole mount in situ Hybridisation (WISH)*)

Mit Hilfe der WISH können ganze Präparate von E7.5 bis etwa E12.5 analysiert werden. Zur Detektion wurden markierte antisense-RNA-Sonden genutzt, die in vitro transkribiert und dabei mit Digoxigenin oder Fluorescein markiert wurden. Die Sonden hybridisieren mit der mRNA des Gens und können dadurch nicht mehr durch RNasen abgebaut werden. Ungebundene Sonden werden durch RNasen abgebaut

und nicht mehr detektiert. Die Expression wurde direkt durch spezifische Antikörper gegen Digoxygenin, bzw. Fluorescein detektiert. Die Expression konnte mit Hilfe einer an den Antikörper konjugierten alkalischen Phosphatase (AP) durch Zugabe eines Substrats anhand einer Farbreaktion verfolgt werden.

5.3.2.1 Präparation und Fixierung von Mausembryonen

Um Mausembryonen für *in situ* Hybridisierungen zu präparieren wurden die Uteri aus der Maus isoliert und in eiskaltes PBS überführt. Die Embryonen wurden in eiskaltem PBS isoliert und über Nacht in 4%PFA leicht schwenkend bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen in Methanol dehydriert (je 10min in 25%, 50% und 75% MeOH). Die Embryonen werden in 100% Methanol bei –20°C gelagert.

5.3.2.2 Herstellung von RNA-Sonden

Zur Herstellung einer markierten antisense-RNA-Sonde für die *in situ* Hybridisierungen wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das einen Promotor (T7, SP6 oder T3) enthielt sowie die Sequenz, die detektiert werden sollte. Dieses PCR-Produkt diente als Template für die folgende *in vitro* Transkription. Dafür wurden die Polymerasen der Firma Roche und die entsprechenden Puffer verwendet.

Der 20µl-Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Transkriptionspuffer		2µl
NTP-Mix	2µl	
PCR-Produkt		2µl
RNA-Polymerase	2µl	
RNase Inhibitor	1µl	
Wasser		11µl

Der Transkriptionsansatz wurde 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2µl DNase zugegeben und weitere 15min bei 37°C inkubiert. Die RNA-Sonde wurde bei –80°C für 30min gefällt durch Zugabe von:

tRNA (10µg/µl)	1µl
DEPC-H ₂ O	100µl
NH ₄ OAc (7,5M)	33µl
Ethanol	300µl

Anschließend wurde die Sonde mit 70%Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50% Formamid in RNase-freiem Wasser aufgenommen und mit 1µl RNase Inhibitor (RNasin, Promega) versetzt. Die Konzentration der RNA-Sonden wurde auf einem Agarosegel bestimmt und die Sonden wurden anschließend bei –80°C gelagert.

5.3.2.3 WISH

5.3.2.3.1 Tag1: Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden die Präparate auf Eis rehydriert indem sie je 10min in 75%, 50% und 25% MeOH inkubiert wurden. Danach wurde 2x 10min in PBT gewaschen und für 1h auf Eis mit 6% H₂O₂ in PBT gebleicht. Darauf folgten weitere Waschschrte bei RT: 3x 10min mit PBT, 3x 5min mit RIPA und 3x 5min mit PBT. Anschließend wurde 20min bei RT in 4%PFA/0,2%Glutharaldehyd fixiert. Nach weiteren Waschschrten (3x 5min in PBT) wurden die Präparate in Hybridisierungspuffer (Hybe) überführt (1x 10min Hybe/PBT 1:1; 1x 10min Hybe) und 1-3h in Hybe prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 67°C über Nacht in Hybe mit 100µg/ml tRNA und etwa 0,25µg/ml RNA-Sonde.

Verwendete Lösungen	
RIPA	0,05% SDS 150mM NaCl 1% NP40 0,5% Deoxycholat 1mM EDTA 50mM TRIS pH8.0
DEPC-Wasser	0,01% DEPC o.n. at RT, autoklavieren
4%PFA/PBS	4% PFA in DEPC-Wasser, durch Erwärmen und mit einigen Tropfen 10M NaOH lösen, pH 6-7 einstellen
PBS	150mM PBS 15mM Na-Ph Puffer pH7.3
PBT	PBS 0,1% Tween20
4%PFA/0,2% Glutaraldehyd	4%PFA/PBS 0,2% Glutaraldehyd 0,1% Tween20
20x SSC	3M NaCl 0,3M NaCitrat in DEPC-Wasser pH7.0
Citric acid	1M in DEPC-Wasser
Hybridisierungspuffer (Hybe)	50% Formamid 5x SSC 0,1% Tween20 22mM Citric acid in DEPC-Wasser pH6.0

5.3.2.3.2 Tag2: Entfernen der ungebundenen Sonde und

Antikörperinkubation

Um die nicht gebundene Sonde zu entfernen wurde am zweiten Tag der WISH gewaschen und mit RNase verdaut. Anschließend wurde der AP-gekoppelte Antikörper zugegeben.

Zuerst wurde 2x bei 67°C mit Hybe gewaschen, anschließend wurden die Präparate langsam auf RT abgekühlt und in RNase Puffer überführt (1x 5min in Hybe/RNase Solution 1:1). Der RNase Verdau erfolgte durch Inkubation der Präparate in RNase Solution mit 100µg/ml RNase A für 2x 30min bei 37°C. Nachdem die Präparate in SSC/FA/Tween überführt wurden (1x 5min RNase Solution/SSC/FA/Tween 1:1), wurde bei 65°C mit SSC/FA/Tween gewaschen (2x 5min, 3x 10min, 1x 30min, 5x 1h). Danach wurden die Präparate langsam auf RT abgekühlt und in MABT überführt (1x 5min in SSC/FA/Tween/1x TBST 1:1, 2x 10min 1x TBST, 2x 10min MABT). Um den Hintergrund zu verringern wurden die Präparate 1h bei RT in 5% Blocking reagent in MABT geblockt. Die Antikörperinkubation erfolgte anschließend über Nacht bei 4°C in 1% Blocking reagent in MABT mit anti-DIG-AP (1:5000) oder anti-Fluorescein-AP (1:2000) (beide Roche).

Verwendete Lösungen	
SSC/FA/Tween	2x SSC 50% Formamid 0,1% Tween20
10x TBST	1,37M NaCl 270mM KCl 250mM TRIS pH7.5 1% Tween20 (erst diekt vor Gebrauch zugeben)
RNase Solution	500mM NaCl 10mM TRIS pH7.5 0,1% Tween20
MAB	100mM Maleinsäure 150mM NaCl pH7.5
MABT	MAB 0,1% Tween20
Blocking stock solution	10% (w/v) blocking reagent in MAB durch erhitzen lösen, autoklavieren, 0,1% Tween20 zugeben und aliquotiert bei -20°C lagern

5.3.2.3.3 Tag3: Entfernen des ungebundenen Antikörpers

Um den ungebundenen Antikörper zu entfernen wurden die Präparate in 1x TBST gewaschen (3x 5min, mind. 8x 1h bei RT und über Nacht oder mehrere Tage bei 4°C)

Tag4: Färben

Um die Expression sichtbar zu machen wurde zu den Präparaten ein Substrat gegeben, das durch die AP in blauen, bzw. roten Farbstoff umgesetzt wurde. Dazu wurde zuvor 3x 20min mit alkalischer Phosphatase Puffer gewaschen und anschließend das Substrat zugegeben. Es wurde 1h bis mehrere Tage bei 4°C gefärbt. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und abgestoppt. Es wurde 3x 20min mit alkalischer Phosphatase Puffer gewaschen, um das Substrat zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate in 4%PFA über Nacht bei 4°C fixiert, um den Antikörper zu inaktivieren. Die Präparate wurden in dieser Lösung bei 4°C gelagert.

Für eine Doppelfärbung zur Veranschaulichung der Expression zweier Gene im selben Präparat wurden unterschiedlich markierte RNA-Sonden in der Hybridisierung eingesetzt. Allgemein wurde das schwächer exprimierte Gen mit Digoxigenin markiert und das stärker exprimierte mit Fluorescein. Das schwächere Gen wurde zuerst mit der anti-DIG-AP blau gefärbt. Nach der Antikörperinaktivierung wurde einige Male gewaschen und über Nacht mit dem anderen Antikörper (anti-Fluorescein-AP) inkubiert. Danach wurde weiter verfahren wie schon mit dem ersten Antikörper ab Tag3, allerdings wurde zum Färben rotes Substrat eingesetzt.

Verwendete Lösungen	
Alkalische Phosphatase Puffer	100mM NaCl 50mM MgCl ₂ 100mM TRIS pH9.5 2mM Levamisol 0,1% Tween20
Staining solution (Blue)	BM Purple AP substrat (Roche) 2mM Levamisol 0,1% Tween20
Staining solution (Red)	7,5µl INT/BCIP stock solution (Roche) je 1ml alkalische Phosphatase Puffer

5.3.3 lacZ-Reportergenanalyse in Embryonen

Zur Analyse der LacZ-Reportergen-Expression werden die Embryonen zwischen E7,5 und E9,5 präpariert und 5min fixiert. Danach werden die Embryonen 2x 5-10min gewaschen und anschließend etwa 16h bei 37°C gefärbt. Nach der Färbung werden die Embryonen weitere 2x gewaschen und in 4% PFA in PBS gelagert. Alle Abbildungen von Embryonen nach lacZ-Färbung in dieser Arbeit stammen von Färbungen über Nacht.

Puffer	Zusammensetzung
--------	-----------------

Fixierlösung	10ml Phosphatpuffer (SPP) 80µl Glutaraldehyd (50% in Wasser) 20µl 1M MgCl ₂ 100µl EGTA pH7,5
Waschlösung	2ml 1M MgCl ₂ 10ml 1%Na-Desoxycholat 10ml 2% NP-40 Add SPP to 1000ml
Färbelösung	9,6ml Waschlösung 100µl 0,5M K ₃ FeCN ₆ 100µl 0,5M K ₄ FeCN ₆ 200µl X-Gal (50mg/ml in DMF)
SPP	77,4ml 0,1M Na ₂ HPO ₄ 22,6ml 0,1M NaH ₂ PO ₄

5.3.4 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 OsO₄) 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) 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 (OsO₄) 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 CO₂ 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 (Stiftproben-teller 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 Rasterelektronen-mikroskop (SEM 505 von Fa. Philips). Die Proben sind lange haltbar, vorausgesetzt, sie werden vor der Luftfeuchtigkeit geschützt und im Exsikkator zur langfristigen Lagerung aufbewahrt. Die REM-Untersuchungen wurden mit Unterstützung von Stephanie Groos am Institut für Zellbiologie, MHH, durchgeführt.

5.4 Material

5.4.1 Chemikalien und Geräte

5.4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen

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.

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Leiter	NEB, Invitrogen
Anti Dig-AP Antikörper	Roche
Block Reagenz (blocking reagent)	Roche
BM Purple AP Substrat	Roche
DMEM Pulver (#52100)	Gibco BRL
DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment	Promega
dNTPs	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Expand High Fidelity PCR System	Roche
FCS	Gibco BRL
Glutamax 100x stock solution (200mM) Cat. No. 35050-012	Gibco BRL
Kaisers Glyceringelatine	Merck
NucleoSpin [®] Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin [®] Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)	Gibco BRL
pGEMT (easy) System	Promega
Prime-it [®] II Random Primer Labeling Kit	Stratagene
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	NEB, Boehringer
RNase A für WISH	Sigma (R-4875)

Bezeichnung	Hersteller
Shrimp Alkaline Phosphatase	Boehringer
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Tri Reagent™	Sigma
TOPO®XL Cloning Kit	Invitrogen
tRNA	Roche

5.4.1.2 Computerprogramme und Datenbanken

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.), *ImageJ*

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™ 7.2* (Accelrys Inc.)

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

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/>)

5.4.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Binokular	Leica M420	Leica
Digitalkamera	Fujix HC300Z	Fuji
Elektroporiergerät	MicroPulser	BioRad

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kamera	ProgRes C14	Jenoptic
Mikroskop	Axioplan	Zeiss
PCR-Maschine	Primus96 plus	MWG-Biotech
Phosphorimager	Fujix BAS1000	Fuji

5.4.2 Medien

5.4.2.1 Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
LB (Luria-Bertani)	Bacto-Trypton Hefe-Extrakt Natriumchlorid (Agar)	10 g/l 5 g/l 10 g/l (15 g/l)

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in 70% EtOH (500x)	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O (1000x)	50 µg/ml
IPTG	1 M (1000x)	1 mM
X-Gal	50 mg/ml (1000x)	50 µg/ml

5.4.2.2 Zellkulturmedien

Name	Inhaltsstoffe	Konzentration
DMEM/F12	DMEM/F-12 FCS Glutamax Penicillin Streptomycin	1:1 5% 4 mM 100 U/ml 100 µg/ml

5.4.3 Plasmide

Die im *Noto*^{Foxj1^{Ki}}(+neo)-Targeting-Konstrukt für die negative Selektion verwendete Diphtherie-Toxin-Selektionskassette (DT) stammt aus dem pKOSelectDT aus der pKO Scrambler SeriesTM (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 Polyadenylierungs-signal (PolyA). Die cDNA des rot fluoreszierenden Proteins tdTomato (Shaner et al., 2005) gefolgt vom SV40 Polyadenylierungssignal. Des Weiteren wurde im *Noto*^{Foxj1^{Ki}}(+neo)-Targeting-

Konstrukt für die positive Selektion eine mit „FRT“-Erkennungssequenzen flankierte Neomycinresistenz-Selektionskassette verwendet. Diese Kassette beinhaltet den PGK-Promotor, die cDNA des Neomycinresistenz-gens und das SV40 PolyA.

5.4.4 Primer

Name	Sequenz (5'->3')
NotoES-screen-F	TGT CAC GTC CTG CAC GAC G
NotoES-screen-B	CAG CAA TCT CTC CAG TTT TTA TAC G
pMP8typ-B1	GAGGCGGGCGCCTGTAATCCCA
pMP8-typ-F1	TGAGACTAGCTAGGAAATGAGC
Noto-7-B1	TTAAGTAGGGCACAGCCTGCAG
pMP5 3'det F	CCAGCATTCTGCCCCAACA
pMP5 3'det B	ATGTGTATGGGGGTTTCTGCTGC
pMP5 3'long F Sal	AAGTCGACAGGACTGGGGTTTGGTTACT
pMP5 3'long B Sal	AAGTCGACGGGAATCACTAAGTTCAAGG
BAC3'lacZ-F73	GGTAAACTGGCTCGGATTAGGG
BAC5'lacPrimer	GTAAGGTGACCACCTCTCTCTCTCCCATTGAGCTCCTTGCACAGCCTGGG AGGTCCTCAGGGTCGCGCAATGATTACGGATTCACTGGCC
BAC3'lacZPrimer	GGGGAACAGCTCCCGACAGGGGCGCAGGCTCCCGGGCTGGACCTGA GTGCCTGAGGGAGCAGGGCTGGAATGTACCTGACTGATGAAGTT

5.4.5 Plasmide und Bakterien

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

5.4.6 Whole mount in situ-Proben

<i>dante (cerl-2)</i>	pBS II KS	EcoR I	T7	José António Belo
<i>Dynlrb2</i>	pBS II SK-ZX	Pac I	T3	diese Arbeit
<i>Dnahc11</i>	pBS II KS	Hind III	T7	Martina Brückner
<i>Foxj1</i>	pCRII	Hind III	T7	Brian P. Hackett

MATERIAL UND METHODEN

<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>Rfx3</i>	pBS II KS	EcoR I	T7	Bénédicte Durand
<i>0710001D07Rik</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>Btbd9</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>1700026D08Rik</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>1700003M02Rik</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>1700012B09Rik</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>3100002J23Rik</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit
<i>Dync2h1</i>	pBS II KS	PCR	T7	diese Arbeit

6 Ergebnisse

6.1 Promoteranalyse von *Noto*

6.1.1 Eingrenzung regulatorischer Elemente im *Noto*-Lokus

6.1.1.1 Untersuchung großer Fragmente des *Noto*-Lokus

Bei *Noto* handelt es sich um ein murines Gen, das nur in wenigen Zellen während der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Die Expression von *Noto* wurde mit Hilfe von RNA *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie ausschließlich im embryonalen Primitivknoten und im naszierenden Notochord gezeigt. *Noto* ist notwendig für die Entwicklung von Primitivknoten und Notochord. Zum besseren Verständnis der Rolle von *Noto* wurde in dieser Arbeit die Regulation von *Noto* untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung bestand die Möglichkeit potentiell neue Regulatoren von Knoten- und Notochord-spezifischer Genexpression zu identifizieren.

Zu Beginn wurde ein Teil des *Noto*-Lokus (LUR1, *large upstream region 1*) vor ein lacZ Reporter gen kloniert. LUR1 enthält etwa 10kb des *Noto*-Lokus vor dem ersten Exon, das erste Exon und das erste Intron. Das Reporter gen wurde hinter die Splice-Acceptor-Stelle im zweiten Exon kloniert. Dieses Konstrukt wurde von Dr. Karin Schuster-Gossler in den Pronukleus von befruchteten murinen Oozyten injiziert. Die Reporter genexpression wurde in transgenen Embryonen am Tag E9,5 untersucht (Abbildung 5A). Alle lacZ-Färbungen zum Nachweis der Reporter genaktivität, die in dieser Arbeit gezeigt werden, entwickelten sich über Nacht. In den transgenen Embryonen wurde variable Reporter genexpression beobachtet. Die Expression im posterioren Notochord war allem gemein. In einigen Embryonen war die Expression aber zusätzlich in anderen Domänen zu beobachten. Dazu gehören die Expression in Darm, Leberanlage und Diencephalon (Abbildung 5Aa). Alle beobachteten Expressionsdomänen von LUR1(PI) sind Domänen, in denen *Foxa2* exprimiert wird. Da *Noto* in *Foxa2*-Mutanten nicht mehr exprimiert ist, ist *Foxa2* ein Kandidat für die Regulation von *Noto*.

Bei der Pronukleus-Injektion wird das Transgen zufällig in das Genom integriert. Dadurch können je nach Integrationsort und Kopienzahl Variationen im Expressionsmuster auftreten. In diesem konkreten Fall waren zwei Möglichkeiten der Interpretation der bisherigen Ergebnisse möglich. Entweder ist die ektopische Reporter genexpression ein Produkt der Pronukleus-Injektion durch unterschiedliche

Kopienzahl und Integrationsorte, oder es fehlen noch wichtige reprimierende Elemente, die im Transgen noch nicht enthalten waren. Diese beiden Möglichkeiten wurden auf unterschiedliche Weise untersucht. Zum einen wurde ein größeres Transgen hergestellt, um den untersuchten Bereich auszudehnen, falls noch regulatorische Elemente fehlen. Zum anderen wurde LUR1 als Einzelkopie-Transgen in einem bekannten Locus untersucht.

Mit Hilfe von *BAC (Bacterial Artificial Chromosome) recombineering*, einer Technik zur Modifikation von BACs (siehe 5.1.10.3), erfolgte die Einführung eines LacZ-Reportergens in das Translationsstartkodon von *Noto* in einem BAC. Er enthält jeweils etwa 35kb vor und nach dem *Noto*-Gen. Nach Pronukleus-Injektion dieses Transgens durch Dr. Karin Schuster-Gossler spiegelte dieses Transgen die endogene Expression von *Noto* im Notochord (E8,5) wider (Abbildung 5B c,d).

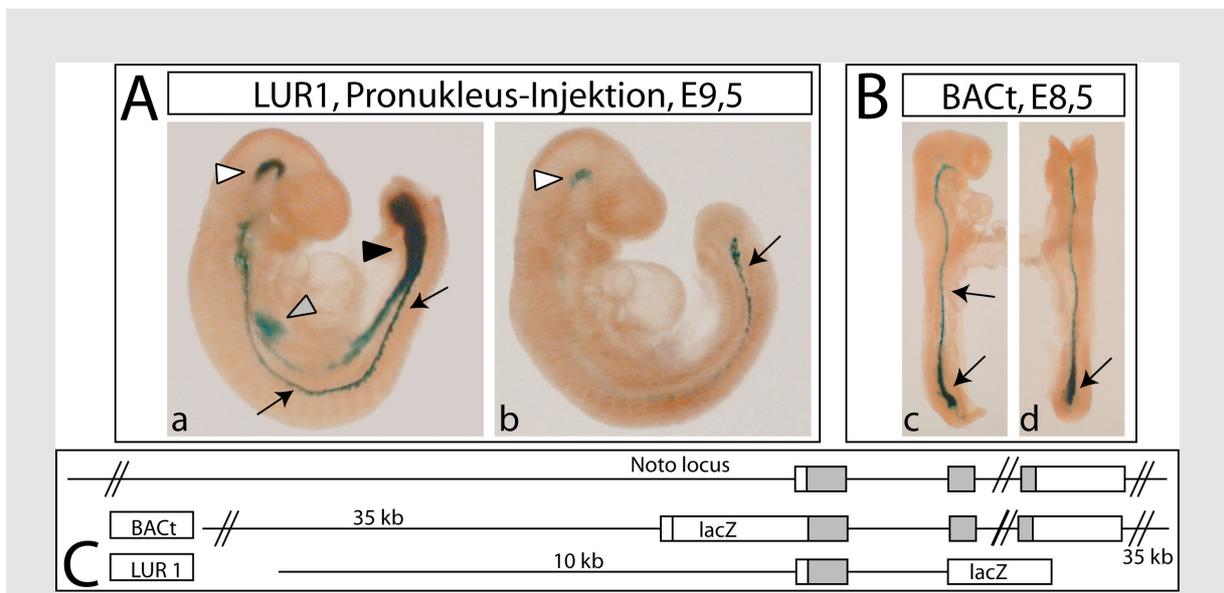


Abbildung 5: LUR1-PI und BACt aktivieren Reporterexpression im Notochord

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E9,5; zwei Beispiele für Reporteraktivität von LUR1 in E9,5 nach Pronukleus-Injektion, Expression in Notochord (Pfeile), Darm (schwarze Pfeilspitze), Leberanlage (graue Pfeilspitze) und Diencephalon (weiße Pfeilspitze) (a), Expression nur in Notochord und Diencephalon (b); (B) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8,5 mit BACt nach Pronukleus-Injektion, Expression nur im Notochord, laterale Ansicht (c), dorsale Ansicht (d); (C) schematische Darstellung der Position der Transgene

Für die Einzelkopie-Transgen-Analyse wurde der *Hprt*-Lokus ausgewählt. Dieser Locus bietet mehrere Vorteile. Zum einen wurde gezeigt, dass Transgenexpression von diesem Locus möglich ist, da es sich um „offenes“ Chromatin handelt und die Transgenexpression ausschließlich durch die eingebrachten Enhancer reguliert wird (Evans et al., 2000; Minami et al., 2002). Des Weiteren bietet der *Hprt*-Lokus praktische Vorteile. Es kann sowohl auf An- wie auch auf Abwesenheit des

funktionellen *Hprt*-Gens selektiert werden. Da *Hprt* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und die verwendeten embryonalen Stammzellen männlich sind, liegt nur eine Kopie dieses Gens vor und die Rekombination in einem Allel ist ausreichend für die erfolgreiche Selektion. Hier wurde die *Hprt*-defiziente ES-Zelllinie E14tg2a verwendet, die eine große Deletion im *Hprt*-Lokus trägt. Darin enthalten ist der Promoter und das erste Exon (Reid et al., 1991). Durch das *Targeting*-Konstrukt werden neben dem Zielkonstrukt auch die Promoterregion und das erste Exon aus dem humanen Lokus eingebracht. So wird die Funktion der HPRT wiederhergestellt und die Zellen können auf diese Wiederherstellung selektioniert werden (Bronson et al., 1996)(siehe 5.2.2.2).

Für die folgende Analyse der Reportergenkonstrukte in chimären Embryonen wurden jeweils zwei unabhängige Klone von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verwendet, in die die Transgene durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingebracht wurden. Alle ES-Zell Injektionen in dieser Arbeit wurden von Dr. Karin Schuster-Gossler durchgeführt. Die Reportergenexpression wurde von E7,5 bis E9,5 untersucht, um beide Expressionsdomänen von *Noto*, den Embryonalknoten und das Notochord, analysieren zu können.

Die Reportergenanalyse von LUR1 als Einzelkopie-Transgen ergab ein verändertes Bild (Abbildung 6Aa-e) im Gegensatz zur Untersuchung durch Pronukleus-Injektion (Abbildung 5A). Die Reportergenaktivität wurde nur noch in den Expressionsdomänen von endogenem *Noto* wieder gefunden. Dies zeigt, dass das ursprüngliche Transgen bereits alle regulatorischen Elemente, die für die Expression in Knoten und Notochord notwendig sind, enthielt. Bei der Pronukleus-Injektion von Transgenen kommt es sehr häufig zur willkürlichen Integration von vielen Kopien nacheinander. Dies kann zu einer Veränderung des Expressionsmusters führen. Da die Analyse eines Einzelkopie-Transgens näher an der tatsächlichen Situation im Genom liegt, wurden alle folgenden Reportergenkonstrukte nur als Einzelkopie untersucht.

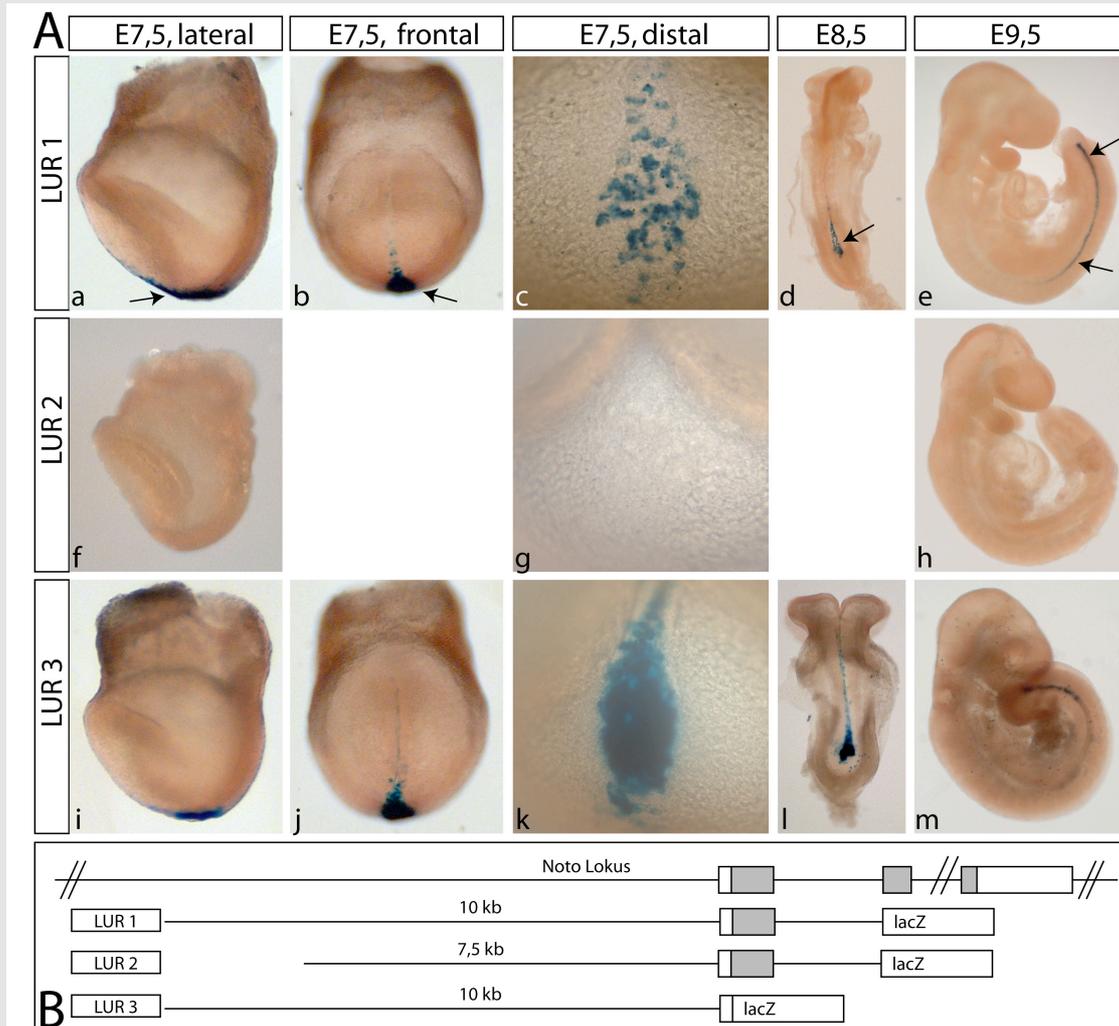


Abbildung 6: 10 kb aus dem *Noto*-Lokus sind ausreichend und notwendig, um die endogene *Noto*-Expression wider zuspiegeln

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (a-e) Reporterexpression von LUR1 im Primitivknoten (a-c) und Notochord (d,e) (Knoten und Notochord wurden exemplarisch durch Pfeile markiert (a-e)), LUR2 (f-h), Reporterexpression von LUR3 in Primitivknoten (i-k) und Notochord (l,m); **(B)** schematische Darstellung der Transgene

Durch *in silico* Analysen zeigte sich, dass das erste Intron von *Noto* mehrere mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor FOXA2 enthält. Daher wurde das Reporter gen bei LUR1 nicht hinter das Translationsstartkodon von *Noto* im ersten Exon kloniert, sondern in das zweite Exon (Abbildung 6 B). Um die Funktionalität dieser potentiellen Bindestellen zu untersuchen, wurde die Expression mit einem Konstrukt verglichen, dass das Reporter gen am Translationsstartkodon (LUR3) enthält (Abbildung 6Ai-m). Da keine Veränderung der Reporterexpression

beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass diese potentiellen Bindestellen *in vivo* im Kontext des *Hprt*-Lokus nicht notwendig sind.

Außerdem wurde eine Verkürzung des Transgens am 5' Ende um 2,5kb vorgenommen (LUR2) (Abbildung 6Af-g). Bei LUR2 kommt es zum vollständigen Verlust der Transgenaktivität. Daher muss davon ausgegangen werden, dass der deletierte Bereich wesentliche Elemente enthält, die zur Regulation beitragen.

6.1.1.2 Eingrenzung einer Knoten-spezifischen Enhancer-Region

Der Verlust der Reporter-genaktivität bei der Verkürzung von LUR1 zu LUR2 impliziert wesentliche regulatorische Elemente in diesem Bereich. Die deletierte Region (LUR 4) enthält Elemente, die für die Genexpression im Primitivknoten und Notochord notwendig sind. Um zu zeigen, dass diese Region auch ausreichend ist für die Genexpression in Knoten und Notochord, wurde das entsprechende Fragment vor einen *hsp70*-Minimalpromoter mit lacZ Reporter-gen kloniert (Abbildung 7B). So wurde auch für die folgenden Reporter-genkonstrukte verfahren. Das Fragment LUR4 ist ausreichend, um Genexpression im Knoten und Notochord zu aktivieren (Abbildung 7Aa-e). Die β -Galaktosidase-Aktivität konnte bereits nach 20 Minuten im Knoten und Notochord beobachtet werden. Nach Färbung über Nacht wurde zusätzlich ektopische Reporter-genaktivität im Darm, im Dottersack und möglicherweise in Blutgefäßen in Kopf und Körper gefunden. Diese Reporter-genexpression wurde auf den *hsp70*-Minimalpromoter zurückgeführt, da sie durch Verwendung des endogenen Minimalpromotors nicht auftritt (Abbildung 6A, Abbildung 28A).

Zur weiteren Eingrenzung wurde die Promoter-Region von *Noto in silico* mit der der homologen Gene in anderen Spezies verglichen. Dies zeigte, dass es in LUR4 eine Region gibt, die konserviert ist, allerdings ausschließlich in höheren Säugetieren, bzw. Plazentatieren. In dem Bereich von LUR4 ist dies der einzige Bereich, der auch im *Noto*-Lokus in anderen Spezies, beispielsweise Hund und Mensch, erhalten ist. Der konservierte Bereich umfasst etwa 500bp und ist am 3' Ende von LUR4 lokalisiert. Der größere Teil von LUR4, die 2kb am 5' Ende (LUR5) (Abbildung 7B), kann *in vivo* keine Genexpression im Knoten und Notochord aktivieren (Abbildung 7A f-j). Daraus kann gefolgert werden, dass der Bereich von LUR5 nicht ausreichend ist für die Aktivierung der Genexpression im Knoten und Notochord. Einzig die schwache lacZ-Aktivität in den ektopischen Domänen bleibt erhalten. Dies unterstützt

die Annahme, dass es sich dabei um Hintergrund handelt, der durch den heterologen Minimalpromoter erzeugt wird.

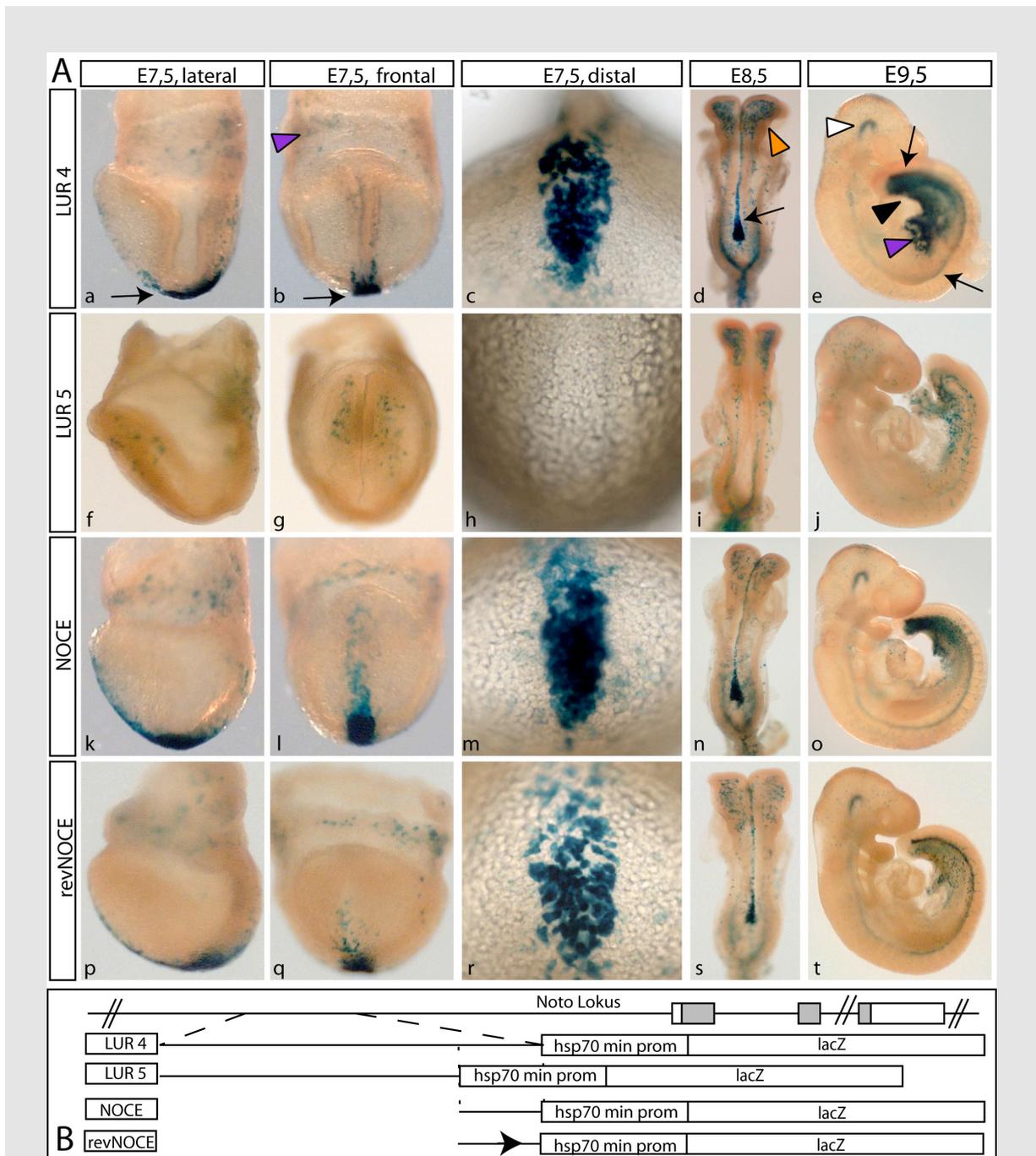


Abbildung 7: NOCE ist notwendig und ausreichend für robuste Reportergenexpression in Knoten und Notochord

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 – E9,5; Aktivität von LUR4 in Primitivknoten (a-c, Pfeile) und Notochord (d,e, Pfeile) und Diencephalon (d,e, weiße Pfeilspitze), außerdem in Kopf (d, orange Pfeilspitze), Darm (e, schwarze Pfeilspitze) und Dottersack (b,e violette Pfeilspitze); LUR5 reicht nicht für Reportergenaktivität in Knoten und Notochord aus, die ektopische Expression in Kopf und Darm bleibt erhalten, NOCE (k-o) und revNOCE (p-t) aktivieren Reportergenaktivität wie LUR4 (a-e) Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene

Im Gegensatz zu LUR5 reicht der konservierte Bereich von etwa 500 bp aus, um starke Reporterogenaktivität zu erzeugen (Abbildung 7Ak-o). Die Färbung im Knoten und Notochord war bereits nach 20min deutlich erkennbar. Dieser Bereich wird im Folgenden als NOCE (*node and notochord specific enhancer region*) bezeichnet.

Weiterhin wurde NOCE in umgekehrter Orientierung vor den Minimalpromoter kloniert (revNOCE), um die Identität von NOCE als Enhancer zu bestätigen. Auch in dieser Konstellation kann revNOCE starke Reporterexpression in Primitivknoten und Notochord aktivieren (Abbildung 7Ap-t). Das Signal war wiederum nach 20min deutlich zu erkennen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass NOCE im Kontext des *Hprt*-Lokus hinreichend und notwendig ist, um Genexpression im Primitivknoten und Notochord zu aktivieren.

6.1.1.3 Untersuchung der Sequenz von NOCE

Die Enhancer-Region NOCE aus dem Noto-Lokus ist etwa 500 bp. NOCE ist ausreichend und notwendig, um starke Reporterexpression in Primitivknoten und Notochord zu aktivieren. Zur Identifizierung der Sequenzabschnitte, die essentiell sind für diese Aktivität, wurden unterschiedliche Computerprogramme angewendet, unter anderem MatInspector, Vista2.0, Consite und ECR browser (Quandt et al., 1995; Sandelin et al., 2004; Visel et al., 2007; Ovcharenko et al., 2004). Dadurch sollten Konsensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktorbindestellen gefunden und ihre Konservierung in anderen Spezies bestimmt werden (Abbildung 8).

Mit Hilfe der Computerprogramme wurden drei Transkriptionsfaktorbindestellen erkannt, die in Maus, Ratte, Hund und Mensch konserviert sind.

Eine Bindestelle für TCF/LEF1 ist konserviert. TCF/LEF1 sind Mediatoren von kanonischen Wnt-Signalen. Für den kanonischen Wnt-Signalweg wurde gezeigt, dass er Genexpression im Primitivknoten aktivieren kann und auch Zielgene im Knoten und Notochord hat (Nakaya et al., 2005; Yamaguchi et al., 1999).

Eine potentielle Bindestelle für TEAD-Transkriptionsfaktoren ist in NOCE erhalten. Für diese Transkriptionsfaktoren wurde gezeigt, dass sie an der Regulation eines Primitivknoten-spezifischen Enhancers von *Foxa2* beteiligt sind (Sawada et al., 2005).

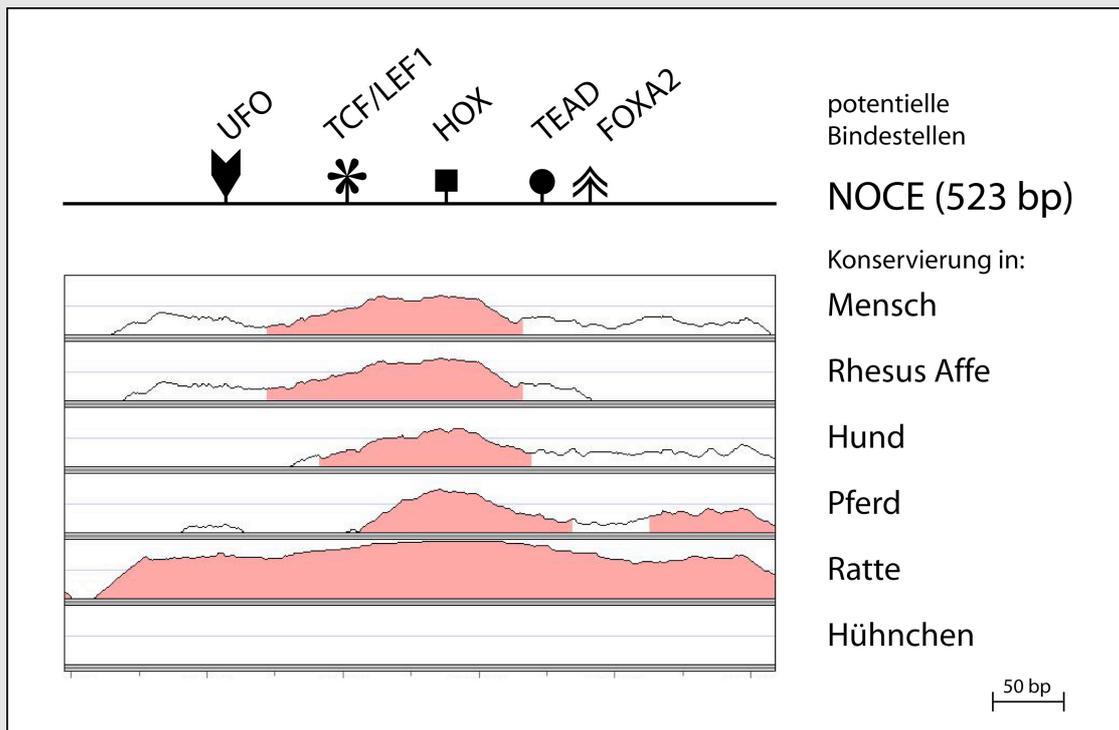


Abbildung 8: Übersicht über die Enhancer-Region NOCE

NOCE ist in Plazentatieren konserviert, beispielsweise in Mensch, Rhesus Äffchen, Hund, Pferd und Ratte, aber nicht im Hühnchen (rosa markiert sind Regionen, die über >100bp mehr als 70% konserviert sind, die weißen Regionen sind weniger stark konserviert, die grauen Balken markieren 50% Homologie, die dünnen Linien 75%); im stärker konservierten Zentrum von NOCE sind potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen für TCF/LEF1, einen HOX-Faktor und TEAD-Proteine erhalten, darüber hinaus sind eine FOXA2-Bindestelle und eine potentielle Bindestelle für einen unbekanntem Faktor (UFO) enthalten.

Die dritte Konsensus-Sequenz soll die Bindung eines Homeobox-Transkriptionsfaktors (HOX) ermöglichen. Da es eine Vielzahl von HOX-Transkriptionsfaktoren gibt, von denen einige im Knoten exprimiert sind, könnte ein Mitglied dieser Familie von Transkriptionsfaktoren an der Regulation von NOCE beteiligt sein.

In Maus und Ratte ist eine potentielle Bindestelle für den Transkriptionsfaktor FOXA2 in NOCE enthalten. *Foxa2* ist in Primitivknoten und Notochord exprimiert, allerdings ebenso in Darm, Diencephalon und Leberanlage. LUR1-PI zeigt Reporterexpression in diesen Domänen. LUR1 enthält 14 potentielle FOXA2-Bindestellen. Außerdem ist die *Noto*-Expression in *Foxa2*-Mutanten abwesend. Daher ist FOXA2 ein potentieller Regulator von NOCE und *Noto*.

Der Vergleich der Sequenz von NOCE mit einem Enhancer aus dem *Foxa2*-Lokus, der ausreichend ist Primitivknoten- und Notochord-spezifische Reporterexpression zu aktivieren (Sawada et al., 2005), erbrachte, dass ein Teil

dieser Sequenz auch in NOCE enthalten ist. Allerdings ist für diese Sequenz noch nicht bekannt, welche Faktoren daran binden. In dieser Arbeit wird sie daher als UFO (*unknown factor*)-Bindestelle bezeichnet.

Alle weiteren Untersuchungen von NOCE fanden unter Berücksichtigung dieser potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen statt.

6.1.1.4 Unterteilung von NOCE in weitere Abschnitte

NOCE wurde in mehrere Teile unterteilt, um zu testen, ob die Enhancer-Region noch eingegrenzt werden kann. shoNO1 enthält die 3'Hälfte von NOCE. Darin enthalten sind die HOX, die TEAD und die FOXA2-Bindestellen (Abbildung 9).

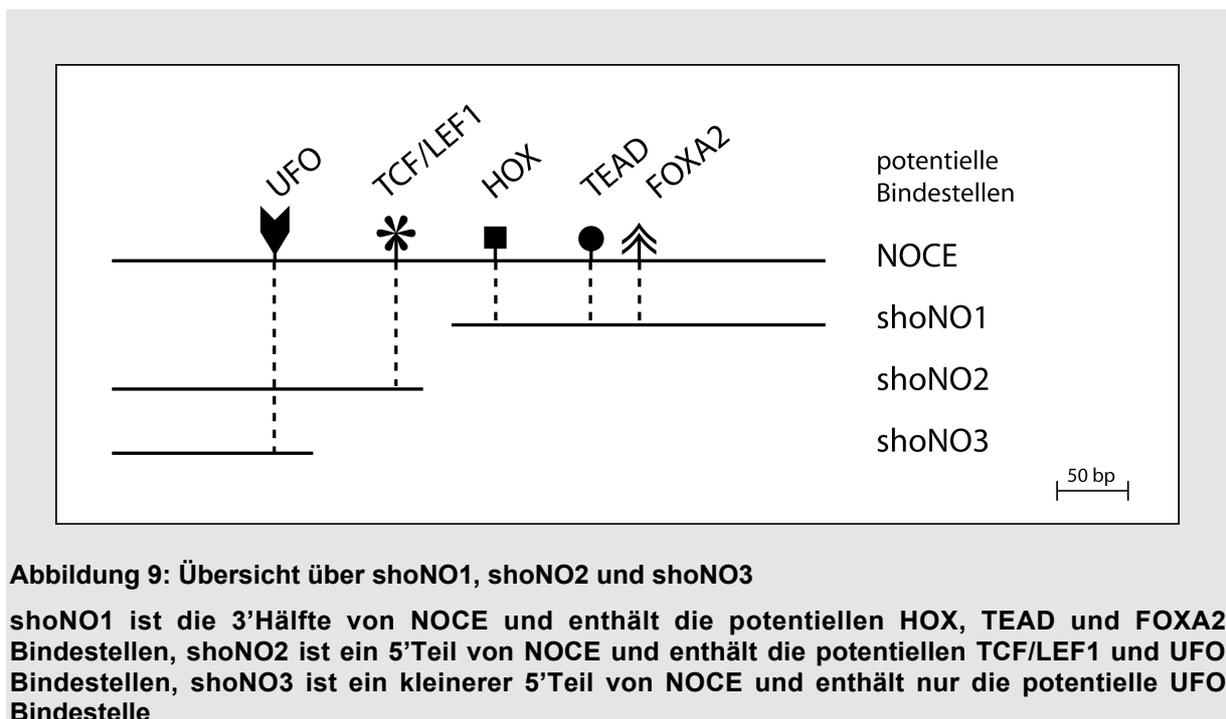


Abbildung 9: Übersicht über shoNO1, shoNO2 und shoNO3

shoNO1 ist die 3'Hälfte von NOCE und enthält die potentiellen HOX, TEAD und FOXA2 Bindestellen, shoNO2 ist ein 5'Teil von NOCE und enthält die potentiellen TCF/LEF1 und UFO Bindestellen, shoNO3 ist ein kleinerer 5'Teil von NOCE und enthält nur die potentielle UFO Bindestelle

shoNO1 ist ausreichend, um Reporter-genaktivität im Knoten und Notochord zu erzeugen. Allerdings war die Aktivität stark reduziert (Abbildung 10A a-e). Eine eindeutige Färbung in Knoten und Notochord war nach 8h zu erkennen, dies deutet darauf hin, dass durch die Verkürzung bereits ein Teil des Enhancers deletiert wurde. Die Spezifität von NOCE bleibt in shoNO1 erhalten. Die Expression in Primitivknoten und Notochord nimmt allerdings stark ab. Im Knoten ist noch deutliche Reporter-genaktivität zu detektieren (Abbildung 10Aa-c), im Notochord ist sie daneben kaum noch nachweisbar (Abbildung 10d,e). Die Reporter-genexpression im Diencephalon ist nicht mehr nachweisbar (Abbildung 10Ae), während die Expression in Kopf, Darm und Dottersack erhalten bleibt.

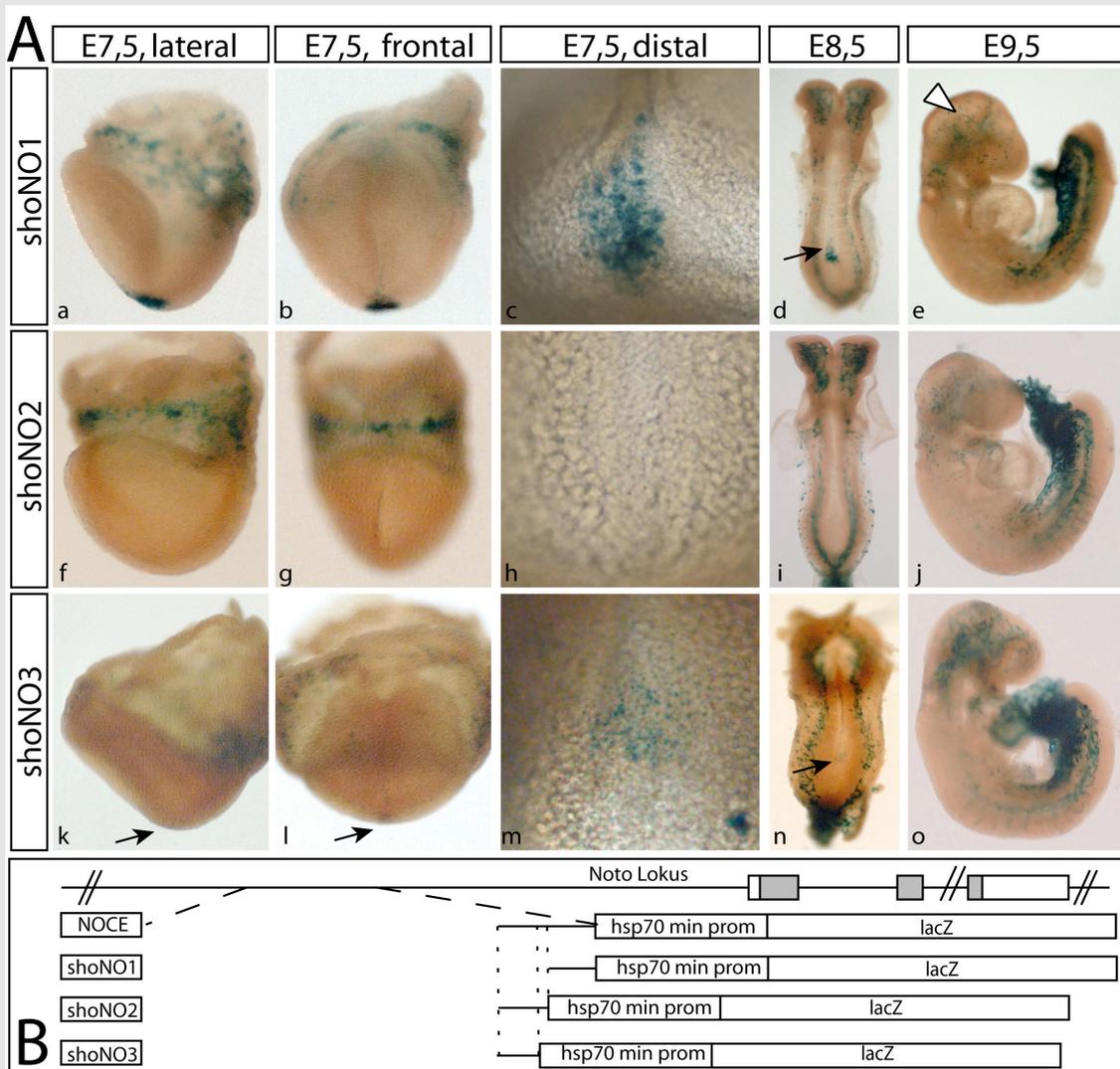


Abbildung 10: shoNO1 und 3 aktivieren schwache Knoten- und Notochord-spezifische Genexpression

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; shoNO1 aktiviert Reporterexpression in Knoten (a-c) und Notochord (d(Pfeil), e), außerdem in Kopf (d) und Darm (e), die Expression im Diencephalon (weiße Pfeilspitze) geht verloren, shoNO2 (f-j) aktiviert keine Reporterexpression in Knoten und Notochord, nur in den ektopischen Domänen, shoNO3 (k-o) aktiviert schwach Reporterexpression in Knoten und Notochord (Pfeile), außerdem in Kopf und Darm, aber nicht im Diencephalon; Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene

Die 5'Hälfte von NOCE wurde ebenso getestet, um festzustellen, ob auch sie noch hinreichend ist, um das Reportergen zu aktivieren. Wie bereits erwähnt, wurden durch *in silico* Untersuchungen einige potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen in NOCE gefunden. NOCE enthält beinahe in der Mitte eine potentielle Bindestelle für TCF/LEF1 Transkriptionsfaktoren. Daher wurde die 5'Hälfte in zwei unterschiedlichen Versionen getestet. Es wurde ein Konstrukt hergestellt, welches die potentielle

TCF/LEF1 Bindestelle umfasst (shoNO2) und ein anderes, welches diesen Bereich nicht umfasst (shoNO3) (Abbildung 9). Die Färbung der Chimären, die diese Konstrukte enthalten, zeigte, dass shoNO3 noch ausreichend ist, um Genexpression in Knoten und Notochord zu aktivieren (Abbildung 10A f-j). Allerdings schwächer als shoNO1. Ein Reportergensignal konnte erst nach Färbung über Nacht spezifisch in Knoten und Notochord beobachtet werden. Da LUR5 beispielsweise nach Färbung über Nacht kein Signal im Notochord und Knoten erzeugt hatte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses schwache Signal durch den 5'Teil von NOCE dennoch spezifisch auf eine schwache Enhanceraktivität zurückzuführen ist. Die schwache Aktivität wurde nur bei shoNO3 beobachtet, dem kürzeren 5'Teil. shoNO2 kann keine nachweisbare Reportergenaktivität in Knoten und Notochord aktivieren (Abbildung 10Ak-o). Dies könnte darauf hindeuten, dass shoNO2 zusätzlich Sequenzen enthält, die die Aktivität weiter schwächen.

Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass sich die starke Enhanceraktivität von NOCE aus dem Zusammenwirken mehrerer Faktoren in beiden Teilen von NOCE herleitet.

6.1.2 Analyse möglicher Regulatoren von NOCE

Nachdem mit NOCE ein wichtiges Enhancer-Element für Primitivknoten und Notochord-spezifische Genexpression lokalisiert wurde, sollte geklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren an den Enhancer binden und wie sie wirken. Wie bereits erwähnt wurden einige potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert, die in anderen Säugerspezies konserviert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von fünf potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen für die Regulation von NOCE untersucht. Dazu gehören eine Bindestelle für TCF/LEF1, eine Bindestelle für Tead-Proteine, eine Homeoboxfaktor-Bindestelle, eine FOXA2-Bindestelle und eine Bindestelle für einen unbekanntem Faktor.

6.1.2.1 Untersuchung der Aktivierung von NOCE durch den Wnt-Signalweg

NOCE enthält eine Bindestelle für TCF/LEF1 Faktoren. Diese Transkriptionsfaktoren sind an der Weiterleitung von kanonischen Wnt-Signalen beteiligt. Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die ein Reporter gen tragen, welches die Aktivität von Wnt-Signalen widerspiegeln soll, konnte gezeigt werden, dass WNT3A in der Lage ist, Genexpression im Primitivknoten zu aktivieren (Nakaya et al., 2005). Daher ist der Wnt-Signalweg ein guter Kandidat, die Expression eines Knoten und Notochord-spezifischen Enhancers zu regulieren.

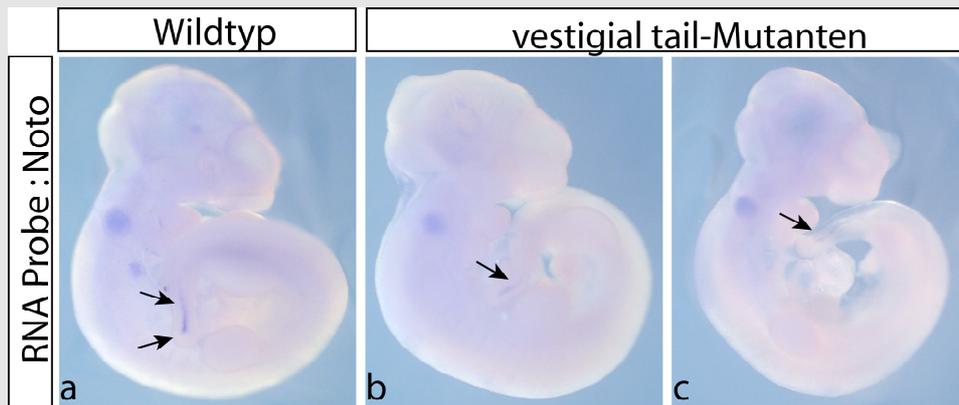


Abbildung 11: Die *Noto*-Expression ist in *vestigial tail*-Mutanten reduziert

WISH mit einer *Noto*-Probe auf WT und *vestigial tail*-mutanten Embryonen E8; Die *Noto*-Expression (Pfeile) ist im Wildtyp (a) deutlich zu erkennen, in den *vestigial tail*-Mutanten (b,c) ist sie reduziert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von *Noto* in *vestigial tail*-Mutanten untersucht. Bei der *vestigial tail* Mutante handelt es sich um eine hypomorphe Mutation von *Wnt3a*, die zu einer Abschwächung der Wnt-Signalwirkung führt (Greco et al., 1996). Die Expression von *Noto* ist in *vestigial tail* Mutanten reduziert (Abbildung 11). Dies ist ein Zeichen dafür, dass der Wnt-Signalweg einen aktivierenden Effekt auf die Regulation von *Noto* hat.

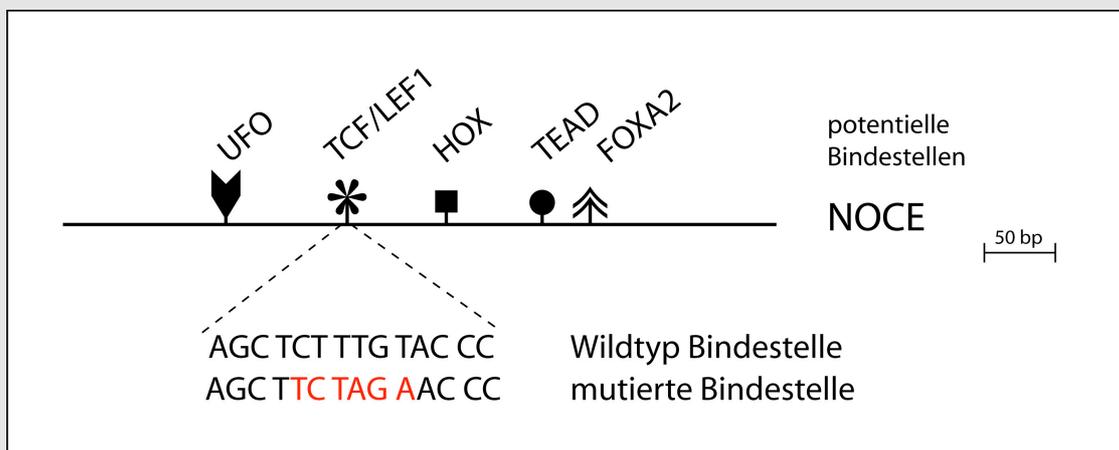


Abbildung 12: schematische Darstellung von NOCE mit der Mutation der potentiellen TCF/LEF1 Bindestelle

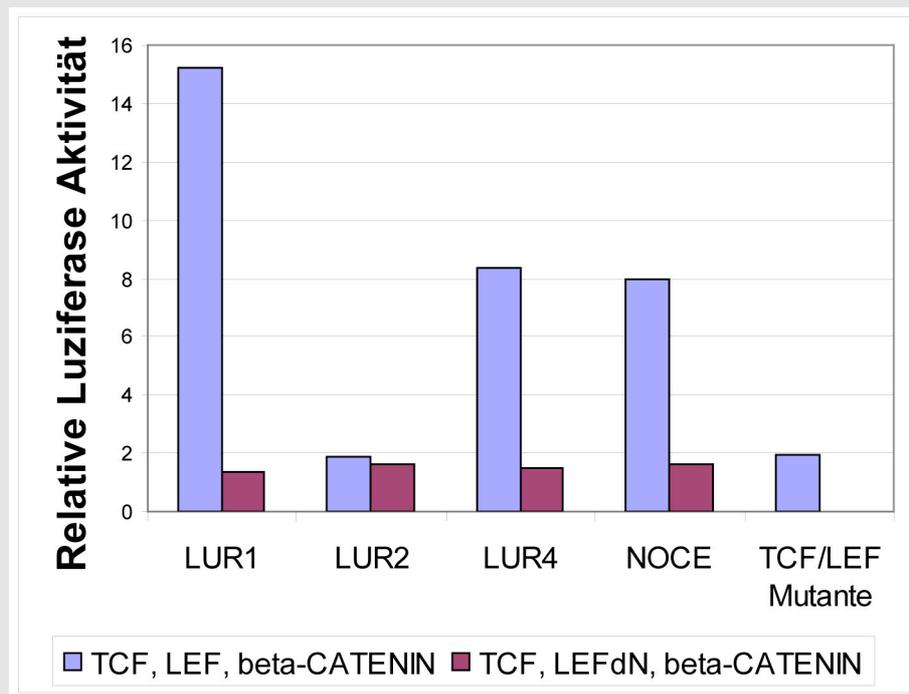


Abbildung 13: TCF/LEF1 können LUR1, 4 und NOCE aktivieren

Luziferase-Assay in HeLa-Zellen; TCF/LEF1 und betaCatenin können LUR1 (15fach), LUR4 (8fach) und NOCE (8fach) aktivieren, LUR2 und die LUR4 mit einer Mutation der Bindestelle (TCF/LEF-Mutante) werden nicht aktiviert (blaue Balken), durch Verwendung einer dominant-negativen Variante von LEF1 (LEFdN) geht in allen Fällen die Reporterogenaktivität zurück (violette Balken).

Die Aktivierung des Wnt-Signalweges wurde in Zellkultur durch Kotransfektion von TCF1, LEF1 und betaCATENIN simuliert. Für die Reporterkonstrukte wurden unterschiedliche Teile des *Noto*-Lokus vor ein Luziferase-Reporter gen mit TATA-Box-Minimalpromoter kloniert. Dazu wurden die Teile verwendet, die schon für die Reporter genkonstrukte zur Analyse *in vivo* verwendet wurden. Die basale Aktivität der Reporterkonstrukte wurde durch Transfektion des Reporters mit einem leeren Expressionsplasmid bestimmt. Die Kotransfektion von TCF, LEF1 und betaCATENIN zusammen mit dem LUR1-Reporterkonstrukt steigerte die Luziferase-Aktivität auf das 15fache. Mit LUR2 geht diese Aktivierung verloren. Mit den LUR4- und NOCE-Reporter genkonstrukten kann etwa eine 8fache Aktivierung erreicht werden. Durch Kotransfektion einer dominant-negativen Form von LEF1 geht die Aktivierung mit allen Reportern fast vollständig zurück. Komponenten des Wnt-Signalweges können also Reporter genexpression durch Aktivierung von NOCE in Zellkultur erzeugen (Abbildung 13).

Durch zielgerichtete Mutagenese wurde die TCF/LEF1 Bindestelle in LUR4 mutiert, um dadurch ihre Bedeutung zu untersuchen (Mutation siehe Abbildung 12). Die

Einführung dieser Mutation führte in Zellkultur zum weitgehenden Verlust der Luziferase-Aktivität (Abbildung 13, TCF/LEF Mutante).

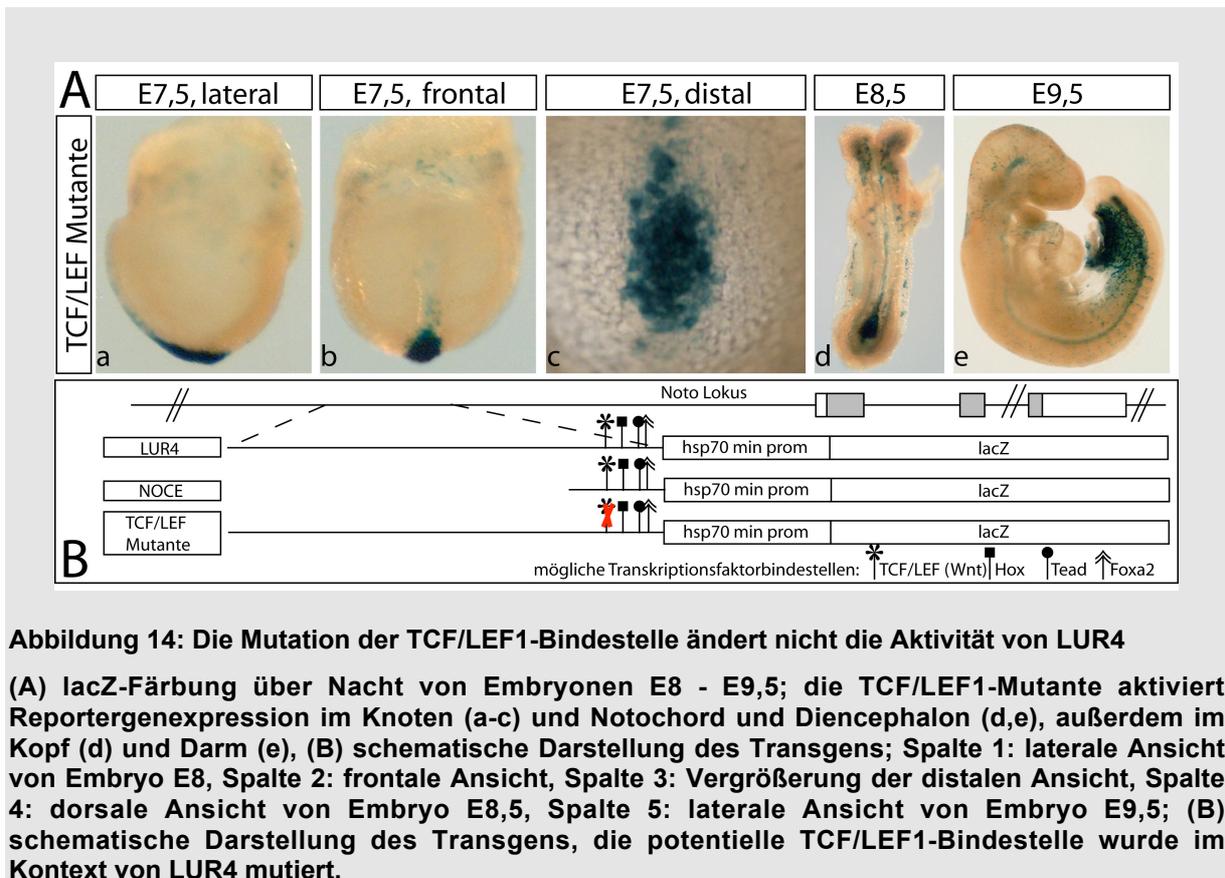


Abbildung 14: Die Mutation der TCF/LEF1-Bindestelle ändert nicht die Aktivität von LUR4

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; die TCF/LEF1-Mutante aktiviert Reporterexpression im Knoten (a-c) und Notochord und Diencephalon (d,e), außerdem im Kopf (d) und Darm (e), (B) schematische Darstellung des Transgens; Spalte 1: laterale Ansicht von Embryo E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryo E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryo E9,5; (B) schematische Darstellung des Transgens, die potentielle TCF/LEF1-Bindestelle wurde im Kontext von LUR4 mutiert.

Die Untersuchung des Konstrukts mit der Mutation *in vivo* sollte die vorangegangenen *in vitro* Analysen bestätigen. Allerdings wurde durch die Mutation der TCF/LEF1 Bindestelle im Kontext von LUR4 *in vivo* kein signifikanter Verlust der lacZ-Aktivität beobachtet (Abbildung 14A a-e). Die Reporterexpression war bereits nach etwa 20 min in Knoten und Notochord erkennbar. Nach Färbung über Nacht wurden alle Expressionsdomänen von NOCE beobachtet, Knoten, Notochord, Diencephalon, Kopf, Darm und Dottersack. Weder die Spezifität noch die Expressionsstärke waren deutlich verändert.

NOCE und LUR4 können *in vitro* durch TCF/LEF1 aktiviert werden, allerdings scheint dies *in vivo* im Kontext des *Hprt*-Lokus nicht essentiell für die Aktivierung von LUR4 zu sein.

6.1.2.2 Untersuchung der Aktivierung von NOCE durch TEAD Proteine

In NOCE wurde eine Bindestelle für TEAD-Transkriptionsfaktoren gefunden (Abbildung 15). TEAD Proteine sind nicht spezifisch im Knoten exprimiert, allerdings wurde gezeigt, dass ein Enhancer aus dem *Foxa2*-Lokus eine Bindestelle für TEAD-

Proteine enthält, die unentbehrlich ist für die Reporterexpression im Knoten von transgenen Embryonen (Sawada et al., 2005).

Da *Tead1* am Tag E7,5 noch nicht exprimiert ist (Sawada et al., 2005), kommen für die Regulation von NOCE noch *Tead2* und *Tead4* in Frage, da TEAD3 eine andere Bindestelle besetzt. *Tead4* ist in seiner Funktion unterschiedlich zu *Tead1* und *Tead2*. *Tead4* wird zur Spezifikation des Trophectoderms in Präimplantations-Embryonen benötigt. Der Verlust von *Tead4* ist vor E4,5 letal (Nishioka et al., 2008). Allerdings ist *Tead4* für die Postimplantations-Entwicklung nicht notwendig (Yagi et al., 2007). *Tead1* und *Tead2* haben teilweise redundante Funktionen. Der Verlust beider Gene führt zum Verlust eines großen Teils des Notochord, zu Wachstumsverzögerungen und schweren Fehlbildungen (Sawada et al., 2008). Der Einfluss von *Tead1* und *Tead2* auf das Notochord kann ein Anzeichen für eine Regulation von NOCE sein, da *Noto* für das kaudale Notochord benötigt wird (Abdelkhalek et al., 2004). Für ihre Funktion benötigen die TEAD-Transkriptionsfaktoren den Kofaktor YAP65 (Sawada et al., 2005).

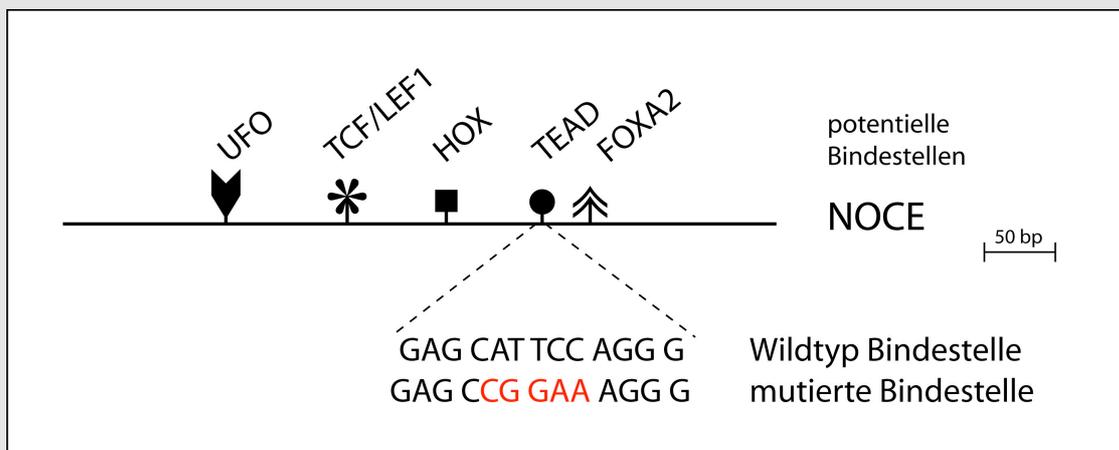


Abbildung 15: schematisch Darstellung von NOCE mit der Mutation der potentiellen TEAD-Bindestelle

Da *Tead2* im hier untersuchten Zeitraum exprimiert wird, wurden die Untersuchungen *in vitro* an dieser Stelle mit *Tead2* durchgeführt. Als Koaktivator wird zusätzlich *Yap65* verwendet.

TEAD2 in Kombination mit YAP65 kann die Aktivität des NOCE-Reportergenkonstrukts auf das 7fache steigern. Durch Transfektion einer Fusion der DNA-bindenden Domäne von TEAD2 in Kombination mit der reprimierenden Domäne von ENGRAILED (TEAD-EnR) geht die Aktivierung verloren, ebenso durch Mutation (Abbildung 15) der potentiellen Bindestelle (Abbildung 16).

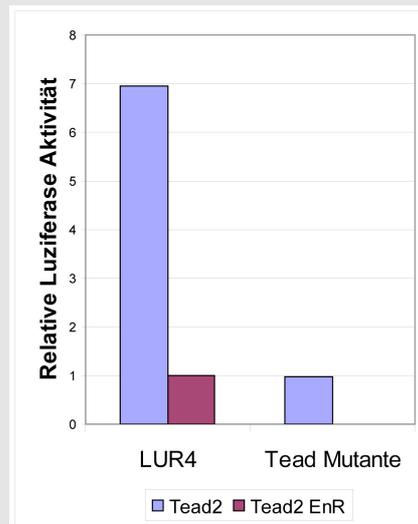


Abbildung 16: TEAD2/YAP65 aktivieren LUR4 *in vitro*

Luziferase-Assay in HeLa-Zellen; TEAD2 kann zusammen mit YAP65 die Reporterogenaktivität von LUR4 auf das 8fache steigern. Diese Aktivierung geht durch die Mutation der Bindestelle verloren (blaue Balken), durch Verwendung einer reprimierenden Variante von TEAD2 geht die Aktivierung ebenfalls verloren (violetter Balken).

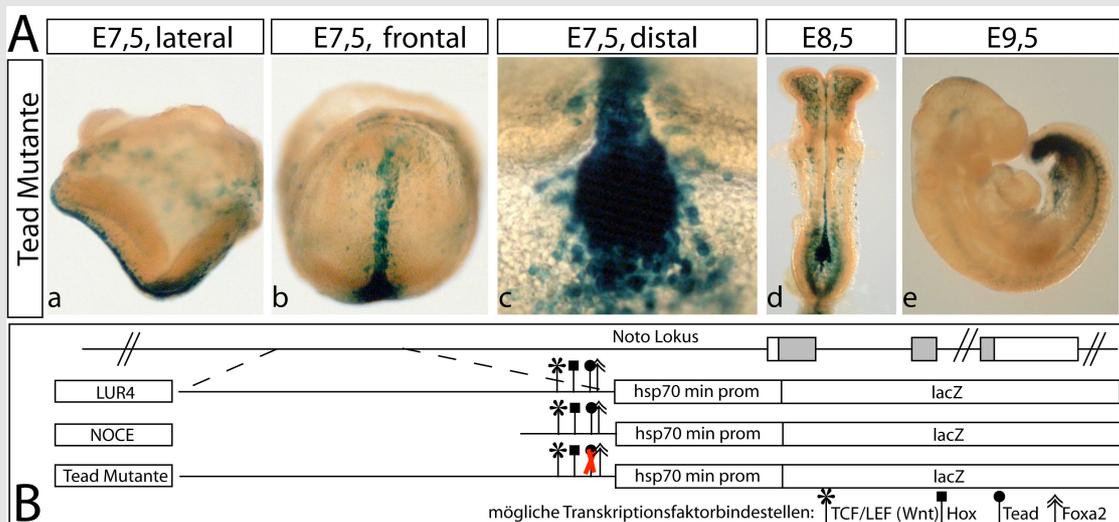


Abbildung 17: Die Reporterogenexpression wird *in vivo* durch die Mutation der TEAD-Bindestelle nicht verändert

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; die TEAD-Mutante aktiviert Reporterogenexpression in Knoten (a-c) und Notochord und Diencephalon (d,e), außerdem im Kopf (d) und Darm (e), (B) schematische Darstellung des Transgens; die potentielle TEAD-Bindestelle wurde im Kontext von LUR4 mutiert.

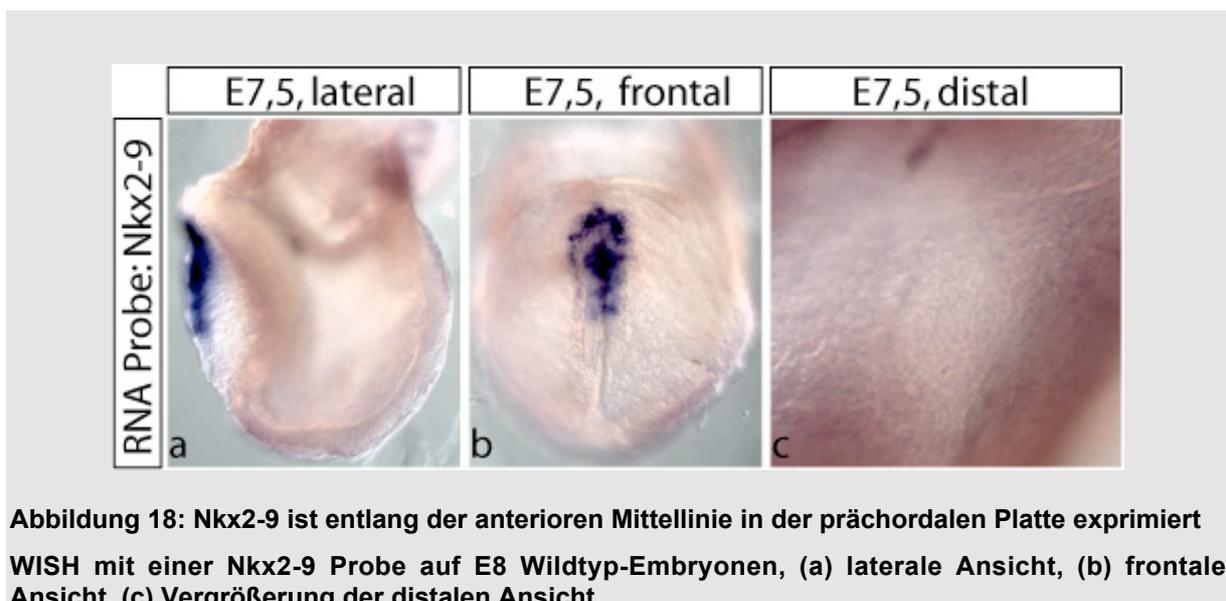
Zur Untersuchung der Bedeutung der potentiellen Bindestelle für die TEAD-Faktoren wurde die Mutation im Kontext von LUR4 auch *in vivo* getestet. Die lacZ-Aktivität *in vivo* bleibt von der Mutation unverändert (Abbildung 17A). Sowohl die

Expressionsdomänen von NOCE, als auch die Stärke der Reporterogenaktivität werden nicht signifikant verändert.

LUR4 wird *in vitro* durch TEAD2/YAP65 aktiviert, allerdings ist die potentielle Bindestelle für TEAD-Proteine *in vivo* nicht essentiell für die Aktivierung von LUR4.

6.1.2.3 Untersuchung der Regulation von NOCE durch Homeobox-Proteine

NOCE enthält auch eine Bindestelle für einen Homeobox-Transkriptionsfaktor (Abbildung 19). Homeobox-Transkriptionsfaktoren können unterschiedliche Funktionen haben. Sie können als Aktivatoren oder Repressoren der Zielgenexpression wirken. Die Konsensus-Sequenzen für die Bindung von Homeobox-Faktoren sind sehr ähnlich. Dadurch konnte eine weitere Eingrenzung nur durch Literatur-Recherche und begründete Vermutungen stattfinden. *Nkx2-9* ist zum fraglichen Zeitpunkt exprimiert. Allerdings ist *Nkx2-9* nicht im Knoten, sondern entlang der anterioren Mittellinie, also in der prächordalen Platte exprimiert (Abbildung 18), einem Bereich, in dem *Noto* nicht exprimiert wird (Abbildung 2b).



In vitro wirkt *Nkx2-9* als Repressor der Transkription (Abbildung 20). Daher könnte *Nkx2-9* an der Unterdrückung der Expression durch NOCE in der prächordalen Platte und Begrenzung der Transkription auf den Knoten beteiligt sein.

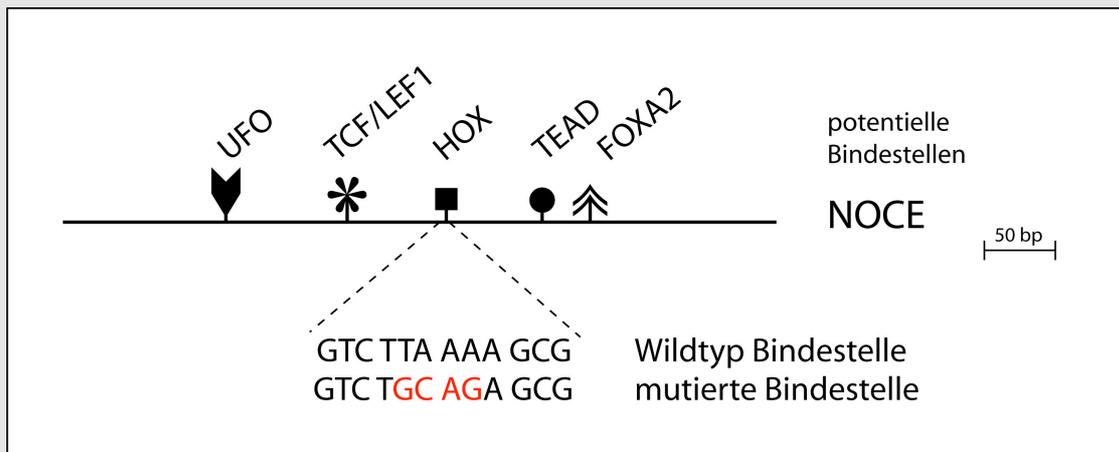


Abbildung 19: schematische Darstellung von NOCE mit der Mutation der potentiellen Homeobox-Faktor Bindestelle

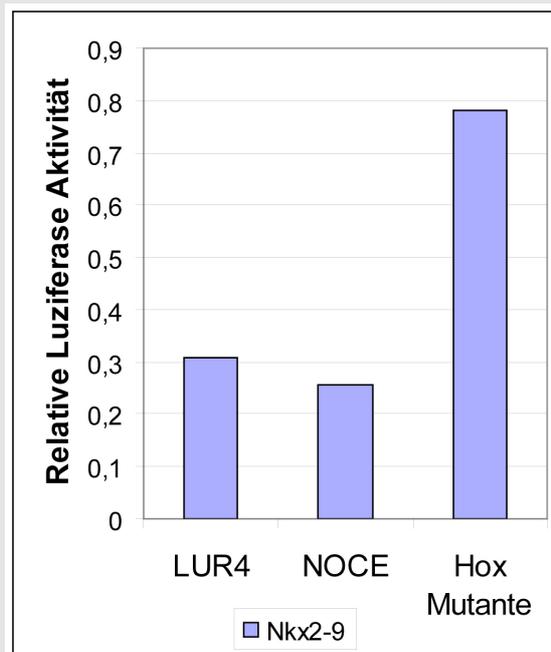


Abbildung 20: *Nkx2-9* reprimiert die Reporterexpression durch LUR4 und NOCE

Luziferase-Assay in HeLa-Zellen; *Nkx2-9* reprimiert die Aktivierung von LUR4 und NOCE. Diese Aktivierung geht durch die Mutation der potentiellen Bindestelle in LUR4 (Hox-Mutante) verloren.

NKX2-9 wirkt reprimierend auf NOCE. Es reduziert die Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auf das etwa 0,3fache (Abbildung 20). Als Kontrolle gilt die Aktivität des Reportergens ohne Kotransfektion weiterer Transkriptionsfaktoren, diese wird als einfache Aktivierung gesetzt. Die Mutation der potentiellen Bindestelle von NKX2-9 (Abbildung 19) stellt die Reporterexpression wieder her. Diese Mutation führt *in vivo* jedoch ebenfalls zu keiner Veränderung der Reporterexpression

(Abbildung 21) im Vergleich zu LUR4. Die Spezifität und Stärke der Reporterogenaktivität bleiben erhalten.

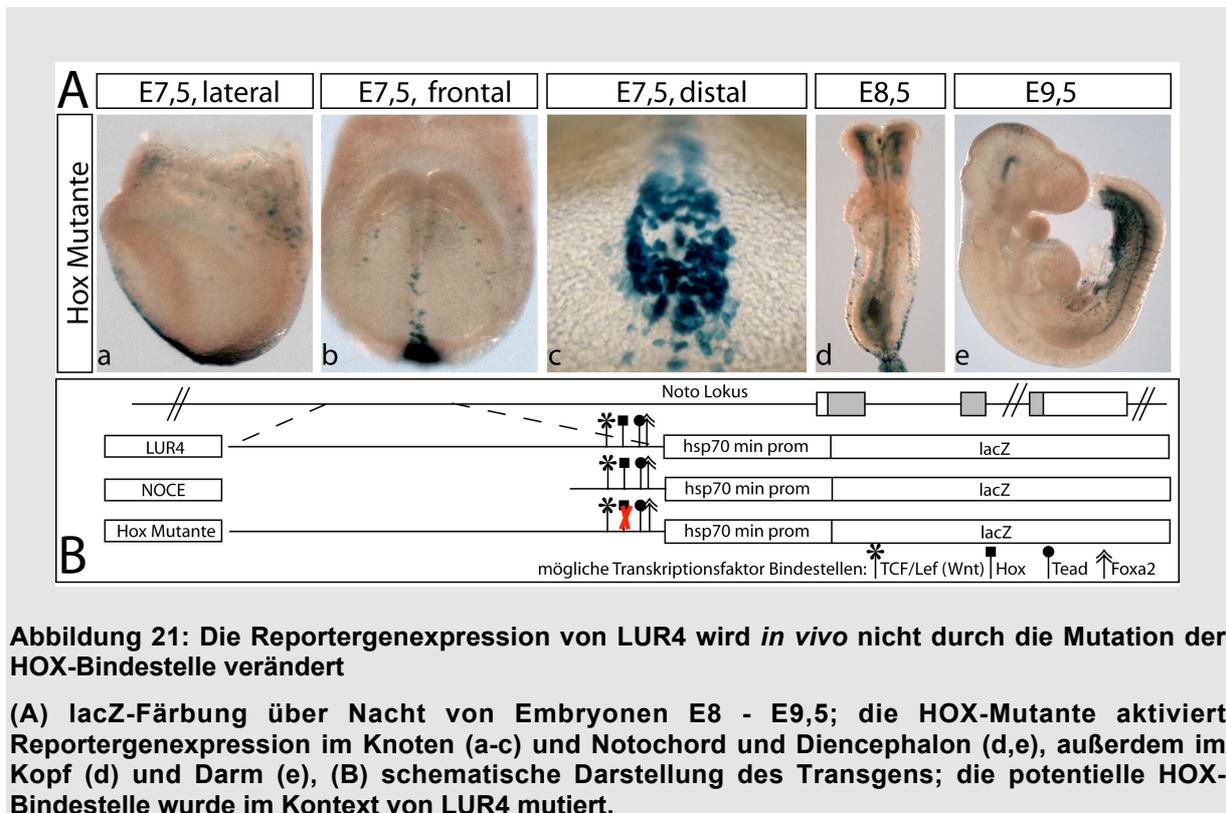


Abbildung 21: Die Reporterexpression von LUR4 wird *in vivo* nicht durch die Mutation der HOX-Bindestelle verändert

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; die HOX-Mutante aktiviert Reporterexpression im Knoten (a-c) und Notochord und Diencephalon (d,e), außerdem im Kopf (d) und Darm (e), (B) schematische Darstellung des Transgens; die potentielle HOX-Bindestelle wurde im Kontext von LUR4 mutiert.

NKX2-9 kann *in vitro* die Reporterogenaktivität bei LUR4 und NOCE reprimieren. *In vivo* ist diese Bindestelle nicht essentiell für die Aktivität von LUR4.

6.1.2.4 Untersuchung eines möglichen additiven Effekts von Wnt-Signalweg, Tead und Homeobox Transkriptionsfaktoren

Da die Reporterexpression durch NOCE sehr stark ist, wäre es möglich, dass ein schwacher Effekt, der durch die Mutation nur einer Bindestelle erzeugt wird nicht ausreicht, um eine signifikante Schwächung des Signals *in vivo* im Kontext des *Hprt*-Lokus zu erreichen. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass das Fehlen eines Faktors durch die anderen kompensiert werden könnte.

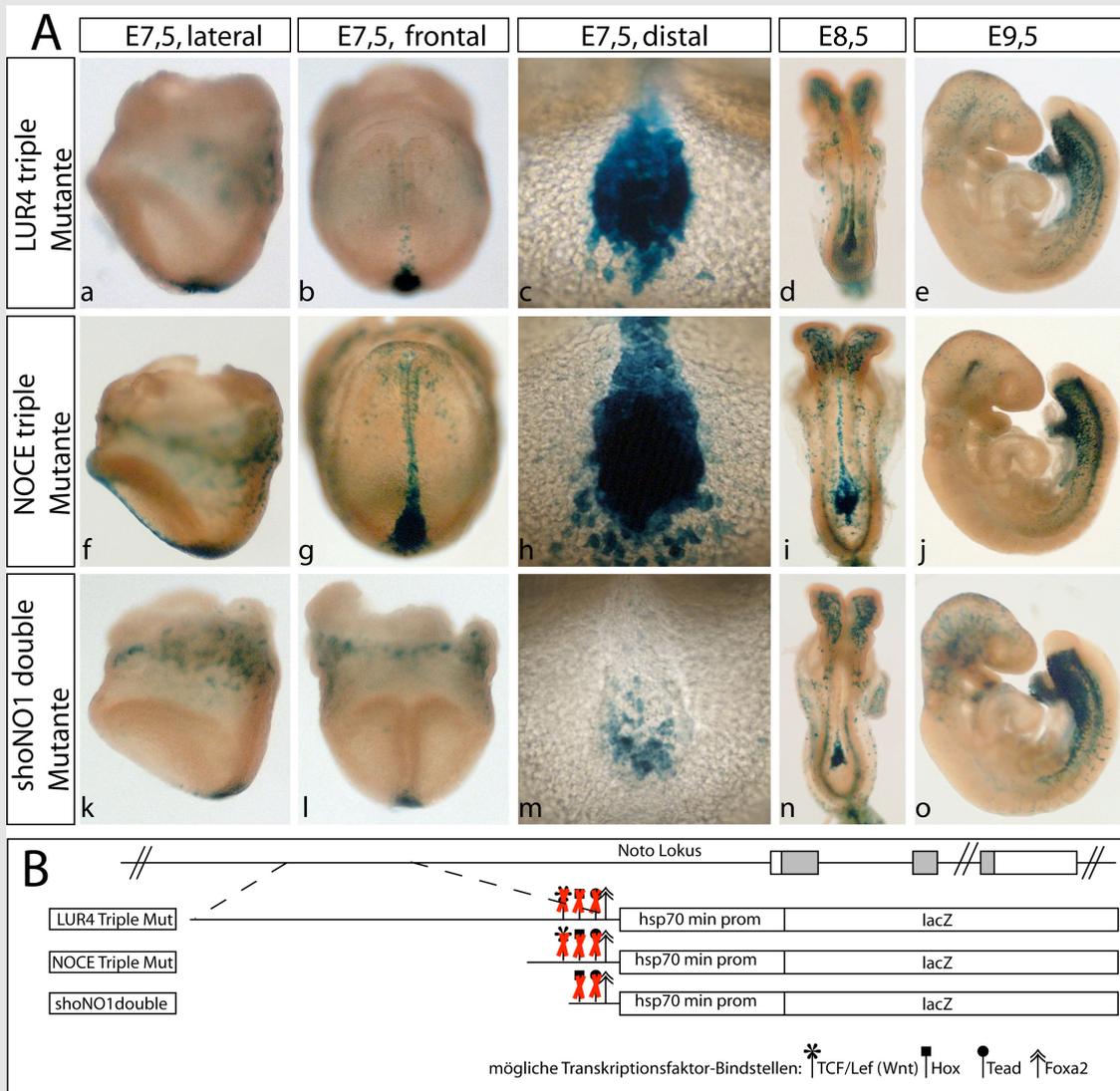


Abbildung 22: Die bislang untersuchten Mutationen haben keinen Einfluss auf die Reporterogenaktivität von LUR4, NOCE und shoNO1

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; die LUR4 dreifach-Mutante (a-e) und die NOCE dreifach-Mutante (f-j) aktivieren Reporterogenexpression im Knoten (a-c; f-h), Notochord und Diencephalon (d,e; i,j), außerdem im Kopf (d; i) und Darm (e; j), die shoNO1 zweifach-Mutante aktiviert schwache Reporterogenaktivität in Knoten (k-m) und Notochord (n,o), außerdem in Kopf (n) und Darm (o); Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene, die roten Kreuze markieren die Mutationen

Daher sollte ein möglicher Effekt durch die additive Wirkung dieser drei Faktoren untersucht werden, in dem die drei Bindestellen, für TCF/LEF1, TEAD und den Homeoboxfaktor, gleichzeitig mutiert wurden. Der Test aller bisheriger Mutanten erfolgte im Kontext von LUR4. Die dreifache Mutante wurde im Kontext von LUR4 und NOCE untersucht (Abbildung 22A), um zu zeigen, ob die beobachtete Reporterogenexpression nur durch Sequenzen aus NOCE reguliert wird, oder ob sie durch weitere Sequenzen aus LUR4 beeinflusst wird. Diese Konstrukte wurde *in vivo*

getestet. Die lacZ-Aktivität *in vivo* wurde von den Mutationen in LUR4 und NOCE nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 22A a-e). Die Beobachtungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der Reporterexpression der mutierten Konstrukte zueinander und zum Wildtyp.

Daher muss davon ausgegangen werden, dass die potentiellen Bindestellen, für TCF/LEF1, TEAD und den Homeobox-Faktor, *in vivo* im Kontext des *Hprt*-Lokus, nicht essentiell für die Aktivierung von NOCE sind.

6.1.2.5 Untersuchung der Regulation von NOCE durch FOXA2

In NOCE sind noch andere potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen enthalten. An eine dieser Stellen könnte der Transkriptionsfaktor FOXA2 binden. Bei FOXA2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der im Knoten und Notochord exprimiert ist. Allerdings ist er darüber hinaus noch in anderen Geweben exprimiert, wie dem Diencephalon, dem Darm und der Leberanlage.

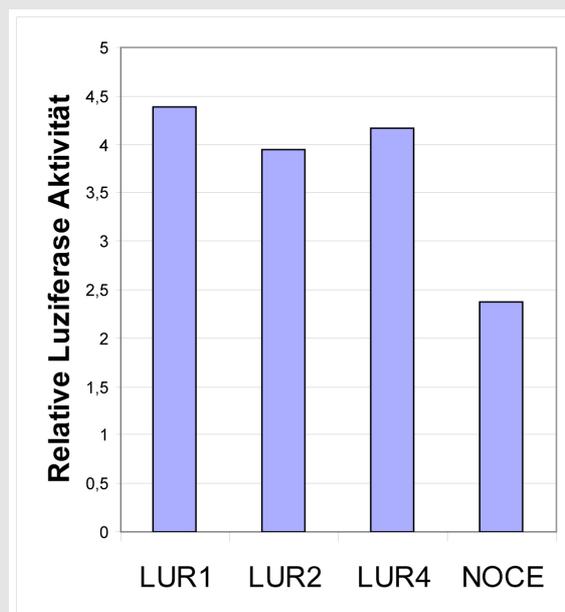


Abbildung 23: FOXA2 aktiviert die Reporterexpression von LUR1, 2, 4 und NOCE *in vitro*

Luziferase-Assay in HeLa-Zellen; FOXA2 kann die Aktivität von LUR1, LUR2 und LUR4 auf das 4fache steigern, bei NOCE wird die Aktivität etwa 2,5fach erhöht.

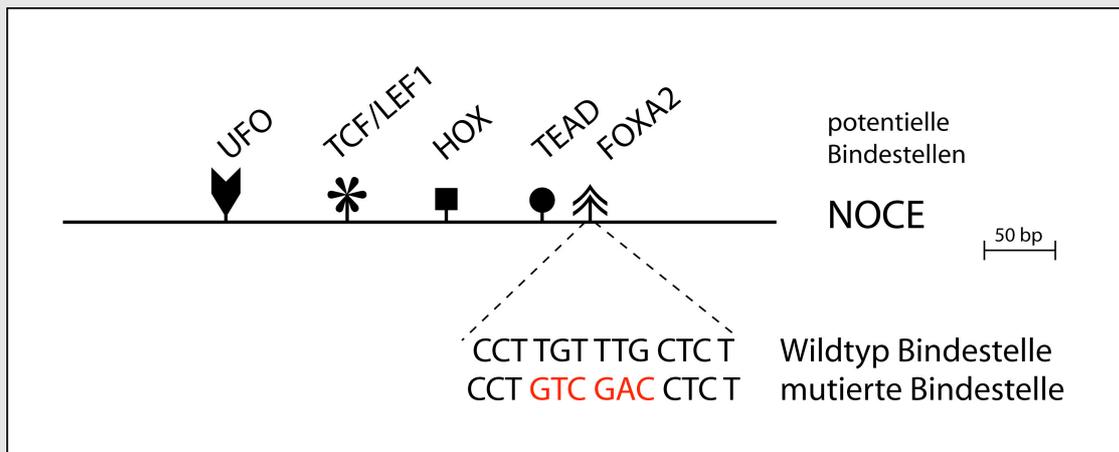


Abbildung 24: schematische Darstellung von NOCE mit der Mutation der potentiellen FOXA2-Bindestelle

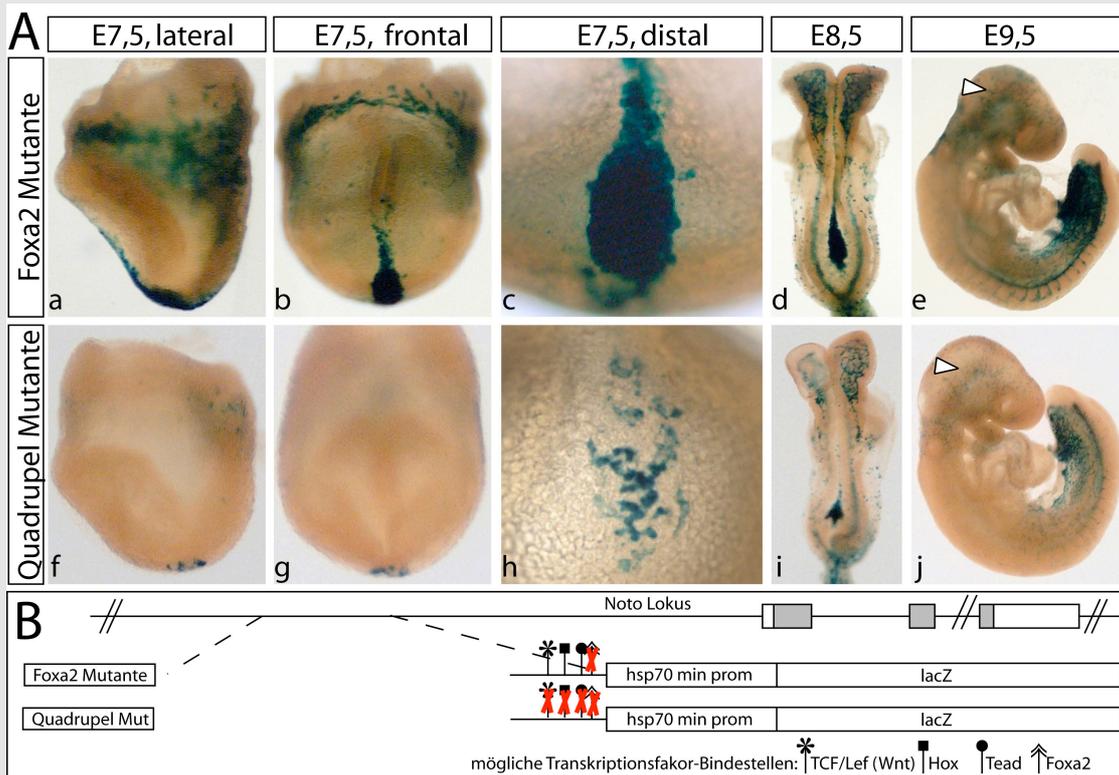


Abbildung 25: Die Mutation der FOXA2-Bindestelle beeinträchtigt die Reporterexpression *in vivo*

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; die FOXA2-Mutante (a-e) und die vierfach-Mutante der potentiellen TCF/LEF1, HOX, TEAD und FOXA2-Bindestellen (f-j) aktivieren Reporterexpression im Knoten (a-c; f-h) und Notochord (d,e; i,j), außerdem im Kopf (d; i), Dottersack und Darm (e; j), es gibt keine Reporteraktivität im Diencephalon (e,j weiße Pfeilspitze); Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene, die roten Kreuze markieren die Mutationen.

Luziferase-Assays zeigten, dass FOXA2 die Aktivität von LUR1, LUR2 und LUR4 auf etwa das 4,5fache steigert. FOXA2 kann die Aktivität von NOCE nur noch auf das 2fache erhöhen (Abbildung 23). Dies könnte darauf hindeuten, dass mehrere potentielle Bindestellen auch außerhalb von NOCE *in vitro* erkannt werden. Die potentielle FOXA2-Bindestelle in NOCE wurde mutiert (Abbildung 24) und getestet. *In vivo* führte die Mutation im Kontext von NOCE zu einer Verringerung der lacZ-Aktivität im Diencephalon (Abbildung 25A). Die Aktivität in Knoten und Notochord blieb erhalten (Abbildung 25Aa-e). Zusammen mit den drei weiteren bereits untersuchten Mutationen ergibt sich ein vergleichbares Bild. Allerdings waren in diesem Fall die Embryonen schwächer chimär (Abbildung 25A f-j), als bei anderen Konstrukten. Dadurch tragen weniger Zellen das Reporter-gen-Konstrukt. Dies ist aber nicht zu verwechseln mit einem Verlust der Reporter-genexpression durch geringere Aktivierung des Promoters. Die Reporter-genexpression der vierfachen Mutante wurde in den selben Domänen beobachtet wie bei der FOXA2-Mutante. Das Reporter-gen ist in Knoten, Notochord, Kopf, Dottersack und Darm exprimiert, aber nicht im Diencephalon. Die beginnende Reporter-genexpression war ebenfalls nach etwa 20min zu beobachten.

Dies zeigt, dass die Bindestelle für FOXA2 *in vivo* einen Einfluss auf die Reporter-genexpression durch NOCE hat.

FOXA2 reguliert NOCE und dadurch mit großer Wahrscheinlichkeit auch *Noto*.

6.1.2.6 Bedeutung einer potentiellen Bindestelle für einen unbekanntem Faktor

Durch Analyse der Sequenz von NOCE wurde ein weiterer Bereich identifiziert, der in anderen Säugetierspezies konserviert ist. Sawada et al. haben im *Foxa2* Promoter ein Element (CE) isoliert, das Genexpression im Knoten und posterioren Notochord aktivieren kann. Im Rahmen der vorangegangenen Untersuchungen im *Foxa2*-Lokus konnte nur für einen Teil von CE ein Interaktionspartner gefunden werden. Für den anderen Teil konnte kein Partner gefunden werden, obwohl die Notwendigkeit *in vivo* gezeigt wurde (Sawada et al., 2005). Der Teil dieses Elements, für den noch kein Interaktionspartner gefunden wurde, ähnelt einem Abschnitt von NOCE. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um eine potentielle Bindestelle für einen unbekanntem Faktor (UFO) handeln könnte, der sowohl an der Regulation von *Foxa2* wie auch der Regulation von NOCE und *Noto* beteiligt ist.

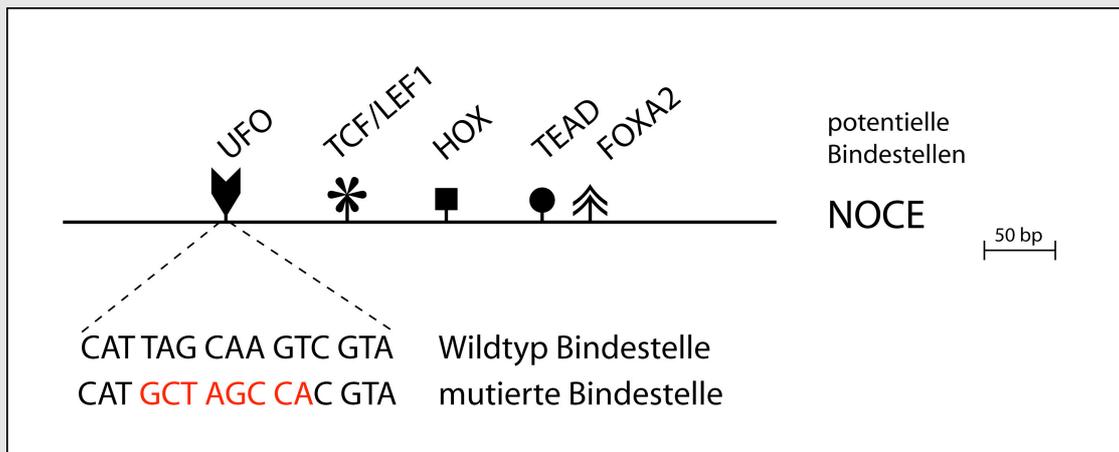


Abbildung 26: schematische Darstellung von NOCE mit der Mutation der potentiellen UFO-Bindestelle

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden 8 Basen in der potentiellen Bindestelle mutiert (Abbildung 26) und dies *in vivo* im Kontext von NOCE getestet. Die Mutation der Sequenz führt zu keiner Verringerung der Reporteraktivität. Tatsächlich nimmt die Reporteraktivität in der Leberanlage zu (Abbildung 27Aj, graue Pfeilspitze). Die Mutation der potentiellen UFO-Bindestelle führt zu stärkerer ektopischer Reporterexpression. In Kombination mit einer Mutation in der FOXA2 Bindestelle geht die lacZ-Aktivität in Notochord und Knoten vollständig verloren (Abbildung 27A). Dies zeigt, dass die Kombination der Bindestellen von FOXA2 und UFO *in vivo* essentiell ist für die Aktivierung von NOCE. Welcher Faktor an die UFO-Bindestelle bindet, ist bislang noch nicht bekannt und steht im Zentrum der weiteren Arbeiten. Ein weiteres Konstrukt sollte zeigen, ob die UFO-Bindestelle allein Reporteraktivität im Primitivknoten und Notochord aktivieren kann. Dazu wurde eine dreifache Wiederholung der potentiellen UFO-Bindestelle mit jeweils 15 bp davor und danach kloniert (3xUFO). Das resultierende Reportergenkonstrukt kann keine Reporteraktivität im Embryo, also auch nicht im Primitivknoten und Notochord, aktivieren.

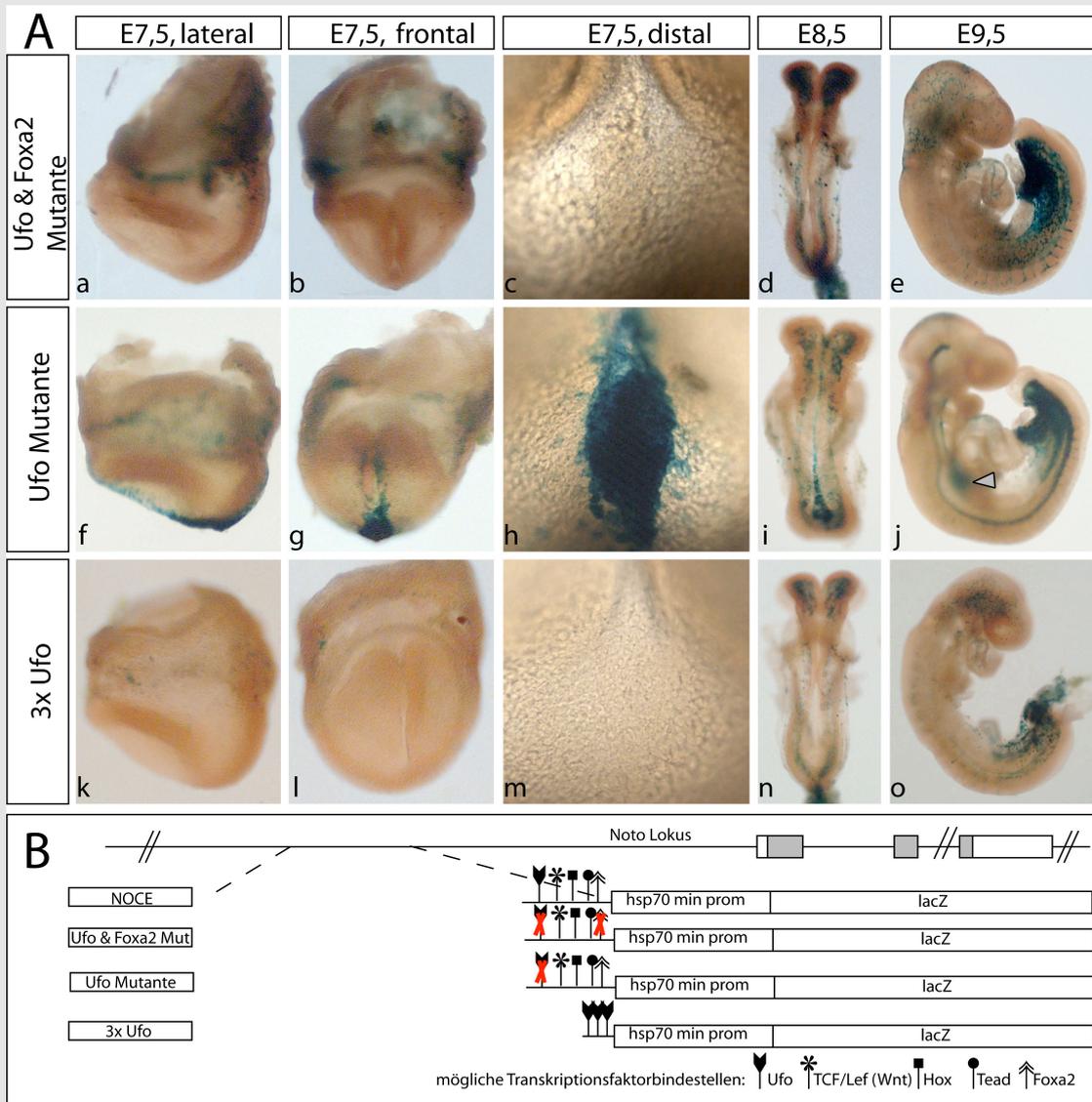


Abbildung 27: Die Mutation der UFO-Bindestelle beeinflusst *in vivo* die Reporterexpression, ist aber allein nicht hinreichend für Genexpression in Knoten und Notochord

(A) lacZ-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; NOCE mit Mutationen der FOXA2 und der UFO-Bindestellen (a-e) reicht nicht für Reporteraktivität in Knoten und Notochord aus, die ektopische Expression in Kopf und Darm bleibt erhalten; NOCE mit einer Mutation in der UFO-Bindestelle reicht aus für Reporteraktivierung in Primitivknoten (f-h), Notochord und Diencephalon (i,j), außerdem in Kopf (i), Darm (j), zusätzliche Expression wird in der Leberanlage beobachtet (j, graue Pfeilspitze); die dreifache Wiederholung der potentiellen UFO-Bindestelle (k-o) reicht nicht für Reporteraktivität in Knoten und Notochord aus, die ektopische Expression in Kopf und Darm bleibt erhalten, Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene, rote Kreuze markieren die Mutationen

Die UFO-Bindestelle ist in Kombination mit einer FOXA2-Bindestelle im Kontext des *Hprt*-Lokus essentiell für die Aktivierung von NOCE, aber sie ist allein nicht hinreichend zur Aktivierung der Reporterexpression.

6.1.3 Analyse von NOCE ohne heterologen Minimalpromoter

Da die Verwendung des *hsp70*-Minimalpromoters das Auftreten von ektopischer Reporterogenaktivität mit sich brachte, sollte das Verhalten von NOCE im Kontext mit dem endogenen Minimalpromoter untersucht werden. Im *Noto*-Lokus wird am ersten Exon kein TATA-Box Minimalpromoter vorhergesagt. Da der Minimalpromoter aber meistens in der Nähe des ersten Exons lokalisiert, wurde davon ausgegangen, dass die Region von etwa 400bp vor dem Beginn des ersten Exons bis zum Translationsstartkodon im ersten Exon den Minimalpromoter enthält. NOCE wurde vor diesen Bereich kloniert, wiederum mit *lacZ* als Reportergen (NOCE_{nativ}, Abbildung 28B).

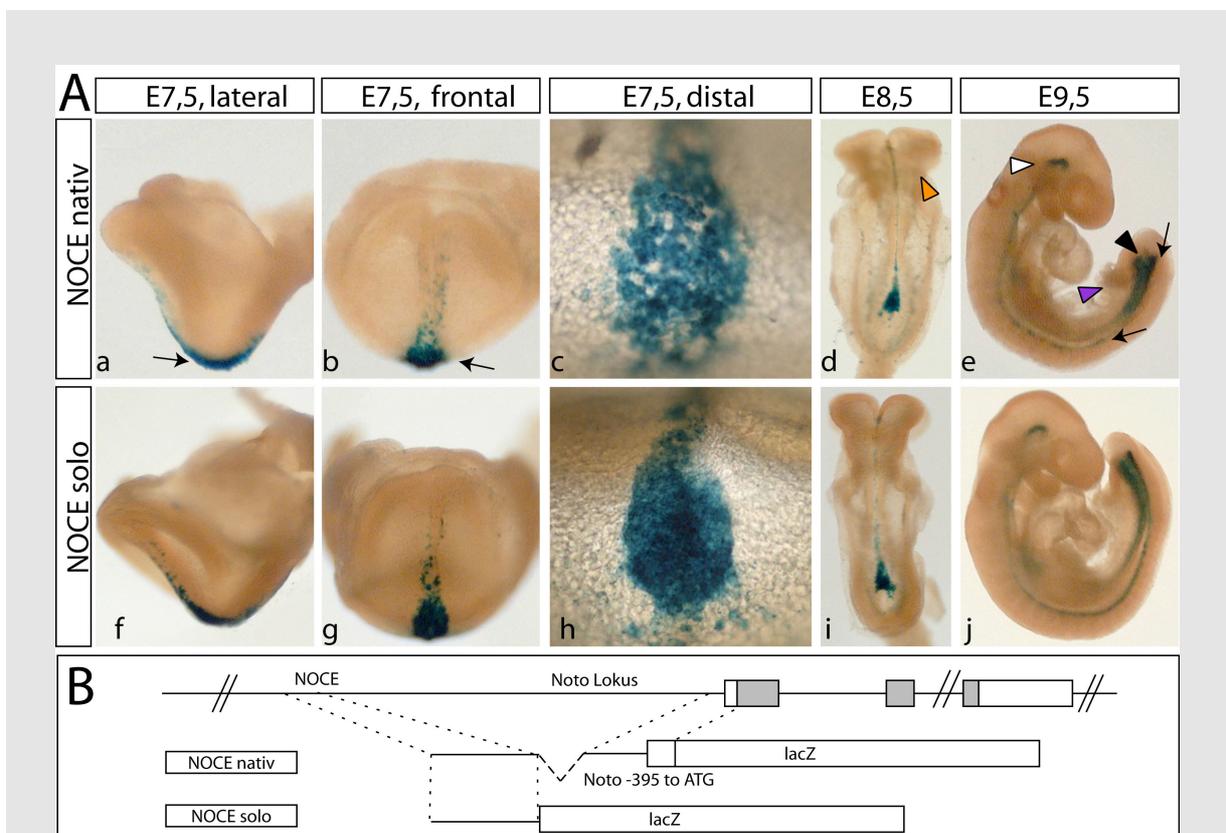


Abbildung 28: NOCE_{nativ} und NOCE_{solo} sind *in vivo* ausreichend für Reporterexpression in Knoten und Notochord

(A) *lacZ*-Färbung über Nacht von Embryonen E8 - E9,5; NOCE mit dem endogenen *Noto*-Minimalpromoter (a-e) reicht aus für Reporterexpression in Primitivknoten (a-c, Pfeile), Notochord (d,e Pfeile), Diencephalon (i,j, weiße Pfeilspitze), und Darm (j, schwarze Pfeilspitze), es wird keine Expression in Kopf (i, orange Pfeilspitze) und Dottersack (e, violette Pfeilspitze) beobachtet; NOCE_{solo} (f-j) aktiviert Reporterexpression in den selben Domänen wie NOCE_{nativ}, Spalte 1: laterale Ansicht von Embryonen E8, Spalte 2: frontale Ansicht, Spalte 3: Vergrößerung der distalen Ansicht, Spalte 4: dorsale Ansicht von Embryonen E8,5, Spalte 5: laterale Ansicht von Embryonen E9,5; (B) schematische Darstellung der Transgene.

NOCE_{nativ} zeigte spezifische Reporterexpression im Knoten sowie Notochord nach etwa 3h Färbedauer (Abbildung 28 a-e). Nach Färbung über Nacht war zusätzlich

schwache ektoische Expression im Diencephalon und dem Darm zu erkennen. Des Weiteren wurde NOCE ohne weiteren Minimalpromoter vor ein lacZ-Reporter gen kloniert, (NOCEsolo, Abbildung 28B). Auch dieses Konstrukt zeigte starke Reporter genaktivität in den beschriebenen Domänen, zuerst in Knoten und Notochord und später in Diencephalon und Darm (Abbildung 28A f-j). Die ektoischen Expressionsdomänen stimmen mit den Expressionsdomänen von *Foxa2* überein.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass NOCE bereits eine endogene Minimalpromoteraktivität besitzt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit NOCE ein Enhancer identifiziert und charakterisiert wurde, der hinreichend und notwendig ist, um robuste Genexpression im Knoten und Notochord zu aktivieren. Innerhalb von NOCE scheinen verschiedene regulatorische Elemente zusammen zu wirken. Einige potentielle Bindestellen für bekannte Faktoren sind zumindest im Kontext der Reporterkonstrukte im *Hprt*-Lokus nicht essentiell für die Aktivierung der Reporter genexpression durch NOCE. Jedoch wurde gezeigt, dass Bindestellen für FOXA2 und einen weiteren unbekanntem Faktor essentiell für die Aktivierung von NOCE sind. Darüber hinaus besitzt NOCE intrinsische Minimalpromoteraktivität.

6.2 Untersuchungen zu *Noto*-Zielgenen

6.2.1 Differentielle RNA-Hybridisierung von *Noto*-defizienten Embryonen

Noto ist im Knoten exprimiert und notwendig für die Ziliogenese im Primitivknoten und die Knoten-Morphogenese, zwei wichtige Prozesse während der Festlegung der Links-Rechts-Achse. *Noto* kodiert für einen Homeobox-Transkriptionsfaktor, zu dessen Zielgenen zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war. Zum besseren Verständnis, der von *Noto* regulierten Prozesse während der Festlegung der Links-Rechts-Achse, war es ein Ziel dieser Arbeit solche Gene zu identifizieren, die in ihrer Regulation direkt oder indirekt von *Noto* abhängen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von Embryonen, die kein NOTO mehr exprimieren, mit Embryonen, die noch eine funktionelle Kopie des *Noto*-Gens besitzen, verglichen. Dafür wurde eine mutante Mauslinie benutzt, die bereits im Labor etabliert war. Diese

Mutante trägt ein Allel, in dem *Noto* durch die codierende Sequenz für grün-fluoreszierendes Protein (GFP) mit Stop-Kodon und PolyA-Signal im Translations-Start-Kodon von *Noto* ersetzt wurde. In Kombination mit der gleichzeitigen Deletion des Bereichs der kodierenden Sequenz von *Noto*, der für die DNA-bindende Domäne kodiert, kann kein funktionelles NOTO mehr hergestellt werden (Abdelkhalek et al., 2004). Ohne den Einfluss von *Noto* wurde erwartet, dass jene Gene, die regulatorisch von *Noto* abhängen, in der Stärke ihrer Expression verändert wurden. Um auszuschließen, dass die Überexpression von GFP Einfluss auf das Expressionsprofil nehmen kann, wurde hier das Expressionsprofil von Embryonen die homozygot mutant waren (*Noto*^{GFP/GFP}) mit dem von heterozygoten Embryonen (*Noto*^{GFP/+}) verglichen. Bei *Noto*^{GFP} handelt es sich um eine autosomal rezessive Mutation. Ein mutanter Phänotyp ist nur bei Fehlen beider funktioneller Allele zu beobachten. Daher wurde davon ausgegangen, dass zur Aufrechterhaltung der Genexpression eine Kopie von *Noto* ausreichend ist und Verfälschungen durch GFP-Expression so besser ausgeglichen werden konnten. Für den Vergleich der Expressionsmuster wurden RNA-Microarray Hybridisierungen durchgeführt. Als Probe wurde gesamt RNA von Embryonen im späten Kopffaltenstadium (E8) verwendet. Die Embryonen wurden von allen extra-embryonalen Membranen befreit. Zur RNA Probe trugen nur Gewebe bei, die später zum Körper beitragen.

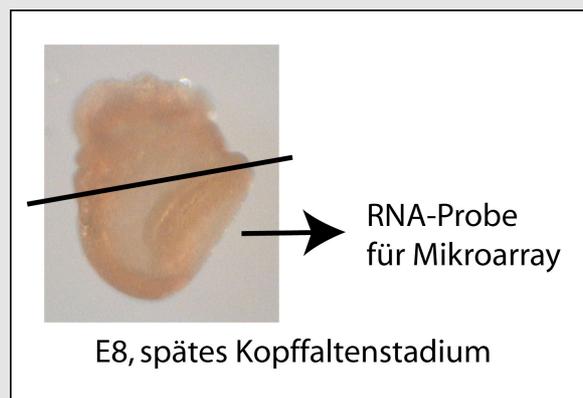


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Gewebe, die für die differentielle Hybridisierung gesammelt wurden

Jeweils 6-8 Embryonen wurden zu einer RNA-Probe zusammengefasst. Je zwei mutante RNA-Proben und zwei Vergleichsproben wurden vorbereitet. Zur Herstellung der RNA-Proben wurden nur Embryonen im späten Kopffaltenstadium verwendet, die noch keine Somiten gebildet hatten. Dieses Stadium wurde streng eingehalten, um möglichst homogene Proben zu erhalten. Bereits innerhalb eines

Wurfes können die Unterschiede in der Entwicklung mehrere Stunden betragen. Zu dem gewählten Zeitpunkt beginnen unter anderem die Gastrulation und die Somitogenese, wodurch es innerhalb von kurzer Zeit zu einer drastischen Veränderung des Expressionsprofils kommt. Durch die besonders strikte Einhaltung eines kleinen Zeitfensters in der Entwicklung, sollten Einflüsse auf das Expressionsprofil durch fortschreitende Entwicklungsprozesse so gering wie möglich gehalten werden. Die RNA-Mikroarray-Hybridisierungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Pharmakologie, MHH) durchgeführt. Es wurden insgesamt drei Hybridisierungen durchgeführt, jeweils zwei Paare gegen einander und in der dritten Hybridisierung wurde die mutante Probe, aus der einen Hybridisierung, mit der Vergleichsprobe aus der anderen Hybridisierung verglichen („Kreuzprobe“). Die Ergebnisse aller drei Hybridisierungen wurden verglichen. Im Folgenden wurden die Gene betrachtet, die in allen drei Hybridisierungen gleichermaßen verändert waren.

Nach Auswertung der drei Hybridisierungen wurden 108 Gene gefunden, die scheinbar durch das Fehlen von *Noto* dereguliert waren. 31 Gene waren mehr als das 1,5fache herauf reguliert und 77 waren in den Mutanten stärker als das 0,65fache herunter reguliert, im Vergleich zur heterozygoten Kontrolle. Einige Gene wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da sie ebenfalls in weiteren *Noto*-unabhängigen Mikroarray-Experimenten dereguliert waren. Sie schienen also ein Hintergrund der Methode oder des speziellen Chips zu sein

Mit Unterstützung von Dr. Anja Beckers und Anna Trincone wurden 45 potentielle Zielgene mit Hilfe von Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen (*Whole Mount In Situ Hybridisation*, WISH) auf ihr Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung hin untersucht. Viele der untersuchten Gene sind nicht oder nicht nur mit *Noto* koexprimiert. Für einige Faktoren wurde keine Expression in embryonalen Geweben von E7,5 bis E9,5 festgestellt. Andere Gene sind in diesem Zeitraum ubiquitär exprimiert. Für weitere Untersuchungen wurden diese Gene nicht ausgewählt.

Eine weitere Gruppe von Genen verändert ihre Expression etwa zum Zeitpunkt der Probennahme. Beispielweise durch die Gastrulation und die Entwicklung der Kopfregeion werden im späten Kopffaltenstadium viele Gene stark herauf oder herunter reguliert. Da diese Prozesse unabhängig von *Noto* stattfinden, wurden diese Gene nicht weiter untersucht. Das Ziel war, neue potentielle Zielgene von *Noto* zu finden. Als ein Anzeichen dafür wurde die spezifische Expression im

Primitivknoten oder Notochord betrachtet. Im Rahmen dieses Mikroarrays wurden neun Gene identifiziert, die spezifisch im Primitivknoten exprimiert werden. Keines der Gene wird mit *Noto* im Notochord koexprimiert. Unter den neun potentiellen Zielgenen sind vier, deren Funktion in Zusammenhang mit der Ziliogenese gebracht werden kann. Dazu gehören *Foxj1*, *Tektin2*, *Dync2h1* und *Dynlrb2*. Des Weiteren wurden fünf Gene mit unbekannter Funktion identifiziert. Auf diese neun Gene wird im Folgenden eingegangen.

6.2.1.1 Untersuchung von *0710001D07Rik*

Die Expression von vier Genen, die herauf reguliert waren, wurde untersucht. Dabei wurde nur eine cDNA (*0710001D07Rik*) identifiziert, die spezifisch im Knoten exprimiert ist (Abbildung 30a,b). Im Mikroarray war das Signal von *0710001D07Rik* auf das 1,5fache verstärkt. In *Noto*-defizienten Embryonen konnte allerdings keine wesentliche Änderung der Expression festgestellt werden. Allerdings ist die WISH keine quantitative Methode, daher könnte die 1,67fache Verstärkung des Expression zwar vorliegen, aber mit Hilfe von WISH nicht zu erkennen sein.

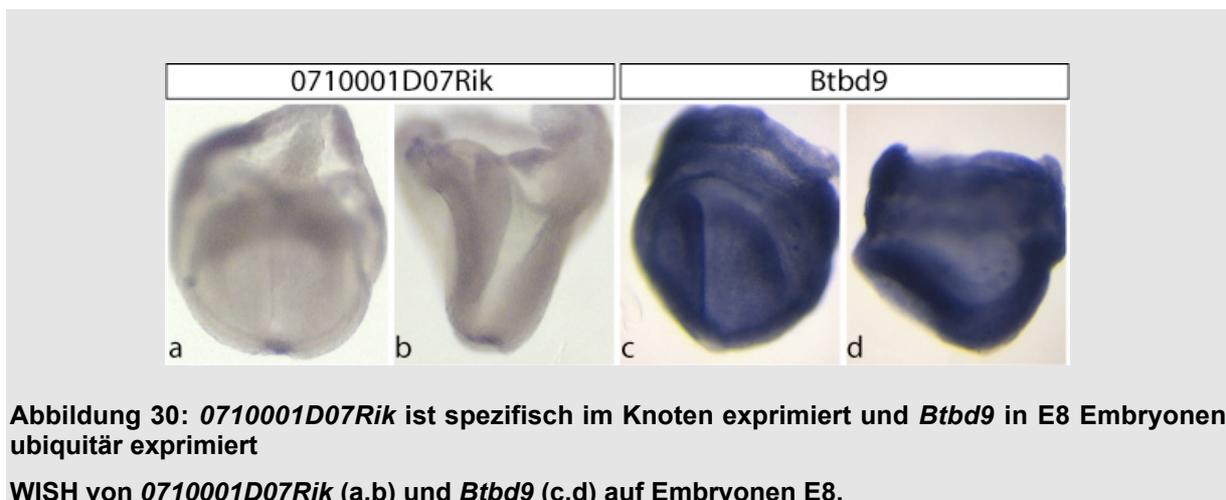


Abbildung 30: *0710001D07Rik* ist spezifisch im Knoten exprimiert und *Btbd9* in E8 Embryonen ubiquitär exprimiert

WISH von *0710001D07Rik* (a,b) und *Btbd9* (c,d) auf Embryonen E8.

Da *0710001D07Rik* scheinbar für kein Protein kodiert und auch nur aus einem Exon besteht, wurden keine weiteren Analysen durchgeführt. Allerdings ist auffällig, dass *Btbd9* im Microarray herauf reguliert ist. *Btbd9* ist zwar nicht spezifisch im Knoten exprimiert (Abbildung 30c,d), aber die Transkriptionsstarts von *Btbd9* und *0710001D07Rik* liegen nahe bei einander. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Verlust von *Noto* einen Einfluss auf die Expression dieser Gene hat.

6.2.1.2 Untersuchung der Expression von potentiellen *Noto*-Zielgenen mit unbekannter Funktion

Im Rahmen des Mikroarray wurden vier Gene mit unbekannter Funktion als potentielle Zielgene von *Noto* identifiziert. Die Expression dieser Gene ist in den

Noto-Mutanten reduziert. WISH zeigte in allen vier Fällen Koexpression mit *Noto* im Primitivknoten der Maus. In den *Noto*-Mutanten wurde diese Expression stark reduziert.

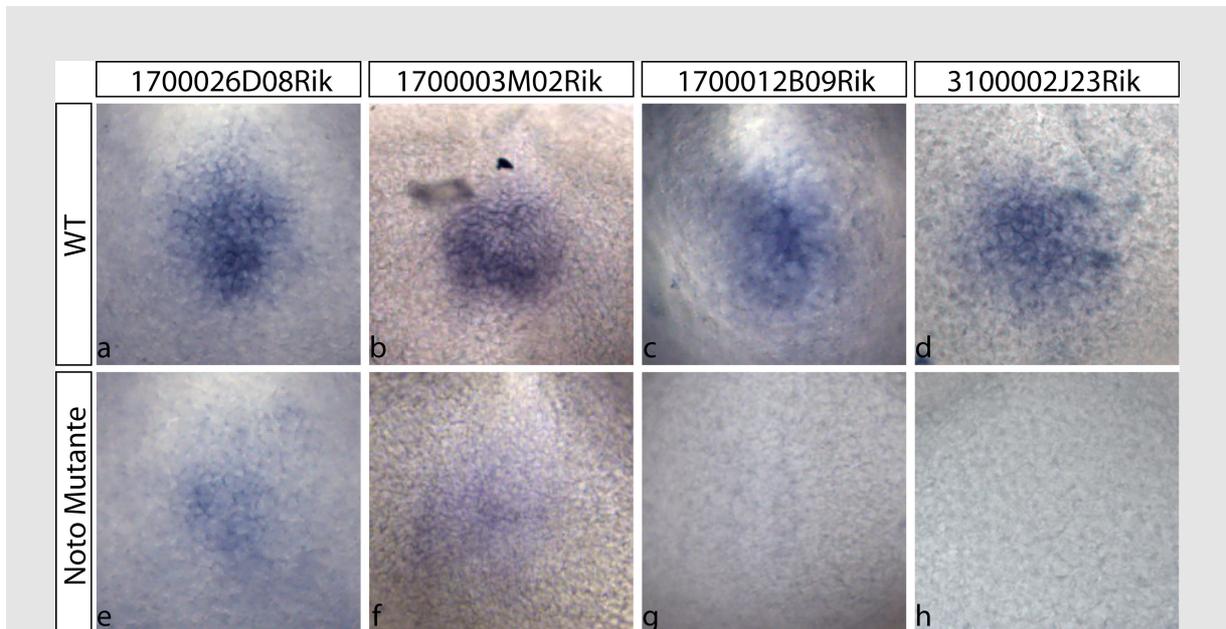


Abbildung 31: Vier potentielle *Noto*-Zielgene mit unbekannter Funktion sind spezifisch im Knoten exprimiert und in *Noto*^{GFP/GFP}-Embryonen reduziert oder abwesend

WISH auf Embryonen E8, von *1700026D08Rik* in Wildtyp (WT) (a) und in *Noto*-Mutanten (e), *1700003M02Rik* im WT (b) und in *Noto*-Mutanten (f), *1700012B09Rik* in WT (c) und in *Noto*-Mutanten (g), *3100002J23Rik* in WT (d) und in *Noto*-Mutanten (h).

1700026D08Rik war im Mikroarray in den *Noto*-Mutanten auf 65% reduziert. Durch WISH wurde nur eine sehr schwache Expression sichtbar. *1700026D08Rik* (Abbildung 31a,e) ist ein Gen mit unbekannter Funktion, welches für ein hypothetisches Protein, mit einer Serin-Protease-Domäne, kodiert.

1700003M02Rik war im Mikroarray auf 64% reduziert und zeigte durch WISH nur noch schwache Expression im Knoten der *Noto*-Mutanten (Abbildung 31b,f).

Die Expression von *1700012B09Rik* war im Mikroarray auf 60% reduziert, aber mit WISH in *Noto*-Mutanten nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 31c,g).

Das Signal von *3100002J23Rik* war im Mikroarray auf 56% reduziert, durch WISH wurde keine Expression im *Noto*-defizienten Primitivknoten nachgewiesen (Abbildung 31d,h).

1700003M02Rik kodiert für ein hypothetisches Protein ohne bekannte Domänen, ebenso wie *1700012B09Rik* und *3100002J23Rik*. Für alle vier Gene mit unbekannter Funktion wurde gezeigt, dass sie Knoten-spezifisch exprimiert sind. Der Verlust von *Noto* führt zu einer verringerten Expression. Ein Hinweis auf eine Funktion im Zusammenhang mit Aufbau und Funktion der Zilien ist, dass alle vier

Gene in einer der Datenbanken über das Proteom der Zilien aufgeführt sind. Diese basieren allerdings nicht auf experimentellen Daten, sondern nur auf Datenbankanalysen. In unserem Labor wurde gezeigt, dass diese Gene auch in anderen Zilien-tragenden Geweben exprimiert sind. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um potentiell neue Faktoren in der Ziliogenese oder Primitivknoten-Morphogenese handeln könnte.

6.2.1.3 Untersuchung der Expression potentieller *Noto*-Zielgene mit teilweise bekannter Funktion

Dynlrb2 kodiert für eine leichte Kette von zytoplasmatischen Dyneinkomplexen. Zytoplasmatische Dyneine sind am retrograden Transport (IFT) beteiligt. Für *Dynlrb2* wurde bisher noch kein experimenteller Beweis für die Beteiligung am IFT erbracht, allerdings ist die Expression in Zilien-tragendem Gewebe ein Hinweis darauf. *Dynlrb1* ist am retrograden Transport an Mikrotubuli innerhalb der Zelle beteiligt (Wanschers et al., 2008). Die Knoten-spezifische Expression von *Dynlrb2* könnte auf eine Beteiligung am retrograden IFT hinweisen.

Durch WISH wurde gezeigt, dass *Dynlrb2* spezifisch im Primitivknoten der Maus exprimiert ist (Abbildung 32a). *Dynlrb2* ist im Mikroarray auf etwa 48% in den *Noto*-Mutanten reduziert. Mit Hilfe von WISH wurde im *Noto*-defizienten Knoten kein *Dynlrb2* mehr nachgewiesen (Abbildung 32e).

Mit *Dync2h1* wurde ein weiteres zytoplasmatisches Dynein als potentielles Zielgen von *Noto* identifiziert. In unabhängigen Experimenten wurde gezeigt, dass Mutanten für *Dync2h1* Links-Rechts-Defekte und weitere Ziliopathien aufweisen (Huangfu and Anderson, 2005). Die Zilien in *Dync2h1*-Mutanten sind zwar noch vorhanden, aber die Morphologie scheint verändert zu sein, wie Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten. Durch die auftretenden Defekte wird davon ausgegangen, dass *Dync2h1* eine Rolle in der Ziliogenese und dem retrograden IFT spielt.

Die Expression von *Dync2h1* wurde bislang nur mit Hilfe eines lacZ-Reportergens im *Dync2h1*-Lokus gezeigt werden. Hier wird die Expression von *Dync2h1* im Primitivknoten auf RNA-Ebene gezeigt (Abbildung 32b). *Dync2h1* ist laut Microarray in den *Noto*-Mutanten auf etwa auf 45% reduziert. Bei einer WISH ist dieser Unterschied noch gravierender, da keine Expression von *Dync2h1* in den *Noto*-Mutanten nachgewiesen wurde (Abbildung 32f).

Durch Kombination von Literaturrecherche und den differentiellen Hybridisierungen wurde mit *Tektin2* noch ein weiteres potentielles Zielgen von *Noto* gefunden. Tektine

lokalisieren an den Basalkörpern und Zentrosomen. Sie haben eine Microtubuli stabilisierende Funktion (Marshall, 2008).

Tektin2 ist spezifisch im Primitivknoten der Maus exprimiert (Abbildung 32c). Im Mikroarray ist *Tektin2* etwa auf 80% in den *Noto*-Mutanten herunterreguliert. Durch WISH wurde eine noch schwächere Expression festgestellt. Die Expression von *Tektin2* ist in den *Noto*-Mutanten stark reduziert (Abbildung 32g).

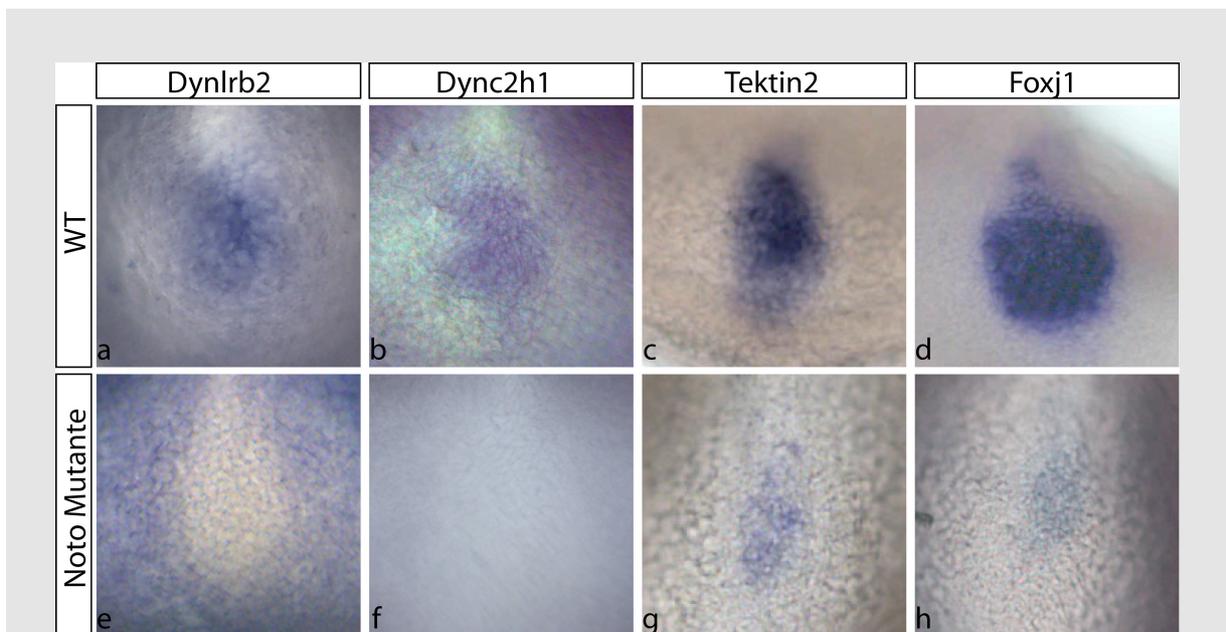


Abbildung 32: Die Expression *Dynlrb2*, *Dync2h1*, *Tektin2* und *Foxj1* ist in *Noto*^{GFPiGFP}-Mutanten reduziert oder abwesend

WISH auf Embryonen E8, von *Dynlrb2* in Wildtyp (WT) (a) und in *Noto*-Mutanten (e), *Dync2h1* im WT (b) und in *Noto*-Mutanten (f), *Tektin2* in WT (c) und in *Noto*-Mutanten (g), *Foxj1* in WT (d) und in *Noto*-Mutanten (h).

Ein weiteres Gen, für das bereits gezeigt wurde, dass es eine unabdingbare Bedeutung für die Ziliogenese in allen Zilien-tragenden Geweben hat, ist ebenso in *Noto*-Mutanten herunter reguliert. Dabei handelt es sich um *Foxj1*. *Foxj1* spielt eine übergeordnete Rolle in der Ziliogenese. Es wurde in unabhängigen Experimenten gezeigt, dass es durch den Verlust von *Foxj1* zu einem vollständigen Verlust der Zilien in den Zilien-tragenden Zellen des respiratorischen Epithels der Lunge kommt (Brody et al., 2000). Des Weiteren ist *Foxj1* im Primitivknoten exprimiert (Abbildung 32d) und *Foxj1*-Mutanten haben Defekte in der Festlegung der Links-Rechts-Achse. Allerdings zeigten bisherige Daten keine Defekte in den Zilien im Knoten. (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998)

Die *Foxj1*-Expression in *Noto*-Mutanten ist laut Mikroarray auf 47% reduziert. Durch die WISH wurde eine fast vollständige Abwesenheit der *Foxj1*-Expression in den *Noto*-Mutanten bestätigt (Abbildung 32h).

6.3 Analyse von *Foxj1* im Primitivknoten der Maus

Der Transkriptionsfaktor *Noto* wird zur Morphogenese des Primitivknotens und zur Ziliogenese im Primitivknoten benötigt. Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, gehört *Foxj1* zu den Zielgenen von *Noto*. *Foxj1* kodiert für einen Forkhead-Transkriptionsfaktor. Wie bereits erwähnt hat *Foxj1* in der Ziliogenese eine große Bedeutung für alle Gewebe, die bislang untersucht wurden (Brody et al., 2000). Der Verlust von *Foxj1* führt zu Defekten in der Festlegung der Links-Rechts-Achse. Die genaue Funktion von *Foxj1* im Knoten ist jedoch noch unklar, denn bisher wurde beschrieben, dass die Zilien im Primitivknoten von *Foxj1*-Mutanten normal erscheinen. Daher wurde die Funktion von *Foxj1*, als einem Effektor von *Noto*, im Primitivknoten erneut genauer untersucht, um zu differenzieren, welche spezifischen Funktionen *Noto* und *Foxj1* im Knoten haben.

6.3.1 Expression von *Foxj1* im Primitivknoten

Zu nächst wurde die Expression von *Foxj1* im Embryonalknoten der Maus untersucht, um ein Expressionsprofil zu erstellen. Die Expression von *Foxj1* beginnt am Tag E7. *Foxj1* wird im mittleren Gastrula-Organizer am anterioren Ende des Primitivstreifens hoch reguliert (Abbildung 33a). Die Expression wird bis zum *zero bud*-Stadium immer stärker (Abbildung 33f,g).

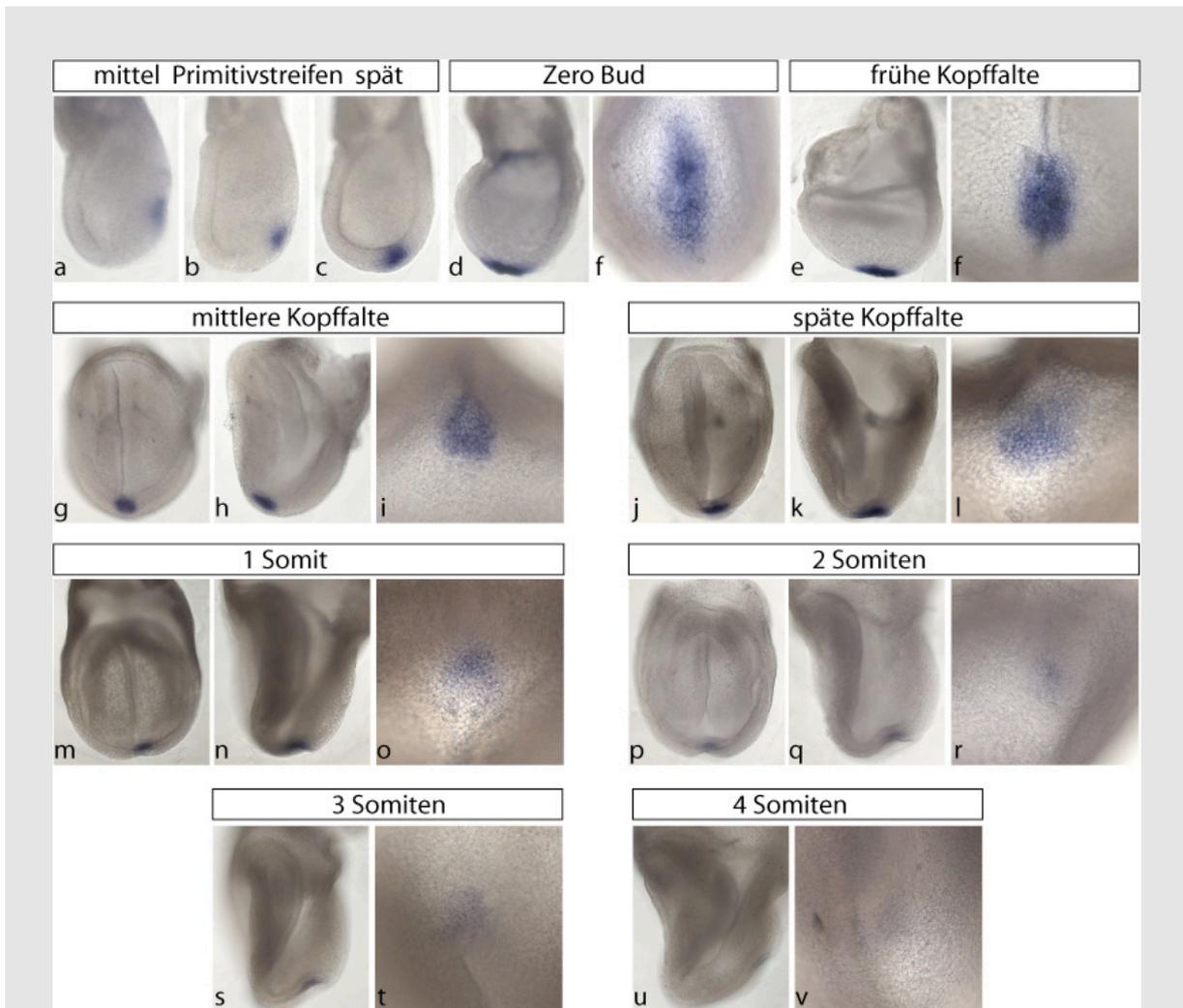


Abbildung 33: *Foxj1* wird vom mittleren Primitivstreifenstadium bis zum 4. Somiten exprimiert

WISH von *Foxj1* auf Embryonen unterschiedlicher Stadien, die Expression von *Foxj1* beginnt im mittleren Gastrula-Organizer (a) und verstärkt sich bis zum späten Kopffaltenstadium (j-l), danach wird die Expression von *Foxj1* wieder reduziert und verschwindet etwa mit der Bildung des 4. Somiten (u,v); (a-c) Primitivstreifenstadien, laterale Ansichten; zero bud-Stadium (d) laterale Ansicht, (f), Vergrößerung der dorsalen Ansicht; frühes Kopffaltenstadium (e) laterale Ansicht, (f) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; mittleres Kopffalten-Stadium (g) frontale, (h) laterale Ansicht, (i) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; spätes Kopffalten-Stadium (j) frontale, (k) laterale Ansicht, (l) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; 1-Somiten-Stadium (m) frontale, (n) laterale Ansicht, (o) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; 2-Somiten-Stadium (p) frontale, (q) laterale Ansicht, (r) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; 3-Somiten-Stadium (s) laterale Ansicht, (t) Vergrößerung der dorsalen Ansicht; 4-Somiten-Stadium (u) laterale Ansicht, (v) Vergrößerung der dorsalen Ansicht.

Am Stärksten ist die Expression im Kopffaltenstadium (Abbildung 33j-l), wenn der Knoten seine endgültige Morphologie ausgebildet hat und die Festlegung der Links-Rechts-Achse induziert wird.

Darüber hinaus wird *Foxj1* mit Beginn der Somitogenese im posterioren Notochord (PNC) zunehmend schwächer exprimiert. Diese Domäne bleibt etwa bis zur Ausbildung des 4. Somiten erhalten (E8,25) (Abbildung 33u,v).

Foxj1 ist über den gesamten Zeitraum der Festlegung der Links-Rechts-Asymmetrie im Knoten exprimiert. Die Expression von *Noto* und *Foxj1* beginnt etwa zur selben Zeit, während *Foxj1* mit der Bildung des 4. Somiten herunter reguliert wird, bleibt die Expression von *Noto* im posterioren Notochord erhalten.

6.3.2 Untersuchung der Knotenmorphologie und Ziliogenese in *Foxj1*-Mutanten

Wie bereits erwähnt, deuteten vorangegangene Analysen darauf hin, dass die Zilien im Knoten äußerlich normal sind. Sie sollen dieselbe Länge wie Wildtyp-Zilien haben und wiesen scheinbar keinerlei Deformierungen auf. Nicht nur die Zilien scheinen normal, auch die Knoten-Morphologie schien in vorangegangenen Untersuchungen normal. (Zhang et al., 2004; Brody et al., 2000)

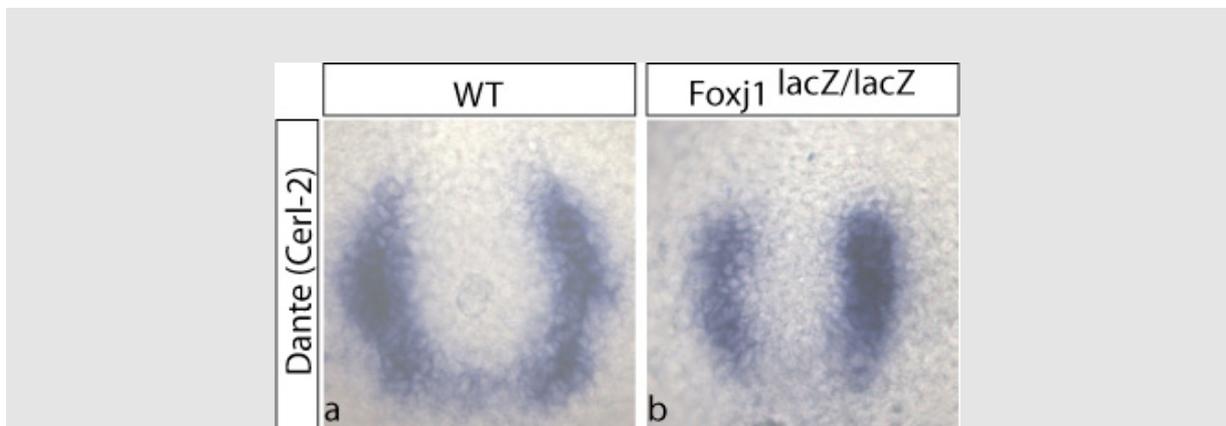


Abbildung 34: *Dante* ist in *Foxj1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen E8 hufeisen-förmig um den Knoten exprimiert

WISH von *Dante* (einem Kronenzell-Marker) auf Embryonen E8 WT (a) und *Foxj1^{lacZ/lacZ}* (b).

Mit Hilfe von WISH mit einer Probe für *Dante*, einem Gen, das in den Kronenzellen des Knotens exprimiert ist, wurde gezeigt, dass diese scheinbar normal um die Knotengrube verteilt sind (Abbildung 34). Bei *Noto*-Mutanten ist dies nicht mehr der Fall, hier erscheinen Kronen- und Grubenzellen durchmischt.

Um mögliche andere Veränderungen in der Knoten-Morphologie und den Zilien im Knoten zu untersuchen, wurden rasterelektronenmikroskopische (REM) Analysen von Wildtyp und *Foxj1*-defizienten Embryonen aus demselben Wurf durchgeführt (Abbildung 35). Diese Untersuchungen zeigten, dass der Knoten der *Foxj1*-Mutanten (Abbildung 35d) in der Morphologie dem Wildtyp (Abbildung 35a) stark ähnelt. Im späten Kopffaltenstadium wurde eine gut ausgebildete Grube aus Zilien-tragenden Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu sind bei *Noto*-Mutanten deutliche Defekte zu beobachten. In *Noto*-Mutanten wird keine Grube ausgebildet, die Grubenzellen

liegen verstreut in mehreren Gruppen vor. Die Ausbildung der Grube des Embryonalknotens in den *Foxj1*-Mutanten ist im Gegensatz zu *Noto*-Mutanten normal.

Allerdings erschien der Knoten der *Foxj1*-Mutanten kleiner im Vergleich zum Wildtyp. Nach Zählen aller Zellen in der Grube wurde festgestellt, dass die Anzahl der Zellen in der Grube durch den Verlust von *Foxj1* verringert wird. Ein Wildtyp-Knoten enthält durchschnittlich 350 Zellen, während der *Foxj1*-defiziente Knoten nur etwa 188 Zellen umfasst (Abbildung 36A).

Die REM-Bilder zeigten außerdem, dass die Zilien im Knoten von *Foxj1*-defizienten Embryonen im Gegensatz zu den schon erwähnten vorangegangenen Veröffentlichungen (Brody et al., 2000; Chen et al., 1998) deutlich durch den Verlust von *Foxj1* beeinträchtigt werden. Die Länge der Zilien ist stark reduziert. Die Wildtyp-Zilien sind etwa 2,5µm lang (Abbildung 35b,c), während die Zilien in *Foxj1*-Mutanten nur etwa 1,4µm lang sind (Abbildung 35e,f)(Abbildung 36B).

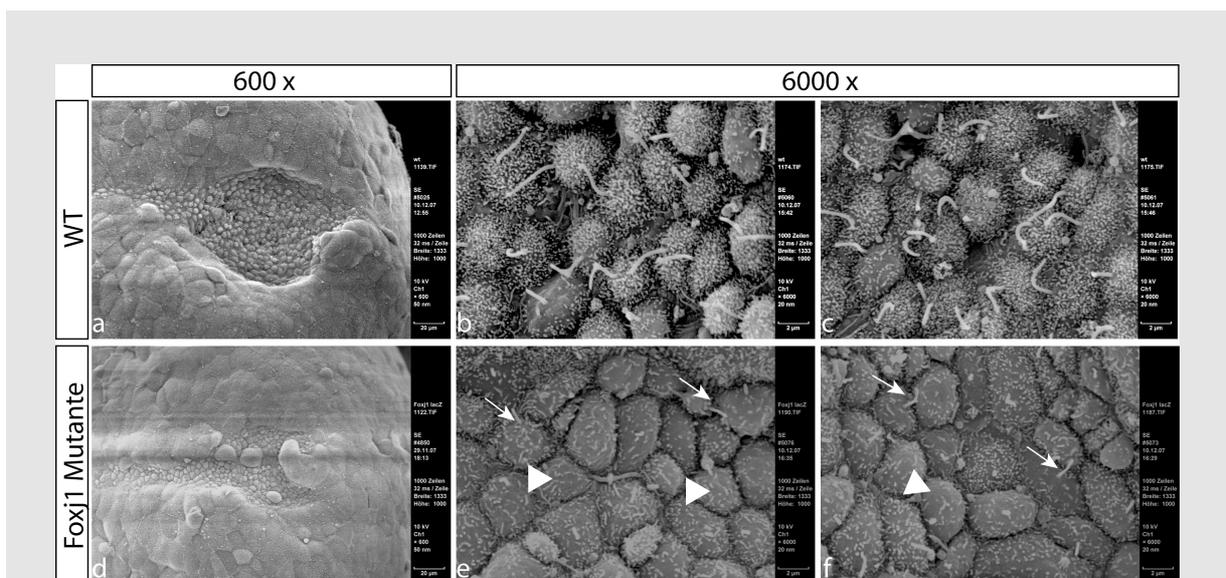


Abbildung 35: Der Knoten von *Foxj1*-Mutanten ist kleiner und die Zilien sind verkürzt oder abwesend

Raster-Elektronenmikroskopie von Embryonen E8 Wildtyp (a-c) und *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (d-f); 600fache Vergrößerung (a und d), 6000fache Vergrößerung (b,c und e,f), Pfeile markieren verkürzte Zilien, Pfeilspitzen markieren Zellen ohne Zilium

Des Weiteren war zu beobachten, dass viele der Grubenzellen in den *Foxj1*-Mutanten kein Zilium tragen (Abbildung 35e,f). Daher ist nicht nur die Länge der vorhandenen Zilien reduziert, sondern auch die Anzahl der Zilien insgesamt, nur etwa jede zweite Zelle trägt ein deutlich erkennbares Zilium.

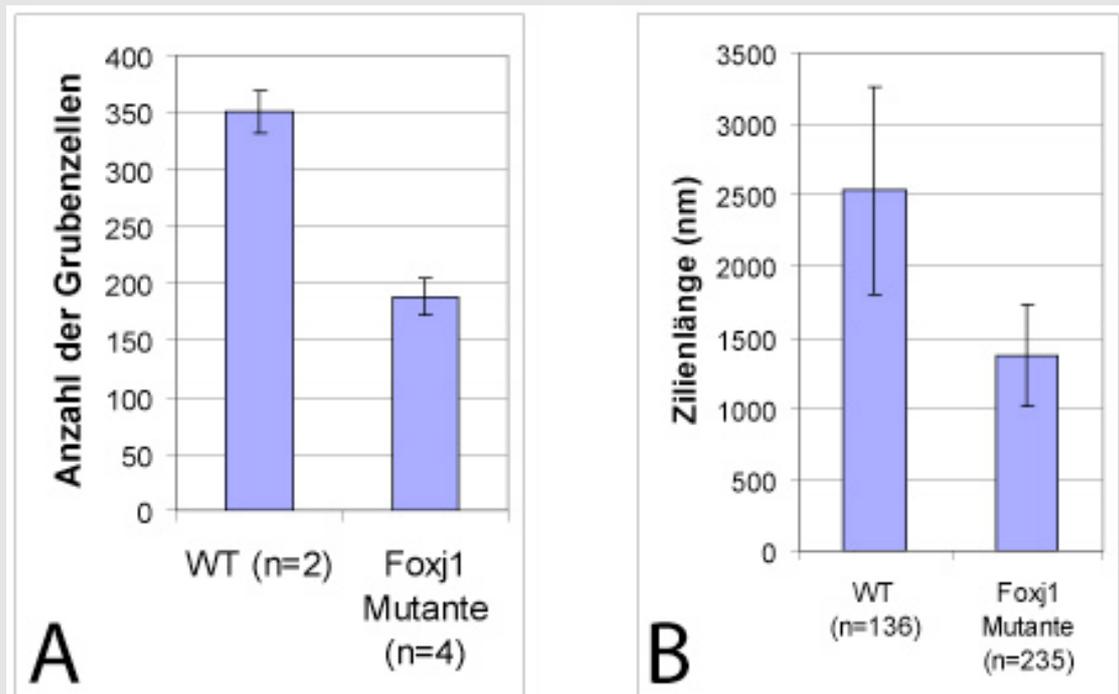


Abbildung 36: WT-Knoten enthalten etwa 350 Zellen, Knoten in den *Foxj1*-Mutanten nur 188, die Zilien sind im Wildtyp 2,5 μ m lang, in den *Foxj1*-Mutanten nur 1,4 μ m

(A) Bestimmung der Zellzahl durch Zählen der Zellen in mehreren Embryonen E8 (WT n=2; *Foxj1^{lacZ/lacZ}* n= 4); (B) Bestimmung der Zilien-Länge im Primitivknoten durch Messen der Zilien mit Hilfe von ImageJ (WT n=136, *Foxj1^{lacZ/lacZ}* n=235); für beide Bestimmungen wurden die Werte gemittelt und die Standard-Abweichung bestimmt.

Die Ursache für die Defekte der Links-Rechts-Asymmetrie bei *Foxj1*-defizienten Mäusen ist wahrscheinlich das Zusammentreffen von drei Merkmalen. Zum einen trägt nicht jede Grubenzelle ein Zilium. Zweitens sind die vorhandenen Zilien verkürzt. Drittens ist insgesamt die Anzahl der Grubenzellen verringert.

6.3.3 Expressionsanalyse von potentiellen Zielgenen von *Noto* in *Foxj1*-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Foxj1* für die Ziliogenese im Primitivknoten notwendig ist und *Noto* nachgeschaltet wirkt. Mit Hilfe der Expressionsanalyse von Zielgenen von *Noto* in *Foxj1*-Mutanten wurde untersucht, welche Aspekte des *Noto*-Phänotyps möglicherweise durch den Verlust von *Foxj1* vermittelt werden.

6.3.3.1 Analyse von Zielgenen mit teilweise bekannter Funktion

Bislang wurden drei potentielle Zielgene von *Noto* identifiziert, die eine Funktion im retrograden IFT haben oder haben könnten. Der intraflagellare Transport (IFT) ist essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung der Zilien.

Bei DYNC2H1 (DNCHC2) handelt es sich um ein zytoplasmatisches Dynein. Diese sind an der Ausbildung von Motorkomplexen für den retrograden IFT, also den Transport von der Zilienspitze zum Basalkörperchen, beteiligt. DYNLRB2 (DNCL2B) ist am retrograden Transport von RAB6 von Golgi zum endoplasmatischen Retikulum (ER) beteiligt. RAB6 ist wiederum in den Aufbau von Zilien involviert (Wanschers et al., 2008). DYNLRB2 könnte an den retrograden IFT Komplexen beteiligt sein. Beide Dyneine sind spezifisch im Knoten exprimiert (Abbildung 37b,c) und in *Foxj1*-Mutanten herunter reguliert (Abbildung 37e,f).

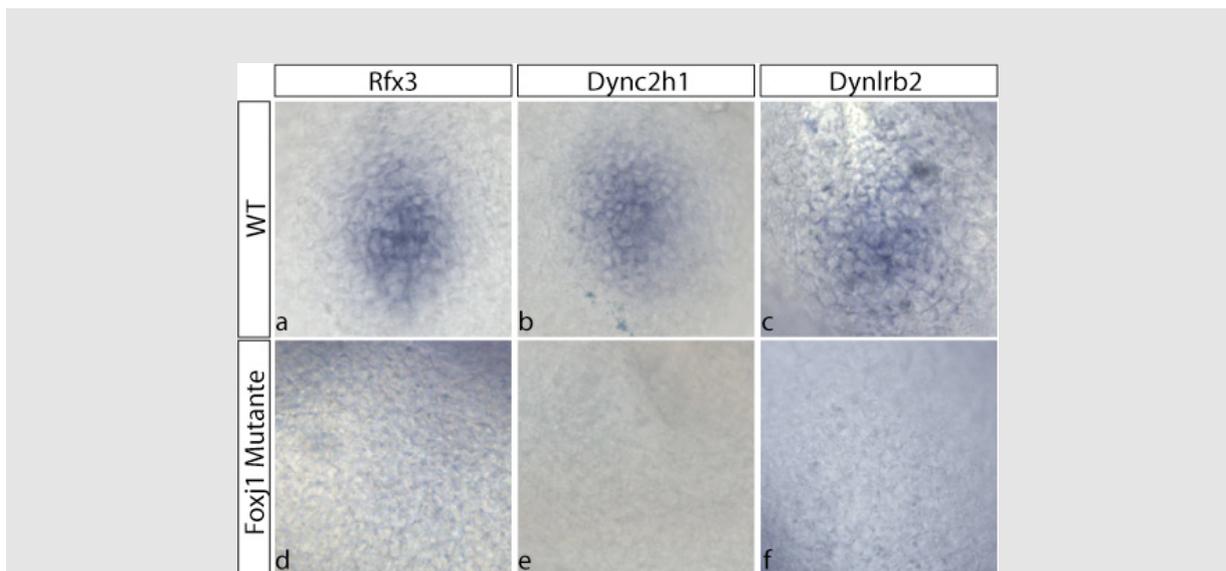


Abbildung 37: *Rfx3*, *Dync2h1* und *Dynlrb2* sind in *Foxj1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen E8 nicht exprimiert
WISH auf Embryonen E8, von *Rfx3* auf WT (a) und *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (d), *Dync2h1* auf WT (b) und *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (e) und *Dynlrb2* WT (c) und *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (f).

Rfx3 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen Verlust zu Defekten in der Ziliogenese führt. Es wurde gezeigt, dass *Rfx3* an der Regulation weiterer Komponenten des retrograden IFT beteiligt ist, wie beispielsweise dem Dynein *D2lic* (Bonnafe et al., 2004). *Rfx3* ist spezifisch im Knoten exprimiert (Abbildung 37a). In *Noto*-Mutanten ist die *Rfx3*-Expression stark verringert (Beckers et al., 2007). Die Expression von *Rfx3* in *Foxj1*-Mutanten ist ebenfalls stark reduziert (Abbildung 37d). *Tektin2* ist ein Zielgen von *Noto*, das am Basalkörper lokalisiert. TEKTIN2 kolokalisiert mit den Zentriolen, also mit Zentrosomen und Basalkörpern, es gehört zu den zentralen strukturellen Bausteinen der Basalkörper. TEKTIN2 ist an der Stabilisierung der Zentriole beteiligt. *Tektin2* ist spezifisch im Knoten exprimiert (Abbildung 38a). In *Foxj1*-Mutanten kommt es zu einer starken Reduktion der *Tektin2*-Expression (Abbildung 38d).

Dnahc11 ist besser unter dem Namen *Lrd*, *left-right* Dynein, bekannt. Es ist ein Zielgen von *Noto* und spezifisch im Knoten exprimiert (Abbildung 38b). Der Verlust von DNAHC11 zieht Links-Rechts-Defekte nach sich (Supp et al., 1999). Bei DNAHC11 handelt es sich um ein axonemales Dynein. Anders als DYNC2H1 und DYNLRB2, die zytoplasmatischen Dyneine, ist es nicht am IFT beteiligt, sondern an der Bildung der inneren und äußeren Dynein-Arme der motilen Zilien. Dynein-Arme sind für die Motilität der Zilien unentbehrlich. Bisher wurde bereits gezeigt, dass *Dnahc11* in *Foxj1*-defizienten Lungen nicht mehr exprimiert wird (Chen et al., 1998; Zhang et al., 2004).

Im Primitivknoten von *Foxj1*-Mutanten ist *Dnahc11* ebenfalls nicht mehr exprimiert (Abbildung 38e).

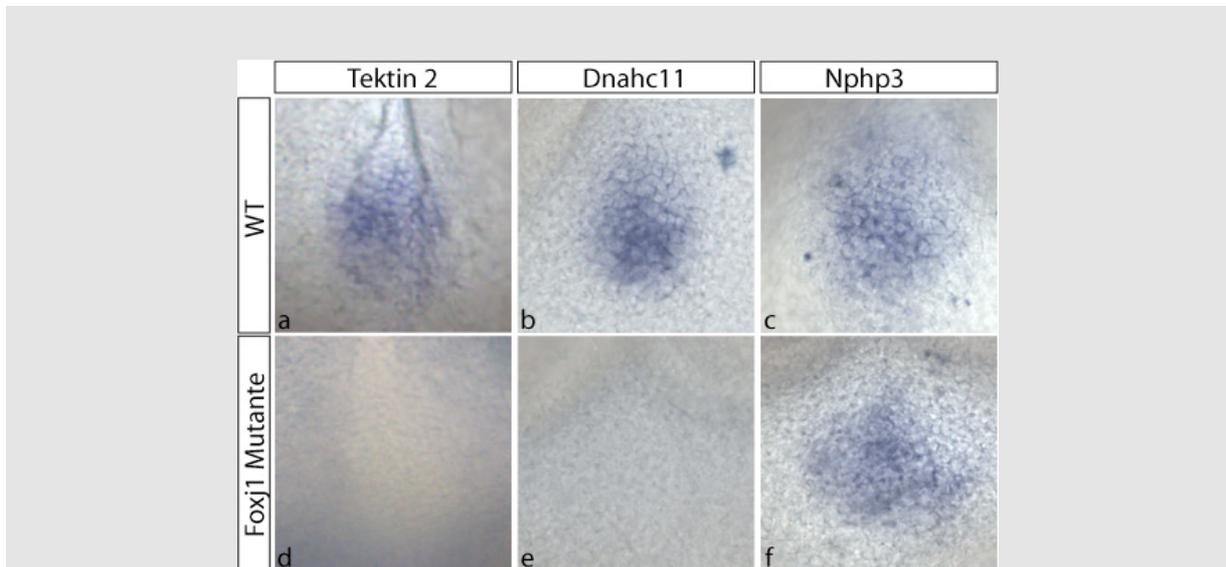


Abbildung 38: *Tektin2* und *Dnahc11* sind in *Foxj1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten nicht mehr exprimiert, die Expression von *Nphp3* ist nicht verändert

WISH auf Embryonen E8, von *Tektin2* auf WT (a) und *Foxj1^{lacZ/lacZ}* (d), *Dnahc11* auf WT (b) und *Foxj1^{lacZ/lacZ}* (e) und *Nphp3* WT (c) und *Foxj1^{lacZ/lacZ}* (f).

Nphp3 ist ein Zielgen von *Noto*, das bei Nephronophthisis Typ 3 (NPHP3), einer autosomal rezessiven Nierenerkrankung, von einer Mutation betroffen ist. Es wurde gezeigt, dass NPHP3 mit NPHP1 und NPHP4 interagiert (Sharma et al., 2008). Diese Proteine sind im Zilium lokalisiert. Daher wird für NPHP3 eine ähnliche Lokalisation angenommen. NPHP3 interagiert auch mit NPHP2 (*Inversin*, betroffen in der *inv*-Mutante). *Inversin* ist am nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt (Simons et al., 2005). Aufgrund der Interaktion von NPHP3 mit INVERSIN und der Ähnlichkeit der Phänotypen wird davon ausgegangen, dass auch NPHP3 am nicht-kanonischen Signalweg beteiligt ist. Da NPHP3 im Kopffaltenstadium spezifisch im Knoten exprimiert und in *Noto*-Mutanten reduziert ist, wurde seine Expression auch in *Foxj1*-

Mutanten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass *Nphp3* in *Foxj1*-Mutanten (Abbildung 38f) auf vergleichbarem Niveau exprimiert wird wie im Wildtyp (Abbildung 38c).

6.3.3.2 Analyse von potentiellen Zielgenen mit unbekannter Funktion

Wie bereits erwähnt, wurden bei dem Mikroarray einige potentielle Zielgene von *Noto* identifiziert, für die bisher noch keine Funktion bekannt ist. Um die Funktionen von *Noto* und *Foxj1* besser differenzieren zu können, wurde die Expression dieser Gene auch in *Foxj1*-Mutanten überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass vier Gene mit unbekannter Funktion, die spezifisch im Knoten exprimiert sind, sowohl in *Noto*- als auch in *Foxj1*-Mutanten herunter reguliert sind (Abbildung 39). Dies deutet darauf hin, dass die bisher bekannten Zielgene von *Noto* durch *Foxj1* reguliert werden und unterstützt die Annahme, dass sie möglicherweise eine Funktion im Zusammenhang mit dem Aufbau und der Funktion der Zilien haben.

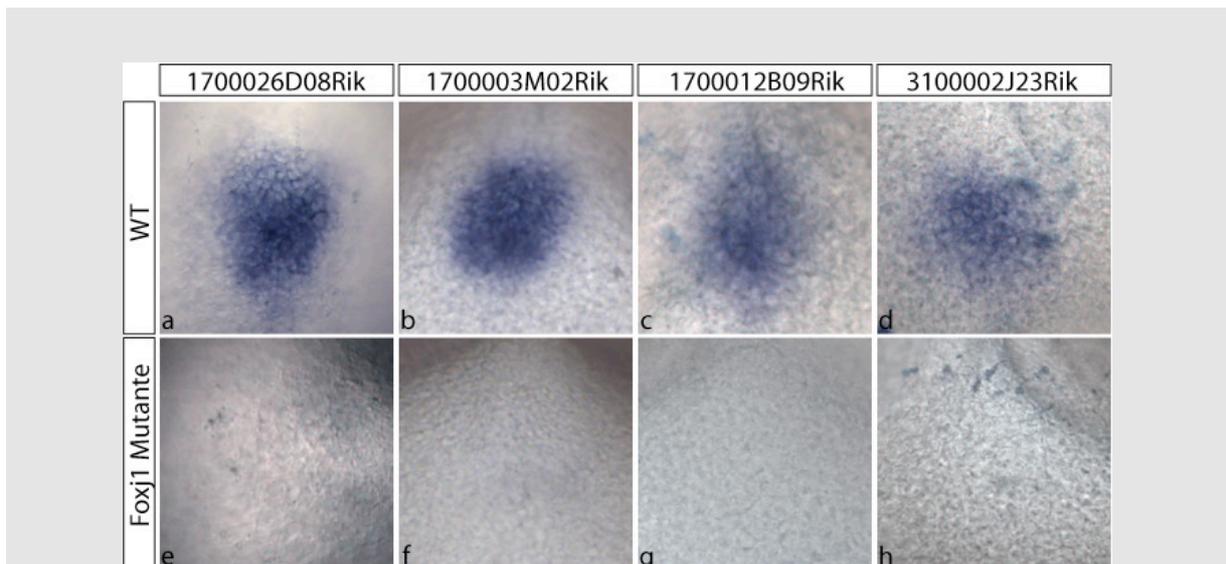


Abbildung 39: Die Expression von *1700026D08Rik*, *1700003M02Rik*, *1700012B09Rik* und *3100002J23Rik* ist in *Foxj1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten abwesend

WISH auf E8 Embryonen von *1700026D08Rik* auf WT (a) und *Foxj1*-Mutante (e), *1700003M02Rik* auf WT (b) und Mutante (f), *1700012B09Rik* auf WT (c) und Mutante (g) und *3100002J23Rik* auf WT (d) und Mutante (h).

6.4 Differenzierung der Funktion von *Noto* und *Foxj1*

Durch die REM Analyse wurde ein Unterschied der *Foxj1*-Mutanten zum Phänotyp der *Noto*-Mutanten deutlich. Im Gegensatz zu *Noto*-Mutanten werden in *Foxj1*-Mutanten die Zilien-tragenden Zellen im Knoten vollständig in der Grube angeordnet. Viele Zielgene von *Noto* sind ebenfalls in *Foxj1*-Mutanten herunter reguliert. Daher

war es ein Ziel, die spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Primitivknoten zu differenzieren.

6.4.1 Strategie zur Expression von *Foxj1* unter der Kontrolle des *Noto*-Lokus

Zur weiteren Differenzierung, der spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Knoten, wurde eine Strategie entwickelt, um *Foxj1* bei gleichzeitiger Ausschaltung von *Noto* im *Noto*-Lokus zu exprimieren. Dadurch sollten die *Foxj1*-spezifischen Defekte gerettet werden, während die Funktionen von *Noto*, die darüber hinausgehen, untersucht wurden.

Das Allel wurde so konstruiert, dass hinter der kodierenden Sequenz von *Foxj1* eine interne Ribosomen Einstiegsstelle (IRES) mit der kodierenden Sequenz für tdTomato, einem rot fluoreszierenden Protein, folgt. Dadurch kann die Transgenexpression durch direkte Fluoreszenz verfolgt werden. Bei tdTomato handelt es sich um ein weiter entwickeltes fluoreszierendes Protein, das sich durch eine größere Stabilität und Signalintensität auszeichnet. Es wird als Tandem-Dimer exprimiert und muss folglich nicht erst in der Zelle multimerisieren, bevor es angeregt werden kann. Danach folgte eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Die Neomycin-Resistenz dient als Selektionsmarker nach der Elektroporation der ES-Zellen, um die Klone finden zu können, die das Transgen integriert haben. Die Resistenz-Kassette ist von FRT-Rekombinationsstellen umgeben, so dass diese Kassette später mit Hilfe der Flp-Rekombinase entfernt werden kann. Dies geschieht durch Kreuzung der späteren Mäuse (*Noto*^{Foxj1KI}) mit einem Mausstamm, der die Flp-Rekombinase ubiquitär exprimiert.

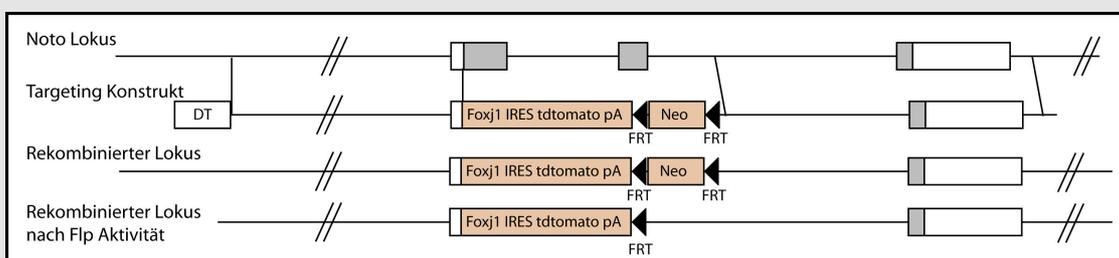


Abbildung 40: *targeting*-Strategie für den *knock-in* von *Foxj1* in den *Noto*-Lokus bei gleichzeitiger Ausschaltung von *Noto* (*Noto*^{Foxj1KI})

Noto-Exons sind durch Kästen gekennzeichnet, die UTR ist weiß dargestellt, die kodierende Sequenz in grau, zusätzlich integrierte Sequenzen (*Foxj1* IRES tdTomato, Neomycin-Resistenz) sind rot markiert, FRT-Stellen sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet.

Für diesen *Foxj1-knock in* wurde dieselbe Deletion im *Noto*-Lokus vorgenommen und das Transgen integriert, wie beim *Noto^{GFP}* Allel, da für dieses bereits gezeigt wurde, dass die Funktion von *Noto* unterbrochen wird und das Reportergen die endogene *Noto*-Expression widerspiegelt.

6.4.2 Generation der *Noto^{Foxj1KI}* Mauslinie

Das *targeting*-Konstrukt wurde kloniert und in die ES-Zelllinie 762 elektroporiert. Nach dieser Elektroporation wurden 480 Klone untersucht.

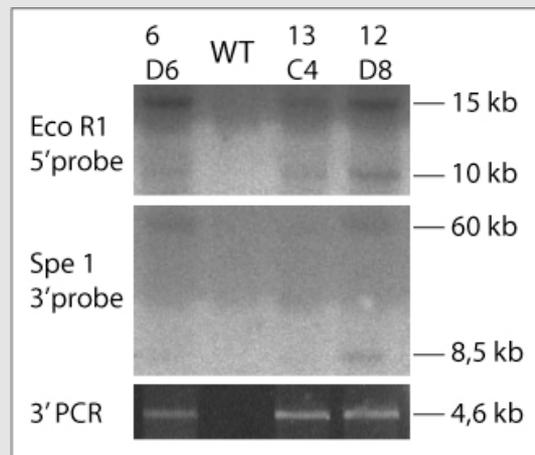


Abbildung 41: Durch Southern Blot und PCR Verifizierung der ES Zellklone wurde die korrekte, homologe Rekombination des *Foxj1-knock-in* -Konstrukts im *Noto*-Lokus bestätigt

Mit Hilfe des Southern Blots wurde ein Fragmentlängen-Polymorphismus festgestellt, auf der 5' Seite ist das Wildtyp-Fragment etwa 15 kb lang, während nach erfolgreicher Rekombination ein Fragment von 10 kb nachgewiesen wurde, auf der 3' Seite war das Wildtyp-Fragment 60 kb lang und das erwartete Fragment nach erfolgter Rekombination 8,5 kb, außerdem wurde eine *long range*-PCR verwendet, die nach erfolgreicher homologer Rekombination ein Fragment von 4,6 kb amplifiziert; die Klone 6D6 und 13C4 sind Klone aus der ersten Elektroporation und wurden als positiv Kontrolle mitgeführt. Der Klon 12D8 stammt aus der zweiten Elektroporation. Bei allen drei ES-Zellklonen hat die homologe Rekombination erfolgreich stattgefunden; zur Etablierung der transgenen Mauslinie wurde der Klon 12D8 verwendet.

Die DNA der ES-Zellklone wurde mit Hilfe von *Long range*-PCR vorgescreent. Dazu wurde ein Primerpaar verwendet, welches bereits für das *Noto^{GFP}*-Allel verwendet wurde (Abdelkhalek et al., 2004). Es amplifiziert aus der Neomycin-Resistenz-Kassette heraus, über die 3' Flanke hinweg ein Fragment von 4,6kb Länge bei korrekter Rekombination an dieser Seite. Mit Hilfe von Southern Blot-Hybridisierungen wurde die korrekte Integration durch den Nachweis von Fragmentlängen-Polymorphismen nachgewiesen. Die Proben liegen jeweils außerhalb der Homologie-Arme. Mit der 5'Probe wurde nach einem *EcoR1*-Restriktions-Verdau eine Länge von 15 kb beim Wildtyp erwartet, während bei korrekter Integration des *targeting*-Konstrukts ein Fragment von 10 kb detektiert

wurden. Mit Hilfe der 3'Sonde wurde im Wildtyp eine Bande bei 60 kb nach einem *Spe1*-Verdau nachgewiesen, während bei korrekter Integration das Fragment nur noch 8,5 kb groß war (Abdelkhalek et al., 2004). Bei drei Klonen, von 480 analysierten, wurde die korrekte Integration in den *Noto*-Lokus bestätigt (dazu gehören die Klone 6D6 und 13C4). Allerdings ergab keiner der Klone Chimäre, die das Transgen an die Nachkommen weitergaben.

Daher wurde die Elektroporation in 129cast#3 ES-Zellen wiederholt. Nach der Elektroporation wurden 384 ES-Zellklone untersucht. Mit Hilfe von *long range* PCR und Southern Blot Hybridisierungen konnte ein Klon (12D8) identifiziert werden, der nach allen Tests das Transgen richtig integriert hat (Abbildung 41). Dieser Klon wurde durch Dr. Karin Schuster-Gossler in Präimplantations-Embryonen injiziert. Der Klon war ausreichend um Chimäre zu erzeugen, die das Transgen an ihre Nachkommen weitergaben. Daraus wurde eine Mauslinie etabliert.

6.4.3 Überprüfung der Transgenexpression in *Noto*^{Foxj1Ki}

Die Untersuchung der Fluoreszenz von tdTomato zeigte, dass sie mit der Expression von GFP (grün fluoreszierendem Protein) aus dem *Noto knock-out* Allel überlappt (Abbildung 42A). Wie erwartet, wird das Transgen durch dieses Allel unter der Kontrolle des *Noto*-Promoters in den Expressionsdomänen von *Noto* exprimiert.

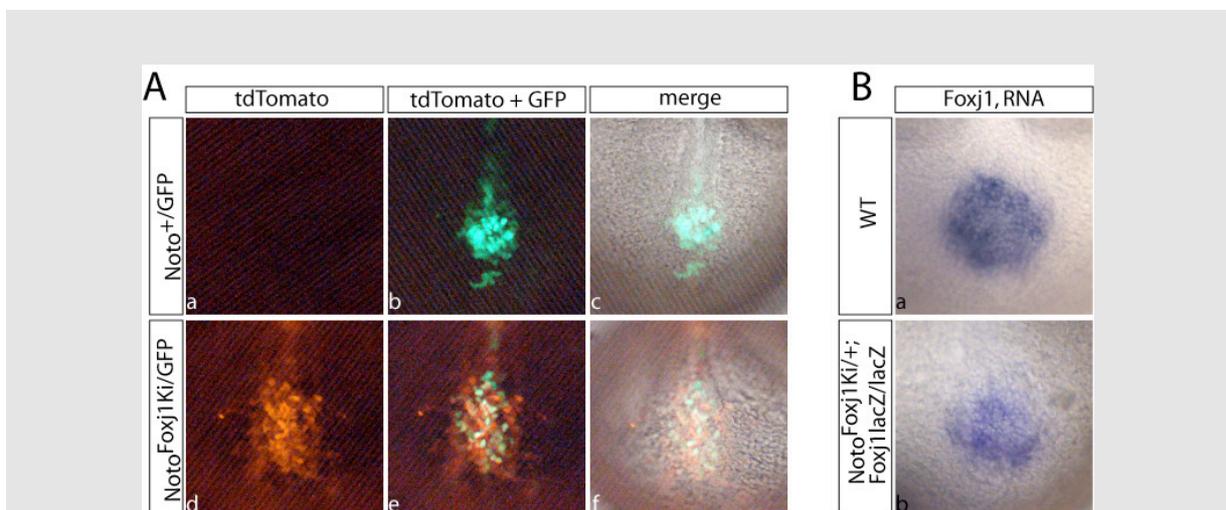


Abbildung 42: Direkte Fluoreszenz von tdTomato und WISH von *Foxj1* bei *Noto*^{Foxj1Ki}

(A) Bei *Noto*^{GFP/+} wird deutliche GFP-Aktivität im Knoten gezeigt (a-c), bei *Noto*^{GFP/Foxj1Ki} wird außerdem tdTomato-Aktivität im Knoten gezeigt, die mit der GFP-Aktivität kolokalisiert; (B) WISH von *Foxj1* in *Noto*^{Foxj1/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ} zeigt die Wiederherstellung der Expression von *Foxj1* auf RNA-Ebene (a), diese Expression ist etwas schwächer als im Wildtyp (b).

Zur weiteren Bestätigung wurde eine WISH durchgeführt, um die Expression von *Foxj1* durch das Transgen nach verfolgen zu können. Dazu wurde das *Noto*^{Foxj1Ki}-

Allele auf *Foxj1^{lacZ/lacZ}* gekreuzt. Da beim *Foxj1^{lacZ}*-Allel der Promoter und Teile der kodierenden Sequenz deletiert wurden, findet keine Expression von endogenem *Foxj1* mehr in den Mutanten statt. Durch die WISH konnte gezeigt werden, dass auch *Foxj1* durch das *Noto^{Foxj1Ki}*-Allel exprimiert wird (Abbildung 42B). Allerdings ist die Expression durch das Transgen geringer als im Wildtyp. Dies könnte generell daran liegen, dass die Expression durch den *Noto*-Promoter und den *Foxj1*-Promoter nicht gleich stark ist. Außerdem lag in den untersuchten Embryonen nur eine Kopie des *Noto^{Foxj1Ki}*-Allels vor, während der Wildtyp zwei Kopien von *Foxj1* enthält.

6.4.4 Beschreibung des Phänotyps von *Noto^{Foxj1Ki}*

Rein äußerlich unterscheiden sich homozygote Mutanten mit *Noto^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}* nicht von Mutanten mit *Noto^{GFP/GFP}*. Wie auch beim *Noto^{GFP}*-Allel führt der Verlust von *Noto* bei *Noto^{Foxj1Ki}* zu einem Phänotyp der Schwanzwirbelsäule in variabler Penetranz. Homozygote Mutanten haben häufig einen verkürzten Schwanz, oder Lücken in der Schwanzwirbelsäule, die äußerlich als Knick zu sehen sind (Abbildung 43). Es gibt aber auch homozygote Tiere, die äußerlich normal erscheinen und einen normal langen Schwanz haben. *Foxj1*-defiziente Mäuse weisen keinerlei Defekte des axialen Skeletts auf.

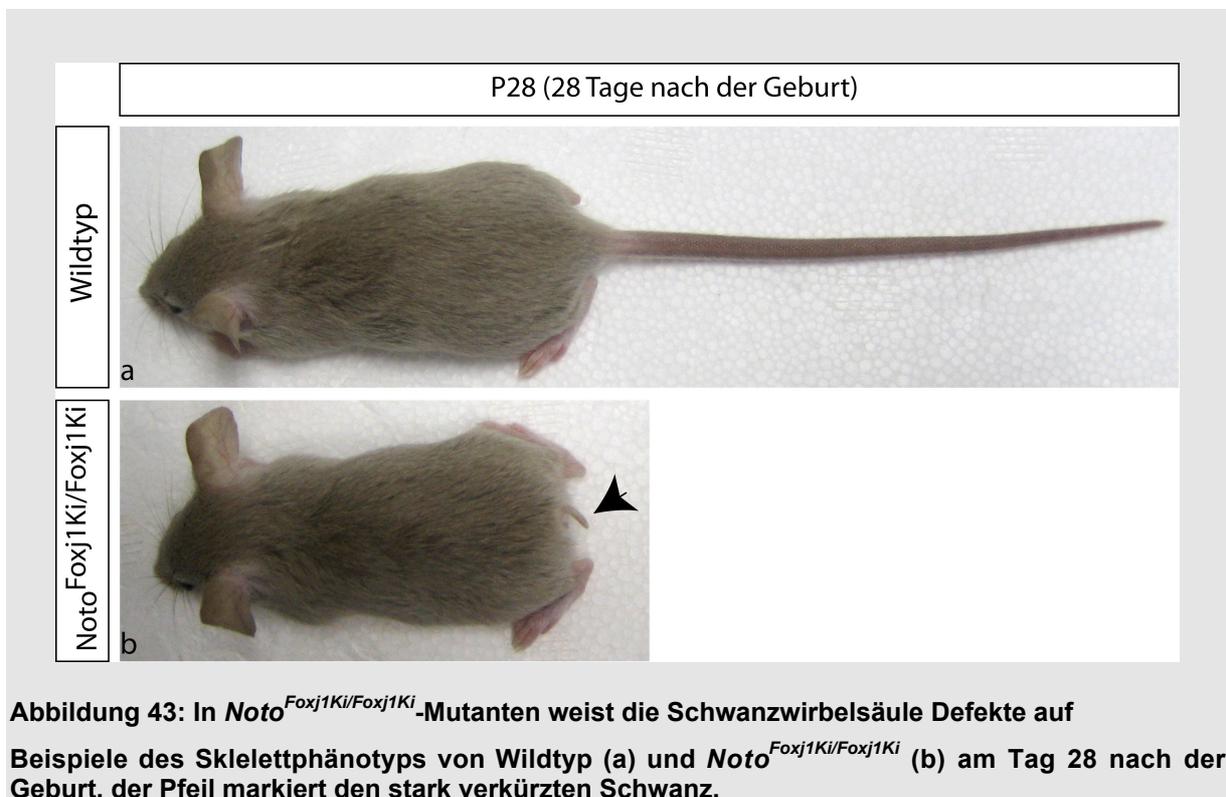


Abbildung 43: In *Noto^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}*-Mutanten weist die Schwanzwirbelsäule Defekte auf

Beispiele des Skelettphänotyps von Wildtyp (a) und *Noto^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}* (b) am Tag 28 nach der Geburt, der Pfeil markiert den stark verkürzten Schwanz.

Weiterhin überleben nur etwa 10% der homozygoten *Noto^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}*-Tiere. Die höchste Sterblichkeit ist perinatal zu beobachten. Dies wurde auch bei den

Noto^{GFP/GFP} Mutanten beobachtet und war dort ein Zeichen für die Herzdefekte, die durch Fehler in der Festlegung der Links-Rechts-Achse entstanden waren (Beckers et al., 2007).

6.4.5 Beschreibung der Knotenmorphologie in *Noto*^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}

Embryonen

Die Defekte der Links-Rechts-Asymmetrie und die Schwanz-Defekte werden durch den *knock in* von *Foxj1* in den *Noto*-Lokus nicht wiederhergestellt. Dies zeigte bereits, dass der *Noto*-Phänotyp durch *Foxj1* allein nicht gerettet werden kann. Zur genaueren Beurteilung wurden WISH von *Nodal* in homozygoten *Noto*^{Foxj1Ki/Foxj1Ki} Mutanten durchgeführt. Bei *Nodal* handelt es sich um einen Marker für Kronenzellen. Diese sind im Wildtyp Hufeisen-förmig um die Grube angeordnet (Abbildung 44a). Für *Noto*^{GFP/GFP}-Mutanten wurde gezeigt, dass Gruben- und Kronenzellen in kleinen Gruppen angeordnet und zufällig vermischt waren (Beckers et al., 2007). In den *Foxj1*^{lacZ/lacZ}-Mutanten hingegen blieb die Hufeisen-förmige Verteilung der Kronenzellen um die Grubenzellen herum erhalten.

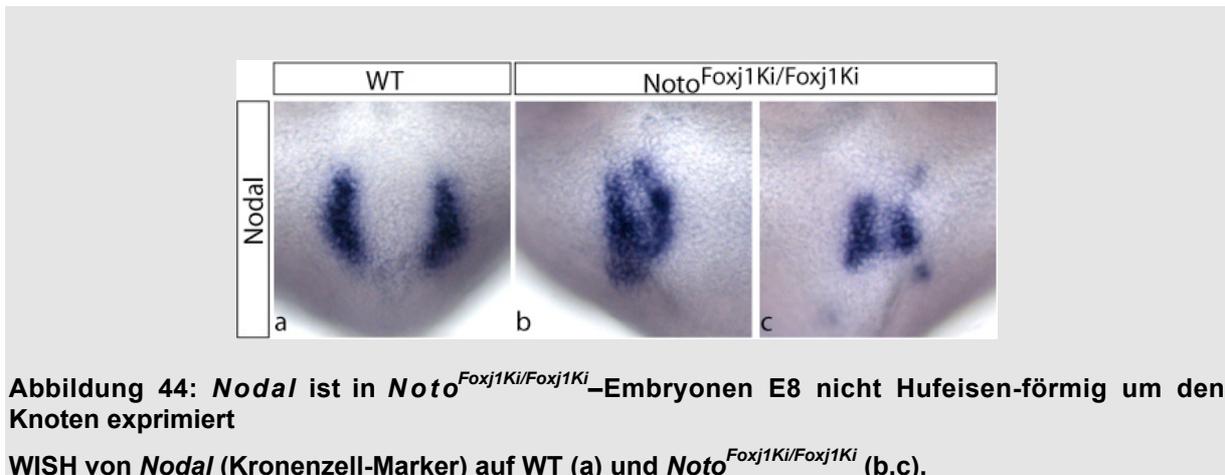


Abbildung 44: *Nodal* ist in *Noto*^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}-Embryonen E8 nicht Hufeisen-förmig um den Knoten exprimiert

WISH von *Nodal* (Kronenzell-Marker) auf WT (a) und *Noto*^{Foxj1Ki/Foxj1Ki} (b,c).

Bei *Noto*^{Foxj1Ki/Foxj1Ki} Embryonen wurde beobachtet, dass die Knotenmorphologie zwischen den Zuständen der beiden Mutanten von *Noto* und *Foxj1* einzuordnen ist. Die Kronenzellen sind weiterhin hauptsächlich in zwei Gruppen organisiert, allerdings sind sie nicht mehr Hufeisen-förmig um die Grubenzellen verteilt. Es scheinen weniger Grubenzellen zwischen den Kronenzellen erhalten geblieben zu sein und diese sind nicht in einer Tropfen-förmigen Grube angeordnet, sondern in einer eher länglichen Vertiefung (Abbildung 44b,c).

6.4.6 Analyse der Funktionalität des *Noto*^{Foxj1Ki}-Allels

Durch WISH bestätigte sich die Expression der *Foxj1*-RNA im Knoten (Abbildung 42B). Zur Bestätigung der Funktionalität des Transgens wurde die Anwesenheit von aktivem FOXJ1 untersucht. Dies geschah durch die Untersuchung der Expression von potentiellen Zielgenen, die in beiden Mutanten, *Noto*^{GFPiGFP} und *Foxj1*^{lacZ/lacZ}, herunterreguliert wurden. Dazu wurden Embryonen, ohne endogenes *Foxj1* mit einer Kopie *Noto*^{Foxj1Ki} (*Noto*^{Foxj1+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ}) verwendet. Die *Foxj1*-abhängigen Zielgene können so nur durch *Foxj1*, vom Transgen, aktiviert werden, da kein endogenes *Foxj1* exprimiert wird.

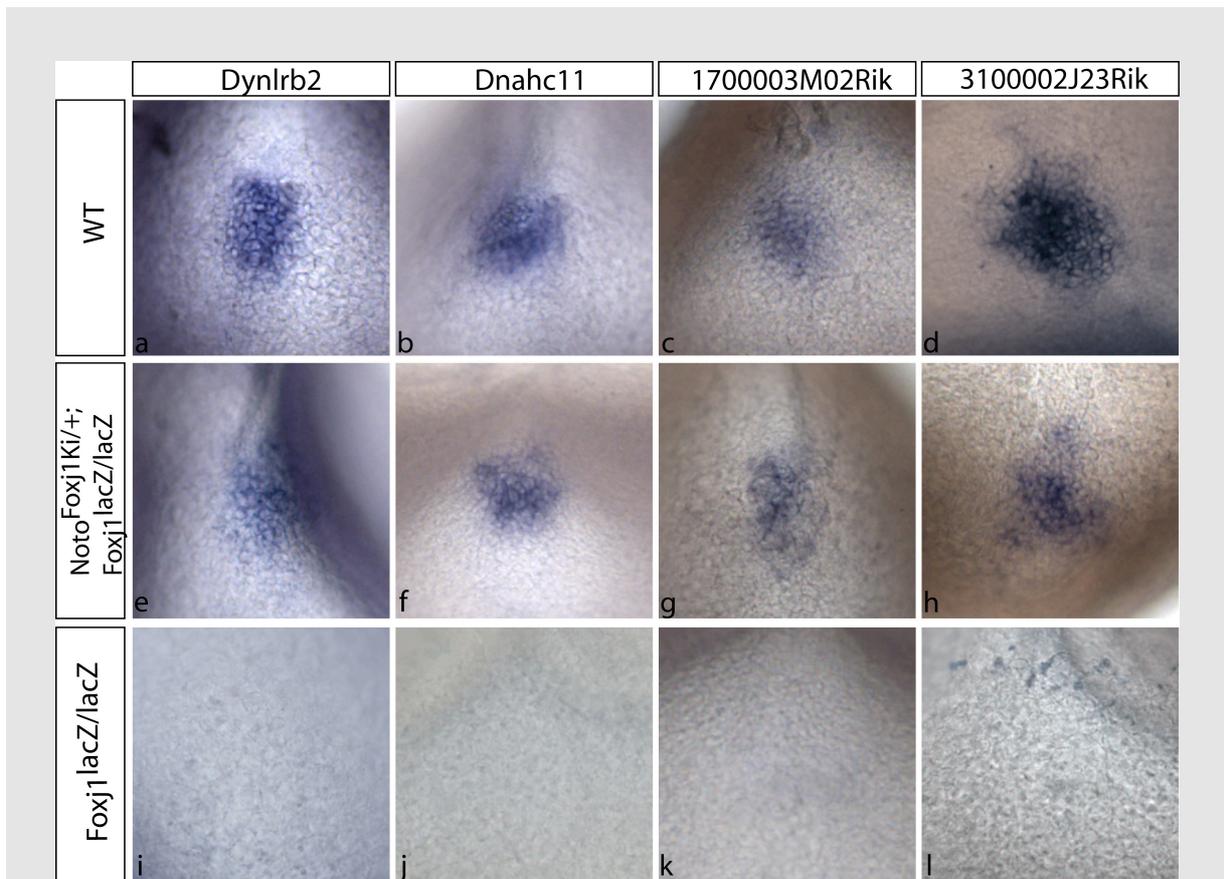


Abbildung 45: Durch den *Noto*^{Foxj1Ki} werden Zielgene von *Foxj1* im Knoten wiederhergestellt

WISH auf Embryonen E8, von *Dynlrb2* auf WT (a), *Noto*^{Foxj1Ki/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (e), *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (i); von *Dnahc11* auf WT (b), *Noto*^{Foxj1Ki/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (f), *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (j); von *1700003M02Rik* auf WT (c), *Noto*^{Foxj1Ki/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (g), *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (k); von *3100002J23Rik* auf WT (d), *Noto*^{Foxj1Ki/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (h), *Foxj1*^{lacZ/lacZ} (l).

Mit Hilfe von WISH konnte die Wiederherstellung der Expression von *Dynlrb2*, *Dnahc11*, *1700003M02Rik* und *3100002J23Rik* in *Noto*^{Foxj1Ki/+}; *Foxj1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen gezeigt werden (Abbildung 45). Dies bestätigt, dass durch das Transgen aktives FOXJ1 unter der Kontrolle des *Noto*-Promoters exprimiert wird. Das Transgen ist daher funktionell. Allerdings reicht dies noch nicht aus, um die

Morphogenese des Primitivknotens zu retten. Dieser Prozess ist wahrscheinlich unabhängig von *Foxj1*, da dieser Defekt auch nicht in den *Foxj1*-Mutanten auftritt.

7 Diskussion

Das Homeobox-Gen *Noto* spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. *Noto* wird für die Entwicklung des kaudalen Notochord benötigt. Weiterhin ist *Noto* für die Primitivknotenmorphogenese und die Ziliogenese im Knoten unentbehrlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde NOCE, eine bislang unbekannte Enhancer-Region im *Noto*-Lokus lokalisiert. NOCE aktiviert robuste Reporterexpression im Primitivknoten und Notochord. Diese Enhancer-Region ist nur in Plazentatieren konserviert und wird durch die kombinatorische Funktion mehrerer Faktoren reguliert, von denen einige in dieser Arbeit untersucht wurden. NOCE ist notwendig und hinreichend für Reporterexpression im Primitivknoten und Notochord.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Identifizierung von *Noto*-Zielgenen, um einen tieferen Einblick in die Funktion von *Noto* zu erhalten. Einige der Zielgene wurden bislang noch nicht funktionell charakterisiert und stellen möglicherweise neue Faktoren mit Bedeutung in der Ziliogenese und Morphogenese im Knoten dar. Einer der identifizierten Effektoren von *Noto* ist der Transkriptionsfaktor *Foxj1*. Die Untersuchungen zu *Foxj1* in der vorliegenden Arbeit zeigen die Notwendigkeit von *Foxj1* für die Ziliogenese im Primitivknoten. Für nachfolgende Untersuchungen wurde ein neues Allel von *Noto* hergestellt. Darin wird *Foxj1* im *Noto*-Lokus exprimiert und gleichzeitig *Noto* ausgeschaltet. Dies ermöglicht die weitere Differenzierung der spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Primitivknoten.

7.1 ***NOCE, ein neuer Knoten-spezifischer Enhancer***

7.1.1 **Reporteranalyse im *Hprt*-Lokus**

Für die Untersuchung der Promoterregion von *Noto* fand eine Methode Anwendung, die es ermöglicht die Reporter-Konstrukte zielgerichtet in einen Lokus einzuführen.

Die Einzelkopietransgenanalyse ist ein guter Weg um *in vivo* Promoteranalysen durchzuführen, da die Vergleichbarkeit verschiedener Konstrukte erhöht wird und keine Effekte durch den Integrationsort und die Anzahl der Kopien auftreten.

Der besondere Vorteil des *Hprt*-Lokus besteht weiterhin darin, dass seine Charakterisierung bereits weit fortgeschritten ist (Reid et al., 1990). Mehrere Gruppen haben Promotoren getestet, die in ihrer Spezifität in E14tg2a-Zellen nicht vom *Hprt*-Lokus beeinflusst worden zu sein scheinen (Evans et al., 2000; Minami et

al., 2002; Minami et al., 2002). Mit Hilfe der HAT Selektion zur Identifizierung von HPRT-positiven ES-Zellklonen ist es möglich, einen erheblich geringeren Aufwand in der ES-Zellkultur zu erreichen, Hierbei ist nicht die Untersuchung mehrerer Hundert resistenter Klone notwendig, sondern nur ein Dutzend (Bronson et al., 1996). Außerdem müssen weniger transgene, bzw. chimäre, Embryonen erzeugt werden, da die Varianz der Reporterexpression im Vergleich zur Analyse von zufällig integrierten Transgenen geringer ist.

7.1.2 Die Reporterexpression von Fragmenten aus dem *Noto*-Lokus ist abhängig von der Kopienzahl

Zu Beginn dieser Arbeit wurden einige Promoter-Reporter-Konstrukte, nach Pronukleus-Injektion in befruchtete Eizellen, in Embryonen getestet. Der erste Schritt war der Test von LUR1-PI (Abbildung 5A, Abbildung 46 #2), einem Konstrukt, das insgesamt etwa 12 kb des *Noto*-Lokus enthält. Wie erwartet, wurde dabei eine Spannweite von Reporteraktivität beobachtet. Einige Expressionsdomänen waren allen Embryonen gemein, andere traten nur in manchen auf. Das posteriore Notochord ist eine Expressionsdomäne, die allen gemein war, und spiegelt die endogene *Noto*-Expression wider. Die weiteren Expressionsdomänen, wie Diencephalon, Darm, Leberanlage und Bodenplatte des Neuralrohrs, sind bekannte Expressionsdomänen von *Foxa2*, das auch im Notochord exprimiert ist (Sasaki and Hogan, 1996; Ang et al., 1993).

Die Varianz der Reporterexpression von LUR1-PI in den transgenen Embryonen am Tag E9,5 konnte zwei Ursachen haben. Zum einen war es möglich, dass die ektopische Expression auf das Fehlen eines wichtigen regulatorischen Elements zurückzuführen ist. Die andere Möglichkeit bestand darin, dass es sich um Effekte durch die Integration einer variablen Anzahl von Kopien in unterschiedliche Loci handelt. Die Auswertung eines größeren Transgens (BACt, Abbildung 5B, Abbildung 46 #1) ergab, dass dieses die endogene Expression von *Noto* am Tag E8,5 widerspiegelt. Des Weiteren wurde LUR1 als Einzelkopietransgen in den *Hprt*-Lokus eingebracht (Abbildung 6A, Abbildung 46 #3). Die Untersuchung der Reporterexpression von E7,5 bis E9,5 zeigte, dass LUR1 als Einzelkopietransgen die endogene Expression von *Noto* widerspiegelt. Daher wird davon ausgegangen, dass LUR1 bereits alle notwendigen, regulatorischen Elemente enthält.

Die ektopische Reporterexpression von LUR1-PI nach der Pronukleus-Injektion könnte durch die Überrepräsentation von FOXA2-Bindestellen entstanden sein. *In silico* Untersuchungen haben gezeigt, dass in LUR1 14 potentielle FOXA2-Bindestellen vorkommen. Eine größere Anzahl von FOXA2-Bindestellen in den Reporter-Konstrukten könnte ausreichend sein, um ektopische Reporterexpression in den *Foxa2*-Expressionsdomänen anzuschalten. Dies könnte insbesondere bei der Integration mehrerer Kopien von LUR1-PI zur ektopischen Reporterexpression führen. Reduziert man die Anzahl der Bindestellen, beispielsweise durch Anwendung eines Einzelkopietransgens, geht auch die ektopische Expression verloren.

Der Verlust der ektopischen Expressionsdomänen durch das BAC Transgen könnte eine vergleichbare Ursache haben. Durch die Größe des Transgens (~80 kb) wird der Abstand der Bindestellen so sehr vergrößert, dass sie nicht additiv wirken können. Außerdem könnte es sein, dass durch die Größe eines einzelnen Transgens weniger Kopien integriert werden. Weiterhin wird für die Injektionen immer eine bestimmte Konzentration der DNA (ng/μl) verwendet, dadurch nimmt die Zahl der injizierten Moleküle mit ihrer Größe ab.

7.1.3 Identifikation einer neuen Knoten- und Notochord-spezifischen Enhancer-Region

Die Promoterregion von *Noto* wurde mit Hilfe von Reporter-Konstrukten *in vivo* untersucht. Etwa 10 kb stromaufwärts des Translationsstartkodons von *Noto* sind ausreichend, um die endogene Expression von *Noto* widerzuspiegeln (LUR3, Abbildung 6A, Abbildung 46 #5). Bereits die Deletion 2,5 kb am 5' Ende führte zum vollständigen Verlust der Reporterexpression. 7,5 kb stromaufwärts vom ersten Exon von *Noto* sind nicht ausreichend, um Reporterexpression in Primitivknoten und Notochord zu aktivieren (LUR2, Abbildung 6A, Abbildung 46 #4). Der deletierte Bereich, LUR4, allein ist wiederum hinreichend, das endogene Expressionsmuster von *Noto* zu reflektieren (Abbildung 7A, Abbildung 46 #6). Durch den Vergleich der Promoterregion von *Noto* mit der homologer Gene aus anderen Spezies zeigte sich, dass nur 500 bp am 3' Ende von LUR4 in anderen Säugetieren konserviert geblieben sind. Die Untersuchung *in vivo* zeigte, dass genau dieser Bereich hinreichend ist für Primitivknoten- und Notochord-Spezifität der Reporterexpression. Diese Region wurde NOCE (*node and notochord specific enhancer region*) genannt und stellt eine bislang unbeschriebene Enhancer-Region dar (Abbildung 7A, Abbildung 46 #10).

NOCE ist notwendig und hinreichend für robuste Reporterexpression in Knoten und Notochord.

7.1.4 Die Bedeutung ektopischer Expressionsdomänen durch verschiedene Konstrukte

Bei allen Chimären, die NOCE ohne Mutationen enthalten, wurde die stärkste Reporterexpression in Primitivknoten und Notochord beobachtet. Allerdings wiesen viele ektopische Expressionsdomänen auf. Die Expression der Reportergene konnte in sieben unterschiedlichen Geweben gefunden werden, dem Primitivknoten, Notochord, Diencephalon, Leberanlage, Darm, Kopf und Dottersack. Diese Expressionsdomänen treten nicht in allen Transgenen auf und zeigen zumeist eine unterschiedlich starke Reporterexpression.

Für die Konstrukte, die bereits einige Kilobasen vor dem ersten bekannten Exon enden, wurde ein heterologer Minimalpromoter („*hsp70 min prom*“) eingesetzt, um die Expression der Transgene zu gewährleisten. Zusätzlich zu Knoten und Notochord wurde das lacZ-Reporter in Diencephalon, Darm, Kopf und Dottersack exprimiert (Abbildung 46, #6, 10-25). Die Deletion von NOCE in LUR5 (Abbildung 7A, Abbildung 46 #7) führte zum Verlust der Reporterexpression in Knoten, Notochord und Diencephalon. Die Expression in Darm, Kopf und Dottersack blieb erhalten. Der Test von NOCE mit dem *Noto*-Minimalpromoter und ohne zusätzlichen Minimalpromoter (Abbildung 28A, Abbildung 46, #8,9) zeigte, dass NOCE die Reporterexpression in Knoten, Notochord, Diencephalon und Darm aktiviert. Durch den Vergleich der Domänen der Reporterexpression kann gefolgert werden, dass die Reporterexpression in Kopf und Dottersack durch den heterologen Minimalpromoter hervorgerufen wird da sie auch bei Verlust der spezifischen Aktivität von NOCE in Knoten und Notochord erhalten bleibt. Aber die Konstrukte ohne den heterologen Minimalpromoter weisen in diesen Geweben keine Reporterexpression auf.

	Name	Schema	Expressionsdomänen						
			Primitivknoten	Notochord	Diencephalon	Leberanlage	Darm	Dottersack	Kopf
1	BACt		+++	+++	+	+	+	-	-
2	LUR1-PI		+++	+++	-	-	-	-	-
3	LUR1		+++	+++	-	-	-	-	-
4	LUR2		-	-	-	-	-	-	-
5	LUR3		+++	+++	-	-	-	-	-
6	LUR4		++++	++++	+	-	+	+	+
7	LUR5		-	-	-	-	+	+	+
8	NOCEnativ		++++	++++	+	-	+	-	-
9	NOCEsolo		++++	++++	+	-	+	-	-
10	NOCE		++++	++++	+	-	+	+	+
11	revNOCE		++++	++++	+	-	+	+	+
12	shoNO1		++	+	-	-	+	+	+
13	shoNO2		-	-	-	-	+	+	+
14	shoNO3		+	(+)	-	-	+	+	+
15	TCF/LEF1 Mut		++++	++++	+	-	+	+	+
16	TEAD Mut		++++	++++	+	-	+	+	+
17	HOX Mut		++++	++++	+	-	+	+	+
18	LUR4 triple Mut		++++	++++	+	-	+	+	+
19	NOCE triple Mut		++++	++++	+	-	+	+	+
20	shoNO1 double		++	+	-	-	+	+	+
21	FOXA2 Mut		++++	+++	-	-	+	+	+
22	Quadrupel Mut		++++	+++	-	-	+	+	+
23	UFO&FOXA2 Mut		-	-	-	-	+	+	+
24	UFO Mut		++++	++++	+	+	+	+	+
25	3x UFO		-	-	-	-	+	+	+

Abbildung 46: Zusammenfassung aller Transgene für die Promoteranalyse

NOCE wurde in grün markiert, der native putative Minimalpromoter in gelb, der heterologe Minimal-Promoter ist in blau dargestellt, in der rechten Seite der Tabelle sind die Expressionsdomänen und die jeweilige Expression dargestellt.

Der Darm ist eine Expressionsdomäne, die in zwei Gruppen von Konstrukten vorkommt. Zum einen ist sie bei den Konstrukten mit heterologem Minimalpromoter zu finden (Abbildung 46 #6, 10-25) und zum anderen bei NOCEnativ (#8), NOCEsolo (#9) und dem Pronukleus-injizierten LUR1 (LUR1-PI, #1). Dies deutet darauf hin,

dass es sich um eine Eigenschaft von NOCE, bzw. LUR1-PI, handelt. In NOCE_{nativ}, NOCE_{solo} und LUR1-PI ist außerdem Expression im Diencephalon zu beobachten. Diese ist an die spezifische Expression in Knoten und Notochord gekoppelt und geht daher in LUR5 (#7) verloren. Dies lässt den Schluss zu, dass NOCE durch wenigstens einen Faktor reguliert wird, der zusätzlich zu Knoten und Notochord auch in Diencephalon und Darm exprimiert wird. Weiterhin ist LUR1-PI (#1) in der Leberanlage exprimiert. Diencephalon, Darm und Leberanlage sind neben Knoten und Notochord Expressionsdomänen von *Foxa2*. Diese ektopischen Expressionsdomänen sind an die Aktivität in Knoten und Notochord gekoppelt.

Alle Transgene, in denen NOCE enthalten ist und die keine Mutation tragen, aktivieren starke Reporterogenaktivität in Primitivknoten und Notochord (Abbildung 46 #1-3, 5, 6, 8-11). LUR1 (#3) und LUR3 (#5) spiegeln die endogene Expression von *Noto* wider. Diese beiden Konstrukte enthalten 10 kb oder mehr des *Noto*-Lokus. In diesen Transgenen ist der endogene Minimalpromoter enthalten und die Abstände zwischen Enhancer, Promoter und Transkriptionsstart entsprechen dem von *Noto*. Bei NOCE_{solo} (#9) ist die Aktivität in Knoten und Notochord stärker als bei LUR3 (#5). Daher ist es möglich, dass die Reporterogenaktivität durch den Abstand von NOCE zum Transkriptionsstart eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knoten- und Notochord-spezifischen Expression in den untersuchten Transgenen und im *Noto*-Lokus spielt. Dies könnte getestet werden, in dem NOCE vor einen heterologen „Abstandhalter“, eine unabhängige Sequenz, kloniert wird.

Bei revNOCE (#11) wurde dieselbe Reporterogenaktivität beobachtet, wie bei NOCE (#10). Daher wird davon ausgegangen, dass die Aktivität nicht durch die Orientierung im Transgen und relativ zum Transkriptionsstart geändert wird. Die Aktivität ist nur auf Sequenzen innerhalb von NOCE zurückzuführen.

Die Untersuchung weiterer Abschnitte von NOCE zeigte, dass zwei der bislang untersuchten Abschnitte (shoNO1 (#12) und shoNO3 (#14) (Abbildung 10)) in der Lage sind, Knoten- und Notochord-spezifische Reporterexpression zu aktivieren. Allerdings ist diese Aktivität erheblich geringer, als die Aktivität von NOCE. Bei shoNO1 ist die Aktivität nach etwa 8h nachweisbar, bei shoNO3 nur nach Färbung über Nacht, während bei NOCE bereits nach 20min ein deutliches Signal zu erkennen ist. Zudem scheint der Verlust der Aktivität sich im Notochord mit voran schreitender Entwicklung stärker zu zeigen, als im Knoten. Dies könnte darauf hindeuten, dass im Notochord zum Teil keine aktuelle Expression beobachtet wird,

sondern die Aktivität von lacZ-Protein, welches im Knoten oder posterioren Notochord exprimiert wurde. Daher könnte eine WISH mit einer lacZ-Probe auf Embryonen mit dem NOCE-Reporter-Konstrukt die tatsächliche Transkription genauer darstellen.

Bei shoNO1 und shoNO3 wird zudem keine Expression im Diencephalon beobachtet. Dies deutet zusätzlich auf eine Reduktion der Reportergenexpression in anterioren Geweben hin.

shoNO2 (#13) enthält shoNO1 und weitere Sequenzen aus NOCE, kann aber keine nachweisbare lacZ-Expression aktivieren. Daraus kann geschlossen werden, dass shoNO1 und shoNO3 Sequenzen enthalten, die hinreichend sind zur Knoten- und Notochord-spezifischen Genexpression. Entweder wirken sie in NOCE kombinatorisch, oder in dem Bereich zwischen shoNO1 und shoNO3 liegen weitere Sequenzen, die für die robuste Genexpression bei NOCE notwendig sind. In shoNO2 sind Sequenzen enthalten, die die Reportergenaktivität eher reduzieren, oder durch die Veränderung des Abstands von Enhancer zu Transkriptionsstart die Aktivität verringern.

Durch die Untersuchung aller bisherigen Transgene wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich nicht möglich ist, unterschiedliche Enhancer aus NOCE zu isolieren, die ausschließlich Primitivknoten-, oder Notochord-spezifische Genexpression aktivieren. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass der Primitivknoten bereits als ein Teil des posterioren Notochord betrachtet werden kann (Blum et al., 2007). In den vorliegenden Ergebnissen waren alle Transgene in der Lage, entweder Expression in beiden Domänen zu aktivieren, oder in keiner. Allerdings wirkte sich eine Reduktion der Reportergenaktivität stärker im Notochord aus, als im Knoten. Ein Beispiel dafür ist shoNO1 (#12). Hier wird bereits eine Verringerung der Reportergenaktivität im Knoten beobachtet, im Notochord hingegen ist nur noch Aktivität in Zellen zu beobachten, die sehr weit posterior lokalisiert sind. Weiter anterior ist keine Aktivität mehr zu beobachten.

In beinahe allen Chimären, die eine Knoten-spezifische Färbung aufweisen, werden weitere Zellen beobachtet, die posterior und lateral im Primitivstreifen lokalisiert sind und Reportergenaktivität zeigen (z.B. Abbildung 22 h). Da diese Aktivität zusammen mit der Reportergenaktivität im Knoten verloren geht, ist sie auf die spezifische Aktivität von NOCE zurückzuführen. Etwas Ähnliches wurde auch für die Reportergene, der beiden Allele von *Noto* (*Noto^{GFP}* und *Noto^{Foxj1Kj}*) festgestellt. Es

gibt einzelne Zellen in der Peripherie des Primitivknotens, die GFP, beziehungsweise tdTomato, exprimieren (Abbildung 42). Frühere Studien belegten, dass mesendodermale Zellen aus dem Primitivstreifen in den Knoten wandern und ihn später wieder verlassen, um zum Notochord beizutragen (Kinder et al., 2001). Daher sind die Zellen in der Peripherie des embryonalen Primitivknotens, die positiv für lacZ sind oder für GFP und tdTomato, möglicherweise Zellen, die in den Knoten einwandern. Da lacZ sehr sensitiv ist, könnte dies darauf hindeuten, dass es sich um eine schwache Expression handelt. Sie ließ sich auf RNA-Ebene wegen einer geringeren Sensitivität nicht beobachten. Zudem zeigte sich, dass ab der Ausbildung des zweiten Somiten, Zellen aus dem Knoten heraus nach posterior wandern (Yamanaka et al., 2007). Die hier untersuchten Chimären standen vor der Ausbildung des ersten Somiten. Daraus folgt, dass entweder schon eher Zellen aus dem Knoten nach posterior auswandern, oder es sich um Zellen handelt, die in den Knoten einwandern. Der Primitivknoten ist eine dynamische Zellpopulation, die sich ständig durch einwandernde Zellen und Zellproliferation erneuert und Zellen zur Bildung des posterioren Notochord bereitstellt. Die Expression von *Noto* in umliegenden Zellen reflektiert möglicherweise diese Dynamik.

7.1.5 Regulation von NOCE, einem Säugetier-spezifischen Enhancer

Es gibt homologe Gene von *Noto* auch in anderen Spezies. Die *Not*-Gene der unterschiedlichen Spezies ähneln sich in ihrer Expressionsdomäne und der DNA-bindenden Domäne. Darüber hinaus gibt es jedoch einige Unterschiede. Die Proteine sind außerhalb der Homeobox nicht stark konserviert. Die Funktion der *Not*-Gene scheint einen gemeinsamen Ursprung zu haben. Alle bislang identifizierten Mitglieder dieser Familie sind im Notochord exprimiert und haben eine Funktion in der Entwicklung des Notochord. Allerdings unterscheiden sich die Funktionen der *Not*-Gene im Detail. *Floating head (flh)* ist das Homolog aus Zebrafisch. *Flh*-Mutanten bilden kein Notochord. Es wird nur noch die prächordale Platte gebildet (Talbot et al., 1995). Dieser Phänotyp ist stärker, als der in der Maus. Der Verlust des murinen *Noto* führt nur zu Lücken im kaudalen Notochord (Abdelkhalek et al., 2004). Die Unterschiede der Funktion setzen sich bei der Regulation der *Not*-Gene fort. In *Xenopus* gibt es zwei *Not*-Gene, *Xnot1* und *Xnot2*. *Xnot2* ist im Organizer und im Notochord exprimiert. Darüber hinaus ist es aber auch in der Schwanzknospe und in der Bodenplatte des Neuralrohrs exprimiert (Gont et al., 1993).

Auch im Hühnchen gibt es zwei *Not*-Gene, *Cnot1* und *Cnot2* (Stein and Kessel, 1995). *Cnot2* ist ebenfalls im Notochord und *Hensen's node* exprimiert, aber darüber hinaus in Primitivstreifen und Epiphyse (Stein et al., 1996). Die *Cnot2* und *Xnot2* haben weitere Expressionsdomänen außer dem Notochord. Durch den Vergleich der Sequenzen aus dem murinen *Noto*-Lokus wurde festgestellt, dass NOCE nicht in den Loci der Hühnchen, Zebrafisch und *Xenopus* Homologe konserviert ist.

NOCE ist nur in Plazentatieren konserviert. Im konservierten Zentrum von NOCE sind drei Transkriptionsfaktorbindestellen in Hund, Mensch, Ratte und Maus konserviert. Diese wurden durch kombinierten Sequenzvergleich und Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen gefunden (Sandelin et al., 2004; Quandt et al., 1995). Es handelt sich um Bindestellen für TCF/LEF1, TEAD-Proteine und einen Hox-Faktor. Diese Bindestellen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Weiterhin sind noch andere potentielle Bindestellen in NOCE enthalten. Davon wurden hier eine Bindestelle für FOXA2 und eine weitere Bindestellen für einen bislang unbekanntem Faktor untersucht.

7.1.5.1 Die Bedeutung von konservierten potentiellen

Transkriptionsfaktorbindestellen in NOCE

Durch die Bindung von TCF/LEF1 Transkriptionsfaktoren mit betaCatenin an ihre Bindestellen werden kanonische Wnt-Signale weitergeleitet (Gerdes and Katsanis, 2008). Es wurde mit Hilfe von Reportertransgenen *in vivo* gezeigt, dass durch WNT3A aus der Peripherie des Knotens im Primitivknoten Genexpression angeschaltet wird (Nakaya et al., 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass *Brachyury* ein direktes Zielgen des Wnt-Signalweges, bzw. von WNT3A, ist. *Brachyury* ist ein Transkriptionsfaktor, der im Primitivknoten, Notochord und der Schwanzknospe exprimiert wird (Yamaguchi et al., 1999). Daher war der Wnt-Signalweg ein Kandidat zur Aktivierung von NOCE. In *vestigial tail* Mutanten führt eine Mutation in *Wnt3a* zu einer verringerten kanonischen Wnt-Signalübertragung durch niedrigere WNT3A Mengen (Greco et al., 1996). Die Expression von *Noto* in *vestigial tail* Mutanten ist reduziert. TCF, LEF1 und betaCatenin sind ausreichend, NOCE *in vitro* zu aktivieren. Die potentielle Bindestelle ist aber nicht notwendig zur Aktivierung der Reporterexpression *in vivo*.

Eine andere potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestelle für TEAD-Transkriptionsfaktoren ist in NOCE enthalten. Die Bindestelle entspricht der Konsensus-Sequenz zur Bindung für TEAD1, 2 oder 4. Transkriptionsfaktoren der

TEAD-Familie sind nicht spezifisch im Primitivknoten exprimiert. Trotzdem trägt wenigstens einer der TEAD-Faktoren zur Knoten- und Notochord-spezifischen Reporterexpression durch ein Enhancer-Element von *Foxa2* bei (Sawada et al., 2005). TEAD1 und TEAD2 haben teilweise redundante Funktionen. Der Verlust beider Gene führt zum Verlust eines großen Teils des Notochord, zu Wachstumsverzögerungen und schweren Fehlbildungen (Sawada et al., 2008). Der Einfluss von TEAD1 und 2 auf das Notochord kann ein Anzeichen für eine Regulation von NOCE sein, da *Noto* für das kaudale Notochord benötigt wird (Abdelkhalek et al., 2004).

Am Tag E8 der Embryonalentwicklung ist *Nkx2-9* entlang der Mittellinie in der prächordalen Platte exprimiert. *Noto* ist in diesem Bereich nicht exprimiert und auch keines der Homologe von *Noto*. Daher könnte *Nkx2-9* an der Unterdrückung der Expression von *Noto* in der prächordalen Platte beteiligt sein.

Die simultane Mutation der potentiellen Bindestellen für TCF/LEF1, TEAD-Proteine und den Homeobox-Faktor führt *in vivo* zu keiner Veränderung der Reporterexpression. Daher ist ein additiver Effekt von Transkriptionsfaktoren durch Bindung an diese drei Bindestellen unwahrscheinlich.

Für Komponenten des Wnt-Signalweges, TEAD-Proteine und den Homeobox-Transkriptionsfaktor NKX2-9 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sie NOCE *in vitro* regulieren können, allerdings sind die potentiellen Bindestellen *in vivo* weder einzeln noch in Kombination essentiell für die Regulation von NOCE in Reportergen-Konstrukten im *Hprt*-Lokus. Möglicherweise tragen sie aber zur Regulation bei. Die Veränderung der genomischen Umgebung kann dazu führen, dass die Bedeutung dieser Faktoren verringert wird. Eine Beteiligung an der endogenen *Noto*-Expression könnte durch Mutation der Bindestelle im *Noto*-Lokus ausgeschlossen werden.

Zudem ist die Expression des Reportergens mit LUR4-basierten Konstrukten (Abbildung 46 #6, 10, 15-19) sehr stark. Durch eine Übersättigung der Zellen mit lacZ-Protein können Unterschiede unter Umständen nicht durch die Aktivität nachgewiesen werden, da für die Geschwindigkeit der Reaktion nicht mehr die Enzymaktivität von lacZ begrenzend wirkt, sondern andere Faktoren, wie die Diffusion des Substrats.

Lediglich für den Wnt-Signalweg wurde ein Einfluss auf die Expression von *Noto* durch die Reduktion der Expression in *vestigial tail*-Mutanten gezeigt.

7.1.5.2 FOXA2 beeinflusst die Aktivität von NOCE

Wie bereits beschrieben ist FOXA2 ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem im Primitivknoten und Notochord exprimiert ist. Er wird zur Bildung von Primitivknoten und Notochord benötigt. Im *Noto*-Lokus sind 14 potentielle Bindestellen für FOXA2 zu finden. Eine davon ist in NOCE enthalten. Die Mutation dieser Bindestelle *in vivo* führt zur Reduzierung der Reporteraktivität im Diencephalon, während das Reportergen in Primitivknoten und Notochord weiter exprimiert wird. Dies schließt nicht aus, dass das Niveau insgesamt gesenkt wurde, aber der Knoten und das Notochord trotzdem noch mit lacZ gesättigt sind. Daher ist kein signifikanter Unterschied der Expression in Knoten und Notochord im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt zu erkennen. Durch die Mutation der FOXA2-Bindestelle in Kombination mit den drei vorangegangenen Mutationen wird der selbe Effekt erzielt, wie die alleinige Mutation der FOXA2-Bindestelle und bestätigt deren Funktion. Obwohl *Noto* im Wildtyp nicht im Diencephalon nachgewiesen wurde, zeigt dies trotzdem, dass FOXA2 einen Einfluss auf die Reporterexpression durch NOCE hat. Des Weiteren kann FOXA2 in Zellkultur die Reporteraktivität durch NOCE und andere Fragmente aus dem *Noto*-Lokus erhöhen. Hinweise auf eine Regulation von *Noto* durch FOXA2 wurden auch in anderen Experimenten erzielt. In *Foxa2*-Mutanten geht etwa die Expression von *Noto* verloren (Abdelkhalek et al., 2004) und durch die zufällige Integration von LUR1-PI entsteht in einigen Fällen ein Expressionsmuster, das dem von *Foxa2* gleicht. Dies entsteht vermutlich durch eine übermäßige Präsenz von potentiellen FOXA2-Bindestellen, die *in vivo* besetzt werden. Daher „erzwingen“ sie über das spezifische Maß hinaus Reporterexpression.

Foxa2 ist nicht nur in Primitivknoten und Notochord exprimiert, sondern auch in Leberanlage, Darm und Diencephalon. Daher muss die Spezifität der Expression für Primitivknoten und Notochord von NOCE noch durch weitere Faktoren bestimmt werden.

FOXA2 hat keine direkte aktivierende Wirkung auf seine Zielgene, sondern ist daran beteiligt, das Chromatin zu öffnen und den Zugang für weitere Transkriptionsfaktoren zu erleichtern (Friedman and Kaestner, 2006). Durch das Zusammenwirken von Faktoren, die das Chromatin im *Hprt*-Lokus öffnen, könnte die Wirkung von FOXA2 verstärkt werden. Dadurch könnte es beispielsweise auch bei NOCEsolo (#9) zur Reporterexpression in *Foxa2*-Expressionsdomänen wie Diencephalon und Darm kommen. Der Verlust der FOXA2-Bindestelle führt zur Verringerung der

Reporterexpression im Diencephalon. Im Darm ist keine Veränderung zu beobachten, allerdings wird hier zusätzlich Reporterexpression durch den heterologen Minimalpromoter hervorgerufen. Dies überdeckt möglicherweise den Effekt durch den Verlust der FOXA2-Bindestelle. Die Expression in Knoten und Notochord wird aufrechterhalten. Dazu ist möglicherweise der Einfluss des *Hprt*-Lokus ausreichend. Zudem die Spezifität der Expression durch NOCE durch weitere Faktoren außer FOXA2 bestimmt werden muss. Im *Noto*-Lokus wird das Chromatin möglicherweise nur durch FOXA2 gelockert. Dadurch ist die Bedeutung von FOXA2 bei der Regulation von endogenem *Noto* möglicherweise größer, als seine Bedeutung bei der Regulation von NOCE im *Hprt*-Lokus.

Alle bisher durchgeführten Experimente lassen darauf schließen, dass *Foxa2* NOCE und *Noto* reguliert.

7.1.5.3 Die Funktion von UFO für die Regulation von NOCE

Durch den Versuch NOCE weiter zu verkleinern wurde gezeigt, dass shoNO3 (#14) ausreichend ist, um Primitivknoten- und Notochord-spezifische Reporterexpression zu aktivieren. Jedoch enthält dieser Bereich keine potentielle Transkriptionsfaktorbindestelle, die offensichtlich ein Kandidat für Knoten- und Notochord-spezifische Aktivierung von Genexpression sein könnte. Alle zuvor beschriebenen und mutierten Bindestellen liegen außerhalb von shoNO3 (Abbildung 10, Abbildung 46 #14). Durch Sequenzvergleiche mit anderen Knoten und Notochord-spezifischen Enhancer-Regionen ließ sich ein Bereich identifizieren, der einem Abschnitt aus dem *Foxa2*-Promoter ähnelt. Die Sequenz aus dem *Foxa2*-Lokus ist ausreichend für Knoten- und Notochord-spezifische Expression. Allerdings konnte bislang der Faktor, der an die Sequenz bindet, nicht identifiziert werden (Sawada et al., 2005). Daher wird diese Sequenz in dieser Arbeit als potentielle Bindestelle für UFO, einen unbekanntem Faktor, bezeichnet.

Die Mutation der UFO-Bindestelle verändert die Reporterexpression von NOCE *in vivo*. Die lacZ-Aktivität in Knoten und Notochord bleibt erhalten wie im Wildtyp-Konstrukt. Darüber hinaus kommt es aber zu einer Verstärkung der ektopischen Expression in der Leberanlage. Dies zeigt, dass die potentielle UFO-Bindestelle eine Funktion in der Regulation von NOCE hat.

Sawada et al. haben gezeigt, dass in Zellkultur der *Foxa2*-Enhancer nicht direkt durch Wnt-Signale aktiviert wird, sondern indirekt. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit überein. Die Reduktion von WNT3A

führt zwar zu einer verringerten Expression von *Noto*, es kann aber keine direkte Regulation durch TCF/LEF1 *in vivo* gezeigt werden. Im Falle der Regulation wird angenommen, dass *Foxa2* durch einen Faktor reguliert wird, der selbst ein Zielgen des Wnt-Signalwegs ist. Sollten *Foxa2* und *Noto* von einem gemeinsamen Faktor reguliert werden, könnte dies UFO sein. Daraus könnte geschlossen werden, dass UFO möglicherweise durch Wnt-Signale reguliert wird.

Um die Identität von UFO zu klären, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Yeast-One-Hybrid*-Assay (Y1H) durchgeführt. Bei einem Y1H wird eine Bank von cDNAs mit einer transkriptionsaktivierenden Domäne fusioniert. Als Reporter-Konstrukt wird die zu untersuchende Sequenz vor einen Selektionsmarker kloniert. Durch Kotransfektion des Reporter-Konstrukts zusammen mit der cDNA-Bank in Hefezellen, werden Zellen erhalten, die den Reporter und jeweils meist ein cDNA-Konstrukt enthalten. Durch das cDNA-Konstrukt wird jeweils ein spezifisches Fusionsprotein exprimiert. Die Bindung des Fusionsproteins an die Enhancer-Sequenz aktiviert die Expression des Selektionsmarkers und die Zellen überleben die Selektion. Die Sequenzierung der selektierten cDNA-Konstrukte ermöglicht die Identifizierung der Faktoren, die an die Enhancer-Region binden. Allerdings wurde durch den Y1H kein Interaktionspartner für die UFO-Bindestelle identifiziert.

Eine Ursache dafür könnte sein, dass nicht ein Faktor allein an die UFO-Bindestelle bindet. Bei UFO könnte es sich um ein Dimer handeln. Die Interaktion der beiden Proteine könnte Voraussetzung für die Bindung an die Bindestelle sein. Das bei einem Y1H zufällig zwei Bindungspartner in eine Zelle transformiert werden, ist unwahrscheinlich. Daher werden solche Faktoren mit Hilfe eines Y1H oft nicht entdeckt.

Die Untersuchung der potentiellen UFO-bindenden Sequenz zeigte, dass dieser Bereich die Konsensus-Sequenz einer Bindestelle für ein Heterodimer eines Homeobox-Transkriptionsfaktors mit MEIS1 enthält. Diese Konsensus-Sequenz wird durch die Mutation im Rahmen dieser Arbeit zerstört. Da die Dimerisierung der beiden Faktoren für die Bindung wahrscheinlich eine Voraussetzung ist (Mann and Affolter, 1998; Moens and Selleri, 2006), könnte dies erklären, warum bisher kein Ansatz durch einen Yeast-1-Hybrid-Assay (Y1H) zur Identifizierung von UFO geführt hat.

Wie auch der folgende Teil der Untersuchungen zeigt, ist UFO an der Regulation von NOCE beteiligt. Die Identität von UFO muss noch geklärt werden.

7.1.5.4 FOXA2 und UFO wirken kooperativ auf NOCE

Die Mutation der Bindestellen für FOXA2 und UFO in NOCE führt zum vollständigen Verlust der Reporter-genaktivität in Primitivknoten und Notochord. Dies zeigt, dass NOCE von der kooperativen Aktivität von FOXA2 und UFO abhängig ist.

Bei der weiteren Suche nach konservierten Notochord-spezifischen Enhancer-Regionen und konservierten Sequenzen, die mehreren Notochord-spezifischen Enhancer-Regionen gemein sind, wurde festgestellt, dass es eine Reihe von Enhancer-Regionen gibt, die durch FOXA2 in Kombination mit einem zweiten unbekanntem Faktor reguliert werden. Die Sequenz der potentiellen Bindestelle von Rastegar et al. zeigt ebenfalls Gemeinsamkeiten mit der Sequenz der potentiellen UFO-Bindestelle. In einem Teil der Enhancer-Regionen reichte es aus, die FOXA2-Bindestelle mit der Sequenz des unbekanntem Faktors zu kombinieren, um Notochord-spezifische Reporter-genaktivität zu erreichen, allerdings nicht immer. (Rastegar et al., 2008)

Für NOCE ist ebenso zu erwarten, dass wenigstens noch eine weitere Sequenz, außer der Bindestellen für UFO und FOXA2, für die Aktivität benötigt wird. Durch *shoNO1* wurde gezeigt, dass der Bereich, der die UFO-bindende Sequenz nicht mehr enthält, aber die FOXA2-Bindestelle, noch ausreichend ist für Primitivknoten- und Notochord-spezifische Reporter-genexpression. Da *Foxa2* aber nicht nur im Knoten und Notochord exprimiert ist, muss die Spezifität noch durch einen weiteren Faktor reguliert werden, dessen Identität bislang noch nicht geklärt wurde.

Als Modell für die Regulation von NOCE ist es denkbar, dass die Bindung von FOXA2 und UFO ausreicht, um einen oder mehrere weitere Faktoren zu rekrutieren, die die Genexpression durch NOCE aktivieren. Der Verlust der FOXA2- oder UFO-Bindestelle hat nur geringe Auswirkungen, da die Regulation durch die verbliebenen Faktoren weitgehend beibehalten wird. Dadurch kommt es nur zu geringen Veränderungen im Expressionsmuster. Gehen beide Bindestellen verloren, kommt es zum vollständigen Verlust der Reporter-genaktivität, da die entsprechenden Aktivatoren nicht mehr rekrutiert werden können. Es wäre auch vorstellbar, dass FOXA2 und UFO daran beteiligt sind, einen Repressor von NOCE zu verdrängen. Jeder für sich allein ist dazu hinreichend. Der Verlust der Bindung beider Faktoren führt aber zur Repression der Expression.

7.2 Identifizierung von *Noto*- Zielgenen

Durch den Verlust von *Noto* kommt es zu Fehlern in der Festlegung der Links-Rechts-Achse. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die Struktur der Zilien im Primitivknoten gestört ist. Das Axonem der Zilien hat seine natürliche 9+0 oder 9+2 Struktur der Mikrotubuli verloren. Stattdessen kommen unterschiedliche Konfigurationen der Mikrotubuli mit variabler Anzahl von Dublets und Singlets vor. Die Zilien im Primitivknoten sind in *Noto*-Mutanten nicht motil oder bewegen sich unkoordiniert. (Beckers et al., 2007).

Die Identifizierung von Zielgenen für Transkriptionsfaktoren ist ein wesentlicher Schritt im Verständnis ihrer Funktion. Dazu gibt es unterschiedliche Ansätze. Ein Weg ist die differentielle RNA-Hybridisierung, bzw. der Mikroarray. Dadurch werden die Expressionsprofile unterschiedlicher Gewebe, oder Zellproben, mit einander verglichen. Dieses Verfahren erlaubt es innerhalb von kurzer Zeit die Expression vieler Gene zu überprüfen und Veränderungen im Expressionsprofil festzustellen. Allerdings werden in einem Mikroarray alle Veränderungen des Expressionsprofils festgestellt. Daher findet auch die Detektion von Unterschieden in der Zusammensetzung und dem Entwicklungsstadium der Gewebeproben statt. Diese Effekte werden durch die Hybridisierung mehrerer unabhängiger Proben erheblich verringert.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue potentielle Zielgene von *Noto* durch Mikroarray-Hybridisierungen identifiziert. Als Ausgangsgewebe wurden 6-8 Embryonen im späten Kopffaltenstadium verwendet. Das heißt, dass in den Proben nicht nur der Primitivknoten, die Expressionsdomäne von *Noto*, enthalten war, sondern auch viele andere Zellen. Die umliegenden Gewebe dienten sozusagen als Quelle der „Träger-RNA“ für die RNA aus den Knotenzellen.

Um die Unterschiede der einzelnen Proben, durch äußere Einflüsse, wie Aufbereitung und Entwicklungsunterschiede, zu verringern wurden jeweils zwei unabhängige WT und mutante RNA-Proben aufbereitet. Diese wurden in drei Hybridisierungen mit einander verglichen, je zwei Paare und eine Kreuzprobe. Die Auswertung der drei Durchgänge identifizierte 108 Gene aus 36.000 Proben auf dem verwendeten Chip, die in den *Noto*-Mutanten herauf oder herunter reguliert waren. Fünf dieser Gene wurden ausgeschlossen, da sie auch in *Noto*-unabhängigen Hybridisierungen aufgefallen waren. Ein Grund dafür ist möglicherweise, dass die Fluoreszenz-Farbstoffe, mit denen die RNA-Proben markiert werden, die Affinität zu

Erkennungssequenzen für bestimmte Gene verändern. Die Veränderung ihres Expressionsprofils ist wahrscheinlich nicht *Noto*-abhängig. Zur folgenden Untersuchung der Expression von potentiellen *Noto*-Zielgenen in Wildtyp und *Noto*-Mutanten wurden Gene ausgewählt, deren Signalstärke im Mikroarray wenigstens auf eine moderate oder starke Expression hindeutete. Weiterhin wurden die Gene ausgewählt, für die es Hinweise auf die Expression im Knoten oder eine Funktion in der Ziliogenese gab. Dazu kamen Gene, für die bislang keine Funktion bekannt ist, da diese potentielle neue Faktoren in Knotenmorphogenese und Ziliogenese sind.

Nach Überprüfung der Expression von 42 Genen wurde für neun dieser Gene gezeigt, dass sie mit *Noto* im Knoten koexprimiert und außerdem in *Noto*-Mutanten herunter reguliert sind.

Allerdings scheint keines der Gene ebenso wie *Noto* im neu gebildeten Notochord exprimiert zu werden. Da die Proben aber im späten Kopffaltenstadium gesammelt wurden, war dies auch nicht zwingend zu erwarten, da kein oder nur sehr wenig Notochord in den Proben enthalten war.

Unter den neun Knoten-spezifischen Genen ist eins, das im Mikroarray herauf reguliert ist, und acht, deren Expression in *Noto*-Mutanten verringert ist.

Unter den herunter regulierten Genen sind vier, die eine Bedeutung für Aufbau und Funktion von Zilien haben, dies sind *Foxj1*, *Dync2h1*, *Dynlrb2* und *Tektin2*. *Dync2h1* ist eine Komponente des retrograden Dyneinmotorkomplexes im IFT. Eine Mutation in *Dync2h1* führt unter anderem zu Defekten in der Links-Rechts-Festlegung. Ohne *Dync2h1* kommt es zu einer Verkürzung der Zilien und Blasen-artigen Ausstülpungen an den Zilien, die vermutlich mit IFT-Partikeln gefüllt sind (Huangfu and Anderson, 2005). Für *Dynlrb2* wurde noch keine Beteiligung am retrograden IFT nachgewiesen. *Dynlrb2* codiert für ein Dynein vom *roadblock*-Typ. Für diesen Typ wurden bislang zwei Gene identifiziert, die in Säugetierzellen exprimiert sind, *Dynlrb1* und *Dynlrb2*. *Dynlrb1* ist ein Teil von Dynein-Motorkomplexen für den retrograden Transport innerhalb der Zelle (Wanschers et al., 2008). Die spezifische Expression von *Dynlrb2* im Primitivknoten, könnte darauf hindeuten, dass es sich um eine neue Komponente des retrograden IFT Motorkomplexes handelt.

Die Zilien in *Noto*-Mutanten sind zwar ebenso verkürzt wie die von *Dync2h1*-Mutanten. Allerdings sind in den *Noto*-Mutanten keine Ausstülpungen zu beobachten wie in den *Dync2h1*-Mutanten. Wahrscheinlich ist *Noto* nicht nur notwendig für den retrograden IFT, sondern auch noch für andere Prozesse in den Zilien.

Tektin2 kolokalisiert mit Zentrosomen und Basalkörper und ist ebenfalls in *Noto*-Mutanten geringer exprimiert. Die Funktion von *Tektin2* ist noch nicht vollständig verstanden. Es wurde gezeigt, dass es *in vitro* notwendig ist zum Abschluss der Zytokinese, also der endgültigen Trennung der Tochterzellen nach der Zellteilung von einander (Durcan et al., 2008). Weiterhin soll es einen stabilisierenden Effekt auf die Zentriole haben (Bettencourt-Dias and Glover, 2007). Wie die Funktion von *Tektin2* in der Ziliogenese ist, wurde bislang noch nicht untersucht.

Bei den *Noto*-Mutanten wurde beobachtet, dass die Zilien und Basalkörper teilweise in das Zytoplasma eingesunken und nicht richtig an der Zellmembran befestigt sind. Dies wurde auch in der Lunge von *Foxj1*-Mutanten beobachtet (Brody et al., 2000). *Foxj1* ist in *Noto*-Mutanten geringer exprimiert. Da *Foxj1* ein übergeordneter Faktor in der Regulation von Genen ist, die für die Ziliogenese wichtig sind, wurde seine Funktion im Zusammenhang mit *Noto* im folgenden Abschnitt genauer untersucht.

Mit Hilfe des Mikroarrays wurden fünf Gene gefunden, deren Expression in *Noto*-Mutanten reduziert ist, die aber bislang noch nicht funktionell charakterisiert wurden. Für alle fünf Gene mit unbekannter Funktion wurde gezeigt, dass sie Knotenspezifisch exprimiert sind. Der Verlust von *Noto* führt zu einer verringerten Expression von vier Zielgenen. Ein Hinweis auf eine Funktion im Zusammenhang mit Aufbau und Funktion der Zilien besteht darin, dass alle vier Gene in einer der Datenbanken über das Proteom der Zilien aufgeführt sind (Inglis et al., 2006; McClintock et al., 2008). Diese basieren allerdings nicht auf experimentellen Daten, sondern nur auf Datenbankanalysen. Durch weiterführende Untersuchungen im Labor von Prof. Dr. Achim Gossler wurde gezeigt, dass sie zudem in anderen Zilientragenden Geweben exprimiert sind. Daher haben die *Noto*-Zielgene mit bislang unbekannter Funktion möglicherweise eine generelle Bedeutung für den Aufbau und die Funktion von Zilien, die nicht auf den Knoten beschränkt ist.

Bislang ist nicht bekannt, ob es sich bei NOTO um einen Aktivator oder Repressor der Transkription handelt und auch die Bindestelle wurde noch nicht charakterisiert. Durch den Mikroarray werden Gene identifiziert, deren Expression durch *Noto* beeinflusst wird. Ob dieser Einfluss eine direkte Regulation ist, oder indirekt durch andere Faktoren vermittelt wird, kann nicht bestimmt werden.

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation werden die Proteine an der genomischen DNA in Gewebe oder Zellen fixiert, danach wird die DNA geschert. Durch Immunpräzipitation des Faktors von Interesse, werden die DNA-Fragmente mit

präzipitiert. Die präzipitierten Sequenzen können anschließend wieder vom Transkriptionsfaktor gelöst und bestimmt werden. Dadurch werden direkte Zielgene bestimmt, da der Nachweis durch direkte Bindung des Faktors an die Enhancer-Regionen geführt wird. Der Vergleich der präzipitierten Sequenzen ermöglicht eine Bestimmung der Bindestelle. Zusätzlich kann durch die Untersuchung der Regulation dieser direkten Zielgene in An- und Abwesenheit des Transkriptionsfaktors eine Aussage über die regulatorischen Eigenschaften des Faktors gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide ausgewählt zur Herstellung von zwei Antikörpern gegen *Noto*. Die Charakterisierung der Antikörper zeigte, dass einer der Antikörper eingesetzt werden kann für Immunpräzipitation und Western Blot von NOTO. Der zweite Antikörper ist zusätzlich zur Ganzpräparat-Immunhistochemie geeignet. Mit Hilfe dieser Antikörper könnte ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der direkten Zielgene von *Noto* durchgeführt werden.

Für viele Homeobox-Transkriptionsfaktoren ist die Interaktion mit einem Partner Voraussetzung zur Bindung an die Zielgene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Yeast-2-Hybrid-Assay vorbereitet und in Auftrag gegeben. Die Auswertung der Ergebnisse ergab allerdings, dass nur ein Kandidat in Hefe an NOTO bindet und dieser nicht mit *Noto* im Embryo koexprimiert wird. Dadurch konnte eine direkte Interaktion mit *Noto in vivo* ausgeschlossen werden. Die weitere Suche nach direkten Zielgenen und Interaktionspartnern von NOTO wird notwendig sein, um die spezifische Funktion von *Noto* in Knoten und Notochord besser zu verstehen.

Durch den Mikroarray im Rahmen dieser Arbeit wurden Zielgene von *Noto* gefunden. Dies trägt zum Verständnis der Genregulation von Ziliogenese im Knoten und der Morphogenese des Knotens bei.

7.3 Spezifische Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Knoten

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, haben Zilien eine große Bedeutung in der Festlegung der Links-Rechts-Achse. Die Zellen in der Grube des Primitivknotens tragen ein primäres Zilium. Die Anwesenheit und die Motilität der Zilien sind wichtig für die Festlegung der Links-Rechts-Achse.

Der Transkriptionsfaktor *Noto* ist wichtig für die Ziliogenese im Knoten (Beckers et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Foxj1* einer der Effektoren von *Noto* ist.

Für den Transkriptionsfaktor *Foxj1* wurde gezeigt, dass er notwendig ist für die Ziliogenese in anderen Geweben (Chen et al., 1998; Zhang et al., 2004; Gomperts et al., 2004; Brody et al., 2000). Zur Funktion von *Foxj1* im Primitivknoten waren noch Fragen offen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von *Foxj1* im Knoten untersucht. Das Ziel war die Differenzierung der spezifischen Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Knoten.

7.3.1 Die Funktion von *Foxj1* in der Ziliogenese im Knoten

Der Verlust von *Foxj1* wird bereits seit einigen Jahren untersucht. Von zwei Arbeitsgruppen wurden Untersuchungen der *Foxj1-knock-out* Mäuse veröffentlicht (Brody et al., 2000; Zhang et al., 2004). Dabei wurde gezeigt, dass der Verlust von *Foxj1* mehrere Defekte nach sich zieht. Es kommt unter anderem zum Verlust der Zilien in den Atemwegen, der Ausbildung eines Wasserkopfes und zu Links-Rechts-Defekten. Während für die Lunge und das Gehirn der Verlust der Zilien gezeigt wurde, schienen die Zilien im Primitivknoten intakt zu sein. Die Erklärung für die Links-Rechts-Defekte in *Foxj1*-Mutanten stand daher noch aus.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Funktion von *Foxj1* im Primitivknoten, um seine Funktion in der Festlegung der Links-Rechts-Achse zu erklären.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen wurde hier deutlich, dass die Zilien im Primitivknoten ohne *Foxj1* auf 56% verkürzt sind. Wie das Axonem der Zilien aussieht, ist Gegenstand laufender Experimente. Die bisherigen Untersuchungen durch Rasterelektronenmikroskopie zeigen äußerliche Ähnlichkeiten zu den Zilien in *Noto*-Mutanten. Daher ist es möglich, dass die Defekte in den Zilien in *Noto*- und *Foxj1*-Mutanten vergleichbar sind. Der Zilien-Phänotyp von *Noto*-Mutanten könnte also durch den Verlust von *Foxj1* entstehen. Dies wird dadurch unterstützt, dass *Dync2h1* und *Dnylrb2* auch in *Foxj1*-Mutanten herunter reguliert sind. Des Weiteren ist *Rfx3*, ein Transkriptionsfaktor, der *Noto* nachgeschaltet ist (Beckers et al., 2007), auch in *Foxj1*-Mutanten herunter reguliert. *Rfx3* reguliert *D2lic*, eine andere Komponente des retrograden IFT-Motorkomplexes (Bonnafe et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Foxj1* die Expression von Komponenten des retrograden IFT-Motorkomplexes im Primitivknoten reguliert.

Foxj1 reguliert auch *Tektin2* und *Dnahc11*. Zwei strukturelle Komponenten des Ziliums. *Dnahc11* ist eine Komponente der Dyneinarme von motilen Zilien (Supp et

al., 1997) und *Tektin2* gehört zum Basalkörper (Durcan et al., 2008). Beide werden für die Funktion von Zilien und Basalkörpern benötigt.

Foxj1 ist in der Maus notwendig für die Ziliogenese im Primitivknoten. Dies ist wahrscheinlich die Ursache der Links-Rechts-Defekte.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass *Foxj1* notwendig ist zur Ausbildung von Zilien im *Kupfer's vesicle* und GRP in Zebrafisch und *Xenopus*. Dies sind die äquivalenten Strukturen zum Primitivknoten in der Maus. Des Weiteren ist *Foxj1* ausreichend zur Induktion von ektopischen primären Zilien (Stubbs et al., 2008). Diese Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *Foxj1* an der Ziliogenese im Knoten beteiligt ist.

Die Zielgene von *Noto*, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, und *Rfx3* sind ebenfalls in *Foxj1*-defizienten Embryonen herunter reguliert. Dies deutet darauf hin, dass die Funktion von *Noto* in der Ziliogenese wenigstens zum Teil durch seinen Effektor *Foxj1* vermittelt wird.

7.3.2 *Foxj1* in der Kontrolle der Zellzahl im Knoten

Der Verlust von *Foxj1* führt nicht nur zur Veränderung der Zilien, sondern auch zu einer Verkleinerung des Knotens. Die Anzahl der Grubenzellen im Primitivknoten ist in *Foxj1*-Mutanten auf 54% reduziert. Für *Foxj1* ist bislang keine Funktion im Zusammenhang mit der Zellproliferation bekannt. Dieser Effekt kann aber möglicherweise durch Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit erklärt werden. Die Reduktion der Zilien-tragenden Zellen im Knoten wurde auch bei den *Noto*-defizienten Embryonen beobachtet (Prof. Dr. Achim Gossler und Dr. Anja Beckers, nicht publizierte Daten). Sie wurden allerdings nicht quantifiziert, da dies durch die Störung der Morphologie erschwert wurde.

Der Primitivknoten ist eine dynamische Population von Zellen. Nach anterior wird durch konvergente Ausdehnung und Zellinterkalation das Notochord aus Grubenzellen gebildet. Damit der Knoten trotzdem weiter besteht, werden von posterior mesendodermale Zellen rekrutiert, die in den Knoten wandern und die ausgewanderten Zellen ersetzen (Kinder et al., 2001). Zusätzlich sind die Zellen im Knoten in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten und dadurch die Population aufrecht zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Foxj1* *Tektin2*, eine Komponente des Basalkörpers, reguliert. *Tektin2* kolokalisiert auch mit den Zentrosomen während der Zellteilung. In Zellkultur wird *Tektin2* zum Abschluss der Zytokinese benötigt, also zur

endgültigen Trennung der beiden Tochterzellen (Durcan et al., 2008). Der Verlust von *Tektin2* könnte also in *Foxj1*-Mutanten zu Störungen in der Zellproliferation der Zellen im Knoten führen.

Weiterhin wurde durch die Arbeit an den bislang nicht genau charakterisierten Zielgenen von *Noto* im Labor von Prof. Dr. Achim Gossler gezeigt, dass diese Gene nicht alle in Zellkultur überexprimiert werden können. Die Expression der Proteine führt zum Zelltod. Dies deutet darauf hin, dass durch *Noto* und *Foxj1* weitere Gene reguliert werden, die nicht nur eine Funktion in der Ziliogenese haben. Durch eine Funktion an den Zentriolen haben sie auch Einfluss auf das Überleben der Zellen. Durch Fehler während der Zellteilung, z.B. die Bildung multipolarer Spindeln, durch mehr als zwei Zentrosomen, oder Missregulation der Ausbildung der Spindeln wird der Zelltod eingeleitet (Bettencourt-Dias and Glover, 2007).

Durch eine Störung der Zentriole für Basalkörper und Zentrosome in den *Foxj1*- und *Noto*-Mutanten kann es zum Zelltod der Zellen kommen, die im Knoten wieder in den Zellzyklus eintreten. Dadurch könnte die Zellzahl im Primitivknoten verringert werden.

7.3.3 *Noto* und *Foxj1* in Knotenmorphogenese und PCP

Ein Unterschied zwischen den Primitivknoten von *Noto*- und *Foxj1*-Mutanten ist im Rahmen dieser Arbeit deutlich geworden. Normalerweise liegen die Kronenzellen Hufeisen-förmig, um den Primitivknoten herum, angeordnet vor. Für die *Noto*-Mutanten wurde gezeigt, dass die Primitivknotenmorphogenese gestört ist. Die Zilien-tragenden Grubenzellen sind nicht in der Grube organisiert. Sie sind durchmischt mit Kronenzellen (Beckers et al., 2007). Der Primitivknoten von *Foxj1*-Mutanten ist zwar kleiner als der Wildtyp, aber die Grube wird ausgebildet, der Aufbau bleibt scheinbar erhalten. Die Defekte des Primitivknotens in *Noto*-Mutanten haben also eine Ursache, die unabhängig von *Foxj1* ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein potentielles Zielgen von *Noto* (Beckers et al., 2007) gefunden, dass nicht in *Foxj1*-Mutanten reduziert exprimiert wird, *Nphp3*. Die NPHP-Gene wurde identifiziert als eine Gruppe von Genen, die eine zystische Nierenerkrankung verursacht. Für NPHP3 wurde gezeigt, dass es auf Proteinebene mit NPHP2, also Inversin, interagiert. Da die *knock-out* Mäuse beider Gene einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, wird davon ausgegangen, dass sie am selben Prozess beteiligt sind (Yokoyama et al., 1993; Bergmann et al., 2008). Beide Gene verursachen eine hundertprozentige Umkehrung des Organ-*Situs*, im Gegensatz zur *Noto*-Mutante, bei der der *Situs* zufällig festgelegt wird.

Durch die Untersuchung einer Doppelmutante von *Foxj1* und *Inversin* wurde gezeigt, dass der Verlust von *Foxj1* den von *Inversin* überlagert. In Bezug auf die Links-Rechts-Asymmetrie tritt also nur der *Foxj1*-Phänotyp, mit einer zufälligen Festlegung von Links und Rechts zu Tage (Tamakoshi et al., 2006). Vergleichbar ist es wahrscheinlich bei den *Noto*-Mutanten. Der Verlust von *Nphp3* trägt möglicherweise zum Phänotyp von *Noto* bei, allerdings sind *Noto* und *Foxj1 Nphp3* in Bezug auf die Festlegung der Links-Rechts-Achse vorgeschaltet. Nach den bisherigen Untersuchungen wird erwartet, dass *Nphp3* im *Noto*^{*Foxj1Ki/Foxj1Ki*} nicht wiederhergestellt wird, da es nicht durch *Foxj1* reguliert wird (Abbildung 38). Da der Defekt in der Knotenmorphogenese im *Noto*^{*Foxj1Ki/Foxj1Ki*} erhalten ist, ist *Nphp3* möglicherweise an diesem Prozess beteiligt.

Für *Inversin* wurde eine Beteiligung am PCP-Signalweg gezeigt (Simons et al., 2005). *Nphp3* hat wahrscheinlich ebenso eine Funktion im PCP-Signalweg. Der PCP-Signalweg wird benötigt zur Polarisierung von Zellen orthogonal zu ihrer apikal-basalen Achse. Darauf aufbauend wird die Migrationsrichtung für Zellen, die Ausrichtung von Zilien und auch die Richtung für konvergente Ausdehnung festgelegt (Gerdes and Katsanis, 2008).

Möglicherweise spielt ein Defekt der PCP-Signalübertragung eine Rolle bei dem Primitivknoten-Phänotyp von *Noto*. Der Verlust von *Nphp3* könnte die Zellen in ihrer Migration in den Knoten behindern. Dadurch könnte auch die Migration und Zellinterkalation aus dem Knoten heraus beeinträchtigt werden. Daher wird nicht nur der Primitivknoten unterbrochen, sondern auch das kaudale Notochord, welches aus dem Knoten hervorgeht und in den *Noto*-Mutanten Lücken aufweist.

Der PCP-Signalweg ist komplex und noch nicht voll verstanden. Für die Regulation der unterschiedlichen Prozesse, wie die Vorgabe der Migrations- oder Teilungsrichtung für Zellen, die Ausrichtung von Zilien und auch die Richtung für konvergente Ausdehnung wird eine gute Feinabstimmung benötigt. Im Knoten werden alle diese vier Prozesse benötigt, aber nicht gleichzeitig in allen Zellen. Daher muss die Feinabstimmung in der Lage sein, die Signale in das richtige Verhalten der Zelle zu übersetzen. Daran könnte *Nphp3* beteiligt sein.

Die Zilien sind als Plattform für PCP-Signalübertragung wichtig, daher wirken Mutationen in basalen Faktoren (*Noto*, *Foxj1*) der Ziliogenese dem Verlust des PCP-Signalweges vorgeschaltet. Der Verlust der Zilien führt unter anderem zu Defekten in der Interpretation der PCP-Signale. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass *Dishevelled*,

eine Komponente des PCP-Signalweges, benötigt wird zum Andocken der Basalkörper an die apikale Zelloberfläche, also für den ersten Schritt der Ziliogenese (Park et al., 2008).

Bei der Vermittlung von PCP-Signalen und der Ziliogenese sind wahrscheinlich Rückkopplungsmechanismen vorhanden, deren Aufschlüsselung weiteren Einblick in die Festlegung der Links-Rechts-Achse geben wird. Dazu können die Zielgene von *Noto*, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden beitragen. Diese sind durch *Foxj1* reguliert. Aber auch für *Foxj1* wurde gezeigt, dass es Faktoren beeinflusst, die zusammen mit *Dishevelled* am Andocken der Basalkörper an der Zellmembran beteiligt sind (Pan et al., 2007).

7.3.4 Differenzierung der Funktionen von *Noto* und *Foxj1* im Primitivknoten der Maus

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass *Noto* zur Aktivierung von *Foxj1* im Primitivknoten benötigt wird. Durch *Foxj1* werden verschiedene Faktoren reguliert, die für Aufbau und Funktion von Zilien benötigt werden. Durch die Wiederherstellung von *Foxj1* im Primitivknoten und gleichzeitiger Ausschaltung von *Noto* (*Noto^{Foxj1Ki}*) wurde gezeigt, dass die Expression potentieller Zielgene im Knoten wiederhergestellt wird. Die Defekte in der Knotenmorphogenese bleiben erhalten. Daher kann angenommen werden, dass die Ziliogenese im Knoten wenigstens teilweise durch *Foxj1*, als Effektor von *Noto*, vermittelt wird. Darüber hinaus reguliert *Noto* Komponenten anderer Signalwege, die an der Morphogenese beteiligt sind. Eine davon könnte *Nphp3* sein. Daher könnte der PCP-Signalweg durch *Noto* beeinflusst werden und an der Morphogenese des Primitivknotens beteiligt sein.

Zur weiteren Differenzierung der Funktionen von *Noto* und *Foxj1* und zum Verständnis, wie *Noto* die Knotenmorphogenese reguliert, wird das *Noto^{Foxj1Ki/Foxj1Ki}*-Allel weiter analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Foxj1* ein wichtiger Effektor von *Noto* ist. Durch *Foxj1* werden Aspekte der Ziliogenese im Primitivknoten reguliert. *Noto* reguliert darüber hinaus Aspekte der Primitivknotenmorphogenese.

8 Anhang

8.1 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, 1725-1736.
- Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193, 317-319.
- Afzelius, B.A. (1982). Immotile-cilia syndrome: ultrastructural features. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl* 118, 117-122.
- Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Cascio, S., Rossant, J., and Zaret, K.S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315.
- Beckers, A., Alten, L., Viebahn, C., Andre, P., and Gossler, A. (2007). The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left right patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 15765-15770.
- Bergmann, C., Fliegau, M., Bruchle, N.O., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kranzlin, B., Nurnberg, G., Becker, C., Grimm, T., Girschick, G., Lynch, S.A., Kelehan, P., Senderek, J., Neuhaus, T.J., Stallmach, T., Zentgraf, H., Nurnberg, P., Gretz, N., Lo, C., Lienkamp, S., Schafer, T., Walz, G., Benzing, T., Zerres, K., and Omran, H. (2008). Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 959-970.
- Bettencourt-Dias, M. and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 451-463.
- 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, 133-146.
- Bonnafant, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., Ucla, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubrulle, R., Couple, 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, 4417-4427.
- Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M., Zuppan, C.W., and Fletcher, W.H. (1995). Mutations of the *Connexin43* gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N. Engl. J. Med.* 332, 1323-1329.
- 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, 45-51.

- Bronson, S.K., Plaehn, E.G., Kluckman, K.D., Hagaman, J.R., Maeda, N., and Smithies, O. (1996). Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 9067-9072.
- Brueckner, M., D'Eustachio, P., and Horwich, A.L. (1989). Linkage mapping of a mouse gene, *iv*, that controls left-right asymmetry of the heart and viscera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 5035-5038.
- Buceta, J., Ibanes, M., Rasskin-Gutman, D., Okada, Y., Hirokawa, N., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2005). Nodal cilia dynamics and the specification of the left/right axis in early vertebrate embryo development. *Biophys. J.* *89*, 2199-2209.
- Caspar, T., Larkins, C.E., and Anderson, K.V. (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev. Cell* *12*, 767-778.
- 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*, 1077-1082.
- Choi, K.S., Cohn, M.J., and Harfe, B.D. (2008). Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev. Dyn.* *237*, 3953-3958.
- Chomczynski, P. and Qasba, P.K. (1984). Alkaline transfer of DNA to plastic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *122*, 340-344.
- Dawe, H.R., Farr, H., and Gull, K. (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell Sci.* *120*, 7-15.
- de Saint, P.B. and Sullivan, W. (1998). Spindle assembly and mitosis without centrosomes in parthenogenetic *Sciara* embryos. *J. Cell Biol.* *141*, 1383-1391.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* *330*, 576-578.
- Doetschman, T., Shull, M., Kier, A., and Coffin, J.D. (1993). Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* *22*, 618-629.
- Durcan, T.M., Halpin, E.S., Rao, T., Collins, N.S., Tribble, E.K., Hornick, J.E., and Hinchcliffe, E.H. (2008). Tektin 2 is required for central spindle microtubule organization and the completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* *181*, 595-603.
- Eggenchwiler, J.T. and Anderson, K.V. (2007). Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 345-373.
- 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*, 1247-1260.

- Evans, V., Hatzopoulos, A., Aird, W.C., Rayburn, H.B., Rosenberg, R.D., and Kuivenhoven, J.A. (2000). Targeting the Hprt locus in mice reveals differential regulation of Tie2 gene expression in the endothelium. *Physiol Genomics* 2, 67-75.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fischer, E. and Pontoglio, M. (2006). [Planar cell polarity and polycystic kidney disease]. *Med. Sci. (Paris)* 22, 576-578.
- Fliegauf, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 880-893.
- Franco, D. and Campione, M. (2003). The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 157-163.
- Friedman, J.R. and Kaestner, K.H. (2006). The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2317-2328.
- Gerdes, J.M., Davis, E.E., and Katsanis, N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137, 32-45.
- Gerdes, J.M. and Katsanis, N. (2008). Ciliary function and Wnt signal modulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 85, 175-195.
- 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, 1329-1337.
- Gont, L.K., Steinbeisser, H., Blumberg, B., and de Robertis, E.M. (1993). Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119, 991-1004.
- Greco, T.L., Takada, S., Newhouse, M.M., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Camper, S.A. (1996). Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev.* 10, 313-324.
- Habas, R. and Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J. Biol.* 4, 2.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* 3, 103-113.
- Hildebrandt, F. and Zhou, W. (2007). Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1855-1871.
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., and Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125, 33-45.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.

- 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*, 4935-4945.
- Huangfu, D. and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 11325-11330.
- Inglis, P.N., Boroevich, K.A., and Leroux, M.R. (2006). Piecing together a ciliome. *Trends Genet.* *22*, 491-500.
- Jeong, Y. and Epstein, D.J. (2003). Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development* *130*, 3891-3902.
- Jones, C. and Chen, P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* *29*, 120-132.
- Jones, C., Roper, V.C., Foucher, I., Qian, D., Banizs, B., Petit, C., Yoder, B.K., and Chen, P. (2008). Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat. Genet.* *40*, 69-77.
- Keller, L.C., Romijn, E.P., Zamora, I., Yates, J.R., III, and Marshall, W.F. (2005). Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* *15*, 1090-1098.
- 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*, 3623-3634.
- Lawrence, P.A., Struhl, G., and Casal, J. (2007). Planar cell polarity: one or two pathways? *Nat. Rev. Genet.* *8*, 555-563.
- Lee, J.D. and Anderson, K.V. (2008). Morphogenesis of the node and notochord: The cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse. *Dev. Dyn.*
- Levin, M. and Palmer, A.R. (2007). Left-right patterning from the inside out: widespread evidence for intracellular control. *Bioessays* *29*, 271-287.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.* *13*, 476-484.
- Lopez-Gracia, M.L. and Ros, M.A. (2007). Left-right asymmetry in vertebrate development. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* *188*, 1-121, back.
- Mann, R.S. and Affolter, M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 423-429.
- Marshall, W.F. (2008). Basal bodies platforms for building cilia. *Curr. Top. Dev. Biol.* *85*, 1-22.

- McClintock, T.S., Glasser, C.E., Bose, S.C., and Bergman, D.A. (2008). Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiol Genomics* 32, 198-206.
- Mikels, A.J. and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
- Minami, T., Donovan, D.J., Tsai, J.C., Rosenberg, R.D., and Aird, W.C. (2002). Differential regulation of the von Willebrand factor and Flt-1 promoters in the endothelium of hypoxanthine phosphoribosyltransferase-targeted mice. *Blood* 100, 4019-4025.
- Mitchell, B., Jacobs, R., Li, J., Chien, S., and Kintner, C. (2007). A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature* 447, 97-101.
- Moens, C.B. and Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* 291, 193-206.
- Nakaya, M.A., Biris, K., Tsukiyama, T., Jaime, S., Rawls, J.A., and Yamaguchi, T.P. (2005). Wnt3a links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation. *Development* 132, 5425-5436.
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., and Sasaki, H. (2008). Tead4 is required for specification of trophoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* 125, 270-283.
- 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, 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, 829-837.
- Ocbina, P.J. and Anderson, K.V. (2008). Intraflagellar transport, cilia, and mammalian Hedgehog signaling: Analysis in mouse embryonic fibroblasts. *Dev. Dyn.*
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* 4, 459-468.
- Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., Foreman, J.W., Goodship, J.A., Strachan, T., Kispert, A., Wolf, M.T., Gagnadoux, M.F., Nivet, H., Antignac, C., Walz, G., Drummond, I.A., Benzing, T., and Hildebrandt, F. (2003). Mutations in *INVS* encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat. Genet.* 34, 413-420.
- Ovcharenko, I., Nobrega, M.A., Loots, G.G., and Stubbs, L. (2004). ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res.* 32, W280-W286.
- Pan, J., You, Y., Huang, T., and Brody, S.L. (2007). RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1. *J. Cell Sci.* 120, 1868-1876.

- Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C., and Wallingford, J.B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat. Genet.* *40*, 871-879.
- Pedersen, L.B. and Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.* *85*, 23-61.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* *23*, 4878-4884.
- Rastegar, S., Hess, I., Dickmeis, T., Nicod, J.C., Ertzer, R., Hadzhiev, Y., Thies, W.G., Scherer, G., and Strahle, U. (2008). The words of the regulatory code are arranged in a variable manner in highly conserved enhancers. *Dev. Biol.* *318*, 366-377.
- Reid, L.H., Gregg, R.G., Smithies, O., and Koller, B.H. (1990). Regulatory elements in the introns of the human HPRT gene are necessary for its expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 4299-4303.
- Reid, L.H., Shesely, E.G., Kim, H.S., and Smithies, O. (1991). Cotransformation and gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* *11*, 2769-2777.
- Sandelin, A., Wasserman, W.W., and Lenhard, B. (2004). ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res.* *32*, W249-W252.
- Sasaki, H. and Hogan, B.L. (1996). Enhancer analysis of the mouse HNF-3 beta gene: regulatory elements for node/notochord and floor plate are independent and consist of multiple sub-elements. *Genes Cells* *1*, 59-72.
- Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y., and Sasaki, H. (2008). Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol. Cell Biol.* *28*, 3177-3189.
- Sawada, A., Nishizaki, Y., Sato, H., Yada, Y., Nakayama, R., Yamamoto, S., Nishioka, N., Kondoh, H., and Sasaki, H. (2005). Tead proteins activate the Foxa2 enhancer in the node in cooperation with a second factor. *Development* *132*, 4719-4729.
- 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*, 60-66.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* *2*, 905-909.
- Sharma, N., Berbari, N.F., and Yoder, B.K. (2008). Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases. *Curr. Top. Dev. Biol.* *85*, 371-427.
- Shiratori, H. and Hamada, H. (2006). The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* *133*, 2095-2104.

- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., and Walz, G. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* 37, 537-543.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stein, S. and Kessel, M. (1995). A homeobox gene involved in node, notochord and neural plate formation of chick embryos. *Mech. Dev.* 49, 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, 519-533.
- Stubbs, J.L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J.C., and Kintner, C. (2008). The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Nat. Genet.* 40, 1454-1460.
- Supp, D.M., Brueckner, M., Kuehn, M.R., Witte, D.P., Lowe, L.A., McGrath, J., Corrales, J., and Potter, S.S. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* 126, 5495-5504.
- 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, 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*^{-/-} mice analysis. *J. Cell Biol.* 145, 825-836.
- 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, 150-157.
- Tamakoshi, T., Itakura, T., Chandra, A., Uezato, T., Yang, Z., Xue, X.D., Wang, B., Hackett, B.P., Yokoyama, T., and Miura, N. (2006). Roles of the Foxj1 and Inv genes in the left-right determination of internal organs in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 932-938.
- Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435, 172-177.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367-377.

- Visel,A., Minovitsky,S., Dubchak,I., and Pennacchio,L.A. (2007). VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res.* 35, D88-D92.
- Wallingford,J.B. and Habas,R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421-4436.
- Wanschers,B., van,d., V, Wijers,M., Wieringa,B., King,S.M., and Fransen,J. (2008). Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 183-196.
- Yagi,R., Kohn,M.J., Karavanova,I., Kaneko,K.J., Vullhorst,D., DePamphilis,M.L., and Buonanno,A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134, 3827-3836.
- Yamaguchi,T.P., Takada,S., Yoshikawa,Y., Wu,N., and McMahon,A.P. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* 13, 3185-3190.
- Yamamoto,M., Mine,N., Mochida,K., Sakai,Y., Saijoh,Y., Meno,C., and Hamada,H. (2003). Nodal signaling induces the midline barrier by activating Nodal expression in the lateral plate. *Development* 130, 1795-1804.
- Yamanaka,Y., Tamplin,O.J., Beckers,A., Gossler,A., and Rossant,J. (2007). Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms. *Dev. Cell* 13, 884-896.
- 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, 679-682.
- Zhang,M., Bolting,M.F., Knowles,H.J., Karnes,H., and Hackett,B.P. (2004). Foxj1 regulates asymmetric gene expression during left-right axis patterning in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1413-1420.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alten
 Vorname: Leonie
 Anschrift: Bröhnfeld 7A
 30926 Seelze
 Geburtsdatum und -ort: 24.04.1980 in Hannover
 Eltern: Erich Alten, geboren am 27.8.1950
 Ilona Alten, geb. Gehrke, geboren am 14.5.1957
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1986-1990 Grundschule Groß Munzel (Stadt Barsinghausen)
 1990-1992 Orientierungstufe KGS Barsinghausen
 1992-1999 Hannah-Arendt-Gymnasium Barsinghausen
 1999 Abitur

Studium

Oktober 1999 Studium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

 April 2004 Diplomhauptprüfungen (Wahlpflichtfächer Zell- und Entwicklungsbiologie und Biophysikalische Chemie)

 Mai-Dezember 2004 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Gossler

 Juni 2005 Abschluss: Diplom Biochemikerin

 2005- 2009 Leibniz Universität Hannover
 Eingeschrieben im Promotionsstudiengang Biochemie
 Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. Achim Gossler am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover; Anfertigung dieser Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Gossler.

8.3 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

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. Epub September 20, 2007, 10.1073/pnas.0704344104