

Die Rolle von *Tbx2* und *Tbx3* während der kraniofazialen Entwicklung der Maus

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

Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

MSc. Susann Placzko, geb. Zirzow
Geboren am 3. Dezember 1981 in Hoyerswerda

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 15.10.2006 – 16.12.2010 an der Medizinischen Hochschule im Institut für Molekularbiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert angefertigt.

Referent Prof. Dr. Andreas Kispert

Koreferent Prof. Dr. Dietmar Manstein

Tag der Promotion 01.März 2011

Meiner Familie

Zusammenfassung

Tbx2 und *Tbx3* sind zwei wichtige Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der *T-Box* Gene gehören. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren spielt während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Um *Tbx2* und *Tbx3* genauer zu charakterisieren und ihre Rolle während der Embryonalentwicklung besser darzustellen, wurden mittels Expressionsanalyse mehrere Expressionsdomänen identifiziert und die Rolle von *Tbx2* und *Tbx3* in zwei dieser Domänen in Folgeexperimenten genauer charakterisiert. Dabei handelt es sich um den sekundären Gaumen und die Anlage der Backenzähne.

Die Entwicklung des sekundären Gaumens ist ein streng regulierter und komplexer Prozess. Störungen, genetischer oder umweltbedingter Natur dieses Prozesses, führen zur Ausbildung einer Gaumenspalte. Mittels Expressionsanalyse wurde gezeigt, dass *Tbx2* und *Tbx3* im Mesenchym der auswachsenden Gaumen exprimiert ist. Mit Hilfe von Verlustmutanten konnte festgestellt werden, dass beide Gene einen wichtigen Einfluss auf die Gaumenentwicklung haben und deren Verlust zur Ausbildung einer Gaumenspalte führt. Durch die weiterführende Analyse an *Tbx2* Verlustmutanten konnte gezeigt werden, dass es sich um einen Defekt während des Auswachsens des Gaumens handelt. Dieser Defekt führt zu kleineren Gaumenfortsätzen, die aber weiterhin in der Lage sind zu fusionieren. Im Mesenchym dieser Fortsätze kommt es zu Proliferations- und Apoptosedefekten, die begleitet sind von erhöhten Expressionsleveln von *Bmp4* und *CyclinD1*.

Auch im Bereich der Molaren zeigen beide Transkriptionsfaktoren mesenchymale Expression, direkt benachbart ist zur einwachsenden Zahnknospe. Während im normalen Gebiss der Maus ein Schneidezahn und die jeweils 3 Backenzähne pro Quadrant durch eine zahnlose Lücke voneinander getrennt sind, bildet sich in der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante, anterior zum ersten Molar, ein weiterer Zahn aus. Dieser Zahn ist die Ursache für eine drastische Größenreduktion der Molaren. Der extra Zahn, welcher sich durch Apoptose und Fusionsprozesse mit dem ersten Molar zurückbildet, zeigt in der Mutante eine deutlich verringerte Apoptose, was zu dessen Ausbildung führt. Dieser zelluläre Unterschied ist begleitet von einem deutlichen Anstieg von Fgf-Signalen im Mesenchym. Dadurch wird eine ganze Signalkaskade in Gang gesetzt, die für das Weiterentwickeln eines Zahnes notwendig sind.

Stichworte: Tbx-Gene, Gaumenspalte, Backenzahnentwicklung

Abstract

Tbx2 and *Tbx3* are two closely related transcription factors, belonging to the family of T-box genes. This transcription factor family plays an important role in embryonic development.

To characterize both genes in more detail and gain more insight into their role during embryonic development an expression analysis was performed. Thus some expression domains were more closely described. In two of these domains, the secondary palate and the developing molars, the role of *Tbx2* and *Tbx3* during organogenesis was described in more detail.

Formation of the secondary palate is a closely regulated and complex process. Disturbances during its formation results in cleft palate. By expression analysis it was found that *Tbx2* and *Tbx3* are exclusively expressed in the mesenchyme. By analysis of loss of function mutants for either *Tbx2* or *Tbx3* and compound mutants, it was found that both genes play a crucial role during palatogenesis. It was shown, that loss of *Tbx2* leads to significantly reduced palatal shelf size. This reduced shelf size makes it impossible to make contact, although shelves are still able to fuse. While growth of the craniofacial region seems normal, impaired palate formation is due to a defect during outgrowth of palatal shelves. Cellular assay showed that loss of *Tbx2* lead to increase in proliferation and apoptosis, which is accompanied by increased levels of *Bmp4* and *CyclinD1*.

In the mesenchyme adjacent to the developing tooth bud *Tbx2* and *Tbx3* are expressed as well. While in the normal dentition in mouse there is a toothless gap, between incisors and molars, in the *Tbx2^{cre/cre}* mutant an additional tooth can be found. This tooth forms directly anterior to the first molar, and regresses by apoptosis and fusion with the first Molar in normal development. The formation of this extra tooth leads to a dramatic size reduction of the first molar. By cellular analysis it was found that apoptosis in the extra tooth is reduced, leading to its formation. The reduction in apoptosis is accompanied by an increase in Fgf-signaling in the mesenchyme, which is responsible for the formation of a feed forward loop necessary for continuous tooth development.

Keywords: Tbx-genes, palatogenesis, molar development

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1 Kraniofaziale Entwicklung.....	1
1.1.1 Der Aufbau des Kopfes	1
1.1.2 Die Entwicklung des Kopfes.....	2
1.2 Die Entwicklung des sekundären Gaumens	4
1.2.1 Morphologische Entwicklung des sekundären Gaumens.....	4
1.2.2 Molekulare Kontrolle der Gaumenentwicklung.....	6
1.3 Zahnentwicklung.....	9
1.3.1 Morphologische Entwicklung der Zähne	9
1.3.2 Molekulare Kontrolle der Zahnentwicklung.....	10
1.3.3 Das Diastema.....	12
1.4 Die Transkriptionsfaktoren <i>Tbx2</i> und <i>Tbx3</i>	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	18
2.2 Chemikalien	19
2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie.....	19
2.4 Antikörper	20
2.5 Wirtssysteme	20
2.5.1 Bakterienstämme	20
2.6 Versuchtiere	20
2.7 Synthetische Oligonukleotide	21
2.8 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungssonden	21
2.9 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.9.1 Lösungen.....	23
2.9.2 Standardmethoden.....	24
2.9.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
2.9.4 Herstellung der Hybridisierungssonden	25
2.10 Mausmethoden	26
2.10.1 Lösungen	26

2.10.2	Embryologische Methoden	26
2.10.2.1	Verpaarungen	26
2.10.2.2	Gewinnung der Embryonen	26
2.10.2.3	PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben.....	27
2.10.2.4	Genotypisierung von Embryonen.....	27
2.11	Histologische Methoden.....	27
2.11.1	Lösungen	27
2.11.2	Paraffinschnitte.....	27
2.11.3	Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen.....	28
2.11.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
2.11.5	Alzian-Blau-Färbung.....	28
2.11.6	Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffinschnitten	29
2.11.7	Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Analyse	29
2.11.8	BrdU-Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten	29
2.11.9	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten.....	30
2.11.10	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung auf Ganzkörperpräparaten	31
2.11.11	Dokumentation der <i>in situ</i> Hybridisierungen	32
2.11.12	Dreidimensionale Geweberekonstruktion	32
2.11.13	Skelettpräparation.....	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Die Rolle von Tbx2 und Tbx3 in der Gaumenentwicklung.....	33
3.1.1	Die Expression von Tbx2 und Tbx3 während der Gaumenentwicklung	33
3.1.2	Der Verlust von Tbx2 führt zur Gaumenspalte.....	34
3.1.3	Zelluläre Analyse der Gaumenspalte	38
3.1.4	Vorzeitige Verknöcherung führt nicht zur Gaumenspalte	41
3.1.5	Molekulare Analyse der Gaumenspalte	42
3.2	Die Rolle von Tbx2 während der Zahnentwicklung.....	51
3.2.1	<i>Tbx2^{cre/cre}</i> Embryonen zeigen eine Größenverminderung der Molaren	51
3.2.2	Analyse der Zelldifferenzierung.....	52
3.2.3	Größenunterschiede sind bereits bei E14,5 manifestiert.....	54
3.2.4	Apoptose führt nicht zur Größenminderung des Molaren	56
3.2.5	Die Expression von Tbx3 ist erst ab E14,5 zu erkennen.....	57
3.2.6	Molekulare Unterschiede in der Entwicklung des Molaren.....	58
3.2.7	Entwicklung des Diastemas	62

3.2.8	Zelluläre Analyse der Region des Diastemas.....	63
3.2.9	Molekulare Analyse	64
3.3	Analyse der <i>Tbx2</i> und <i>Tbx3</i> Expression im kraniofazialen Bereich	68
3.3.1	<i>Tbx2</i> und <i>Tbx3</i> sind exprimiert in der Anlage des Innenohres.....	68
3.3.2	Die Expression von <i>Tbx2</i> und <i>Tbx3</i> im trigeminalen Ganglion und Metenzephalon .	70
4.	Diskussion	73
4.1	<i>Tbx2</i> während der Gaumenentwicklung	73
4.2	Der Einfluss von <i>Tbx2</i> in der Zahnentwicklung	76
4.3	Das diastemale Zahn ist verantwortlich für die Größenreduktion	77
4.4	Der Verlust von <i>Tbx2</i> verhindert die Regression eines rudimentären Zahnes	78
4.5	Koexpression von <i>Tbx2</i> und <i>Tbx3</i> in verschiedenen kraniofazialen Strukturen	81
4.6	T-box Gene in der Kopf Entwicklung.....	83
5.	Literatur	85
6.	Danksagung.....	100
7.	Erklärung.....	101
8.	Lebenslauf.....	102

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
a	anterior
Abb.	Abbildung
AP	antero-posterior
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxy-Uridin
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
cre	cyclization recombinase'
d	dorsal
d	Tage
d.h.	das heißt
DAB	3,3' - Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenotriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleinsäurephosphat
DTT	Dithiothreol
DTTP	Desoxythymidintri-phosphat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethyl-diamin-tetraessigsäure
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gf	Gaumenfortsatz
GPisH	Ganzpräperat <i>in situ</i> Hybridisierung

h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IG	Immunglobulin
k	Kilo-
KCl	Kaliumchlorid
LiCl	Lithiumchlorid
m	Milli-
M	Mol pro Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mol	Mol
n	Nano
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
p	pico-
p	posterior
p.A.	Zur Analyse
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Ploymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNASin	RNase inhibitor
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Dodecylsulfatnatriumsalz
SisH	Schnitt <i>in situ</i> Hybridisierung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferRNA

Ü.N.	über Nacht
v	ventral
x-	-fach
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro

1. Einleitung

1.1 Kraniofaziale Entwicklung

1.1.1 Der Aufbau des Kopfes

Der Kopf besteht aus 3 unterschiedlichen Strukturen, die ineinander übergehen und nicht durch Position, sondern durch Funktion voneinander zu trennen sind. Das ist zum Einen der Hirnschädel (Abb. 1.1. grün), bestehend aus dem Schädeldach und der Schädelbasis. Angrenzend befindet sich das Gesicht (Abb. 1.1. gelb), auch orofazialer Komplex genannt. Die dritte und damit letzte größere Struktur des Kopfes bildet der Kauapparat (Abb. 1.1. blau), bestehend aus den Kieferknochen, deren Gelenken, Muskulatur und den Zähnen.

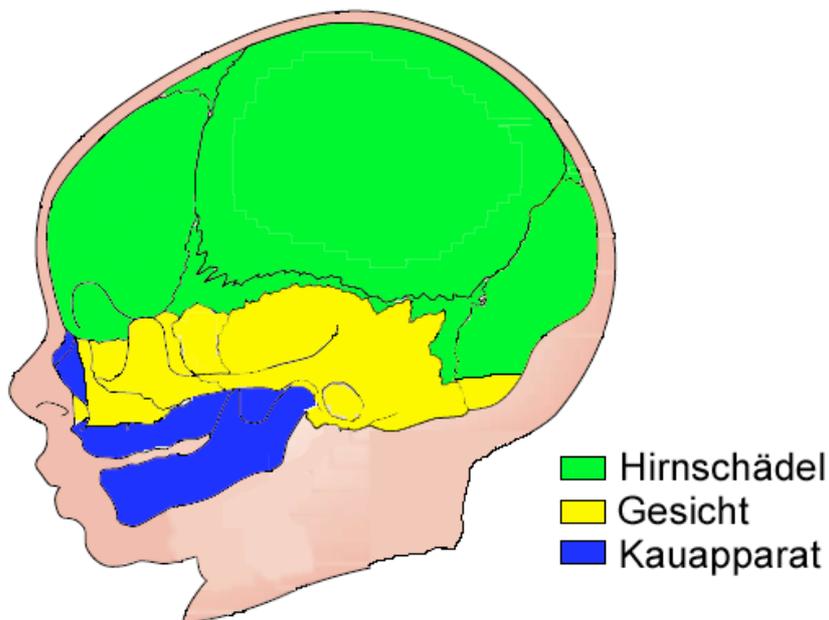


Abbildung 1.1.
Darstellung der 3 Bereiche des Schädels.
Unterteilung erfolgt in Hirnschädel (grün), Gesichtsbereich (gelb) und Kauapparat (blau). (modifiziert nach Wilkie et al., 2001)

Die Komplexität der Struktur kann man daran erkennen, dass die Schädelbasis nicht nur aus dem neurokranialen Bereich besteht, sondern auch aus Elementen des Gesichtes. Der Kauapparat setzt sich zusammen aus Teilen des Gesichtes und den Zahnelementen. Um eine korrekte Formung des Kopfes zu gewährleisten, ist es notwendig, dass deren Untereinheiten sowohl im richtigen Maß, als auch in richtiger Richtung wachsen. Um dies korrekt auszuführen besitzt jede dieser drei Gruppen unterschiedliche Charakteristika in Sachen Wachstum, Entwicklung, Reifung und Funktion. Kommt es während einem dieser

Prozesse zu Fehlern führen diese häufig zu deformierten oder unproportional geformten Schädeln.

Während der Entwicklung kommt es zu unterschiedlichen induzierten und kongenitalen Defekten, dazu gehören unter anderem die Gaumen- und Lippenpalte, Exencephalie, sowie Fehlbildungen im Zahnbereich. Um die unterliegenden Mechanismen zu verstehen ist es notwendig, die normale und die aberante Entwicklung zu studieren.

1.1.2 Die Entwicklung des Kopfes

Beim Studium des kraniofazialen Bereiches bietet sich die Maus, aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zum Menschen, welche von anderen Modellorganismen wie dem Huhn oder dem Frosch nicht abgewonnen werden kann, als Modellsystem an. Zu den morphologischen Ähnlichkeiten gehören unter anderem ein verknöchertes Gaumen und die Schädelnähte. Zudem machen es Methoden der Genetik, Genmanipulation und *in vitro* Organkultur zu einem leistungsstarken Werkzeug der Forschung.

Obwohl der Kopf zwischen einzelnen Wirbeltierarten nach der Geburt unterschiedlichste Formen aufweist zeigen alle im phylotypischen Entwicklungsstadium dieselben Strukturen. Während der Gastrulation kommt es zur Ausbildung der 3 Keimblätter: Mesoderm, Endoderm und Ektoderm. Im Anschluss an die Gastrulation folgt die Neurulation. Dabei kommt es zur Verdickung Neuralektoderm seitlich der Neuralrinne. Anschließend schließt sich diese Ektoderm über der Neuralrinne. Durch diesen Vorgang wird in der Maus zum Embryonaltag 7,5 das Neuralrohr gebildet, welches den Ausgangspunkt der Neuralleistenzellen (NLZ) darstellt. Aus dem anterioren Bereich des Neuralrohres bilden sich in der weiteren Entwicklung die Anlagen des Gehirns. Dazu gehören das Proenzephalon, das Metenzephalon und das Rhombenzephalon, welche im frühen Stadium als Hirnbläschen zu erkennen sind. Durch die Faltung des Endoderms entsteht ventral das Darmrohr, dessen anteriorer Bereich, der Vorderdarm, einen Großteil der Mundhöhle und des Rachen bildet. Ein weiterer wichtiger Bestandteil während der kraniofazialen Entwicklung sind die Kiemenbögen, welche einen Großteil von Kopf und Nacken bilden. Sie entstehen durch Migration von NLZ zum vorderen Kopfdarm, wo sie durch massive Proliferation Wülste bilden, die Kiemenbögen. Diese sind 5 beidseitig und paarig angeordnete Verdickungen entlang des Vorderdarms, die getrennt werden durch endodermale Taschen und ektodermale Spalten. Obwohl alle Kiemenbögen einen Anteil an der kraniofazialen Entwicklung haben, ist der Einfluss des am meisten anterior liegenden,

dem ersten Kiemenbogen, der Größte. Aus ihm wird ein Großteil der Nerven, Knochen und des Mesenchyms der Maxilla und Mandibula gebildet.

Die Entwicklung der kraniofazialen Strukturen kann in 5 Stadien eingeteilt werden welche direkt auf die Strukturierung der Keimblätter folgt.

1. Induktion der Neuralleistenzellen (NLZ)
2. Migration der kranialen NLZ in die spätere Gesichtsregion
3. lokal begrenzte Proliferation der kranialen NLZ, welche zur Ausbildung von Verdickungen führt
4. Fusion der Verdickungen und damit das Ausbilden von Gesichtsstrukturen
5. gerichtetes Wachstum der Skelettstrukturen.

Zu Beginn werden die Neuralleistenzellen (NLZ) an der Grenze zwischen Ektoderm und Neuroektoderm induziert. Diese neugebildeten kranialen NLZ haben, im Gegensatz zu den NLZ des Rumpfes, zusätzlich die Fähigkeit, Knochen, Knorpel und Zähne zu bilden. Nach ihrer Induktion migrieren sie in die spätere Gesichtsregion (Johnston, 1966; Le Lievre, 1978, Le Lievre und Le Douarin, 1975; Sadaghiani und Thiebaud, 1987; reviewed in Creuzet et al., 2005). Sobald die NLZ an ihrem Bestimmungsort angekommen sind, beginnen sie zu proliferieren, was zur Ausbildung von charakteristischen Verdickungen führt. Diese sind am Embryonaltag 9,5 als 7 Wülste zu erkennen, die eine Einstülpung, das Stomodeum, umranden. Das Stomodeum bildet den Endbereich des Vorderdarms, und damit die spätere Mund- und Nasenhöhle. Dorsal des Stomodeums befindet sich die mittlere frontonasale Verdickung, und seitlich wird es umrandet von 3 paarigen beidseitigen Strukturen, die dem ersten Kiemenbogen entspringen (Abb.1.2).

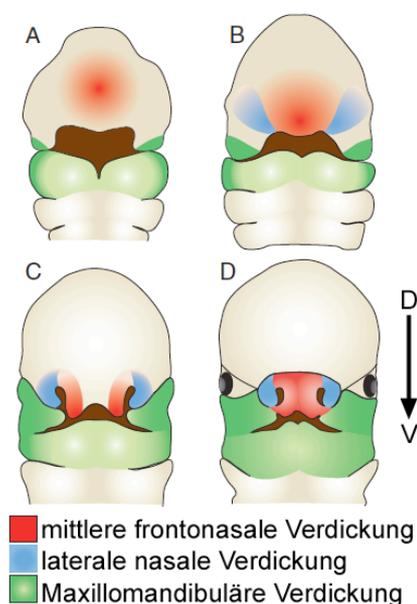


Abbildung 1.2. Entwicklung der kraniofazialen Anlagen in frontaler Ansicht

(A) E9,5; erster Kiemenbogen (grün) und mittlerer nasaler Auswuchs (rot) (B) E10,5; neben den schon vorhandenen Auswüchsen haben sich jetzt zusätzlich die lateralen Nasenauswüchse, woraus sich das Philtrum bildet, entwickelt (C) E11,5 (D) E12,5; durch morphologische Veränderungen kommt es zu Bildung der Nase und des primären Gaumens und aus dem ersten Kiemenbogen (maxillomandibuläre Verdickung) bilden sich Ober- und Unterkiefer, sowie die Seiten des unteren Gesichtsdrittels und des sekundären Gaumens. (modifiziert nach Helms et al., 2005)

Seitlich der frontonasalen Verdickung befinden sich die lateralen nasalen Verdickungen, welche ventral mit dem maxillären Auswuchs benachbart sind. Zu dieser befindet sich weiter ventral die mandibuläre Verdickung. Aus der mittleren und größten Verdickung wird sich im Laufe der Entwicklung die Stirn, das Mittelteil der Nase, der primäre Gaumen und das Philtrum, die Rinne zwischen Nase und Oberlippe bilden. Durch diese lateralen Auswüchse werden dabei die Seiten der Nase geformt (Abb. 1.2. D). Die maxilläre Verdickung entwickelt sich zum mittleren und unteren Gesicht, sowie den Mundwinkel und dem sekundärem Gaumen. Während sich die weiter ventral liegende mandibuläre Verdickung zu Skelettelementen der Maxilla und Mandibula entwickelt (Cerny et al., 2004, Lee et al., 2004).

Während der kraniofazialen Morphogenese ist wie auch in vielen anderen Organen des Körpers zu erkennen, dass sie von kontinuierlicher und wechselseitiger Interaktion zwischen benachbarten Geweben abhängig ist. Zur Untersuchung dieser Vorgänge wird häufig die Entwicklung der Zähne, des sekundären Gaumens und auch des Unterkiefers analysiert.

1.2 Die Entwicklung des sekundären Gaumens

1.2.1 Morphologische Entwicklung des sekundären Gaumens

Der sekundäre Gaumen der Säugetiere trennt den Rachenraum von der Nasenhöhle (Abb. 1.3 A), was unter anderem im Säuglingsalter für die Nahrungsaufnahme bei gleichzeitigem Atmen notwendig ist. Beim Menschen kommt es durch Fehlbildung zur Gaumen bzw. Lippen- und Gaumenspalte, welche mit 1/500 Geburten die häufigste angeborene Fehlbildung ist. Diese Fehlbildung führt bei Nichtbehandlung zum Tod, da es aufgrund einer fehlenden Gaumenplatte Säuglingen nicht möglich ist, Milch zu saugen.

Die Entwicklung beginnt in der Maus um E11, zu diesem Zeitpunkt sind die primordialen Gaumenfortsätze zu erkennen, die bilateral aus der Maxilla auswachsen. Im Laufe der Entwicklung verlängern diese sich entlang der antero-posterioren Achse der lateralen Seiten des Rachenraumes (Ferguson, 1988). Anschließend wachsen die Gaumenfortsätze in vertikaler Richtung in die Mundhöhle hinein (Abb. 1.3. B). Der nächste Schritt in der Gaumenentwicklung ist die Anhebung der Gaumenfortsätze, dazu muss es zuerst zu einem Absenken der Zunge kommen, was durch eine Verlängerung der Mandibula erreicht wird.

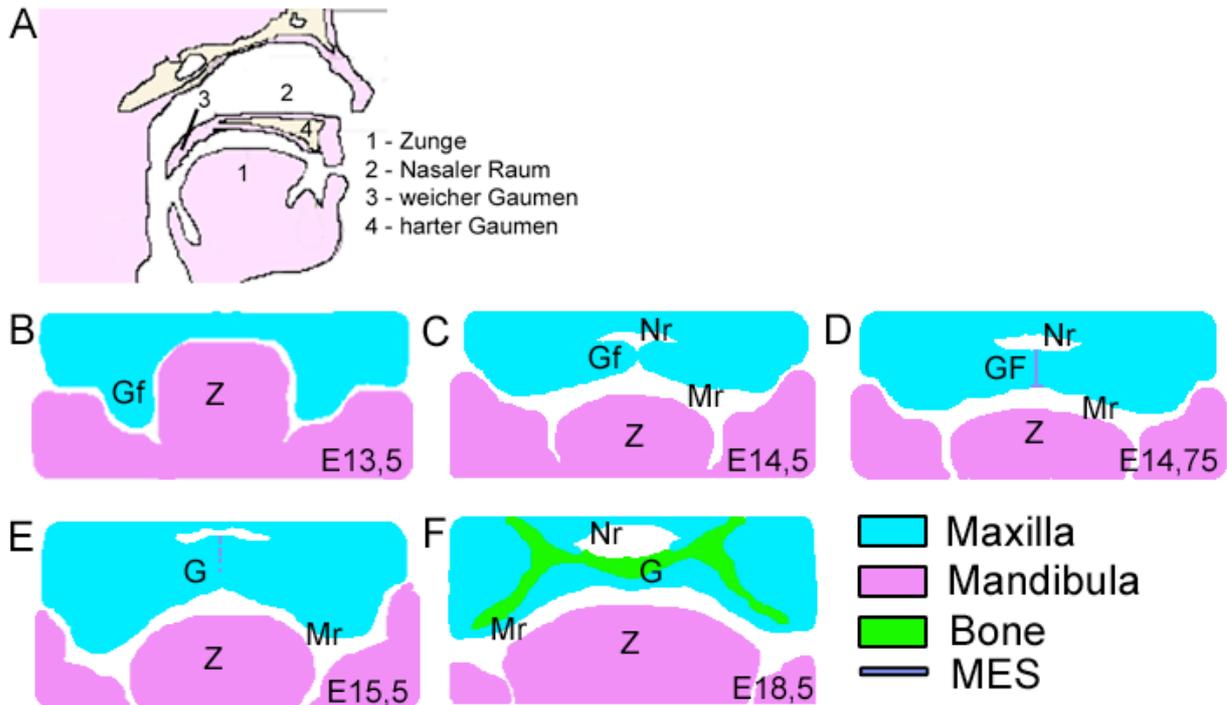


Abbildung 1.3. Der sekundären Gaumens (A) Lage des sekundären Gaumens; bestehend aus hartem und weichem Gaumen, zwischen nasalem und oralem Raum (B-F) Ablauf der Entwicklung des sekundären Gaumens Abkürzungen: Gf-Gaumenfortsatz, Z-Zunge, Nr-Nasenraum, Mr-Mundraum, G-Gaumen

Diese Absenkung ermöglicht es, dass die Gaumenfortsätze sich in eine horizontale Position anheben (Abb. 1.4. C). Durch gerichtetes aufeinander Zuwachsen kommt es anschließend zum Berühren der Spitzen der Gaumenblätter (Abb. 1.3. D). Zu diesem Zeitpunkt haften sie durch eine Glykoproteinschicht und desmosomale Kontakte des mittleren Kantenepithels (MKE) aneinander. Aufgrund dieses Prozesses entsteht ein mehrschichtige Epithelschicht, der mittelepitheliale Saum (MES) (Mogass et al., 2000; Gato et al., 2002). Die Fusion ist erst abgeschlossen, wenn sich dieser MES vollständig aufgelöst hat (Abb. 1.3. E). Wobei bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte, durch welchen zellulären Prozess dies geschieht. Es gibt drei verschiedene Theorien: 1) Apoptose (Martinez-Alvarez et al., 2000; Cuervo und Covarrubias, 2004), 2) Migration der Zellen zu entweder der oralen oder nasalen Seite (Jin und Ding, 2006) und 3) eine epitheliale-mesenchymale Transition (Vaziri Sani et al., 2005). Der Prozess der Gaumenschließung ist am Embryonaltag 16 vollständig abgeschlossen, anschließend kommt es noch zu einer Verknöcherung des anterioren Gaumenbereichs, dem harten Gaumen (Abb. 1.3. F)

1.2.2 Molekulare Kontrolle der Gaumenentwicklung

Wie in vielen anderen Organen kommt es auch in der Entwicklung des sekundären Gaumens zur Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym. Diese Interaktion ist wichtig für die lokale Spezifizierung und das Wachstum der Gaumenfortsätze. (Tyler und Koch, 1977; Tyler und Pratt, 1980, Ferguson und Honig, 1984). Durch verschiedene Experimente und Studien an Tiermodellen konnten unterschiedliche Gene identifiziert werden, welche man in molekulare Netzwerke einordnen kann.

Einer der ersten Schritte der Gaumenentwicklung ist das Auswachsen und vertikale Einwachsen des Gaumenfortsatzes in die Mundhöhle. Eine besonders wichtige Rolle kommt dabei verschiedensten Transkriptionsfaktoren zu, die wichtig sind in der Musterung des Gewebes. So z.B. führt die Mutation von *Msx1* zur Ausbildung einer Gaumenspalte, dieser Phänotyp lässt sich auf einen Defekt in der Proliferation zurückführen (Zhang et al., 2002). *Msx1* ist ein Zielgen des *Bmp*-Signalweges in verschiedenen embryonalen Strukturen, allerdings konnte von Zhang et al., auch gezeigt werden, dass *Bmp4* selbst von der Expression von *Msx1* abhängt. Wodurch eine autoregulatorische Schleife gebildet wird, die sich nicht nur selbst reguliert, sondern auch die Proliferation im Mesenchym. *Bmp4* reguliert nicht nur *Msx1*, sondern reprimiert auch *Pax9* und *Barx1*, einige weitere wichtige Transkriptionsfaktoren. Für beide konnte gezeigt werden, dass die Ablation des *Bmp*-Rezeptors *BmpR1A* und *Bmp4* selbst zur Missexpression beider Gene führt, zusätzlich zu einer veränderten Zellproliferation (Liu et al., 2005). *Pax9* konnte auch als Zielgen von *Osr2* festgestellt werden. Gezieltes Ausschalten von *Osr2* führt zu Proliferationsdefekten und einem verspäteten Anhebungsprozess der Gaumenfortsätze (Lan et al., 2004).

Neben dem *Bmp*-Signalweg spielen auch *Fgf*-Signale eine wichtige Rolle in der Gaumenentwicklung. So haben Studien gezeigt, dass Missexpression von *Fgf10* und *FgfR2*, aufgrund von gestörter Proliferation in Mesenchym und Epithel eine Gaumenspalte verursachen (Rice et al., 2004, Alappat et al., 2005). In diesen Studien wurde eine weitere interessante Signalschleife aufgedeckt. Das mesenchymal exprimierte *Fgf10* signalisiert, mithilfe seines Rezeptors *Fgfr2* in das angrenzende Epithel, wodurch es nicht nur die Proliferation induziert, sondern zusätzlich auch das Morphogen *Shh*. *Shh* selbst signalisiert zurück in das Mesenchym, wo es wiederum Proliferation auslöst (Rice et al., 2004). Auch die Ablation von *Shh* selbst führt zur Gaumenspalte, wobei Rice et al., 2004 ebenfalls zeigen konnte, dass dieser Phänotyp nicht aufgrund der Funktion im Epithel entsteht, sondern vielmehr durch *Shh*-Signale in das unterliegende Mesenchym.

Wie bereits beschrieben ist der sekundäre Gaumen zweigeteilt, in einen harten und einen weichen Gaumen. Dies spiegelt sich auch in der Expression verschiedener Gene wider, wie *Shox2*, dem *short stature homeobox gen 2*, es wird in der anterioren Hälfte des sich entwickelnden Gaumen exprimiert, also der Hälfte, die später den harten Gaumen bildet. *Shox2*^{-/-} Mäuse entwickeln eine sehr seltene Art von Gaumenspalte, bei der der weiche Anteil völlig intakt ist, aber der anteriore harte Gaumen sich nicht schließt (Yu et al., 2005). Dies konnte in der durchgeführten Studie auf Proliferations- und Apoptosedefekte zurückgeführt werden.

Innerhalb dieses ersten Prozesses der Gaumenentwicklung sind auch andere T-Box Faktoren bekannt, die eine Rolle spielen. So wurde für *Tbx1* z.B. beschrieben, eine Rolle im DiGeorge Syndrome zu spielen (Jerome und Papaioannou, 2001). Eines der Merkmale des DiGeorge Syndromes ist die Gaumenspalte im Zusammenhang mit einer Lippenspalte. Auch *Tbx22* wurde im Menschen im Zusammenhang mit einer X-Chromosom verbundenden Gaumenspalte identifiziert (Andreou et al., 2007)

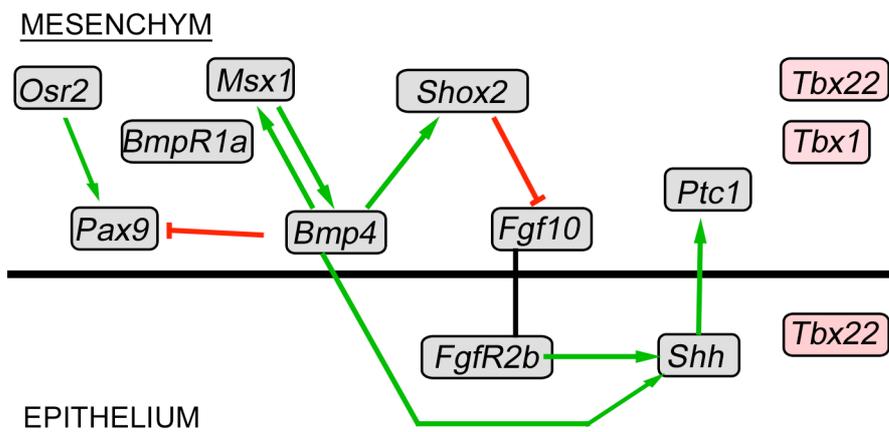


Abbildung 1.4. Molekulares Signalnetzwerk während dem Auswachsen des Gaumens

Komprimierte Darstellung des molekularen Netzwerkes während dem Prozess des Auswachsens der Gaumenfortsätze. Grüne Pfeile stellen eine Induzierung und rote eine Reprimierung dar. An der rechten Seite sind *Tbx22* und *Tbx1* dargestellt, von beiden ist bekannt, dass sie eine Rolle in der Gaumenentwicklung haben. Allerdings konnten sie bisher nicht in das molekulare Netzwerk eingebaut werden.

Der zweite Schritt in der Entwicklung des Gaumens ist Anhebung der Gaumenblätter von vertikaler in die horizontale Lage. Trotz der großen Anzahl von murinen Mutanten mit Gaumenspalte, ist der unterliegende molekulare Prozess nicht besonders gut charakterisiert. Durch *Hoxa2*^{-/-} Mäuse, eine der Mutanten, die in eben diesem Prozess stagnieren, konnte gezeigt werden, dass der Elevationsprozess durch die Zunge, die sich

nicht abgesenkt hat, behindert wird (Barrow und Capecchi, 1999). Aber auch die Extrazellulärmatrix scheint eine wichtige Rolle im Anhebungsprozess zu spielen. In einigen Studien wurde vermutet, dass die Akkumulation von Hyaluronan eine wichtige Rolle spielt (Review von Ferguson, 1988). Selbst Neurotransmitter spielen eine Rolle, bei Untersuchungen mit γ -aminobutyric acid (*GABA*) wurde festgestellt, dass die Zugabe von Agonisten zu einer Inhibierung der Anhebung führt und die Zugabe von Antagonisten die Anhebung stimuliert (Miller und Becker, 1975; Wee und Zimmerman, 1983). Auch hier konnte ein weiterer T-Box Faktor festgestellt werden, der eine Rolle im Anhebungsprozess spielt. Dabei handelt es sich um *Tbx10*. Bush et al., (2004) untersuchten die Mutation der *Dancer* Mutante, die sich unter anderem durch eine Fehlstellung des Kopfes auszeichnet. Bei dessen Untersuchung stellte die Gruppe fest, dass die Gaumenentwicklung vor dem Anhebungsprozess stoppte. Durch die folgende genetische Kartierung konnte eine Mutation im *Tbx10* Locus bestimmt werden, welche zur Überexpression von *Tbx10* führt. Die Fusion der beiden Gaumenfortsätze bildet den Abschluss in der Entwicklung des Gaumens. In Analysen konnten gezeigt werden, dass *Apaf1* eine zentrale Rolle in der Apoptose spielt (Cecconi et al., 1998). Ferner spielen auch *Tgfb3* (Kaartinen et al., 1995; Proetzel et al., 1995), *Egfr* (Miettinen et al., 1999) und *Pdgfr* (Ding et al., 2004) eine wichtige Rolle. Für Knock-out Mutanten der oben genannten Gene konnte gezeigt werden, dass sie in *in vitro* Explantationskulturen nicht in der Lage sind, zu fusionieren. Dieser Fusionsdefekt kann auf ein noch immer Vorhandensein des MES zurückgeführt werden (Kaartinen et al., 1995; Miettinen et al., 1999; Ding et al., 2004). Neben diesen, hier erläuterten Genen, spielen noch eine Vielzahl anderer Gene eine wichtige Rolle im ersten Schritt der Gaumenentwicklung.

Trotz exzessiver Studien mit unterschiedlichen Mutanten konnte für eine Vielzahl der Gene bisher nur gezeigt werden, dass sie während der Gaumenentwicklung eine große Rolle spielen, doch konnten sie bisher nicht in das bereits entwickelte molekulare Netzwerk eingefügt werden. Das zeigt allerdings, dass es sich hierbei um sehr eng regulierte Mechanismen handelt aber trotz dieser Engmaschigkeit können geringste Veränderungen der molekularen Mechanismen bereits zu einem Phänotyp führen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Forschung in dem Bereich weiter voranzutreiben und weitere Spieler in diesem molekularen Netzwerk der Gaumenentwicklung zu finden, zu charakterisieren und sie, wie auch schon bekannte Mitspieler innerhalb des Netzwerkes einzuordnen.

1.3 Zahnentwicklung

1.3.1 Morphologische Entwicklung der Zähne

Die Entwicklung der Zähne findet in mehreren Schritten statt, welche zusammen einen komplexen Prozess bilden. Dies setzt koordinierte Interaktionen zwischen Epithelium und dem umliegendem Mesenchym voraus. Die frühen Stadien der Zahnentwicklung ähneln auf morphologischer und molekularer Ebene stark anderen Organen mit ektodermalem Ursprung, wie z.B. Haaren, Federn und Milchdrüsen (Pispa und Thesleff, 2003). Die Zähne selbst bilden sich aus dem Oberflächenektoderm des ersten Kiemenbogens und dem unterliegenden Mesenchym. Das erste morphologische Zeichen der beginnenden Zahnentwicklung kann am Embryonaltag 11 beobachtet werden.

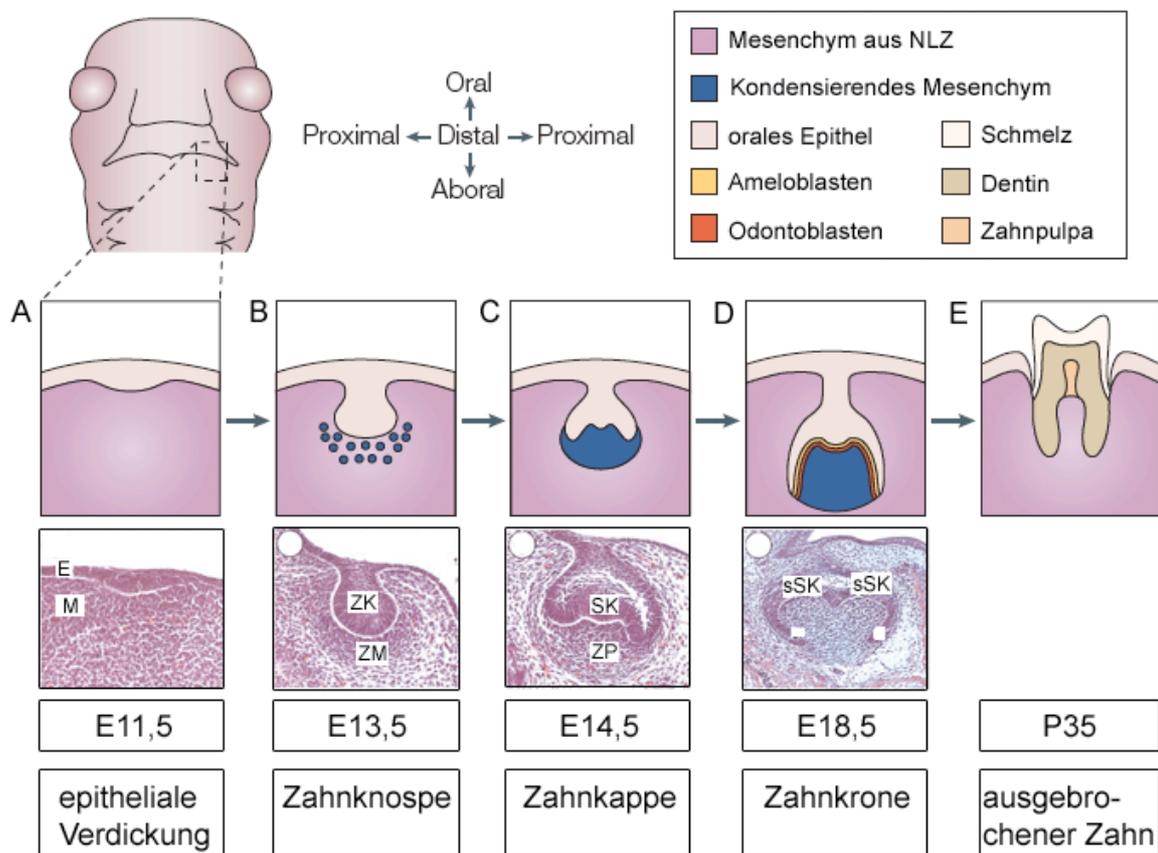


Abbildung 1.5. Darstellung der Zahnentwicklung

(A) Verdickung des Epithels bei E11,5 (B) Ausbildung der Zahnknospe durch weiteres Einwachsen des Zahnepithels in das unterliegende Mesenchym zum Zeitpunkt E13,5 (C) Nachdem es zur Bildung des Schmelzknotsens kam, wächst die Zahnknospe zur Kappe aus, E14,5 (D) Durch weiteres Wachstum der Kappenspitzen kommt es zur Ausbildung der Zahnkrone, welche die letztendliche Form des späteren Zahnes widerspiegelt. Um E18,5 kommt es zusätzlich zur beginnenden Differenzierung zu den unterschiedlichen Zelltypen. (modifiziert nach Tucker et al., 2004 und Miletich und Sharpe, 2004) *Abkürzungen:* E-Epithel, M-Mesenchym, ZK-Zahnknospe, ZM-Zahnmesenchym,, SK-Schmelzknote; sSK sekundärer Schmelzknote

Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Bildung der Zahnleiste, einer streifenähnlichen Verdickung des oralen Ektoderms, welche die Lokalisierung der späteren Zahnreihe kennzeichnet (Smith et al., 2003; Stock et al., 2007). Diese Zahnleiste wächst weiter in das unterliegende Mesenchym ein, dabei kommt es zur Ausbildung von Plakoden. Diese Zahnplakoden signalisieren dem umliegenden Mesenchym, dass es kondensieren soll. Die ektodermalen Plakoden wachsen anschließend weiter in das unterliegende Gewebe und bilden damit die Zahnknospen (Abb. 1.5 B). Während dieses Entwicklungsstadiums bildet die Zahnknospe ein neues Signalzentrum, den Schmelzknoten (Jernvall et al., 1994) welches signalisiert, dass das Epithelium der Zahnknospe nun zu den lateralen Seiten auswächst (Abb. 1.5 C). Damit verzweigt sich die Knospe um E14 zu einer Kappenform, die durch weiteres Wachstum und Verzweigung die endgültige Kronenform des Zahnes bildet (Abb. 1.5 D). Abschließend führen Differenzierung und Spezifizierung zu dem funktionellen Organ, welches in adulter Phase aus dem Unterkiefer auswächst (Abb. 1.5 E).

1.3.2 Molekulare Kontrolle der Zahnentwicklung

Noch vor dem Auftauchen der Zahnleiste, finden die ersten Prozesse der Zahnentwicklung statt. Bei E10 werden im Bereich der späteren Zahnleiste *Fgf8* und *Bmp4* exprimiert. *Fgf8* wirkt aus dem oralen Epithel induzierend auf *Pax9*, dessen lokale Expression durch die Repression durch *Bmp4* und *Bmp2* kontrolliert wird. Diese antagonistischen Signale sind vermutlich dafür verantwortlich, die Lage der Zahnknospen festzulegen (Neubüser et al., 1997; Vainio et al., 1993). Neben *Pax9* sind auch andere Transkriptionsfaktoren für die Lagebestimmung verantwortlich, wie z.B. *Pitx2* und *Shh*, deren Expression begrenzt ist auf die Zahnleiste. Wenn bei E12 die Zahnknospe auch morphologisch sichtbar ist, zeigen sich auch in den Expressionsmustern einige Veränderungen. Dabei werden Gene aus allen 4 Familien der Signalmoleküle (wie *p21*, *Msx1* und *Lef1*) in dem neu entstandenen transienten frühen Signalzentrum exprimiert (Dassule and McMahon, 1998; Keranen et al., 1999). Der Schmelzknoten hat hauptsächlich die Funktion, das Wachstum des Zahnes in die Kappenphase überzuleiten. Der Schmelzknoten exprimiert unter anderem *p21*, einen Zellzyklusregulator, der die Proliferation innerhalb des Schmelzknotens hemmt (Jernvall et al., 1998). Gleichzeitig werden auch *Bmp7*, *Bmp2*, *Shh* und *Fgf9* (Kettunen und Thesleff, 1998; Vaathokari et al., 1996) exprimiert. Insbesondere *Fgf*-Signale sind für die fortschreitende Entwicklung der Zahnentwicklung notwendig. Sie stimulieren das umliegende Epithelium und Zahnmesenchym zu proliferieren wodurch im Folgenden die

typische Kappenform und spätere Glockenform entstehen (Celli et al., 1998; De Moerlooze et al., 2000). Für diesen Prozess signalisieren *Fgf4* und *Fgf9* ausschließlich aus der Schmelzknospe, wobei *Fgf4* in der Lage ist *Fgf3* zu aktivieren (Bei und Mass, 1998, Kettunen et al., 2000). *Fgf3* hingegen ist nicht nur in diesem Signalzentrum exprimiert sondern auch in dem benachbartem Mesenchyme, wo es zusammen mit *Fgf10* in einer Rückwärtsschleife *Shh* in der Schmelzknospe aktiviert. *Shh* seinerseits induziert die Expression von *Fgf4* im Schmelzknospe (Kettunen et al., 2000).

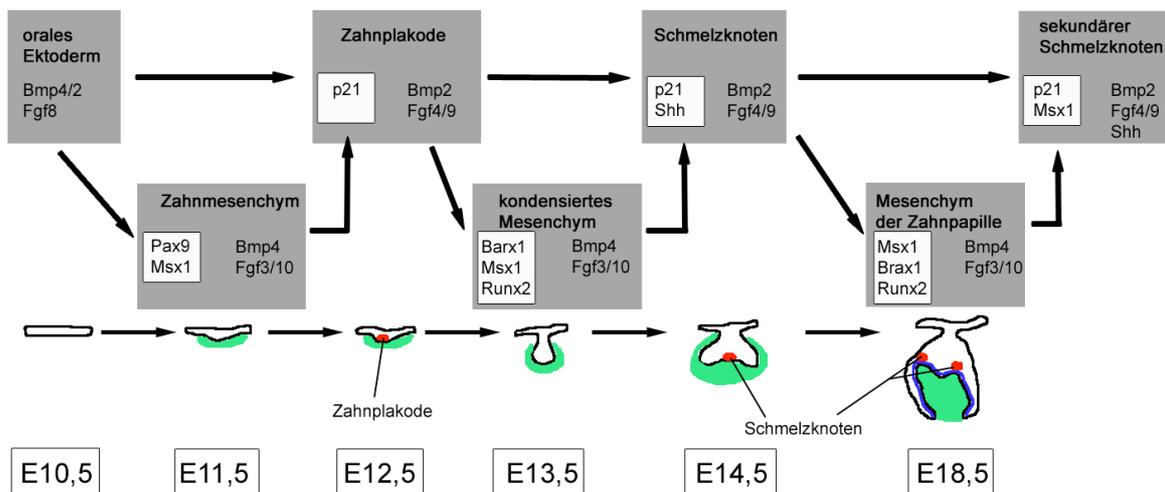


Abbildung 1.6. Übersicht der molekularen Vorgänge während der Zahnentwicklung.

Im oberen Abschnitt der Grafik sind die molekularen Zusammenhänge abgebildet, dabei sind in weißem Kasten die Zielgene abgebildet, welche durch Gene in grauem Rahmen reguliert werden. Im unteren Abschnitt der Abbildung sind die dazugehörigen morphologischen Stadien, sowie die Zeitpunkte der Embryonalentwicklung, grafisch dargestellt. In grün kondensierendes Mesenchym, rot Signalzentrum (Plakode bzw. Schmelzknospe). (Nach Jernvall und Thesleff, 2000)

Zur Bildung der Kappenform kommt es durch ein Zusammenspiel von FGF-Signalen kombiniert mit dem Bereich nicht proliferierender epithelialer Zellen der Schmelzknospe. Dieser unproliferative Bereich ist seitlich benachbart von ebenfalls epithelialen Zellen, die proliferieren, wodurch es zu einer Faltung des Zahnepithels kommt (Jernvall et al., 1994).

Da im umliegenden Mesenchym kein ausgeprägtes Muster für Zellproliferation zu erkennen ist (Jernvall et al., 1994), kann davon ausgegangen werden, dass die zeitliche und räumliche Kontrolle der epithelialen Zellproliferation und Differenzierung hauptsächlich für die Zahnentwicklung benötigt wird. In dem nun entstandenen Kappenstadium bildet der Schmelzknospe eine sichtbare histologische Struktur innerhalb des Epithels. Dieser kann deutlich markiert werden durch die Expressionsanalyse von *Shh*, *Bmp2*, *Bmp7* und *Fgf9*. Zusätzlich zeigt sie eine Hochregulation von *Bmp4* und *Fgf4*, sowie verschiedenen

Mitgliedern der WNT-Familie (Kettunen et al., 1998; Dassule und McMahon et al., 1998; Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996; Sarkar et al., 1999). Die FGF-Familie beinhaltet auch gute Kandidaten, die als Schlüsselsignale der Faltung und des Wachstums des Schmelzorgans fungieren können. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Einschränkung des FGF-Signalweges zu einem Stopp in der Entwicklung zur Kappenphase führt (Celli et al., 1998; De Moerlooze et al., 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, dass FGF-Peptide sowohl im Zahnepithel, als auch im Zahnmesenchym als Mitogen agieren (Jernvall et al., 1994; Kettunen et al., 1998). Diese Tatsachen zeigen einen Widerspruch auf, da der Schmelzknoten eine große Anzahl von Wachstumssignalen exprimiert und doch selbst keinerlei Proliferation zeigt (Jernvall und Thesleff, 2000).

1.3.3 Das Diastema

Das menschliche Gebiss besteht aus einer durchgehenden Reihe von Zähnen, die unterschiedliche Aufgaben haben. Die 20 Milchzähne, also je Quadrant 2 Schneidezähne, einen Eckzahn und 2 Backenzähne, auch Molar genannt. Diese werden im Laufe der Entwicklung durch den zweiten Zahnsatz mit 32 Zähnen ausgetauscht, welches aus 2 Schneidezähnen, ebenfalls einem Eckzahn, 2 Premolaren und 3 Molaren besteht. Im Gegensatz dazu besitzt die Hausmaus *Mus musculus* nur ein Set Zähne, welches nicht aus einer durchgehenden Reihe besteht, sondern in adulten Mäusen in jedem Quadrant eine Lücke zwischen dem Schneidezahn und den 3 Molaren aufweist (Abb. 1.7. A). Diese Lücke wird als Diastema bezeichnet. Obwohl sich innerhalb dieses Diastemas in der adulten Maus keine Zähne befinden, kann man doch während der Zahnentwicklung feststellen, dass es rudimentäre Anlage in dieser Lücke gibt, diese Anlagen sich aber im Laufe der embryonalen Entwicklung zurückbilden (Abb. 1.7. B). In Abbildung 1.7 C-F ist diese Entwicklung etwas genauer beschrieben. Während es zwischen E12,5 und E13,5 zu einer Verdickung des gesamten Epithels im molaren Bereich kommt, bildet sich bei E14,5 der anteriore Bereich wieder zurück. Diese Regression findet in einigen Mutanten nicht statt. Eine Mutante, bei der dieser Vorgang sehr gut beschrieben worden ist, ist die *Spry2*-Mutante (Klein et al., 2006; Peterkova et al., 2009). Bei dieser kommt es ab E14,5 zu entscheidenden Veränderungen im weiteren Verlauf der Entwicklung der Diastemaregion. Statt sich wie in den Kontrollen zurückzubilden, wächst der anteriore Bereich weiter aus (Abb. 1.7.E), was zur Ausbildung einer separaten Zahnkappe führt, wie man bei E15,5 erkennen kann (Abb. 1.7. F).

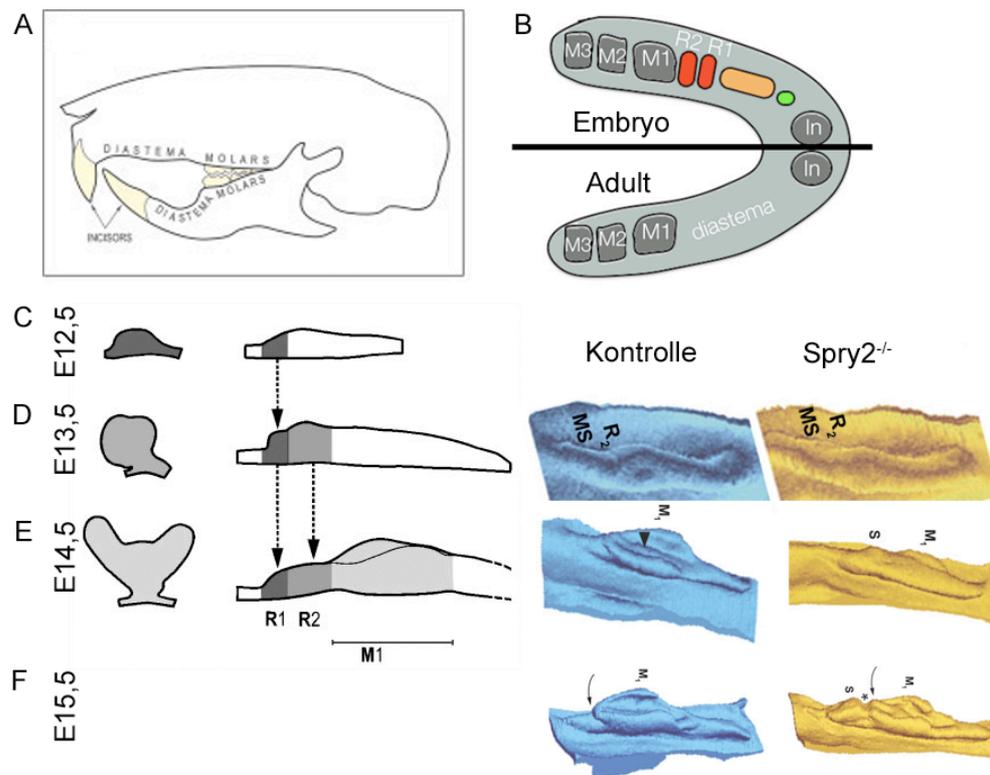


Abbildung 1.7. Das Diastema - Darstellung und Entwicklung.

(A) Adulter Zustand in der Maus, es existieren nur Schneidezähne und Molare, dazwischen eine zahnlose Lücke, das Diastema (B) graphische Darstellung der Zahnanlagen im Embryo und im adulten Tier, obwohl es für den kompletten Kieferbereich in der Maus Zahnanlagen gibt, werden im ausgewachsenen Tier nur Molare und Schneidezähne (beide in grau) ausgebildet. (C-F) Darstellung der Entwicklung des diastemalen Zahnes von E12,5 bis E15,5. Auf der linken Seite ist dabei die schematische Darstellung der Entwicklung des ersten Molars aus frontalen Gewebeschnitten, rechts davon ebenfalls eine schematische Darstellung des gesamten molaren Bereiches aus sagitaler Sicht dargestellt. Dabei kann man erkennen, dass sich 3 verschiedene Strukturen formen. (C) Zum Zeitpunkt E12,5 wächst der gesamte Bereich des ersten Molaren und des posterioren Diastemas gemeinsam aus. (D) Zum Zeitpunkt E13,5 zeigen sich im anterioren Bereich zwei Erhebungen, die weiter ins unterliegende Mesenchym einwachsen als der erste Molar. (E) einen Tag später zum Zeitpunkt E14,4 sind diese Erhebungen im Wildtyp bereits zurückgebildet. Diese schematische Abbildung wurde hier in Beziehung zu 3D Rekonstruktionen von Kontrollen (D-F, dritte von links) und der *Spry2*-Verlustmutante (D-F, dritte von links) gesetzt. Hier ist im Wildtyp zu erkennen, dass sich bei E13,5 eine Erhebung anterior des ersten Molaren entwickelt hat, welche sich bis zum Zeitpunkt E15,5 fast vollständig zurückgebildet hat. Wird dagegen die *Spry2*-Verlustmutante betrachtet, so werden die Unterschiede ab E14,5 deutlich. (E) Zum Zeitpunkt E14,5 kann man in der Mutante kaum einen Unterschied zwischen dem auswachsenden Diastema und dem molaren Bereich erkennen, während der Diastemabereich im Wildtyp bereits wesentlich kleiner ist als der Molar (F) Dieser Unterschied verstärkt sich Zeitpunkt E15,5 noch, hier ist zu erkennen, dass sich in der Mutante deutlich eine extra Struktur anterior der Struktur des Molaren gebildet hat, während im Wildtyp nur der Molar selbst zu erkennen ist (modifiziert nach Peterkova et al., 2006 und 2009)

Aus dreidimensionalen Rekonstruktionen während der frühen Zahnentwicklung ist bekannt, dass sich in dieser Region Anlagen bilden. Diese Anlagen bilden sich aber später unter anderem durch Apoptose zurück (Tureckova et al., 1996; Peterkova et al., 2003). Eine anderer Mechanismus, der zur Regression dieser verkümmerten Zahnanlagen führt, ist die Fusion dieser mit dem ersten Molaren (Prochazka et al., 2010). Das Vorhandensein von rudimentären Anlagen und Anlagen von potentiell funktionellen Zähnen erlaubt, die unterschiedlichen molekularen Mechanismen innerhalb eines Tieres und zwischen Mutanten und Wildtypen, zu untersuchen. Da es bereits unterschiedliche Mausmodelle gibt, die beschreiben, dass sich aus diesen rudimentären Anlagen funktionelle Zähne entwickeln (Ohazama et al., 2009, Ohazama et al., 2008; Klein et al., 2006; Ahn et al., 2010; Peterkova et al., 2009; Kantaputra et al., 2008), ist es als Modell zur kontrollierten Zahnregeneration gut geeignet (Peterkova et al., 2006; D'Souza und Klein, 2007).

1.4 Die Transkriptionsfaktoren *Tbx2* und *Tbx3*

T-Box Gene kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch eine gemeinsame DNA-Bindungsdomäne, der T-Box, charakterisiert sind. Die charakteristische Gemeinsamkeit aller dieser Faktoren ist die T-Box. Sie bindet innerhalb der DNA an die sogenannte T-Seite bzw. das T-Box Bindungselement (TBE). Das TBE besteht aus einer palindromischen Sequenz, welche T-Box Proteine als Dimer bindet. Wobei jedes der zwei Proteine eine Hälfte des TBE bindet, welche dann „T-half Site“ (5'-AGGTGTGAAATT-3') genannt wird. Um trotz dieser starken Gemeinsamkeit die Spezifität der Bindung einzelner TBX Faktoren zu garantieren, variieren die „T-half Sites“ in Orientierung, Anzahl und Abstand (Conlon et al., 2001; Sinha et al., 2000), hinzu kommt noch die Abhängigkeit von Kofaktoren.

Durch spezialisierte Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung ist es den T-Box Faktoren möglich wichtige Rollen in den unterschiedlichsten embryonalen Entwicklungsprozessen zu kontrollieren. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle während der Embryogenese tragen Mutationen in Mitgliedern der T-Box Familie zu einer Vielzahl von humanen Syndromen bei (Naiche et al., 2005).

Die Familie der T-Box Gene besteht aus insgesamt 17 Genen, die in 5 Unterfamilien eingeteilt werden können (Papaioannou und Goldin et al., 2003). Die Einteilung in diese Unterfamilien wurde nach Sequenzähnlichkeiten vorgenommen.

Eine dieser Familien ist die *Tbx2* Unterfamilie, bestehend aus *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx4* und *Tbx5*. Das besondere dieser Familie ist, dass sie durch Tandem Duplikation, also einer Duplikation eines Chromosomen Segments entstanden sind. *Tbx2* und *Tbx4* befinden sich in der Maus auf Chromosom 11, während *Tbx3* und *Tbx5* sich auf Chromosom 5 befinden (Ruvinsky und Silver, 1997). Aufgrund dieser Duplikation sind *Tbx2* und *Tbx3* auch die Gene mit der größten Sequenzhomologie von 90% (Agulnik et al., 1996). Aufgrund ihrer engen evolutionsgeschichtlichen Verwandtschaft werden sie häufig in den selben Geweben exprimiert, wie z.B. in den Milchdrüsen (Chapman et al., 1996; Jerome-Majewska, 2005), den Gliedmassenknospen (Chapman et al., 1996, reviewed in Simon, 1999) und im Herzen (Harrelson et al., 2004, Yamada et al., 2000; Habets et al., 2004; Christoffels et al., 2004; Aanhaanen et al., 2009).

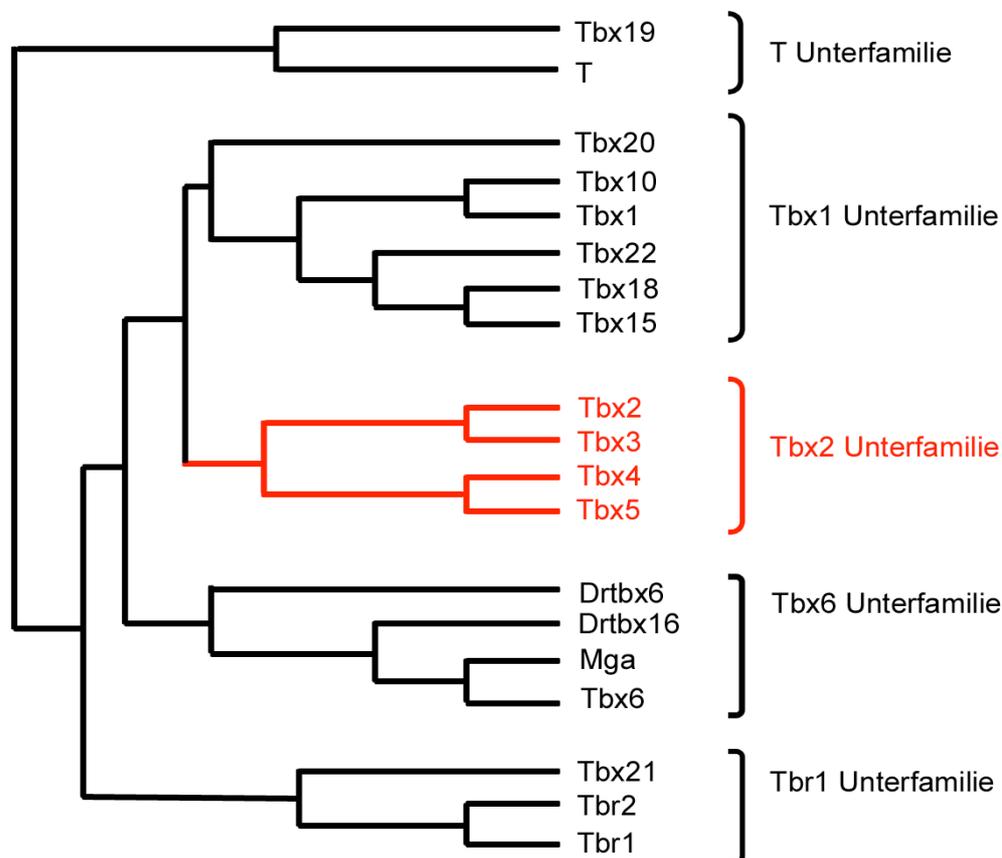


Abbildung 1.8. Übersicht über die T-box Faktoren

Einteilung der einzelnen Gene in unterschiedliche Unterfamilien mit Darstellung welche Gene nah verwandt sind. Die Gruppe der *Tbx2* Unterfamilie ist dabei farblich hervorgehoben (nach Naiche et al., 2004).

Tbx2 wurde beschrieben ab E8,5 in der Allantois exprimiert zu sein. Weitere Expressionsdomänen findet man im Ausflusstrakt, der inneren Wölbung, dem Atrioventriculären Kanal und im Einflusstrakt (Christoffels et al., 2004; Habets et al.,

2002). Auch die Gliedmassenknospen sowie in optischen und otischen Anlagen, dem nasalen-fazialen Mesenchym, der Anlage der Hypophyse, den Lungen, den Nieren und den Genitalien weisen Expression von *Tbx2* auf (Law et al., 1995, Chapman et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998; Harrelson et al., 2004; Lüdtke et al., 2009). Um zu untersuchen wie sich der Verlust von *Tbx2* auswirkt, wurde 2004 die erste *Tbx2*-Verlustmutante beschrieben (Harrelson et al., 2004). Diese Mutanten starben bis spätestens E14,5 aufgrund von Herzinsuffizienz, die durch eine mangelhafte Kissenbildung im Ausflusstrakt begründet wurde. Weiterhin zeigten *Tbx2*-Verlustmutanten eine bilaterale Duplikation des 4. Fingers an den Anlagen der Hintergliedmaßen, eine Vergrößerung der Herzventrikel, perikardiale und generale Ödeme, sowie eine abnormale Morphologie des sechsten Kiemenbogens.

Tbx3, das Paralog zu *Tbx2* wurde 1994 entdeckt (Bollag et al., 1994). Die Mutation dieses T-Box Faktors führt zum Ulna-Mammary Syndrom. Dieses ist charakterisiert durch deformierte Knochen in Armen, Händen und Beinen, sowie Fehlfunktion der Milchdrüsen. Im Gegensatz zu *Tbx2*, ist *Tbx3* bereits früh in der inneren Zellmasse der Blastozyste exprimiert. Später findet sich diese Expression in mesodermalen und endodermalen Schichten wieder. Später in der Organogenese lässt sich *Tbx3* in den Gliedmassenknospen, genauer in der apikalen ektodermalen Falte und in den lateralen Seiten der Knospe der Lunge und in den Milchdrüsen nachweisen (Chapman et al., 1996, Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998, Yamada et al., 2000). Im kraniofazialen Bereich sind nur *Tbx3* Expressionsdomänen im nasalen und maxillaren Fortsatz, der Anlage der Hypophyse, der otischen und optischen Plakode detektierbar. Im Unterschied zu *Tbx2* kann man *Tbx3* auch in der Leber finden (Lüdtke et al., 2009). Ähnlich wie bei *Tbx2* kann man auch im Herzen Expressionsdomänen von *Tbx3* finden, welches hier im Reizleitersystem des Herzens exprimiert ist. Die erste Verlustmutante für *Tbx3* wurde 2003 beschrieben. Diese Verlustmutanten sind, wie *Tbx2*-Mutanten, embryonal letal und sterben bis E16,5. Die Hauptanomalien in dieser Mutante sind Defekte des Dottersackes, der Verlust der Milchdrüsen und Defekte der Gliedmassenknospen (Davenport et al., 2003). Weiterhin wurde in der Studie von Davenport et al., gezeigt, dass die Blutgefäße des Dottersackes entweder klein sind oder völlig fehlen und die Leber in ihrer Größe reduziert ist. Die Gliedmassenknospen zeigten reduziertes Wachstum und abnormale Formung von Hand- und Fußteller.

Aufgrund weiterer Studien konnte festgestellt werden, dass sie eine Repressorfunktion haben (Chen et al., 2004; Sinha et al., 2000). In Studien mit verschiedenen Zelllinien

konnte gezeigt werden, dass sie durch direkte Bindung an den ARF Promotor von *p19ARF*, diesen reprimieren (Jacobs et al., 2000; Brummelkamp et al., 2002; Lingbeek et al., 2002). Der Tumorsuppressor *p19ARF* seinerseits reprimiert *Mdm2*. *Mdm2* wiederum vermittelt die Degradierung von *p53* (Kamijo et al., 1997, 1998; Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998; Stott et al., 1998), welches anschließend die Expression von *p21* aktiviert. *Tbx2* ist allerdings auch zusätzlich in der Lage, die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors durch Bindung an dessen Promotor zu inhibieren (Prince et al., 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Tbx2 und *Tbx3* haben wie andere T-Box Faktoren eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung. Die Inaktivierung eines der beiden Gene führt während dieser Entwicklung zum Tod (Davenport et al., 2003; Harrelson et al., 2004). Der Großteil der bisher veröffentlichten entwicklungsbiologischen Studien bezieht sich auf die Rolle beider Gene in der Herzentwicklung. Doch wurde bereits von Chapman et al., 1996 beschrieben, dass beide Gene auch im kraniofazialen Bereich exprimiert sind. Um diese Studie zu vervollständigen, wurde im Rahmen der Doktorarbeit eine Expressionsanalyse des kraniofazialen Bereiches angefertigt.

Zwei der Expressionsdomänen wurden daraufhin genauer untersucht, um die Rolle von *Tbx2* während der Organogenese weiter zu untersuchen und zu charakterisieren. Bei den untersuchten Domänen handelt es sich um den sekundären Gaumen und die Region der Backenzähne. Dabei konnte mit Hilfe von *Tbx2*- Verlustmutanten festgestellt werden, dass *Tbx2* für eine fehlerfreie Entwicklung dieser Organe notwendig ist. Ziel dieser Doktorarbeit war es dann mittels Analyse des Phänotyps, die Rolle von *Tbx2* innerhalb der jeweiligen molekularen Netzwerke zu analysieren, und *Tbx2* funktionell innerhalb des Netzwerkes einzuordnen. Auch sollte untersucht werden, inwieweit *Tbx3* und *Tbx2* sich während der Entwicklung des Gaumens gegenseitig ergänzen was durch die phänotypische Analyse von doppelheterozygoten Mutanten erreicht wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Computer	Apple IMac Software: Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems, Office:mac v.2008 (Microsoft), Filemaker Pro 9.0, Adobe Photoshop CS4 (Adobe)
Geldokumentationskammer	Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE
Gelelektrophoresezubehör	
Glaswaren	Objektträger: Superfrost plus (Menzel) Deckgläser: 24x60mm (Roth)
Heizplatte	Schott
Hybridisierungsöfen	Mit Kippschüttler (Amersham) Ohne Schüttler (Hybaid)
Inkubatoren	Wasserbad (GfL)
Laborbedarf, allgemein	Multimed, KDL, Kimberley-Clark
Mikroskop	Leica DM5000 mit Digitalkamera DFC 300FX Leica MZ75, Leica M420 mit FUJI Digitalkamera HC3002, Leica MZFLIII mit UV-Lampe ebq 100 (Leistungselektronik Jena GmbH)
Mikrotom	Leica RM2155
Mikrowellenöfen	LG
pH-Meter	WTW
Photometer	Eppendorf BioPhotometer
Plastikwaren	Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Säulenmaterialien	Nucleospin-, Nucleobond-Säulen (Machery&Nagel)
Schüttler und Rührer	Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL
Thermoblock, -mixer	Eppendorf 5436, HeizThermoMixer (HLC)
Thermocycler	peqSTAR 96 (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Trockenplatte	Medax

Waagen	Kern
Zentrifugationszubehör	50 ml und 400 ml Becher (Beckmann)
Zentrifugen	Eppendorf Tischzentrifuge 5424, Beckmann Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20, Heraeus Biofuge13 und Biofuge15

2.2 Chemikalien

Chemikalien des Reinheitsgrads p.A. sowie gebrauchsfertige Lösungen wurden von den Firmen Amersham, AppliChem, BioRad, Boehringer, Fisher Chemicals, Fluka, Invitrogen, J.T.Baker, Merck, Pharmacia, Riedel-de-Häen, Roth, Sigma-Aldrich und Vector bezogen.

2.3 Substanzen und Kits für die Molekularbiologie

5'-Bromo-2'-deoxy-Uridin (Roche), Anti-Digoxigenin-AP-Fab Fragmente (Roche), Antigen unmasking solution (VectorLabs), Blocking Reagent (Roche), BM Purple AP Substrate (Roche), DIG-Labeling-NTP-Mix (Roche), DNase I (Roche), Klenow-Fragment (NEB), Lysozym, Oligonucleotide (Sigma), Proteinase K (Roche), Restriktionsendonukleasen (NEB, Fermentas), RNase A (Roth), Rnasin (Promega), SP6 RNA Polymerase (Roche), T3 RNA Polymerase (NEB), T4 DNA Ligase (Fermentas, Boehringer), T4 Polynukleotidkinase (Pharmacia), T7 RNA Polymerase (NEB), 1 kB Leiter (GibcoBRL), Taq DNA Polymerase (Sigma), Vectastain DAB Substrate Kit für Peroxidasen (VectorLabs), Vectastain Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (PK4001, Vector), Vectastain Peroxidase-Mouse-on-Mouse-Kit (PK2200, Vector).

2.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet:

Antikörper	Herkunft	Verdünnung im Experiment
Anti-Digoxigenin	Roche	1:5000
Maus-anti-BrdU-Antikörper	Roche	1:200
p-Smad 1,5,8	Roche	1:200

Tabelle 2.1. Verwendete Antikörper

2.5 Wirtssysteme

2.5.1 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden *E. Coli*-Zellen der Stämme XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI_qZΔM15 Tn10 (Tetr)]) von Stratagene verwendet.

2.6 Versuchtiere

Folgende rekombinanten Allele, die alle auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C57BL6/J und NMRI) gehalten wurden, fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Tbx2^{cre_Δ(neo)}, : MGI: Tbx2^{tm1.1(cre)Vmc}, Aanhaanen et al., 2009
 Tbx3^{cre_Δ(neo)}, : MGI: Tbx3^{tm1.1(cre)Vmc}, Hoogaars et al., 2007

2.7 Synthetische Oligonukleotide

DNA Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
AKO0207	ATT ACC CCT CAC TAA AGG GA	Sequenzierung
AKO0208	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
AKO0925	AGC GGA GCC AAG CCA GCA	Genotypisierung
AKO0926	GCT AGA GCC TGT TTT GCA CGT TCA	Genotypisierung
AKO0927	CCT TGG CCT CCA GGT GCA C	Genotypisierung
AKO1047	GGA AAT GGT TTC CCG CAG ACC	Genotypisierung
AKO1154	AAG CGT AAA ATC AGC AAT CAA GG	Genotypisierung
AKO1157	AAG GCG GAC ATG GGG AAG TCG	Genotypisierung

Tabelle 2.2. Verwendete Oligonukleotide

2.8 Plasmidkonstrukte zur Erstellung von Hybridisierungssonden

Gen-Symbol	Gen-Name	Plasmid #	Transkription
<i>Axin2</i>	<i>Axin 2</i>	P03846	EcoRI, T7
<i>Bmp2</i>	<i>bone morphogenetic protein 2</i>	P00354	XmaI, Sp6
<i>Bmp3</i>	<i>bone morphogenetic protein</i>	P00355	HindIII, T7
<i>Bmp4</i>	<i>bone morphogenetic protein 4</i>	P01801	EcoRI, Sp6
<i>Ccnd1</i>	<i>Cyclin D1</i>	P01685	SalI, T3
<i>Ccnd2</i>	<i>Cyclin D2</i>	P01686	HindIII, T7
<i>Ccnd3</i>	<i>Cyclin D3</i>	P01687	SalI, T7
<i>Col2a</i>	<i>collagen, type II, alpha 1</i>	P01750	StyI, T7
<i>Etv4</i>	<i>ets variant gene 4</i>	P01946	XhoI, T3

Gen-Symbol	Gen-Name	Plasmid #	Transkription
<i>Etv5</i>	<i>ets variant gene 5</i>	P04132	NotI, Sp6
<i>Fgf10</i>	<i>fibroblast growth factor 10</i>	P1859	BamHI, T3
<i>Fgf3</i>	<i>fibroblast growth factor 3</i>	P02010	EcoRV, T7
<i>Msx1</i>	<i>msh-like 1</i>	P01653	NotI, T7
<i>Notch1</i>	<i>Notch 1</i>	P00757	ClaI, T7
<i>Osr1</i>	<i>odd-skipped related 1</i>	P02127	EcoRI, T7
<i>Osr2</i>	<i>odd-skipped related 2</i>	P02128	EcoRI, T7
<i>P-Cadherin</i>	<i>P-Cadherin</i>	P00471	KpnI, T3
<i>Pax9</i>	<i>paired box gene 9</i>	P00751	EcoRI, T7
<i>Ptc1</i>	<i>Patched Homolog 1</i>	P1746	SpeI, T3
<i>Runx1</i>	<i>runt related transcription factor 1</i>	P04324	NcoI, T3
<i>Runx2</i>	<i>runt related transcription factor 2</i>	P04095	EcoRI, T3
<i>Runx3</i>	<i>runt related transcription factor 3</i>	P03163	PstI, T3
<i>Shh</i>	<i>Sonic Hedgehog</i>	P00423	EcoRI, T7
<i>Shox2</i>	<i>short stature homeobox 2</i>	P02472	XhoI, T7
<i>Sox9</i>	<i>SRY-box containing gene 9</i>	P01351	Sall, T7
<i>Spry2</i>	<i>sprouty homolog 2</i>	P04519	SacII, T3
<i>Spry4</i>	<i>sprouty homolog 4</i>	P04134	EcoRI
<i>Tbx2</i>	<i>T-Box 2</i>	P00608	EcoRI, T3
<i>Tbx22</i>	<i>T-Box 22</i>	P1748	BamHI, T3
<i>Tbx3</i>	<i>T-Box 3</i>	P01204	Sall, T7
<i>TnC</i>	<i>Tenascin C</i>	P02847	SmaI, T3
<i>Versican</i>	<i>Versican</i>	P01771	EcoRV, Sp6
<i>Wnt5a</i>	<i>wingless-related MMTV integration site 5A</i>	P00268	XhoI, Sp6

Tabelle 2.3. Verwendete Plasmidkonstrukte zur Herstellung von Hybridisierungssonden

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Lösungen

Nicht aufgeführte Lösungen wurden nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994).

10x PCR Puffer Nr.2:	100 mM TRIS.HCl pH8.5, 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl,
10x PCR Puffer Nr. 7	100mM TRIS.HCL pH8.5, 10mM MgCl ₂ , 500mM KCl, 50% DMSO
10x PCR Puffer Nr. 8	100mM TRIS.HCL pH8.5, 20mM MgCL ₂ , 500mM KCL, 50% DMSO
10x PCR Puffer Nr. 21	100mM TRIS.HCL pH8.5, 20mM MgCl ₂ , 500mM KCl, 25% DMSO
dNTPs	Je 10mM dATP, DCTP, DGTP, DTTP (für PCR)
Betaine	5M Lösung
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
Antikörper-Lösung	Anti-DIG-AP Antikörper, 1:5000 in Block-Lösung, vor Verwendung 2h bei 4°C präadsorbiert
Block-Lösung	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB zum Lösen unter Rühren auf 50°C erhitzt
DEPC-H ₂ O	100µl/L DEPC in bidest. H ₂ O, über Nacht inkubieren, anschließend autoklavieren
DIG-dNTPs	1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP (gebrauchsfertig, Roche)
DTT	299mM in H ₂ O
Hybridisierungslösung	Ca. 1µg/ml DIG-markierte RNA Sonde im jeweiligem Prähybridisierungspuffer

Prähybridisierungspuffer	Schnitte: 50% Formamid, 5x SSC pH 7,0, 1x Denhardt's-Lösung, 0,1% Tween-20, 0,1mg/ml tRNA, 1x Heparin in DEPC-H ₂ O Gesamtembryonen: 50% Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS, 50 µl/ml Hefe-tRNA, 50 µl/ml Heparin in DEPC-H ₂ O
MAB-Lösung	MAB-Lösung: 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5, frisch anzusetzen
Millipore H ₂ O	bidest H ₂ O gefiltert durch Millipore Filteranlage
Mowiol	
NTMT	100 mM NaCl, 100 mM TRIS.HCl pH 9,5, 50 mM MgCl ₂ , 0,1% Tween-20
PBT	PBS mit 0.1% Tween-20, vor Gebrauch Frisch anzusetzen
PFA/PBS	4% PFA Paraformaldehyd in PBS
SSC (20x) pH 4,5	3M NaCl, 0,3M NaCitrat, pH4,5
SSC (20x) pH7.0	3M NaCl, 0,3M NaCitrat, pH7,0
TAE (50x)	2M TRIS.Acetat, 0.05M EDTA, pH8,0
TE	10mM TRIS.HCL pH8,0, 1mM EDTA
TNT-Puffer	10mM TRIS.HCL pH7,5, 0.5M NaCl 0.1% Tween-20

2.9.2 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Präparation genomischer DNA aus Gewebeproben, Präparation von Plasmid-DNA, Präzipitation von Nukleinsäuren, Agarosegelelektrophoresen, Restriktionsspaltungen von Plasmid-DNA, Dephosphorylierung restriktionsverdauter DNA, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt

(Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel, 1994). Zur Isolierung von sehr reiner Plasmid-DNA wurden Plasmidaufreinigungs-Kits von Macherey&Nagel (NucleoSpin, NucleoBond) verwendet. Für die Elution von DNA

2.9.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation allelspezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz enthielt ungefähr 500 ng genomische DNA, je 10 pmol der spezifischen Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x PCR-Puffer und 1,5 U Taq-Polymerase (Sigma) und wurde mit MilliPore-H₂O auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt. Alle PCR Reaktionsprotokolle beinhalteten eine 4 min Denaturierung bei 94°C, ungefähr 30-35 Amplifikationszyklen, einen abschließenden 8 min Syntheseschritt und eine Lagerungsphase bei 4°C. Die Oligonukleotide wurden allelspezifisch variiert (Tabelle 2.4.):

Allel	Oligo 1	Oligo 2	Oligo 3	Fragmentgröße	
				Wt-Allel	Mut-Allel
<i>Tbx2^{cre}</i>	AKO1049	AKO1154	AKO1157	450bp	500bp
<i>Tbx3^{cre}</i>	AKO0925	AKO0926	AKO0927	300bp	550bp

Tabelle 2.4. Verwendete Primerkombinationen für Genotypisierungen

2.9.4 Herstellung der Hybridisierungssonden

Für die RNA in situ Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierten RNA Sonden verwendet. 10 µl eines Standardreaktionsansatz für die *in vitro* Transkription enthielt 1µl linearisierter Plasmid-DNA (500ng/µl), 1µl 10xTranskriptionspuffer, 1µl 10xDIG-Reaktionsmix, 1µl 0,1mM DTT, 0,5 µl RNAsin, 0,5µl RNA-Polymerase und 5µl Millipore-H₂O. Der Ansatz wurde 2h bei 37°C inkubiert, nach anschließendem DNA Verdau der Plasmid-DNA (2µl DnaseI, 30 min, 37°C) wurde die RNA gefällt und in 60µl 50%igem Formamid/DEPC-H₂O gelöst. Nach der Beurteilung der Qualität durch gelelektrophoretische Auftrennung wurde die RNA bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.10 Mausmethoden

2.10.1 Lösungen

PFA/PBS	4% Paraformaldehyd in PBS
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2

2.10.2 Embryologische Methoden

2.10.2.1 Verpaarungen

Embryonen für Expressionsanalysen gingen aus Verpaarungen von NMRI-Wildtypmäusen hervor. Für vergleichende Analysen wurden zur Gewinnung homozygot mutanter *Tbx2^{cre}*-, *Tbx3^{cre}*- und *Tbx2^{cre}/Tbx3^{cre}*-Embryonen heterozygote bzw. doppelheterozygote Mäuse miteinander verpaart.

Für die Bestimmung der Trächtigkeitsperiode der Mäuse wurde die Vaginal-Plug-Methode angewandt. Ausgehend vom Tag, an dem ein mucoider Plug in der Vagina eines verpaarten Mausweibchens detektiert werden konnte (definitionsgemäß: Tag 0,5 *post coitum* (*p.c.*)), wurde der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet.

2.10.2.2 Gewinnung der Embryonen

Für die Entnahme der Embryonen wurde die trächtige Maus durch Genickbruch getötet, die Bauchdecke durch einen medialen Schnitt geöffnet und die beiden Uteri entfernt. Die Isolierung der Embryonen aus den maternalen und extraembryonalen Geweben erfolgte in gekühltem (4°C) PBS unter einem Stereomikroskop (Leica MZ75). Um die Penetration des Fixatives zu erleichtern, wurde bei Embryonen älter als E13.5 standardmäßig der Kopf vom Rumpf abgetrennt, sofern keine unversehrten Embryonen benötigt wurden. Mussten die Embryonen mittels PCR genotypisiert werden, wurde wahlweise embryonales oder extraembryonales Gewebe (Dottersack) gesammelt.

2.10.2.3 PFA-Fixierung und Dehydrierung von Embryonen und Geweben

Präparierte Embryonen/Gewebe wurden mit 4%PFA/PBS (bei 4°C, ü.N.) fixiert, sofern nicht ausdrücklich anders gekennzeichnet. Die fixierten Embryonen wurden in PBS gewaschen (2x für 10 min, RT) und über eine aufsteigende Methanolreihe (je 1x 25%, 50%, 75%, 100% Methanol/PBS, für je nach Größe 30 min bis 2 h pro Schritt) dehydriert. Anschließend wurden sie in frisches Methanol überführt und bei -20°C bis zur Durchführung der Experimente gelagert.

2.10.2.4 Genotypisierung von Embryonen

Die Genotypisierung von Embryonen erfolgte entweder über genomische DNA mittels PCR (siehe Abschnitte 2.9.3) oder über morphologische Bestimmung der Anzahl der Finger der Hintergliedmassen. Da *Tbx2^{cre/cre}* Mutante eine Duplikation des vierten Fingers hatten und *Tbx3^{cre/cre}* eine Retardierung der gesamten Gliedmassenknospe.

2.11 Histologische Methoden

2.11.1 Lösungen

Acetat-Lösung	0,5% Natriumacetat, vor Gebrauch zu filtrieren
Alzian-Blau	10g/l in 3% Essigsäure, pH 2,5
BrdU-Lösung	10 mg/ml 5-Bromo-2-DeoxyUridin (BrdU) in 0,9% NaCl/0,007N NaOH in ddH ₂ O, die Lösung ist bei -20°C zu lagern und vor Gebrauch stark zu schütteln
DAPI	0,5 mg/l in PBS, zu aliquotieren und bei -20°C zu lagern

2.11.2 Paraffinschnitte

Dehydrierte Embryonen oder Gewebestücke wurden erst schrittweise bei RT in Isopropanol (50% MeOH/EtOH, EtOH, 50% EtOH/Isopropanol, je 1h, Isopropanol, ü.N.), dann bei 65°C in Paraffin überführt (Isopropanol, 25%, 50%, 75% Paraffin/Isopropanol, je 2h und 4x 100% Paraffin, 2h, ü.N.), in eine Einbettungsform überführt und ausgehärtet. Die Lagerung von Paraffinblöcken erfolgte eingewickelt in Frischhaltefolie bei 4°C. Angefertigte Paraffinschnitte (5 und 10µm, Mikrotom RM2155, Leica) wurden auf

beschichtete Objektträger (SuperfrostPlus, Menzel) aufgezogen und ü.N. bei 42°C getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zur Durchführung der Experimente bei RT.

2.11.3 Allgemeine Handhabung von Schnittpräparaten bei Färbungen

Nach der Rehydrierung von Gewebeschnitten war ein Austrocknen der Gewebe zu vermeiden. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Waschschriffe in Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Bei Schritten, die unter Einsatz eines möglichst geringen Volumens durchgeführt werden mussten, wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift (ImmEdgePen, VectorLabs) voneinander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgte in kleinen Kunststoff- Inkubationskammern. Sofern nicht anders gekennzeichnet fanden alle Schritte bei RT statt.

2.11.4 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Für diese Färbung wurden PFA-fixierte Embryonen verwendet. Die Paraffinschnitte wurden in Roti-Histol deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min), in Ethanol/H₂O rehydriert (2x 100%, je 5min, 95%, 90%, 70%, je 2 min, 2x H₂O, 5 min), in H₂O gewaschen und mit Hämatoxilin gefärbt (45 s). Nach dem Waschen in H₂O unter kontinuierlichem Wasseraustausch, einer Inkubation in Natriumacetat-Lösung (0,5%, 1min) und erneutem Waschen (2x H₂O, je 1 min) schloss sich die Eosin-Färbung an (1% alkalische Eosin-Lösung, 1 min). Die Schnitte wurden dann unter kontinuierlichem Wasseraustausch gewaschen, dehydriert (100% Ethanol, 2x je 2 min), in Roti-Histol geklärt (2x, je 10 min) und mit Permount eingedeckt.

2.11.5 Alzian-Blau-Färbung

Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte PFA-fixierter Embryonen verwendet. Die Schnitte wurden deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min in Roti-Histol) und in Ethanol/H₂O rehydriert (2x 100%, je 5min, 95%, 90%, 70%, je 2 min, 2x H₂O, 5 min), in Alzian-Blau-Lösung gefärbt (10 g/L in 3% Essigsäure, pH 2,5, 30 min) und unter kontinuierlichem Wasseraustausch gewaschen. Nach einer Gegenfärbung mit Nuclear-Fast-Red (Sigma, 5 min) oder Eosin (siehe 2.11.5) wurden die Schnitte in Ethanol/H₂O dehydriert (95%,

100%, 100%, je 3 min), in Rotihistol geklärt und mit Permount eingedeckt.

2.11.6 Immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffinschnitten

Für immunhistochemische Färbungen auf 5µm Paraffinschnitten wurden Vectastain Unmasking solution, Vectastain ABC kit (Kaninchen IgG) bzw. Vectastain Mouse-on-Mouse-IgG-Kit und das DAB Substrat Kit für Peroxidasen (VectorLabs) verwendet. Die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4) erfolgte i.d.R. bei 4°C ü.N.. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden 5µm Paraffinschnitte deparaffiniert und rehydriert (siehe 2.11.5).. Epitopdemaskierung erfolgte unter Verwendung von Vectastain Unmasking Solution (100°C, 15 min). Nach dem Waschen in PBST (2x 5 min) folgte das Blockieren unspezifischer Proteinbindungen durch Inkubation mit geeignetem Normalserum (30min, RT, 2,5% in PBST) und die Inkubation des primären Antikörpers (siehe 2.4, 4°C, ü.N.). Nach dem Waschen mit PBST folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1h, RT), Waschen in PBST und das Eindecken in Mowiol (mit DAPI Zusatz, 0,5µg/ml).

2.11.7 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Analyse

Der Nachweis apoptotischer Zellen auf 5 µm Paraffinschnitten erfolgt unter Verwendung des ApopTag Plus Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits (Chemicon International). Die gefärbten Schnitte wurden in Mowiol mit Zusatz von DAPI (0,5µg/ml) eingedeckt.

2.11.8 BrdU–Inkorporationsassay auf Paraffinschnitten

Trächtigen Mäusen wurden 100 µl BrdU-Lösung pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubation von 1 h wurden die Mäuse getötet, die Embryonen entnommen, fixiert und in Methanol überführt (vgl. 2.10.4). Die immunhistochemische BrdU-Detektion mit Zellkerngegenfärbung (DAPI) erfolgte auf 5µm Paraffinschnitten wie unter 2.11.6 beschrieben. Der BrdU- Inkorporationssindex ergab sich aus dem Verhältnis aller BrdU-positiven Zellkerne zur Gesamtzellkernzahl in einer definierten Fläche.

2.11.9 RNA *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Das verwendete Protokoll ist abgeleitet aus Moorman *et al.*, 2001. Alle Waschschritte wurden in sterilisierten Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für Objektträger durchgeführt. Vor der Hybridisierungsreaktion wurden nur DEPC-behandelte Waschlösungen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Waschschritte bei RT durchgeführt. Bei Arbeitsschritten wie Prä- und Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion wurden die Lösungen direkt auf die durch eine Fettstift voneinander getrennten Schnitte auf dem Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden während dieser Inkubationsphasen in flachen Kunststoff-Inkubationskammern aufbewahrt, die wiederum in größeren Inkubationskammern gelegt wurden. Um Verdunstungsvorgänge und damit verbundene Konzentrations-schwankungen zu verhindern, wurden mit den entsprechenden Puffer- oder Wasch-Lösungen befeuchtete Papiertücher in diese Kammern gelegt und die Kunststoff-kammern während der Hybridisierung zusätzlich mit Frischhaltefolie eingeschlagen.

10µm Paraffinschnitte wurden in Rotihistol deparaffiniert (2x, je 10 min), in Ethanol gewaschen (50%Roti-Histol/Ethanol, 2 min, 2x 100%, 2 min), in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (Ethanol/DEPC-H₂O: 95%, 90%, 70%, 50%, je 1min), anschließend in PBS gewaschen (2x je 5min), in Proteinase K-Lösung (10 µg/ml in 0,1M TRIS.HCl, pH7,5 für 10 min bei 37°C) und Glycin/PBS (0,2%, 10 min, RT) inkubiert, in PBS gewaschen (2x je 5min) anschließend in PFA/Glutaraldehyd-Lösung postfixiert (4%-PFA, 0,2% Glutaraldehyd, in PBS, 20 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector) ein Kreis um die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger gezogen und die Objektträger bis zur Prähybridisierung in PBS aufbewahrt. Nach der Prähybridisierung (8µl Prähybridisierungspuffer pro Schnitt, 1-2h , 70°C) und Hybridisierung (10µl Hybridisierungspuffer pro Schnitt, ü.N., 70°C) wurden die Schnitte kurz in 2xSSC gewaschen (65°C), mit 50% Formamide/ 2x SSC (2x 30min, 65°C) und PBS-T (3x 5 min) gewaschen und nach einer Vorinkubation mit Block-Lösung (20µl pro Schnitt, 30min) mit dem alkalische-Phosphatase-konjugiertem anti-DIG-Antikörper inkubiert (20µl, 1:5000 in Block-Lösung, 2h, RT). Die Schnitte wurden anschließend in PBST gewaschen (3x 5min) und durch das Waschen in NTMT in den alkalischen pH-Bereich überführt (2x 5 min, RT). Die Inkubation mit der Färbelösung BM-Purple (40 µl pro Schnitt, RT) fand unter Lichtausschluss statt und wurde bei ausreichend starkem Signal durch das Überführen in PBS gestoppt. Nach einer Postfixierung in PFA

(4%, 1h, RT) und anschließendem Waschen in PBS (2x 5 min) wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

2.11.10 RNA *in situ* Hybridisierung auf Ganzkörperpräparaten

Für dieses Experiment wurden Embryonen verwendet die wir in Kapitel 2.10.2.3 beschrieben isoliert, fixiert und dehydriert worden sind. Für Hybridisierungen der Maxilla wurde vor Beginn der Körper, die Mandibula und die Zunge abgetrennt. Anschließend wurden die Köpfe rehydriert, mittels einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25%), wobei die Präparate in jedem Schritt für 10min inkubiert worden sind. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und 1h in 6% H₂O₂ geblichen. Das ab E12,5 das Ektoderm bereits relativ dick ist, wurde das Gewebe mit Proteinase K anverdaut, dabei war die Zeitdauer altersabhängig (E12,5 3 min; E13,5 4 min; E14,5/E15,5 5 min). Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte mittels Inkubation in PBS/Glyzin. Im Anschluss wurde das Gewebe mit PFA/Glutaraldehyd nachfixiert und nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS-T, in Hybridisierungspuffer für 3h bei 79°C prähybridisiert. Die benutzten RNA Proben wurden 5 min bei einer Konzentration von ca. 1µg/ml aufgekocht und die Präparate darin anschließend bei 70°C ü.N. hybridisiert. Am folgenden Tag wurde 2 mal mit Hybridisierungsbuffer bei 70°C gewaschen. Die restlichen RNA's wurden durch 2 mal 30 min Inkubation mit RNaseA bei 30°C verdaut. Die Präparate wurden im Anschluss für mehrere Stunden in SS/Formamid/Tween-Lösung bei 70°C gewaschen. Während dieser Zeit wurden die Lösung mehrmals mit länger werdenden Intervallen von 5 – 20 min gewechselt. Nach dieser intensiven Waschphase wurden die Objekte umgepuffert, durchzweimaliges Waschen mit TBST und anschließend zweimaligem Waschen mit MABT. Bevor für eine ü.N. Inkubation der Antikörper mit einer 1:500 Verdünnung in 1% Blockierungsreagenz zu den Präparaten gegeben wurde, mussten diese 1h in 5% der Blockierungsreagenz inkubiert werden. Der dritte Tag dieses Experiments setzte sich einzig aus dem Waschen in TBST zusammen, dabei wurde 8 mal mit TBST gewaschen, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Bevor die Präparate gefärbt werden konnten, wurden sie durch dreimaliges Waschen für 20 min in NTMT Puffer auf den richtigen pH-Wert für die Färbelösung eingestellt. Anschließend konnten die Präparate mittels BM Purple gefärbt werden. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Objekte mit PBS gewaschen und anschließend mit PFA ü.N.

fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, konnten sie in schrittweise 80% Glycerin überführt werden, worin sie dokumentiert und gelagert worden sind.

2.11.11 Dokumentation der *in situ* Hybridisierungen

Schnittpräparate wurden mit einem DM5000 (Leica) Stereomikroskop dokumentiert. Für die Dokumentation von Gesamtembryonen und Übersichtsbildern von Schnittpräparaten wurde das Mikroskop Leica M420 mit FUJI Digitalkamera HC3002 verwendet. Eine Nachbearbeitung der digitalen Bilder erfolgte mit Photoshop CS.

2.11.12 Dreidimensionale Geweberekonstruktion

Die 3D-Geweberekonstruktion wurde mit der Software Amira 3.1.1 for OSX (Mercury Computer Systems) unter Verwendung von RNA insitu Hybridisierungen auf Paraffinschnitten und Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten (10µm) durchgeführt.

2.11.13 Skelettpräparation

Für die Analyse des Skelettaufbaus der Maxilla, wurden Skelette im Alter von E18,5 Embryonen präpariert. Nachdem sie vollständig vom extraembryonalen Gewebe befreit waren, wurden sie für 1min in 70°C Leitungswasser gelegt und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Dieser Vorgang ist nötig damit die Haut im Anschluss komplett entfernt werden kann. Die so vorbereiteten Embryonen wurden in abs. Ethanol ü.N. fixiert, wobei die Ethanollösung 1x ausgetauscht wurde. Im Anschluss an die Fixierung, wurden die Präparate für 2x2 d in Alzianblau-Lösung inkubiert um den knorpeligen Anteil zu färben. Um Reste der Alzianblau-Lösung gründlich zu entfernen, wurden die Präparate mind. 2 Tage mit abs. Ethanol gewaschen, welches mehrmals gewechselt wurde. Sind alle Alzianreste entfernt, wurde der verknöcherte Anteil des Skelettes gefärbt. Dafür wurden die Präparate zuerst für 3-5h in 0,5% KOH-Lösung inkubiert um das Gewebe anzuverdauern. Danach folgte eine Inkubation mit Alizarinrot-Lösung in 0,5% KOH für 2-4h. Nach dieser Inkubation konnten die Skelette bis zum gewünschten Ergebnis weiterverdaut werden.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Tbx2 und Tbx3 in der Gaumenentwicklung

3.1.1 Die Expression von Tbx2 und Tbx3 während der Gaumenentwicklung

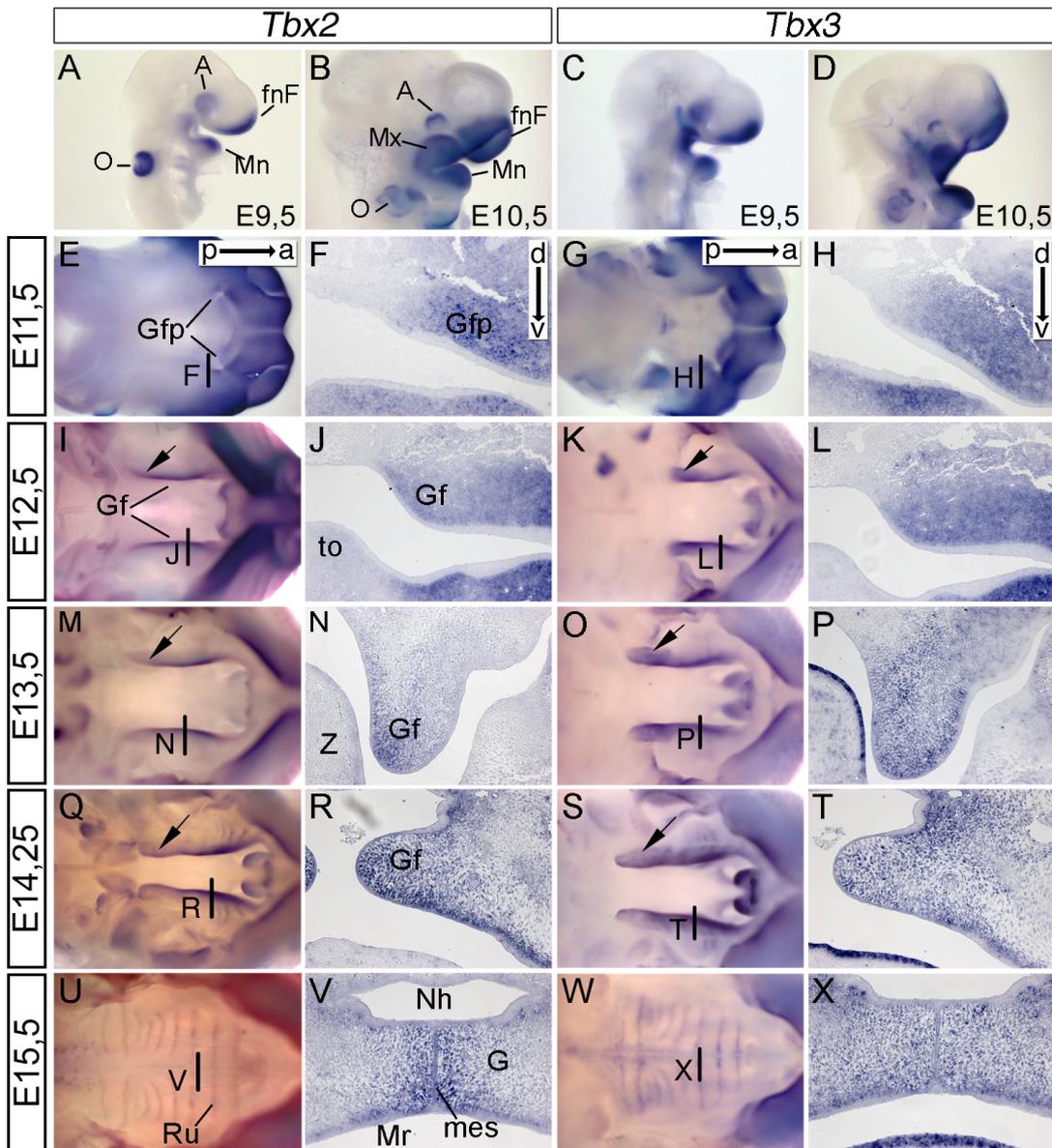


Abbildung 3.1. Expressionsanalyse während der Entwicklung des sekundären Gaumens zwischen E9,5 und E15,5

Tbx2 und *Tbx3* sind während der Gaumenentwicklung weitgehend koexprimiert. Für alle Stadien wurden Ganzpräparate *in situ* Hybridisierungen angefertigt (A-D,E,G,I,K,M,O,Q,S,U,W), wobei A-D lateral dokumentiert worden sind und E,G,I,K,M,O,Q,S,U,W sind ventrale Ansichten auf die Maxilla; Von den Stadien 11,5-15,5 wurden zusätzlich auch Schnitt- *in situ* Hybridisierungen gefertigt (F,H,J,L,N,P,R,T,V,X). Die Schnittebene ist in den dazugehörigen Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet

Abkürzungen: O-Ohr, A-Auge, Mn-Mandibula, fnF-frontonasaler Fortsatz, Mx-Maxilla, Gfp-Primordien der Gaumenfortsätze, Gf-Gaumenfortsatz, Z-Zunge, Ru-Ruga

Bereits aus einer vorangegangenen Veröffentlichung ist bekannt, dass *Tbx2* und *Tbx3* im frontonasalen Fortsatz exprimiert ist (Chapman et al., 1996) und zwischen E13,5 und E14,5 ist *Tbx3* in den auswachsenden Gaumenfortsätzen exprimiert (Lee et al., 2007). Um beide Gene während der Gaumenentwicklung zu untersuchen wurde eine Expressionsanalyse des frontonasalen Fortsatzes und der Maxilla angefertigt. Analysen von Ganzkörperpräparaten zeigten, dass beide Gene zwischen E9,5 und 11,5 in allen Fortsätzen des kranialen Bereiches zu erkennen ist (Abb. 3.1. A-E,G). Zum Tag E11,5 wurden die Anlagen des Gaumens zum ersten mal sichtbar, als Auswüchse zu beiden Seiten des oralen Bereichs (Abb. 3.1. E-H). Beide Gene konnten während der Gaumenentwicklung zu allen Stadien des Auswachsens (E11,5-E14,0), dem Anhebungsprozess (E14,0-E14,5) und dem Fusionsprozess (E15,5) mittels der *in situ* Hybridisierung visualisiert werden (Abb. 3.1. I-X). Die Expression beider Gene war ausschließlich auf das Mesenchym beschränkt (Abb. 3.1. F,H,J,L,N,P,R,T,V,X), wobei die Expression von *Tbx3* sich weiter zu der lateralen Seite ausdehnte als die Expression von *Tbx2* (Pfeile in Abb. 3.1. I,K,M,O,Q,S). Nachdem der Fusionsprozess bei Tag E15,5 abgeschlossen war, bestand die Expression beider Gene in den Rugae und um den mittelepithelialen Saum weiter (Abb.3.1. U-X).

3.1.2 Der Verlust von *Tbx2* führt zur Gaumenspalte

Tbx2 und *Tbx3* sind im auswachsenden Gaumen exprimiert. Dies liegt die Vermutung nahe, dass sie eine Rolle in der Entwicklung des Gaumens haben. Aus diesem Grund wurden *Tbx2* Verlustmutanten auf morphologische Veränderungen des sekundären Gaumens untersucht. Am Embryonaltag 18,5 kann man sowohl in den morphologischen Abbildungen, als auch in den histologischen Schnitten erkennen, dass sich Wildtyp ein durchgängiges Gaumendach gebildet hat (Abb. 3.2. A,C). Im der *Tbx2* Verlustmutante ist in beiden Abbildungen ein deutlicher Spalt zu erkennen (Abb. 3.2. B, D).

Auch in Skelettpräparationen kann man deutliche Unterschiede erkennen. In der Präparation der Kontrolle erkennt man im posterioren Bereich des Gaumens, dass Vomer und Oberkieferknochen verbunden sind. Im anterioren Bereich nimmt der Gaumenfortsatz der Prämaxilla einen Großteil der Fläche ein (Abb. 3.2.E). Vergleicht man diese beiden Knochen nun mit den entsprechenden Knochen in einem Präparat der *Tbx2*-defizienten Maus, erkennt man dass der Vomer nicht nur drastisch verkleinert ist, sondern auch keine Verbindung zum Oberkieferknochen hat.

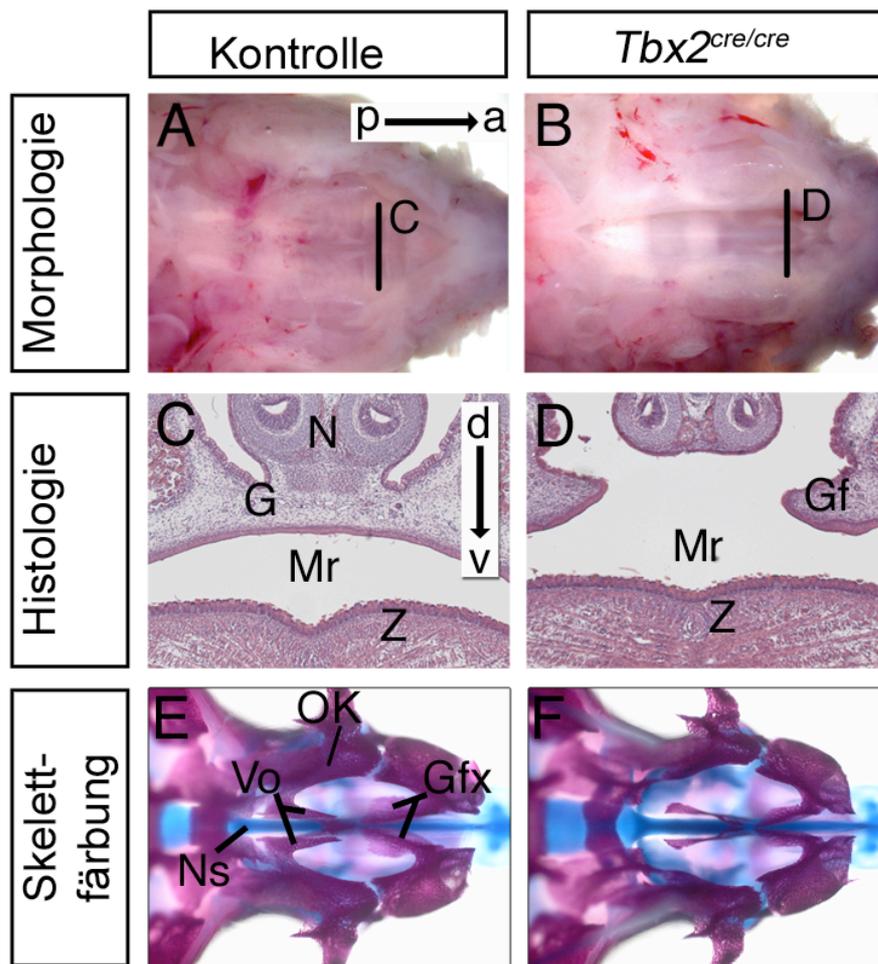


Abbildung 3.2. Beschreibung des Phänotypes zum letzten analysierbaren Stadium E18,5

(A,B) Morphologie des Oberkiefers aus ventraler Sicht, die Balken geben die Schnittebene für C,D an; (C,D) frontaler Gewebeschnitt des Kopfes, gefärbt mit Hämotoxylin/Eosin (E,F) ventraler Ansicht einer Skelettpräparation des Oberkiefers, Knochen sind dabei in rot, Knorpel in blau zu erkennen.

Abkürzungen: p-posterior, a-anterior, v-ventral, d-dorsal, N-Nase, G-Gummen, Gf-Gaumenfortsatz, Mr-Mundraum, Z-Zunge, Ns-nasales Septum, Vo-Vomer, Gfx-Gaumenfortsatz der Prämaxilla, Ok – Oberkieferknochen.

Eine ähnliche dramatische Verkleinerung ist auch im anterioren Bereich zu erkennen, der Gaumenfortsatz der Prämaxilla ist nur im medialen Bereich des Gaumens ausgebildet, während die lateralen Seiten völlig zu fehlen scheinen (Abb. 3.2. F).

Um zu untersuchen welcher der Prozesse während der Gaumenentwicklung gestört ist, wurde eine detaillierte Analyse zwischen E12,5 und E15,5 durchgeführt. Dabei wurden die Morphologie des Oberkiefers aus ventraler Sicht und die Histologie auf frontalen Gewebeschnitten analysiert (Abb. 3.3.).

Zum Embryonaltag 12,5 kann man keine morphologischen Veränderung des Gaumens feststellen (Abb.3.3.A-D).

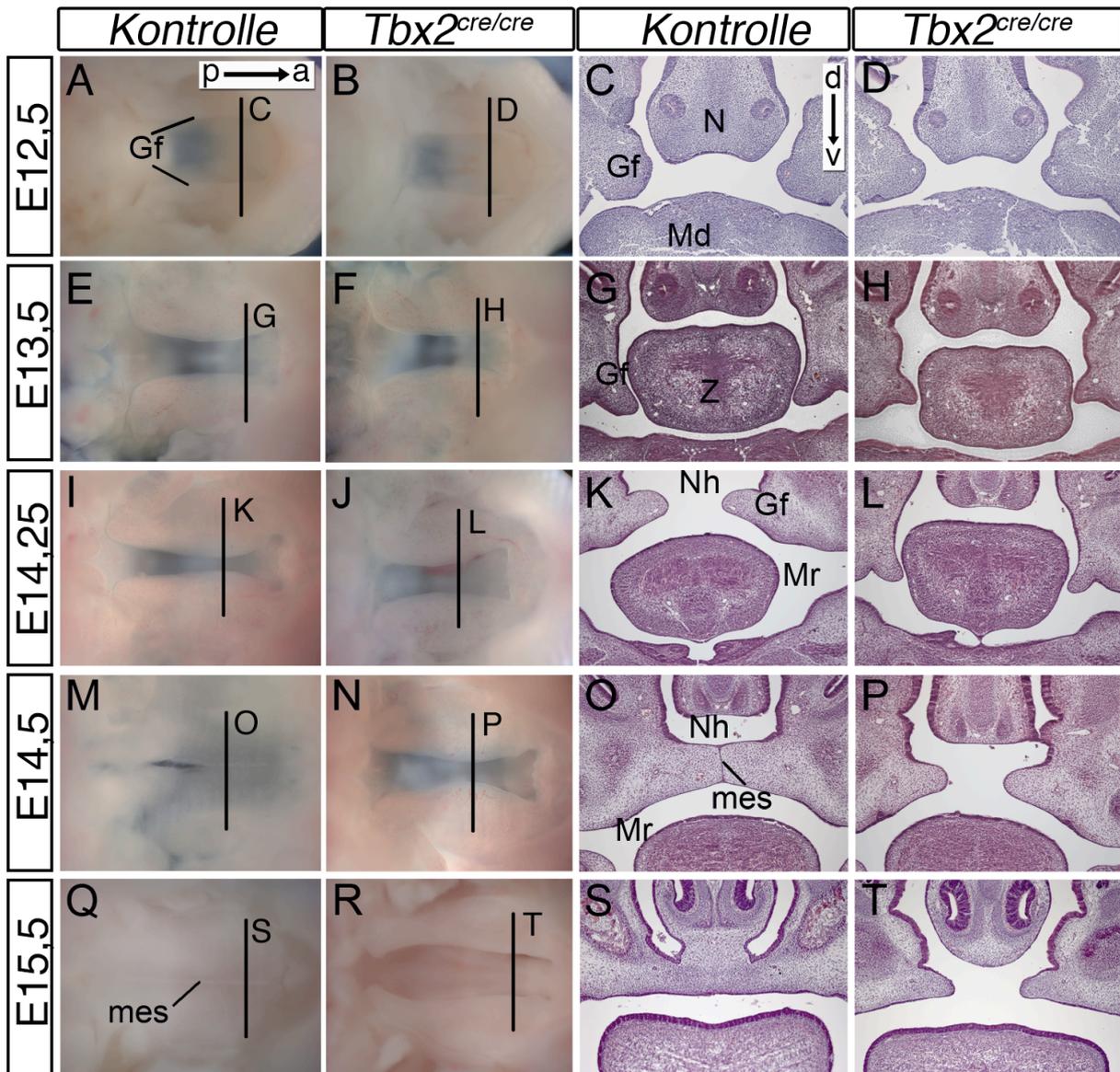


Abbildung 3.3. Beschreibung der Entwicklung des *Tbx2cre/cre* Phänotypes

(A,B,E,F,I,J,M,N,Q,R) Morphologie des Oberkiefers aus ventraler Sicht, die Embryonalstadien sind jeweils am linken Rand angegeben, die Balken geben die Schnittebene für C,D,G,H,K,L,O,P,S,T an; (C,D,G,H,K,L,O,P,S,T) frontaler Gewebeschnitt des Kopfes, gefärbt mit Hämotoxylin/Eosin

Abkürzungen: p-posterior, a-anterior, v-ventral, d-dorsal, N-Nase, Md-Mandibula, Gf-Gaumenfortsatz, Mr-Mundraum, Z-Zunge, Nh-Nasenhöhle, Mes-Mittelepithelialer Saum

Bei E13,5 erschienen die GF der Mutante bereits kleiner als im vergleichbaren Wildtyp (Abb.3.3. E-H). Zum Tag E14,25 haben die Gaumenfortsätze im Wildtyp bereits den Anhebungsprozess unterlaufen (Abb. 3.3. I,K) und zum Zeitpunkt E14,5 und E15,5 sind sie bereits fusioniert (Abb. 3.3. M,O,Q,S).Vergleicht man damit die Entwicklung in den *Tbx2* Verlustmutanten erkennt man, dass die bei E13,5 bereits kleineren GF, weiter in der

Entwicklung zurückbleiben und erst bei E 14,5 einen verspäteten Anhebungsprozess durchlaufen (Abb. 3.3 O,P). Kurz nach diesem Anhebungsprozess stoppt die Entwicklung des Gaumens in der Mutante, bevor sie den finalen Fusionprozess absolvieren können (Abb. 3.3. Q-T).

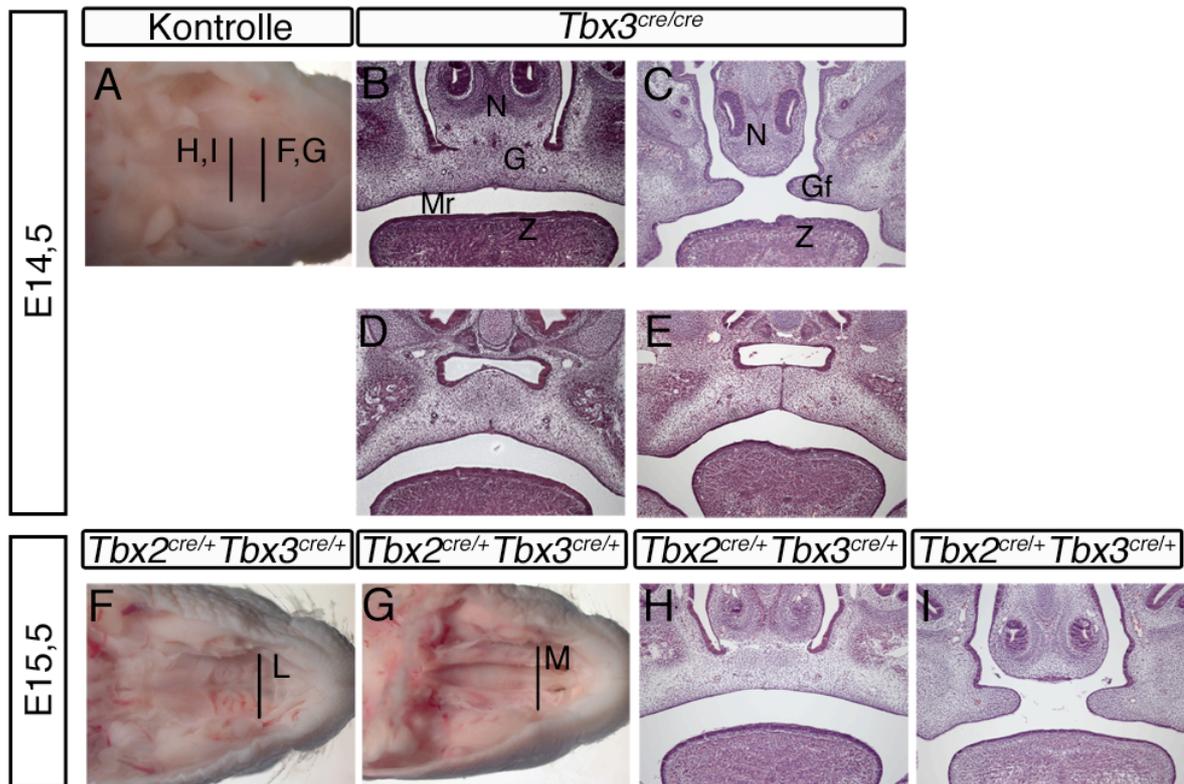


Abbildung 3.4. Analyse von $Tbx3^{cre/cre}$ Embryonen und $Tbx2/Tbx3$ doppelheterozygoten Embryonen

(A) E14,5 Wildtyp Beispiel zur Erklärung der Schnittebenen von B-E, welche mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet sind (B,D) frontaler Schnitt des Kopfes durch den anterioren Bereich des Gaumens (C,E) frontaler Schnitt durch den mittleren Gaumen, B und C, sowie D und E sind jeweils ein Individuum. (F,G) Morphologische Abbildung der ventralen Seite des Gaumens in $Tbx2^{cre/+}$, $Tbx3^{cre/+}$, schwarze Balken zur Kennzeichnung der Schnittebene in H und I, (H,I) frontaler Schnitt des Kopfes durch die mittlere Region des Gaumens.

$Tbx2$ und $Tbx3$ sind im Bereich des auswachsenden Gaumens koexprimiert, was darauf hindeutet, dass nicht nur $Tbx2$ eine Rolle in der Entwicklung des Gaumens hat. $Tbx3$ Verlustmutanten konnten nicht zum Stadium E18,5 untersucht werden, da sie bis E14,5 wahrscheinlich an Herz-, Gefäß- und Leberdefekten sterben (Davenport et al., 2003, Suzuki et al., 2008, Lüdtke et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die phänotypische Beschreibung der $Tbx3$ Mutante zum Zeitpunkt E14,5 vorgenommen (Abb. 3.4. A-E). Dabei konnte festgestellt werden, dass der mittlere Gaumen immer geschlossen ist (Abb. 3.4. D,E). Während sich in anterioren Schnitten sowohl ein geschlossener Gaumen, wie

auch ein offener Gaumen feststellen ließ (Abb. 3.4. B,C). Da bisher für *Tbx3* keine konditionelle Verlustmutante verfügbar ist um den Einfluss von *Tbx3* weiter zu testen, wurden zusätzlich doppelheterozygote Verlustmutanten für *Tbx2* und *Tbx3* generiert und auf ihre Defekte hin untersucht (Abb. 3.4. F-I).

Auch hier zeigten 62% der Embryonen einen geschlossenen Gaumen (Abb.3.4. F,H), die restlichen 38% aber eine komplette Gaumenspalte wie sie auch in *Tbx2^{cre/cre}* Embryonen zu finden ist (Abb.3.4. G,I)

3.1.3 Zelluläre Analyse der Gaumenspalte

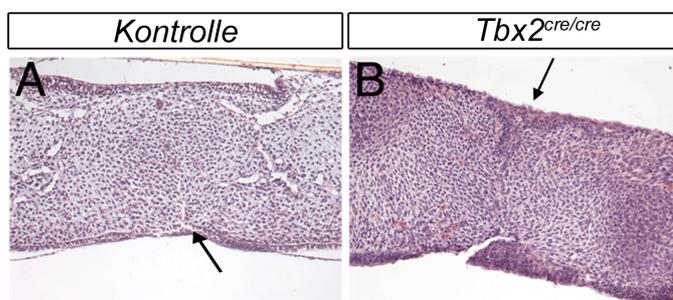


Abbildung 3.5. Analyse der Fusionsfähigkeit

Gaumenfortsätze wurden bei E13,5 isoliert und für 48h kultiviert, während sie mit den Spitzen der Gaumenfortsätze dicht beieinander lagen.

Um zu unterscheiden, ob es sich bei dem Phänotyp um eine Beeinträchtigung des Fusionsprozesses handelt oder die endgültige Fusion aufgrund der physikalischen Umstände, also der weiten Entfernung zwischen den Gaumenblättern, nicht stattfinden kann, wurden Organkulturen angefertigt. Dafür wurden zwei Gaumenblätter mit der medialen Seite zusammengelegt und nach Towell auf Membranen für 2 Tage kultiviert. Von diesen Kulturen wurden im Anschluss Gewebeschnitte angefertigt, welche histologisch gefärbt wurden. Wie in der Abbildung (Abb. 3.5.) zu erkennen, ist die mittlere epitheliale Naht vollständig verschwunden. Auch in der Mutante ist zu erkennen, dass zwischen den mesenchymalen Zellen nur noch vereinzelte epitheliale Zellen zu finden sind. Somit kann man ausschließen, dass es sich in den *Tbx2*-Mutanten um einen Defekt des Fusionsprozesses handelt. Die Ursache hierfür scheint physikalischer Natur zu sein. Bereits in der morphologischen Studie wurde festgestellt, dass die Gaumenblätter der Mutante kleiner waren als im entsprechenden Wildtyp (Abb. 3.2. K,L,O,P). Um dies zu untersuchen wurde die Größe des Gfs bestimmt und statistisch ausgewertet. Dabei wurde festgestellt, dass sich bei E12,5 keine Unterschiede zwischen den Kontrollembryonen und Mutanten finden lassen (Abb 3.6. A). Im Gegensatz dazu, sind signifikante Unterschiede

bei E14,0 zu erkennen. Sowohl im anterioren Bereich als auch im posterioren Bereich sind die Gaumenblätter der Mutanten signifikant kleiner als in den entsprechenden Kontrollembryonen (Abb. 3.6. A). Da Proliferationsunterschiede die Ursache für eine derartige Retardation sein können, wurde während derselben Embryonalstadien ein BrdU-Inkorporations Experiment durchgeführt.

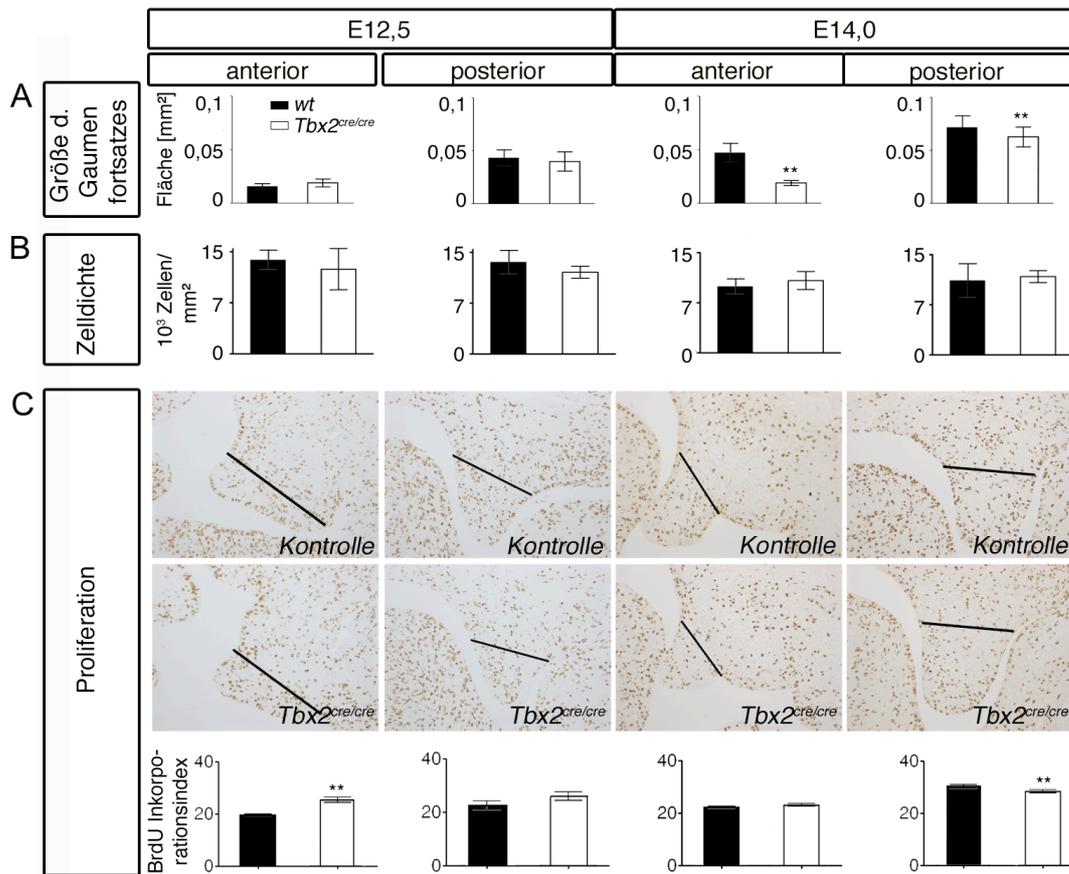


Abbildung 3.6. Unterschiede in Größe, Zelldichte und Proliferation der mesenchymalen Zellen der Gaumenfortsätze in *Tbx2cre/cre* Embryonen

Auf der linken Seite der Abbildung ist das Stadium E12,5 abgebildet und auf der rechten Seite E14,0. Für beide Stadien wurde eine Unterteilung in anterior und posterior vorgenommen. Der schwarze Balken des Diagramms kennzeichnet den Wert der Kontrollen und der weiße Balken des Diagramms den Wert der *Tbx2cre/cre* Mutanten (A) Größe der Gaumenfortsätze [Werte: *E12,5 anterior*: Wt: 0.0157±0.002 mm², Mut: 0.0187±0.004 mm², p=0.03; *posterior*: Wt: 0.0434±0.007 mm², Mut: 0.0397±0.009 mm², p=0.19; *E14,5 anterior*: Wt: 0.0472±0.0087 mm², Mut: 0.0188±0.0023 mm², p<0.0001; *posterior*: Wt: 0.0718±0.0106 mm², Mut: 0.0626±0.0093 mm², p<0.005]; (B) Zelldichte des Mesenchyms [Werte: *E12.5 anterior* Wt: 13791±1416 Zellen/mm², Mut: 12416±3024 Zellen/mm², p=0.209; *posterior* Wt: 13541±1725 Zellen/mm², Mut: 12041±878 Zellen/mm², p=0.023; *E14.0 anterior*: Wt: 9948±1107 Zellen/mm², Mut: 10833±1339 Zellen/mm², p=0.294; *posterior*, Wt: 11125±2524 Zellen/mm², Mut: 11718±1510 Zellen/mm², p=0.547]; (C) Proliferation der mesenchymalen Zellen, in dem oberen Bildern wird dargestellt, welcher Bereich für die Auszählung der BrdU-positiven Zellen genutzt wurde (Bereich unter der schwarzen Linie [Werte: *E12.5 anterior* Wt: 19.5±0.4, Mut: 25.4±0.9, p<0.0001, *posterior* Wt: 22.5±1.7, Mut: 26.0±1.6, p=0.15; *E14.0 anterior* Wt: 22.2±0.4, Mut: 23.0±0.5, p=0.023, *posterior* Wt: 30.3±0.6, Mut: 28.0±0.6, p=0.009]

Dabei kam es zu bei E12,5 zu einer höheren Zellproliferation in den *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten. Bei E14,0 wurde hingegen eine signifikante Verringerung der Zellproliferation im posterioren Bereich des Gaumens von *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten, im Vergleich zu Kontrollembryonen, festgestellt (Abb. 3.6.). Darüber hinaus wurde innerhalb des Gaumensblattes die Zelldichte bestimmt, da aufgrund der erhöhten Proliferation und der geringeren Größe des Gaumenblattes war zu vermuten, dass sich eine größere Anzahl an Zellen innerhalb eines bestimmten Areals befinden. Das Ergebnis des Experiments widerlegte hingegen diese Vermutung. Weder bei E12,5 noch E14,0 konnten Unterschiede in der Zelldichte festgestellt werden. Trotz der erhöhten Zellproliferation kam es zu stark verkleinerten Gaumenblättern, ein Grund hierfür kann auch erhöhte Apoptose sein. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine TUNEL-Untersuchung durchgeführt. Für diese Analyse wurden Wildtypen mit homozygoten Mutanten verglichen, um aber einen Effekt der Cre-Rekombinase auf das Zellüberleben auszuschließen wurden auch heterozygote Kontrollembryonen in die Analyse mit einbezogen.

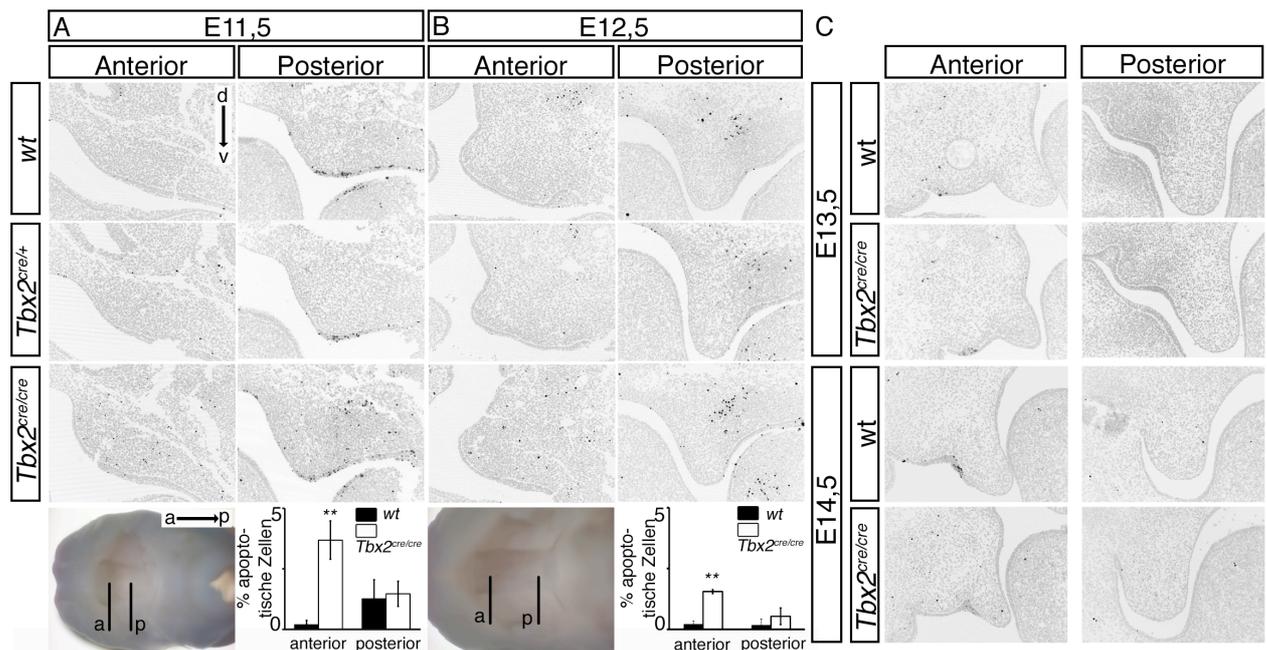


Abbildung 3.7. Analyse der Apoptose in *Tbx2^{cre/cre}* Gaumenfortsätzen

Das TUNEL-Experiment wurde durchgeführt auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes, Bei den jüngeren Stadien E11,5 und E12,5 konnte festgestellt werden, dass die Apoptoserate erhöht ist. Diese Erhöhung ist nicht auf den Einfluss der Cre-Rekombinase zurückzuführen, was durch Schnitte von *Tbx2^{cre/+}* überprüft werden konnte. (A) E 11,5 [Werte: anterior: Wt: 0.18±0.18, Mut: 3.68±0.79, p<0.00005; posterior: Wt: 1.26±0.38, Mut: 1.47±0.51, p=0.69]; (B) E12,5 [Werte: anterior: Wt: 0.21±0.13, Mut: 1.55±0.08, p=0.001; posterior: Wt: 0.17±0.26), mut: 0.53±0.34, p=0.27]; (C) Bei E13,5 und E14,5 konnten keine Veränderung gezeigt werden.

Dabei konnte festgestellt werden, dass in den *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten, bei E11,5 im gesamten Gaumen (Abb. 3.7. A) und bei E12,5 (Abb. 3.7. B) im anterioren Bereich die Anzahl der apoptotischen Zellen signifikant höher lag, als bei gleichaltrigen Wildtyp- und heterozygoten Kontrollembryonen. Diese erhöhte Apoptoserate konnte in den Folgestadien E13,5 und E14,5 nicht mehr festgestellt werden (Abb. 3.7. C).

3.1.4 Vorzeitige Verknöcherung führt nicht zur Gaumenspalte

Bei der bisherigen Analyse konnten, außer einer erhöhten Apoptose keinerlei zelluläre Unterschiede festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit, dass der Gaumen sich nicht schließen kann ist die vorzeitige Verknöcherung dieses. Um dies zu untersuchen wurden während der Gaumenentwicklung Alcianfärbung und RNA *in situ* Hybridisierungen gegen *Sox9* und *Col2a* auf Gewebeschnitten durchgeführt. Wie man im der folgenden Abbildung 3.8 A, B sehen kann, sind *Sox9* und *Col2a* in Bereichen exprimiert, die später verknöchert werden. Beide Gene zeigen in den Gewebeschnitten der Mutanten keine Veränderung ihrer Expression, weiterhin kommt es auch nicht zu einer verfrühten Knorpelbildung, die durch Alcian angefärbt werden kann (Abb.3.8.C).

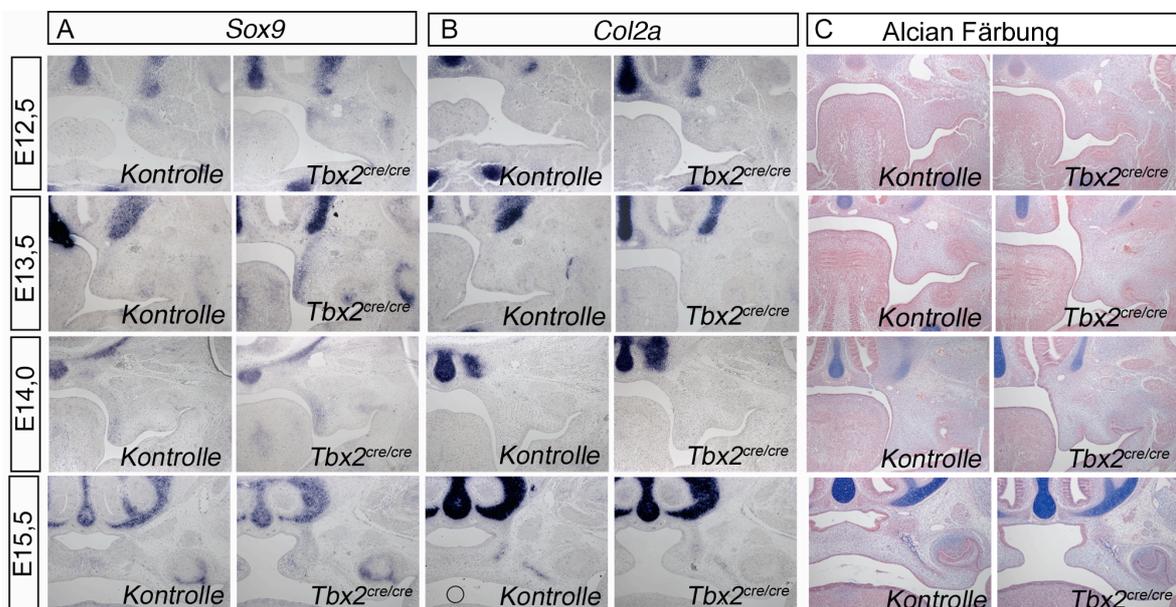


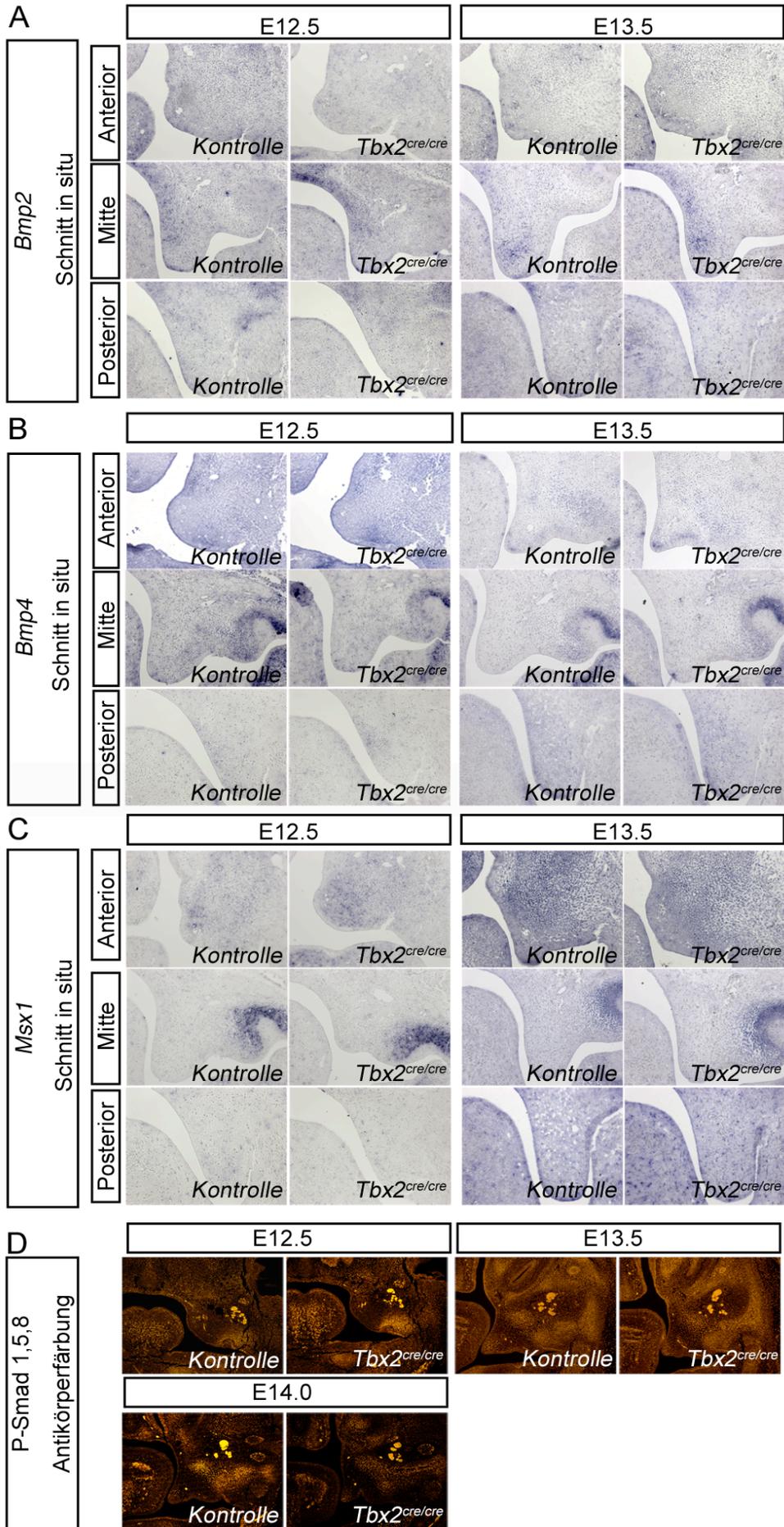
Abbildung 3.8. Analyse zur vorzeitigen Verknöcherung des Gaumens in *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten
 Alle Analysen wurden durchgeführt auf mittleren Schnitten der Gaumenfortsätze während der Embryonalstadien 12,5; E13,5; E14,0 und E15,5
 (A) *Sox9 in situ* Hybridisierung (B) *Col2a in situ* Hybridisierung (C) Alcian Färbung

3.1.5 Molekulare Analyse der Gaumenspalte

Um Unterschiede in den einzelnen molekularen Signalwegen aufzudecken, wurde eine große Anzahl von Genen getestet, für die bereits gezeigt wurde, dass sie eine Rolle in der Gaumenentwicklung spielen (Review von Gritli-Linde, 2007). Eine Familie von Signalmolekülen die eine wichtige Rolle übernehmen sind die BMP-Signalmoleküle. Aus dieser Familie wurden *Bmp2*, *Bmp4* (*Bone Morphogenic Protein 2* und *4*) und ihr Zielgen *Msx1* (*Muscle Segment Homeobox 1*) untersucht. Alle sind nur sehr schwach im Mesenchyme exprimiert und wurden bisher beschrieben, im anterioren Gaumenblatt eine autoregulatorische Schleife aufrecht zu erhalten (Zhang et., 2000,2002). Die Expression von *Bmp2* und *Msx1* ist im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Auch eine Antikörperfärbung gegen phosphoryliertes Smad 1,5,8 zeigt keinerlei Veränderungen in der Mutante im Vergleich zu der Kontrolle (Abb. 3.9. A,C,D). Wenn man dagegen *Bmp4* genau betrachtet, kann eine verstärkte Expression im anterioren Bereich der Maxilla erkannt werden (Abb. 3.9. B).

Abbildung 3.9. Molekulare Analyse des Bmp-Signalweges

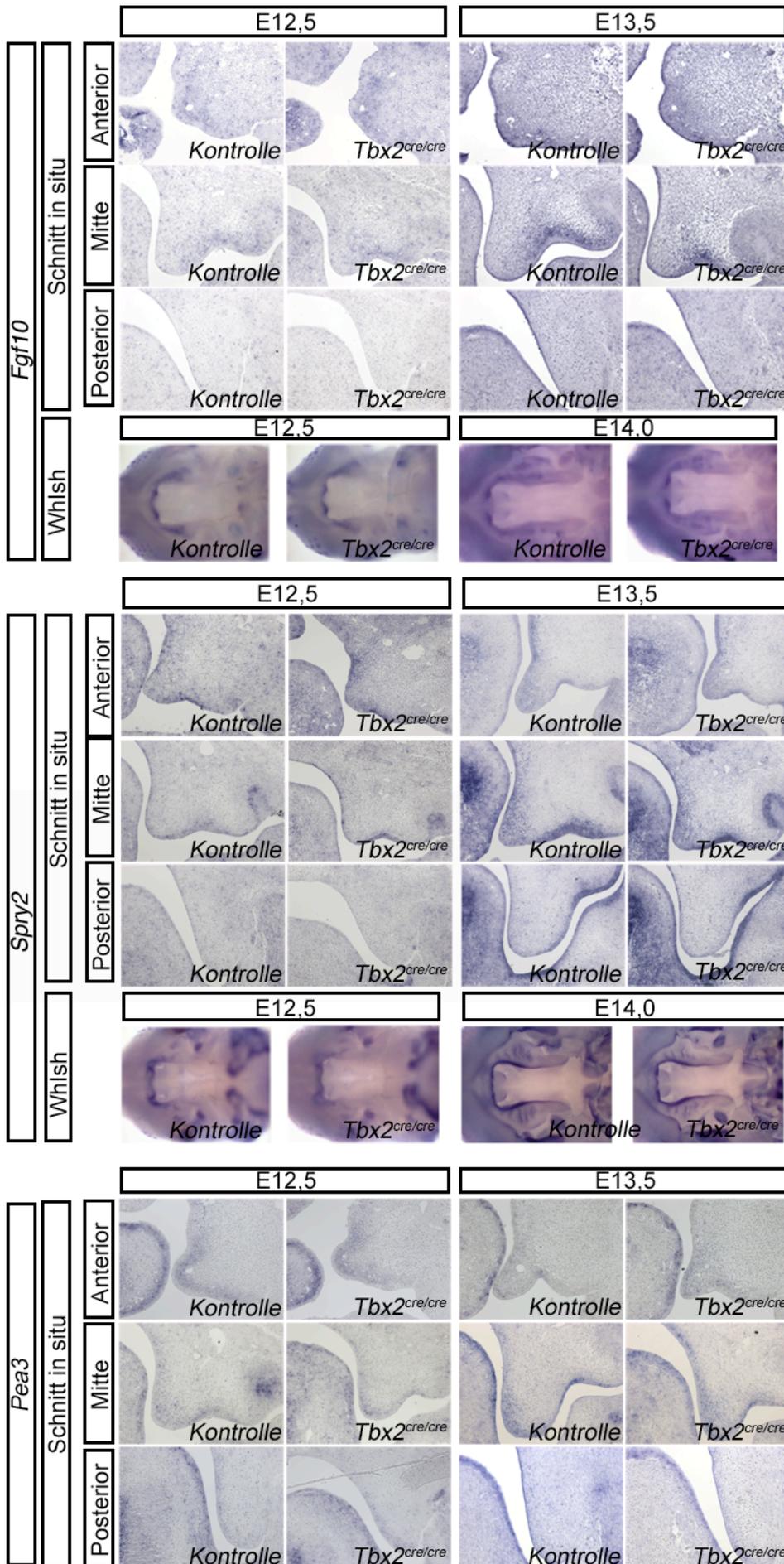
(A-C) RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten zu den Zeitpunkten E12,5 und E13,5. Es wurde jeweils eine anteriore, mittlere und posteriore Schnittebene durch die Maxilla verwendet. *In situ* Hybridisierungen von (A) *Bmp2* (B) *Bmp4* (C) dem Zielgen des *Bmp*-Signalweges *Msx1* (D) Antikörperfärbung gegen die phosphorylierten Varianten der Smads 1,5 und 8 auf anterioren Gewebeschnitten.



Eine andere Gruppe von Signalmolekülen ist die Fgf-Familie. Für diese Gruppe konnten ebenfalls keine Veränderungen der Expressionsdomäne oder Expressionsstärke festgestellt werden. *Fgf10* (*Fibroblast Growth factor 10*) ist ebenfalls einer der Faktoren, die bekannt sind die Proliferation im Mesenchym zu regulieren. Dies geschieht in Rückkopplung mit Signalen aus dem Epithel, was auch in der Expression widerspiegelt wird. *Fgf10* ist im Gaumenmesenchym exprimiert, welches sich benachbart zum Gaumenepithel befindet. Sowohl in den Ganzkörperpräparaten als auch in den Gewebeschnitten ist außerdem zu erkennen, dass sich die Expression bei E12,5 und E14,0 von dem anterioren bis zum mittleren Bereich zieht (Abb. 3.10. A). Für *Spry2* (*Sprouty 2*), einem intrazellulären Inhibitor von Fgf-Signalen, ist um E12,5 in Gewebeschnitten keine Expression zu erkennen, allerdings zeigen die Ganzkörperpräparate in der Kontrolle und in den Mutanten eine Expression im anterioren Gaumenbereich. Eineinhalb Tage später ist diese Expression auch in den Gewebeschnitten zu finden. Deutlich sichtbar, dass *Spry2* nicht nur im Epithelium des Gaumenblattes, sondern auch im benachbarten Mesenchym exprimiert ist (Abb. 3.10. B). Für *Pea3* (*Etv4, Ets Variant Gene 4*), ein Zielgen des Fgf-Signalweges, trifft ähnliches zu. Bei E14,0 ist auch *Pea3* im Epithelium und im Mesenchym des Gaumenblattes exprimiert. Im Gegenteil zu *Spry2* ist auch bei E12,5 eine klare Expression in Mesenchym des Gaumenblattes zu erkennen (Abb. 3.10. C), wobei hier ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontrollgewebeschnitten und Mutantengewebeschnitten zu erkennen waren.

Abbildung 3.10. Molekulare Analyse des Fgf-Signalweges

(A-C) RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E12,5 und E13,5. Es wurden jeweils eine anteriore, mittlere und posteriore Schnittebene durch die Maxilla verwendet. (A,B) Die unteren Abbildungen zeigen Ganzpräparat *in situ* Hybridisierungen von Maxillen der entsprechenden Gene zu den Zeitpunkten E12,5 und E14,0. Diese Maxillen wurden von der ventralen Seite dokumentiert. (A) *Fgf10 in situ* Hybridisierung (B) *Spry2 in situ* Hybridisierung (C) *in situ* Hybridisierung für das Zielgen des Fgf-Signalweges *Pea3*



Ein anderes Gen, welches durch FGF10 aktiviert wird ist *Shh* (Sonic Hedgehog). *Shh*, im Epithelium exprimiert bildet es mit *Fgf10* eine Rückkopplungsschleife (Rice et al., 2004), die auch aus anderen Geweben bekannt ist (Bellusci et al., 1997; Chuang et al., 2003; Ohuchi et al., 1997). In den hier vorliegenden Gewebeschnitten kann man deutlich die epitheliale Expression bei E12,5 und E14,0 erkennen. In den Ganzkörperpräparaten ist bei E12,5 nur eine sehr schwache Färbung im Gaumenblatt zu erkennen. (Abb. 3.11. A). Bei E14,0 ist die typische Färbung der Rugae, den Falten des Gaumenblattes erkennbar (Abb. 3.11. A). *Ptc1* (*Patched 1*) seinerseits ein bekannter *Shh* Rezeptor wird im Mesenchym, benachbart zum oralen Epithelium exprimiert. Auch hier ist bei E14,0 zu sehen wie *Ptc1*, ähnlich zu *Shh*, in der Rugae-Struktur exprimiert wird. Nur im Gegensatz zu *Shh*, zeigt es aufgrund der mesenchymalen Expression eine etwas breitere Expression (Abb. 3.11. B). Auch hier konnten in der *Tbx2^{cre/cre}*-Mutante keine Unterschiede zu den Kontrollen gefunden werden.

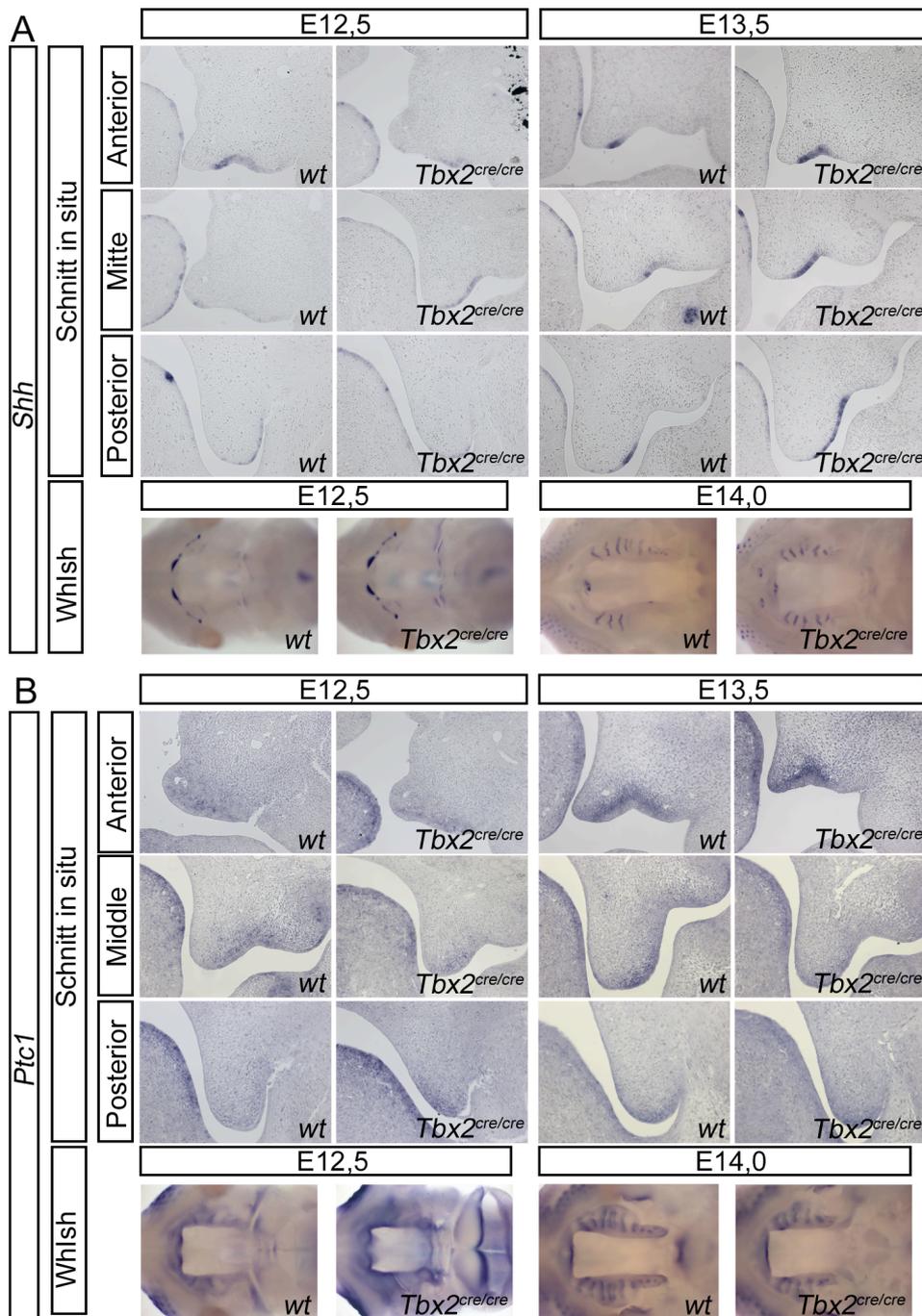


Abbildung 3.11. Molekulare Analyse des Shh-Signalweges

(A-B) RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E12,5 und E13,5. Es wurden jeweils eine anteriore, mittlere und posteriore Schnittebene der Maxilla verwendet. Die unteren Abbildungen zeigen *in situ* auf Ganzkörperpräparaten von Maxillen der entsprechenden Gene zu den Zeitpunkten E12,5 und E14,0. Diese Maxillen wurden von der ventralen Seite dokumentiert. (A) *Shh in situ* Hybridisierung (B) *Ptc1 in situ* Hybridisierung

Der Gaumen ist in zwei unterschiedliche Kompartimente unterteilt, dem weichen Gaumen im hinteren Bereich und im vorderen Bereich den harten bzw. verknöcherten Gaumen. Diese Unterteilung macht sich schon in frühen Entwicklungsstadien bemerkbar. So ist z.B.

Shox2 im Mesenchym des anterioren Gaumenblattes exprimiert, was bei Hybridisierungen auf Ganzkörperpräparaten von E12,5 und E13,5 Maxillen erkennbar ist (Abb. 3.12. A). Ein anderes Gen welches den posterioren Bereich markiert, ist *Tbx22*. Zum Tag E12,5 in den Ganzkörperpräparaten ist dessen Expression im mittleren Bereich der Gaumenblätter sichtbar. Bei Tag E14,0 markiert *Tbx22* die posteriore Hälfte der Gaumenblätter (Abb. 3.12. B). Auch *Pax9* weist entlang der AP-Achse ein unterschiedliche Expressionsmuster. In den Kontrollen ist die posteriore Expression von *Pax9* zu den lateralen Seiten hin ausgebreitet, während sie sich im anterioren Bereich auf die kante des Gfs beschränkt (Abb. 3.12. C). Alle 3 Gene, die für anterior-posteriore Regionalisierung eine Rolle spielen, wiesen bei *Tbx2*-defizienten Embryonen keinerlei Unterschiede in ihrem Expressionsmuster im Vergleich zu Kontrollembryonen auf, was dafür spricht dass dieser Prozess nicht durch *Tbx2* beeinflusst wird.

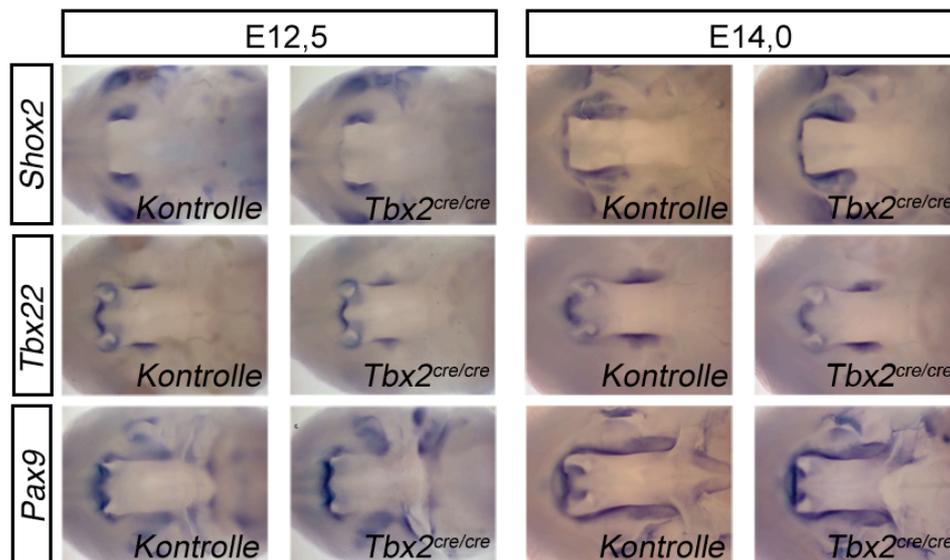


Abbildung 3.12. Molekulare Analyse der Regionalisierung des Gaumens

RNA *in situ* Hybridisierung von Ganzkörperpräparaten der Maxilla der entsprechenden Gene zu den Zeitpunkten E12,5 und E14,0. Diese Maxillen wurden von der ventralen Seite dokumentiert. (A) *Shox2 in situ* Hybridisierung (B) *Tbx22 in situ* Hybridisierung (C) *Pax9 in situ*

Zwei weitere Transkriptionsfaktoren die eine Rolle in der Gaumenentwicklung spielen sind die Gene *Odd-skipped related 1 und 2 (Osr1 und Osr2)*. Beide Faktoren wurden beschrieben die Proliferation innerhalb des Gaumenmesenchyms zu beeinflussen (Lan et al., 2001, 2004). Sie sind beide im Mesenchym des herauswachsenden Gaumenblattes exprimiert (Abb. 3.13). Insbesondere *Osr2* zeigt die Tendenz hauptsächlich in den Zellen benachbart zum Gaumenepithel exprimiert zu sein (Abb.3.13. B). Für beide Gene konnten keine Unterschiede zwischen Gewebeschnitten in den Kontrollen und den Mutanten nachgewiesen werden.

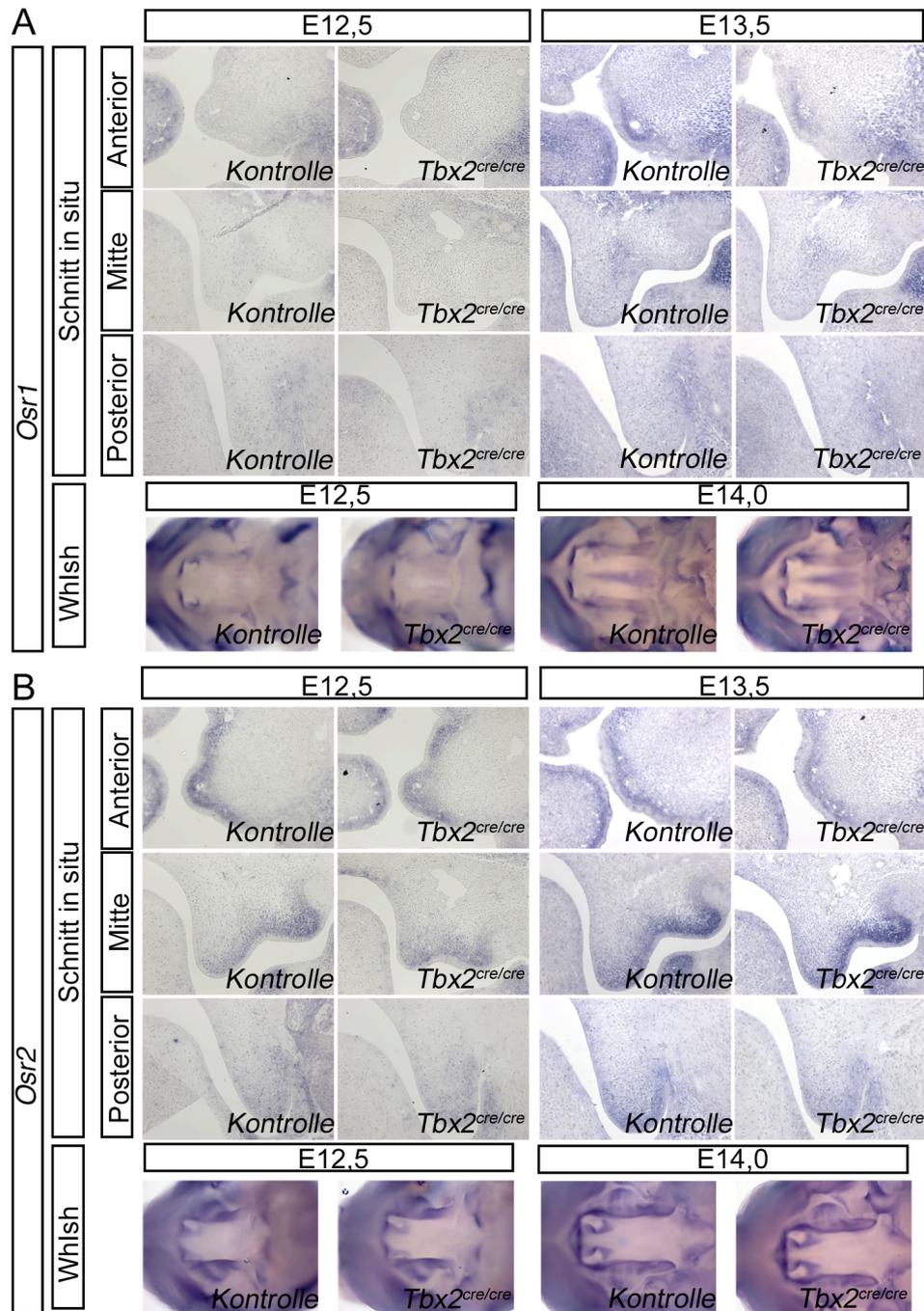


Abbildung 3.13. RNA *In situ* Hybridisierung gegen *Osr1* und *Osr2*

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E12,5 und E13,5. Es wurden jeweils eine anteriore, mittlere und posteriore Schnittebene durch die Maxilla verwendet. Die unteren Abbildungen zeigen *in situ* Hybridisierungen auf Ganzkörperpräparaten von Maxillen der entsprechenden Gene zu den Zeitpunkten E12,5 und E14,0. Diese Maxillen wurden von der ventralen Seite dokumentiert. (A) *Osr1 in situ* Hybridisierung (B) *Osr2 in situ* Hybridisierung.

Da *Tbx2* häufig in Zusammenhang mit Zellzyklusregulation und Proliferation gebracht wurde, wurden auch *CyclinD1*, *D2* und *D3* getestet. Alle 3 dieser getesteten Gene zeigte eine schwache Expression in den Kontrollen und in den Mutanten. Für *CyclinD1* war eine

leichte Erhöhung der Expression im Vergleich zu Kontrollembryoen zu erkennen (Abb.3.14. A).

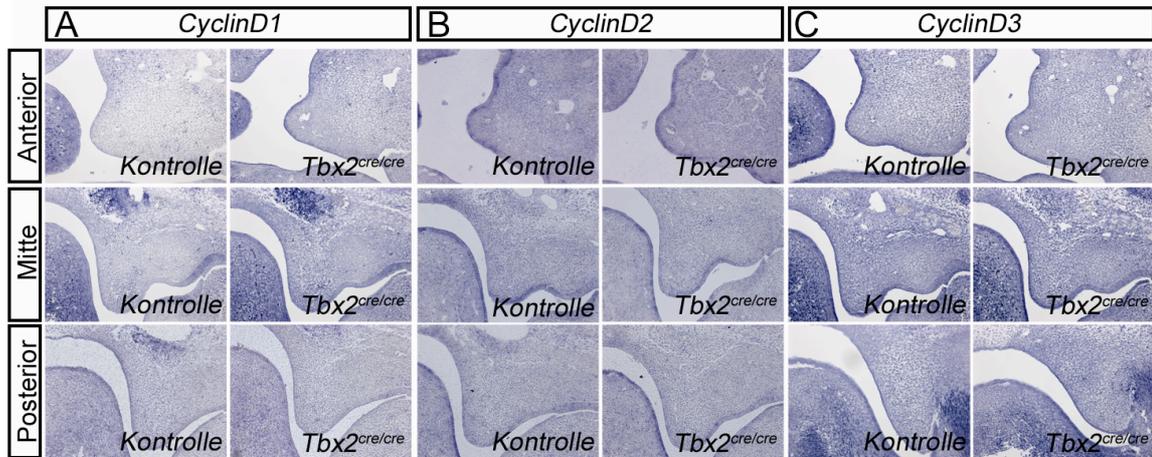


Abbildung 3.14. Analyse einiger Zellzyklusregulatoren zum Zeitpunkt E12.5

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten aller drei Bereiche des Gaumens (Anterior, Mitte und Posterior) gegen (A) CyclinD1 (B) CyclinD2 (C) CyclinD3

Der Verlust *EphB2* und *EphB3* zeigt einen ähnlichen Phänotyp, wie der Verlust von *Tbx2*. Aus diesem Grund wurden auch für diese beiden Gene *in situ* Hybridisierungen angefertigt. Für beide Gene ist im Wildtyp nur eine schwache Expression zu erkennen, welche auch in der *Tbx2*-Mutante keinen Unterschied zeigt (Abb. 3.15).

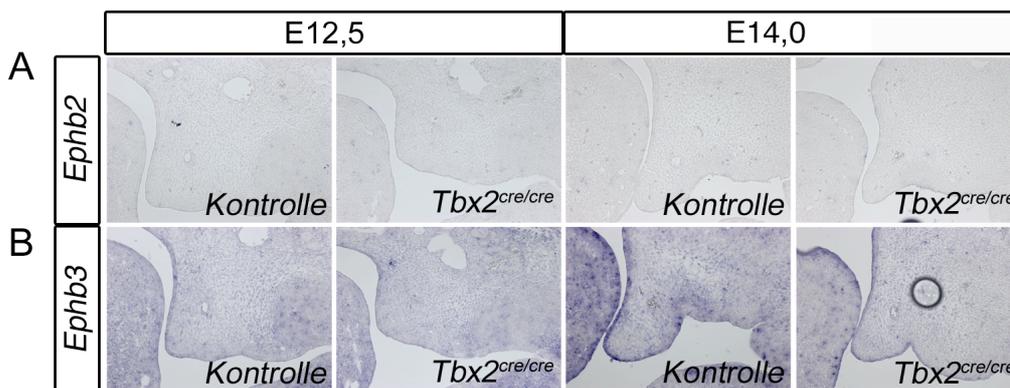


Abbildung 3.15. Molekulare Analyse von EphB2 und EphB3

(A-C) RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E12,5 und E14,0. Es wurden anteriore Schnittebenen durch die Maxilla verwendet. (A) *EphB2* *in situ* Hybridisierung (B) *EphB3* *in situ* Hybridisierung

3.2 Die Rolle von *Tbx2* während der Zahnentwicklung

3.2.1 *Tbx2^{cre/cre}* Embryonen zeigen eine Größenverminderung der Molaren

Um zu untersuchen, ob *Tbx2* einen Effekt auf die Zahnentwicklung hat, wurden sagittale Gewebeschnitte vom Kopfbereich angefertigt, welche anschließend histologisch angefärbt wurden. Bereits auf diesen Schnitten ist zu erkennen, dass sich in der Maxilla, vor den vordersten Molaren eine weitere zahnähnliche Struktur befindet, welche einer Zahnanlage gleicht. Eine weitere Beobachtung ist der Größenunterschied zwischen dem Molaren in der Kontrolle und dem der Mutante (Abb. 3.16. A,B). In der Mutante scheint der Molar etwas kleiner als in dem Kontrollgewebeschnitt. Dieser Eindruck verstärkt sich noch, wenn man die angefertigten 3D Rekonstruktionen der molaren Region der Maxilla betrachtet.

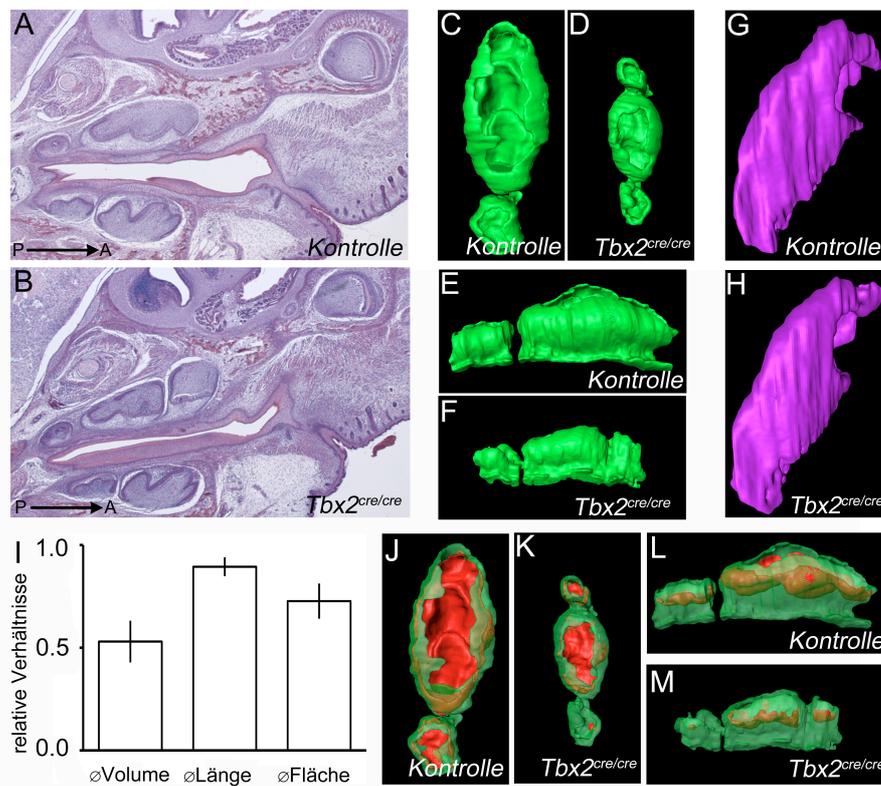


Abbildung 3.16. - Beschreibung des Phänotyps bei E18,5. (A,B) Sagittale Schnitte des Kopfes histologisch gefärbt (A) der Kontrolle und (B) des Wildtyps (C-F, J-M) 3D-Rekonstruktionen der Anlage der Molaren, dabei wurde das Epithel markiert und mittels dem Amira Programm rekonstruiert (C) dorsale Sicht auf die Rekonstruktion einer Kontrolle (D) eine Rekonstruktion einer Mutante; ventrale Sicht auf (E) Kontrollrekonstruktion (F) Rekonstruktion der Mutante; (G) Rekonstruktion der Schneidezähne einer Kontrolle (H) und eines Wildtypes (I) Darstellung der Größenunterschiede der molaren Region. Zur Darstellung wurde der Wert der Kontrolle=1 gesetzt und das relative Verhältnis zwischen Kontrolle und Mutante dargestellt [rel. Werte (wt wurde gleich 1 gesetzt, damit sind alleangaben relativ zu diesem zu sehen) : Volumen $0,53 \pm 0,1$; $p < 0,0005$; Länge $0,89 \pm 0,06$; $p = 0,02$; Fläche $0,72 \pm 0,09$ $p < 0,0005$] (J-M) Rekonstruktion des Epithels auf Gewebeschnitten, welche zuvor einer RNA *in situ* Hybridisierung gegen *Shh* unterzogen wurden. *Shh* ist ein Marker des Schmelzknotens, und dient zur Unterscheidung einzelner Zahnanlagen (J) dorsale Sicht auf die Zahnanlage der Kontrolle, (K) auf die der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante. (L) Ventrale Sicht auf die Zahnanlage der Kontrolle (M) und der Mutante.

In diesen Bildern ist ebenfalls die zusätzliche Struktur anterior vom ersten Molaren zu erkennen (Abb. 3.16. C,D). Wird diese Struktur aus apikaler Richtung betrachtet, wird sichtbar, dass sie geformt ist wie eine Zahnanlage (Abb. 3.16. E,F). Die Größenunterschiede die in den Molaren aufgefallen sind, sind nicht in den Schneidezähnen zu finden (Abb. 3.16. G,H).

Um die Größenunterschiede besser quantifizieren zu können, wurden von je 6 Kontrollen und *Tbx2* Mutanten 3D Rekonstruktionen des gesamten Oberkieferbereichs angefertigt. Anschließend wurde mittels des Programms Amira das Volumen bestimmt, um festzustellen ob es sich um eine statistisch nachweisbare Größenveränderung handelt. Wie in der Abbildung 3.16. I zu erkennen, ist das Volumen der Molare in den *Tbx2*-Mutanten um etwa 50% reduziert. Um zu analysieren ob es sich dabei um proportionale Unterschiede handelt oder die Region der Molaren unproportional kleiner ist, wurde mittels ImageJ die Länge der Molaren und des Oberkiefers (von Schneidezahn bis posteriores Ende des ersten Molar), sowie die Fläche des Molaren und zwischen den posterioren Enden der beiden ersten Molaren und den beiden Schneidezähnen in einem 2D-Bild bestimmt. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion der Größe, der Molaren in den *Tbx2*^{cre/cre} Embryonen im Vergleich zu Wildtype Embryonen, festgestellt werden. Es wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben, dass die Ausbildung eines extra Zahnes, dem sogenannten diastemalen Zahns, dazu führt, dass die Molaren eine kleinere Größe aufweisen als die Molaren in Kontrollwurfgeschwister (Klein et al., 2006). Um besser zu visualisieren, dass es sich um einen extra Zahn handelt, wurden *in situ* Hybridisierungen auf Gewebeschnitten für *Shh* in der gesamten molaren Anlage durchgeführt und diese anschließend rekonstruiert. *Shh* ist als Markergen für das Signalzentrum des sich entwickelnden Zahnes bekannt. Wie in Abb. 3.16. K-N zu erkennen, trifft dies auf die *Tbx2*^{cre/cre} Mutante zu. *Shh*, in den Abbildungen in rot dargestellt, bildet hier eine zusätzliche, isolierte Expressionsdomäne anterior zu der, die sich im ersten Molar befindet.

3.2.2 Analyse der Zelldifferenzierung

Ab E18,5 können die ersten Unterschiede in den Zelltypen festgestellt werden. Da die gezeigten Unterschiede auch auf einer nicht vorhandenen, unvollständigen bzw. falschen Zelldifferenzierung beruhen können. Aus diesem Grund wurden verschiedene bekannte Gene getestet, die bestimmte Zelltypen markieren.

Die Zahnpapilla ist die Region, in der auch *Tbx2* exprimiert ist, ebenso wie *Versican*, welches mesenchymale Zellen der Papilla in der Kontrolle und der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante ohne Unterschiede markiert (Abb. 3.17. B,C). Die Zellschicht der Odontoblasten ist direkt benachbart zu den Papillazellen gelegen und wird markiert durch *Axin2*, welches unverändert ist (Abb. 3.17. D,E). Die nächstgelegene Zellschicht ist das innere Schmelzepithelium und durch *P-Cadherin* gekennzeichnet, auch diese Schicht ist in der *Tbx2*-Mutante vorhanden (Abb. 3.17. F,G). Zusammen mit der Stratum Intermedium bilden diese drei Schichten ein dicht gepacktes Epithel und kann in dem Stadium nur durch die Expression der verschiedenen

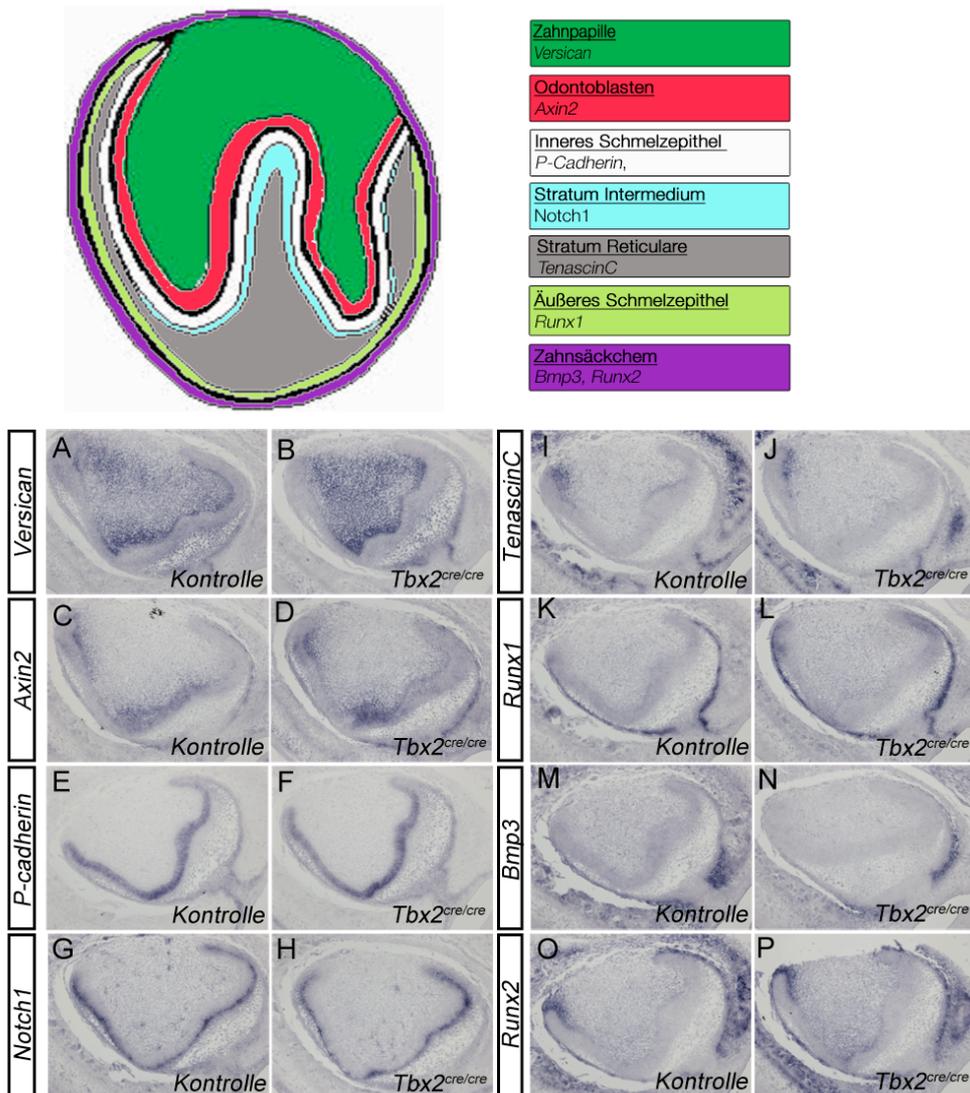


Abbildung 3.17. Analyse der Differenzierung mittels verschiedener Markierungsgene

(A) grafische Darstellung eines Querschnitts durch eine molare Zahnanlage zur Illustration der einzelnen Zellschichten (B-Q) RNA *in situ* auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes und damit Querschnitten durch die Region des Molaren. Auf der linken Seite ist für jedes Gen die Kontrolle zu erkennen und rechts daneben die entsprechende Mutante (B,C) *Versican*, (D,E) *Axin2*, (F,G) *P-Cadherin* (H,I) *Notch1* (J,K) *TenascinC* (L,M) *Runx1* (N,O) *Bmp3*, (P,Q) *Runx2*.

Markierungsgene unterschieden werden. *Notch1* kennzeichnet dabei die Schicht des Stratum Intermedium und ist sowohl in Kontroll- als auch in Mutantengewebeschnitten als schmale Linie entlang des gesamten Epithels exprimiert (Abb. 3.17. H,I). Das Innere des zukünftigen Zahnes bezeichnet man als Stratum reticulare (engl. Stellate Reticulum), welche durch *TenascinC* (*TnC*) markiert werden kann. In den vorliegenden Gewebeschnitten konnte *TnC* nicht detektiert werden, was auf ein sehr frühes Stadium in der Differenzierung zurückgeführt werden kann. Wodurch es möglich ist, dass *TnC* noch nicht exprimiert wird (Abb. 3.17. J,K). Die Schicht die nur die Zahnkrone selbst ummantelt, ist das äußere Schmelzepithelium, das durch *Runx1* markiert werden kann. Auch hier kann sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante die feine Expressionsdomäne, welche die Zahnkrone umrandet erkannt werden (Abb. 3.17. L,M). Dieses äußere Schmelzepithelium ist ebenfalls von einer dünnen Zellschicht umgeben, das Zahnsäckchen, welche die gesamte Zahnanlage umrandet. Diese kann man durch die Expression von *Bmp3* (Abb. 3.17. N,O) und *Runx2* (Abb. 3.17. P,Q) markieren und auch hier ist eine feine Linie an Expression rund um die Zahnanlage bei Kontroll- und Mutantenschnitten zu erkennen.

3.2.3 Größenunterschiede sind bereits bei E14,5 manifestiert

Um zu analysieren, zu welchem Zeitpunkt sich die Unterschiede in der embryonalen Zahnentwicklung manifestiert haben, wurden zwei frühere Stadien untersucht. Bei E15,5 und auch bei E14,5 kann man bereits in den histologischen Gewebeschnitten Unterschiede erkennen (Abb. 3.18. A,B). Während das molare Epithel im Wildtype sehr gleichmäßig von anterior nach posterior verläuft, kann während beider Embryonalstadien im anterioren Bereich des Molaren in der Mutante eine Verdickung erkannt werden. Um diese Verdickung genauer zu charakterisieren wurden auch hier 3D Rekonstruktionen angefertigt. Bei E15,5 wird deutlich, dass sich im anterioren Bereich der molaren Anlage ein weitere Zahnkrone ausgebildet hat. Auch bei E14,5 sind bereits leichte Unterschiede zu erkennen. Während in der lateralen Ansicht des Wildtyps die Zahnknospe sehr gleichmäßig verläuft, ist in der Rekonstruktion der mutanten Zahnanlage eine Art Buckel im anterioren Bereich zu erkennen. Auch die gesamte Struktur scheint sich zu unterscheiden, in der dorsalen Ansicht ist bei beiden Embryonalstadien zu erkennen, dass die Anlage der Molaren in der Mutante schmaler ist. Dieser Fakt konnte auch durch Volumenmessungen bestätigt werden, da weder die Länge noch die 2D-Fläche verändert

waren. Um zu zeigen, dass sich auch zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung bereits eine extra Zahnknospe gebildet hat, wurden wie bei E18,5 *in situ* Hybridisierungen für *Shh* durchgeführt. Bei E15,5 kann man ähnlich wie bei E18,5 innerhalb der zahnkronenförmigen Struktur eine extra *Shh* Expressionsdomäne erkennen.

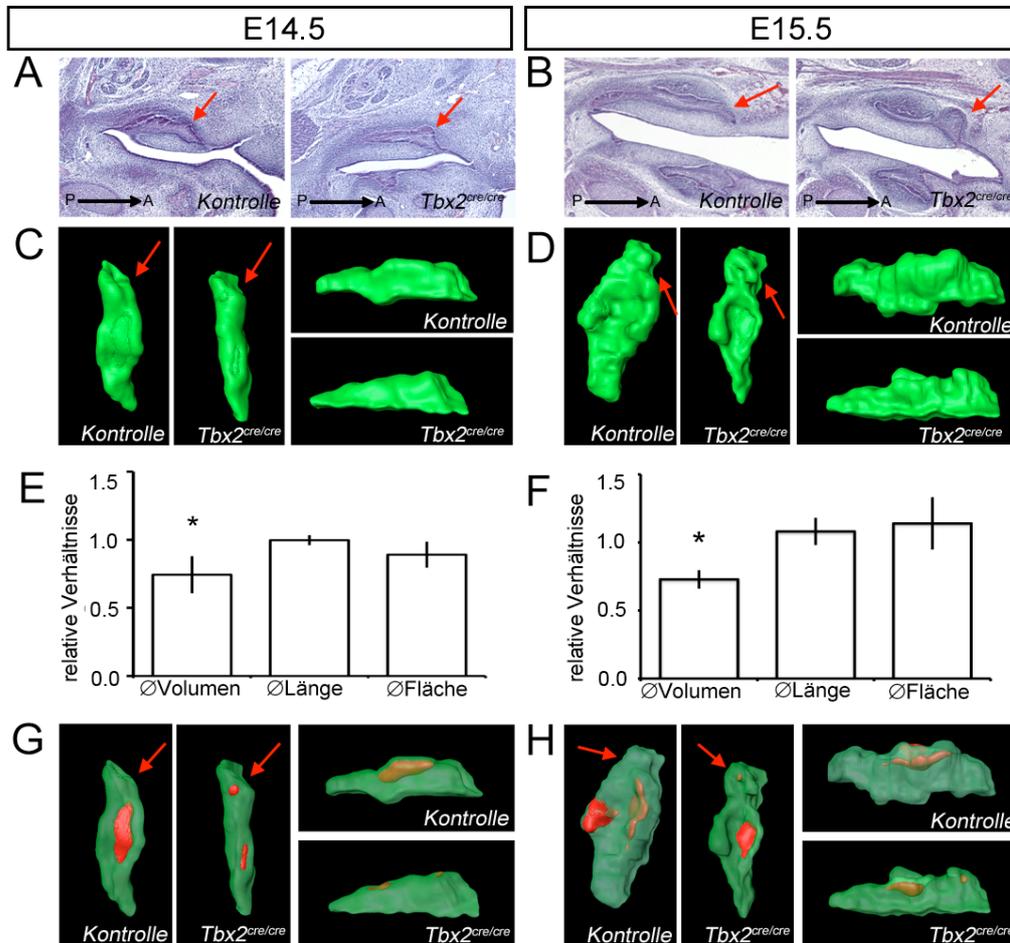


Abbildung 3.18. Analyse der früheren Stadien E14,5 und E15,5

Es wurden hier wie schon bei E18,5 histologische Färbungen von sagitalen Schnitten des Kopfes angefertigt, (A) zum Zeitpunkt E14,5 und (B) E15,5. (C,D) Zu den gleichen Zeitpunkten wurde mittels dem Programm Amira der Bereich der molaren Zahnanlage rekonstruiert. Auf der linken Seite ist dabei die dorsale Ansicht und auf der rechten Seiten die laterale Ansicht. (E,F) Da zu diesen Zeitpunkten weder Histologie noch Rekonstruktion markante Unterschiede aufwiesen, wurde auch hier eine statistische Analyse der relativen Volumen, Längen und Flächenverhältnisse durchgeführt [relative Werte: E14,5 Volumen: $0,74 \pm 0,13$ $p < 0,005$; Länge: $1,00 \pm 0,06$ $p = 0,76$; Fläche: $0,9 \pm 0,08$ $p = 0,91$; E15,5 Volumen: $0,73 \pm 0,06$ $p < 0,005$; Länge: $1,05 \pm 0,1$ $p = 0,68$; Fläche: $1,14 \pm 0,19$ $p = 0,12$]; Bei E18,5 konnte bereits ein extra Signalzentrum gesehen werden. Um den zu früheren Stadien nachzugehen wurden auch hier *Shh* Schnitt *in situ* rekonstruiert bei (G) E14,5; linke Seite mit dorsaler Ansicht, rechte Seite mit lateraler Ansicht (H) E15,5; linke Seite mit dorsaler Ansicht, rechte Seite mit lateraler Ansicht.

Ebenfalls ist zu diesem Zeitpunkt gut zu erkennen, dass die Expressionsdomäne im Molaren kleiner ist als in der Kontrolle. Etwas ähnliches ist auch bei E14,5 zu beobachten. Auch hier ist eine prominente extra Expressionsdomäne im anterioren Bereich der Zahnanlage, obgleich sich die Struktur selbst, noch nicht so stark vom ersten Molar abgetrennt hat wie bei E15,5. Ebenfalls ist der Unterschied in der *Shh* Expressionsdomäne des Molaren deutlich zu erkennen, wie in Abb. 3.18. G zu sehen ist, ist sie bereits bei E14,5 wesentlich kleiner als in der dazugehörigen Kontrolle.

3.2.4 Apoptose führt nicht zur Größenminderung des Molaren

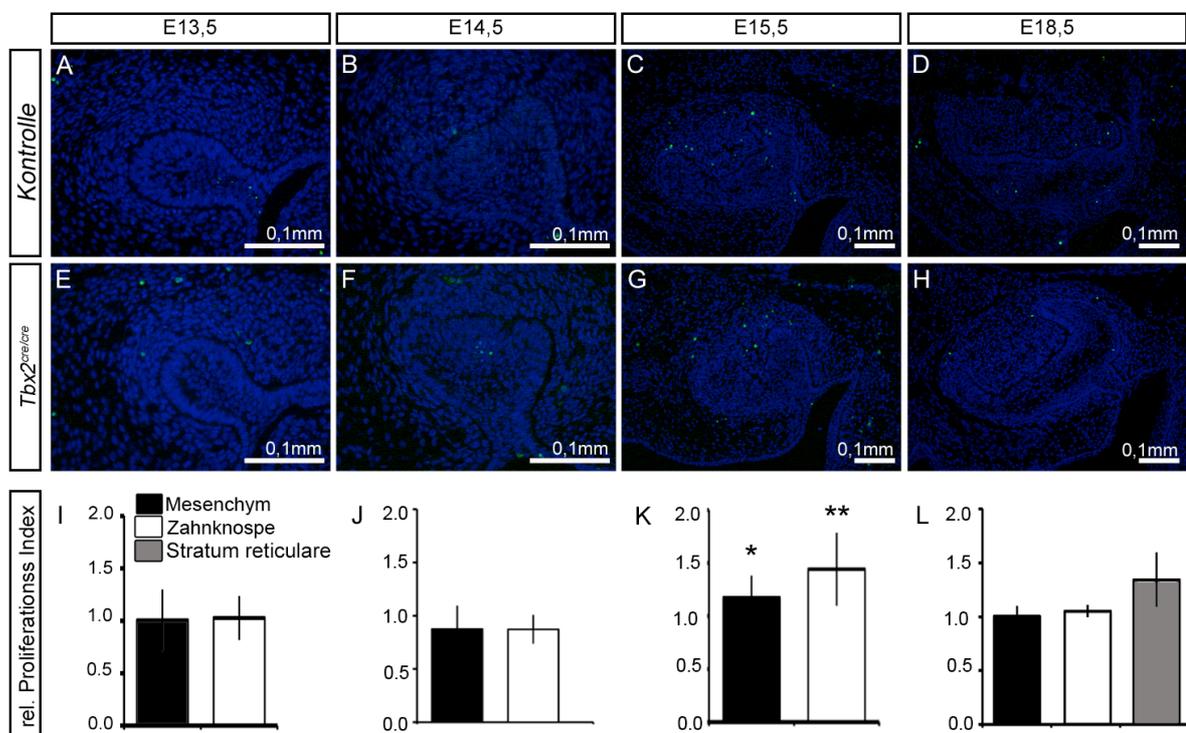


Abbildung 3.19. Analyse von Proliferation und Apoptose im Bereich des Molaren

(A-E) TUNEL Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. In den oberen Bildern (A-D) sind die Kontrollen abgebildet, direkt darunter (E-H) die entsprechenden Schnitte der *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten, Zeitpunkt wie oben in der Abbildung angegeben. (I-L) Untersuchung der Proliferationsindizes zwischen E13,5 und E18,5. Der Wert der Kontrolle wurde 1 gesetzt, so dass die angegebenen Werte relative Werte sind. Der schwarze Balken stellt die relative Proliferation im Mesenchym dar, der weiße die relative Proliferation in der Zahnknospe selbst. [Werte: E13,5 Mesenchym: $1,02 \pm 0,21$ $p=0,81$ Zahnknospe: $1,00 \pm 0,29$ $p=0,96$; E14,5 Mesenchym: $0,87 \pm 0,13$ $p=0,18$ Zahnknospe: $0,87 \pm 0,21$ $p=0,38$; E15,5 Mesenchym: $1,17 \pm 0,21$ $p<0,05$ Zahnknospe: $1,44 \pm 0,34$ $p<0,01$] (L) im Graphen für das Alter E18,5 wurde zusätzlich der relative Proliferationsindex im Stratum reticulare berechnet, dargestellt durch einen grauen Balken [Werte: Mesenchym $1,07 \pm 0,22$ $p=0,37$ Zahnknospe $1,11 \pm 0,59$ $p=0,61$ Stratum reticulare $1,28 \pm 0,63$ $p=17$]

Da sich die Unterschiede zwischen E14,5 und E18,5 sehr verstärkt haben und die molare Zahnanlage besonders betroffen ist, wurden zu diesen Zeitpunkten Apoptose und Proliferationsanalysen im Bereich des Molaren durchgeführt. Zwischen E13,5 und E14,5 ist zu erkennen, dass im Kontrollgewebeschnitt und dem Gewebeschnitt der Mutante etwa gleich wenig apoptotische Zellen vorhanden sind (Abb. 3.19. A,B,E,F). Am Tag E15,5 dagegen, ist in beiden Exemplaren, Kontrolle und *Tbx2^{cre/cre}*, ein deutlicher Anstieg der Apoptose im Vergleich zu früheren Stadien zu erkennen. Der Großteil der apoptotischen Zellen befindet sich dabei im Mesenchym rund um die Zahnkrone, doch auch hier ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen (Abb. 3.19. C,G). Zum Zeitpunkt E18,5 sind nur noch einzelne apoptotische Zellen zu finden, doch auch hier kann man keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante feststellen.

3.2.5 Die Expression von *Tbx3* ist erst ab E14,5 zu erkennen

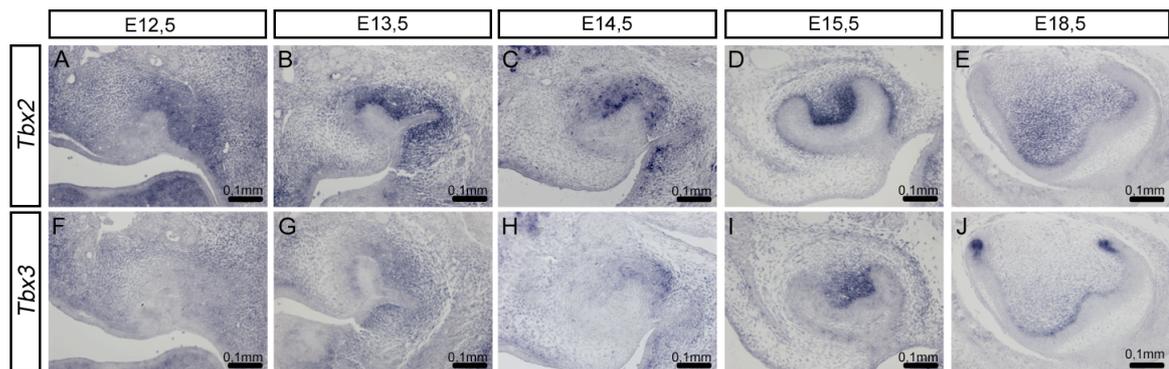


Abbildung 3.20. Expressionsanalyse von *Tbx2* und *Tbx3* im Molaren

RNA *in situ* Hybridisierungen auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes gegen (A-E) *Tbx2* und (F-J) *Tbx3* während der embryonalen Entwicklung des Zahnes zwischen E12,5 und E18,5

Es konnte mittels verschiedener Versuche bereits festgestellt werden, dass sich die Unterschiede in der Mutante bereits vor E14,5 manifestiert haben und sich danach nur noch verstärken. Bisher wurde davon ausgegangen, dass *Tbx2* der regulierende Faktor ist. Wie in der Expressionsanalyse zu erkennen, ist *Tbx2* während der gesamten Zahnentwicklung im lateralen Mesenchym benachbart zum Epithel der Zahnanlage exprimiert. Bei E12,5 und E13,5 wird deutlich, dass *Tbx2* komplett ausgeschlossen ist von dem sich verdickendem Epithel (Abb. 3.20. A,B). Wenn sich bei E14,5 bereits eine Zahnkappe gebildet hat, ist die laterale Expression von *Tbx2* noch immer zu erkennen, die nun aber den Kontakt zum oralen Mesenchym verloren hat (Abb. 3.20. C). Am Tag E15,5, wenn sich aus der Zahnkappe bereits die beginnende Kronenform bildet, ist zu erkennen,

dass die Expression jetzt innerhalb dieser Krone vorhanden ist. Und nur noch ein schmaler Expressionsstreifen direkt an der lateralen Seite der Zahnkrone zu erkennen ist (Abb. 3.20. D). Dieser ist bei E18,5 verschwunden und *Tbx2* ist nur noch im Mesenchym innerhalb der Zahnkrone exprimiert (Abb. 3.20. E).

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist *Tbx3* sehr häufig koexprimiert mit *Tbx2* und beide zeigen funktionelle Redundanz (Ribeiro et al., 2007; Jerome-Majewska et al., 2005, Zirzow et al., 2009; Lingbeek et al., 2002). Aus diesem Grund wurde zusätzlich auch eine Expressionsanalyse für *Tbx3* durchgeführt, dabei wurde festgestellt, dass beide Gene nicht von Beginn an ein gleichartiges Expressionsmuster haben. Bei E12,5 ist deutlich zu erkennen, dass *Tbx3* nicht im zum Zahnepithelium benachbartem Mesenchym exprimiert ist (Abb. 3.20. F), erst bei E13,5 sieht man eine leichte Expression von *Tbx3*, ähnlich wie *Tbx2* laterale zur Zahnknospe. Im Vergleich zu *Tbx2*, geht diese laterale Färbung aber nicht soweit zur medialen Seite wie die von *Tbx2*. Ein weiterer Unterschied zu diesem Zeitpunkt ist eine leichte Expression von *Tbx3* im medialen Epithel der Zahnkrone, die für *Tbx2* nicht gefunden werden konnte (Abb.3.20. G). Dieselbe Beobachtung ist auch bei E14,5 zu machen. Auch hier ist *Tbx3* an der lateralen Seite der Zahnkrone exprimiert und wie *Tbx2* hat die Expression keinen Kontakt mehr zum oralen Epithel, doch ist die Ausbreitung der *Tbx3* Expression in medialer Richtung nicht so stark wie die von *Tbx2* (Abb. 3.20. H). Auch bei E15,5 kann man Unterschiede feststellen, innerhalb der Zahnkrone ist *Tbx3* mit *Tbx2* koexprimiert, doch während *Tbx2* an der lateralen Seite des Zahnepithels eine schmaler Expression zeigt, fehlt diese bei *Tbx3* komplett (Abb. 3.20. I). Am stärksten machen sich die Unterschiede bei E18,5 bemerkbar, hier war *Tbx2* ausschließlich und gleichmäßig im Mesenchym innerhalb der Zahnkrone exprimiert. *Tbx3* hingegen ist zwar im Mesenchym exprimiert, dieses beschränkt sich aber auf die Zellen, die der epithelialen Schicht aus Odontoblasten, innerem Schmelzepithel und der Stratum intermedium besteht, am nächsten ist. Eine weitere Besonderheit in der *Tbx3* Expression ist in den epithelialen Spitzen der Zahnkrone erkennbar, hier ist *Tbx3* stark exprimiert im Gegensatz zu *Tbx2* welches keine Expression im Epithel zeigt.

3.2.6 Molekulare Unterschiede in der Entwicklung des Molaren

Da aufgrund der starken Größenunterschiede davon ausgegangen werden kann, dass es zu einem frühen Zeitpunkt während der Backenzahnentwicklung zu Unterschieden der

molekularen Kontrolle kommt, wurden unterschiedliche Signalwege getestet. Diese Signalwege wurden bereits beschrieben in die Zahnentwicklung involviert zu sein. Aus der Expressionsanalyse ist mittlerweile bekannt, dass *Tbx3* nach E13,5 mit *Tbx2* kooexprimiert ist und daher nach E13,5 die Funktion von *Tbx2* übernehmen könnten. Aus diesem Grund wurde die Markeranalyse bei E13,5 und E14,5 durchgeführt.

Der erste der getesteten Signalwege ist der Bmp-Signalweg, mit den Genen *Bmp2*, *Bmp4* und *Msx2*, sowie *Runx2*, welche beide in der Zahnentwicklung durch *Bmp*-Signale aktiviert werden. *Bmp2* kann bei E13,5 nicht detektiert werden, wird aber am Tag E14,5 im Schmelzknoten detektiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Mutanten festgestellt werden (Abb 3.21. A). Die Expression von *Bmp4* ist bereits bei E13,5 zu erkennen, es ist sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante im Mesenchym lateral zum Epithel der Zahnknospe, womit *Bmp4* mit *Tbx2* kooexprimiert ist. Bei E14,5 ist *Bmp4* ebenfalls im Mesenchym exprimiert, allerdings nicht mehr wie *Tbx2* auf der lateralen Seite der Zahnknospe, sondern in den Zellen, die benachbart sind zum Schmelzknoten, in dem *Bmp4* zusätzlich exprimiert wird.

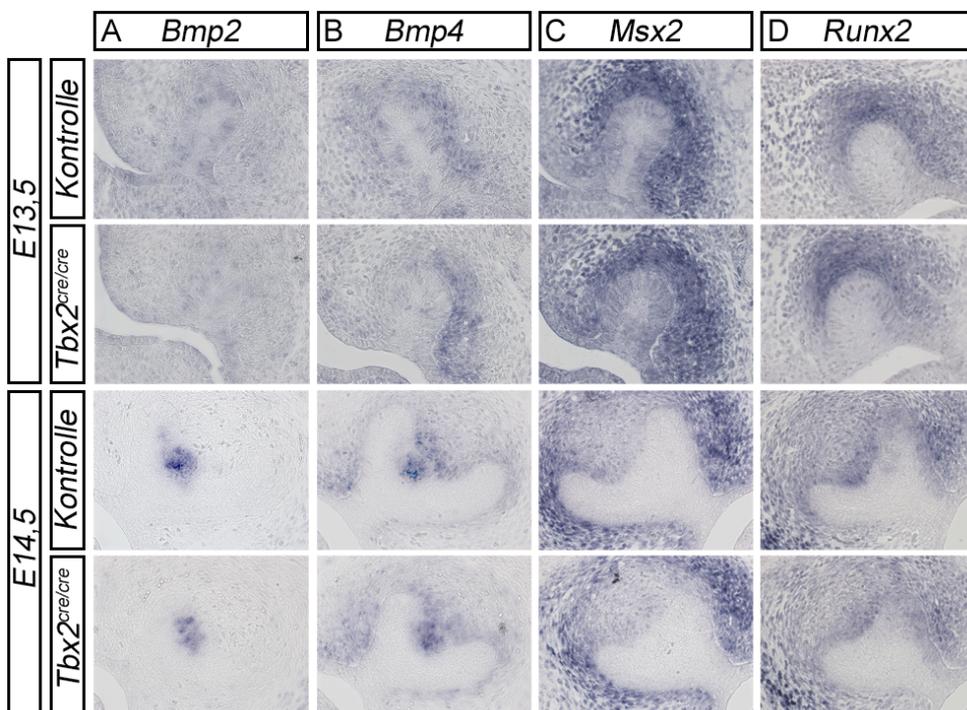


Abbildung 3.21. RNA *In situ* Hybridisierung für Mitglieder des Bmp-Signalweges

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E13,5 (obere Hälfte) und E14,5 (untere Hälfte). Es wurden jeweils mittlere Schnittebene der Region der Backenzahnanlage gewählt. (A) *Bmp2 in situ* Hybridisierung (B) *Bmp4 in situ* Hybridisierung (C) *Msx1 in situ* Hybridisierung (D) *Runx2 in situ* Hybridisierung

Auch zu diesem Zeitpunkt können keine Unterschiede zwischen Kontrollen und den Gewebeschnitten der Mutante festgestellt werden (Abb. 3.21. B). Um zu klären ob der Signalweg selbst durch die Missexpression von *Tbx2* gestört wird, wurden auch zwei Zielgene, und zwar *Msx2* und *Runx2* getestet. *Msx2* ist bei E13,5 im der Zahnknospe umliegendem Mesenchym exprimiert, wobei es eine stärker und etwas weitere Expressionsdomäne an der lateralen Seite zeigt. Um E14,5 ist *Msx2* ebenfalls im die Zahnknospe umliegendem Mesenchym exprimiert, allerdings ausschließlich an den lateralen Seiten und ist ausgeschlossen vom Mesenchym innerhalb der Zahnkappe (Abb. 3.21. C). *Runx2* das zweite Zielgen zeigt bei E13,5 eine ähnliche Expression wie *Tbx2* und *Bmp4*, auch dieses Gen ist um Mesenchym das lateral zu der Zahnknospe liegt exprimiert. Einen Tag später ist *Runx2* nur noch in einer kleineren Domäne lateral zu der Zahnkappe exprimiert und ebenfalls in einer kleinen Domäne im Mesenchym benachbart zu dem Schmelzknoten (Abb. 3.21. D). Weder *Msx2* noch *Runx2* zeigt Unterschiede in Intensität oder der Domäne der Expression zwischen Mutante und Kontrolle.

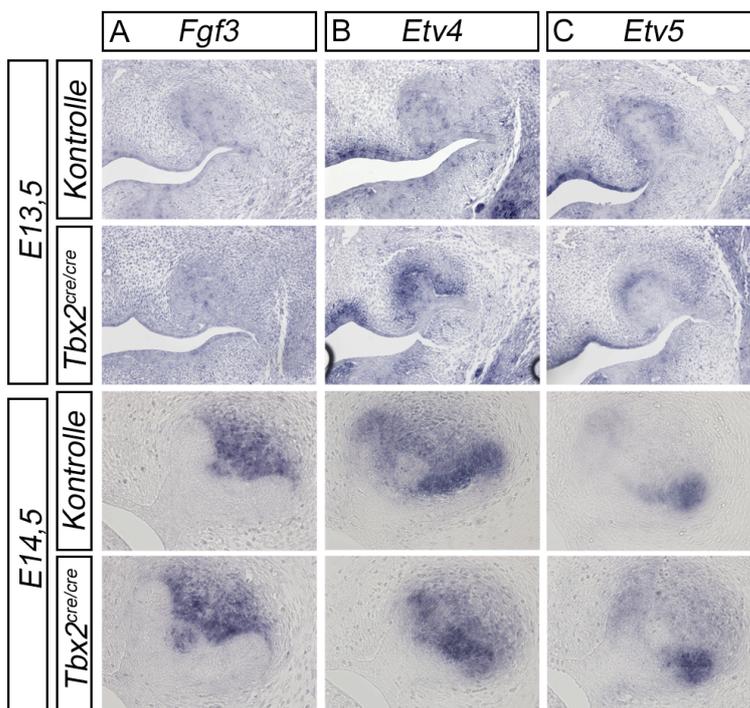


Abbildung 3.22. RNA *In situ* Hybridisierung für Mitglieder des Fgf-Signalweges

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten während der Embryonalstadien E13,5 (obere Hälfte) und E14,5 (untere Hälfte). Es wurden jeweils mittlere Schnittebenen der Region der Backenzahnanlage gewählt. (A) *Fgf3 in situ* Hybridisierung (B) *Etv4 in situ* Hybridisierung (C) *Etv5 in situ*.

Ein weiterer essentieller Signalweg während der Zahnbildung ist der Fgf-Signalweg. Aus diesem wurden *Fgf3* und zwei der Zielgene *Etv4* und *Etv5* getestet. *Fgf3* ist zum Zeitpunkt E13,5 weder in der Kontrolle noch in der Mutante detektierbar, wird dessen Expression am Tag E14,5 untersucht, kann deutlich die Expression im Schmelzknoten und auch im Mesenchym innerhalb der Zahnkappe, also benachbart zum Schmelzknoten in Kontrolle und Mutante erkannt werden (Abb. 3.22. A). *Etv4* ist bei E13,5 in der Kontrolle nicht detektierbar, allerdings zeigt die *Tbx2* Mutante hier eine deutliche Hochregulation im Mesenchym direkt benachbart zur Zahnknospe und eine kleine Expressionsdomäne in der dorsalen Zahnknospe, welche Zellen etwa dieselbe Position haben wie dem sich entwickelnden Schmelzknoten. Bei E14,5 ist dieser Unterschied nicht mehr feststellbar. Zu diesem Zeitpunkt ist *Etv4* im Mesenchym dorsal zur Zahnkappe und im anliegendem Epithel exprimiert, zeigt aber keinerlei Unterschiede im Vergleich zwischen Kontrollen und Mutanten (Abb. 3.22. B). Auch *Etv5*, das zweite getestete Zielgen des Fgf-Signalweges, zeigt bei E13,5 eine leichte Veränderung der Expression, während es im Wildtype sehr schwach rund um die Zahnknospe exprimiert ist, zeigt es in der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante eine stärkere Expression im Mesenchym dorsal zur Zahnknospe. Im Gegensatz zu *Etv4* kann für *Etv5* auch bei Tag 14,5 eine Veränderung der Expression festgestellt werden. In Gewebeschnitten der Kontrollen ist dieses Gen im dorsalen Epithel der Zahnkappe exprimiert, diese Expressionsdomäne lässt sich auch in der Mutante wiederfinden, hier zeigt sich allerdings noch zusätzliche Expression im Mesenchym, welches innerhalb der Zahnkappe liegt (Abb. 3.22. C).

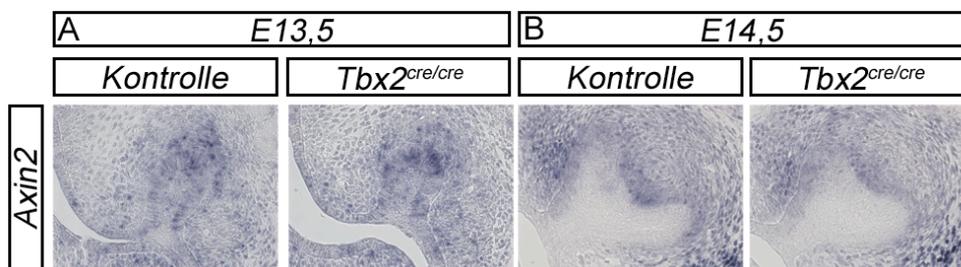


Abbildung 3.23. RNA *In situ* Hybridisierung für Axin2, als Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten gegen *Axin2* während der Embryonalstadien E13,5 und E14,5. Es wurden jeweils mittlere Schnittebenen die Region des Backenzahnanlage gewählt.

Der dritte wichtige Signalweg, welcher in diesem Zusammenhang getestet wurde, ist der Wnt-Signalweg. Aus diesem wurde nur das Zielgen *Axin2* getestet, dieses kann genutzt werden um zu testen ob der kanonische WNT-Signalweg aktiv ist. Zum Zeitpunkt E13,5

ist eine sehr schwache Expression sowohl in der Zahnknospe als auch im umliegenden Mesenchym zu erkennen. Am Tag 14,5 ist die Expression bereits etwas spezifischer, hier sind sie in den inneren epithelialen Zellen der Zahnkappe keine *Axin*-positiven Zellen erkennbar. In den äußeren epithelialen Zellen und auch im gesamten umliegenden Mesenchym ist es dagegen leicht exprimiert (Abb. 3.23).

3.2.7 Entwicklung des Diastemas

Da sich auch auf molekularer Ebene keine Unterschiede feststellen ließen, die zu diesem massiven Größenverlust des ersten Molaren in der Mutante führen, wäre eine weitere Möglichkeit, dass es aufgrund des extra Zahnes anterior des ersten Molaren (Abb. 3.15) zu einer Verkleinerung kommt. Es wurde bereits von Klein et al., in 2006 beschrieben, dass der erste Molar der Mutanten kleiner war als der der Kontrollmäuse. Auch haben Kavanagh et al., 2007 beschrieben, dass der erste Molar eine inhibitorische Wirkung auf den zweiten Molar ausübt. Etwas ähnlich könnte auch in Mutanten der Fall sein, die diesen extra Zahn ausbilden. Das sich ein extra Schmelzknoten entwickelt, konnte bereits bei E18,5 mittels der 3D-Rekonstruktionen der *Shh* Schnitt- *in situ* Hybridisierung festgestellt werden.

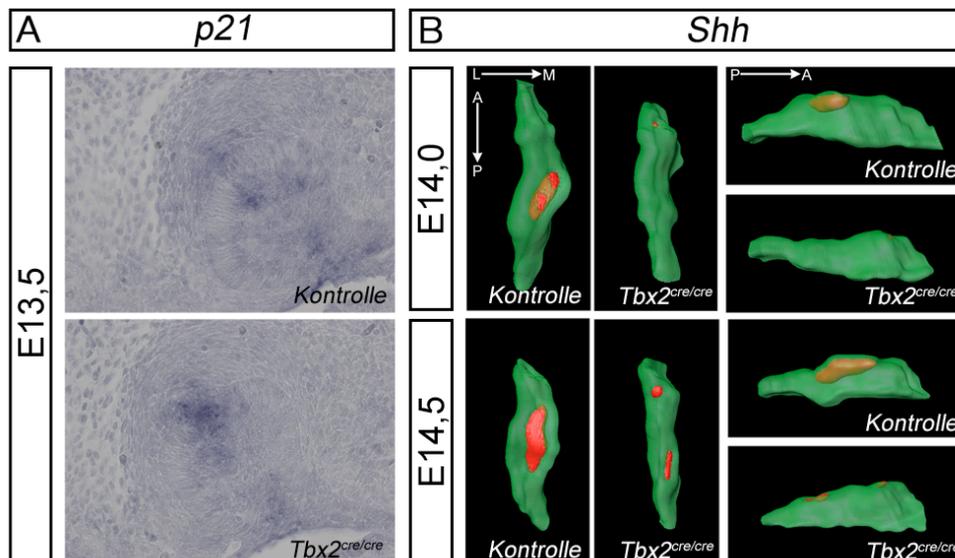


Abbildung 3.24. Analyse zur Ausbildung eines zusätzlichen Schmelzknotens

mittels (A) RNA *in situ* Hybridisierung gegen *p21* zum Zeitpunkt E13,5. Hier wurden frontalen Gewebeschnitte des Kopfes genutzt um einen Querschnitt durch die Zahnanlage zu erhalten und Rekonstruktionen von RNA *in situ* Hybridisierung gegen *Shh* bei E14,0 und E14,5. In den Rekonstruktionen ist *Shh* Expression in rot dargestellt, und das Epithel der Zahnanlage in grün. Auf der linken Seite sind jeweils dorsale Ansichten der Zahnanlage zu sehen, auf der rechten Seite laterale Ansichten.

Um dies genauer darzustellen, wurden die Entwicklung des Schmelzknotens mittels der Marker *p21* und *Shh* dargestellt. In Abbildung 3.24. A sind Gewebeschnitte zu sehen, aus dem Bereich, der als rudimentäre Zahnanlage bezeichnet wird und sich im Wildtyp nicht zu einem Zahn entwickelt. Auf diesen Gewebeschnitten wurde eine RNA *in situ* Hybridisierung gegen *p21*, einen frühen Marker für den Schmelzknoten, durchgeführt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wird *p21* in der Kontrolle nicht exprimiert, dagegen ist in dem Gewebeschnitt der Mutante deutlich eine Färbung an der Position des Schmelzknotens zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass sich in der Mutante bereits bei E13,5 ein Schmelzknoten gebildet hat. Um die weitere Entwicklung von diesem zu untersuchen, wurde ein weiterer Marker für diese Signalzentrum eingesetzt, *Shh*. Die RNA *in situ* Hybridisierungen gegen *Shh* wurden im gesamten Bereich der sich entwickelnden Molaren durchgeführt und die Schnitte anschließend mittels Amira als 3D Objekt rekonstruiert. In Abbildung 3.24. B kann man erkennen, dass sich im Wildtyp der Schmelzknoten (in Rot in der Abbildung) des Molaren bereits bei E14,0 gebildet hat. In der Mutante dagegen hat sich im Vergleich nur eine kleine Expressionsdomäne im anterioren Bereich der Zahnanlage gebildet. Erst einen halben Tag später kann auch in der Mutante die Ausbildung des Schmelzknotens des ersten Molar selbst erkannt werden, doch auch hier ist ein deutlich größer gewordenen Signalzentrum im anterioren Bereich der Zahnanlage sichtbar. Daraus lässt sich bereits schließen, dass sich anterior zum ersten Molar ein separater Zahn entwickeln wird, auf den die Größenunterschiede zurückgeführt werden können. Diese Untersuchung führt zu folgenden Fragestellung: Aus welchem Grund kommt es zu diesem extra Zahn, bzw. warum verschwindet er nicht, wie auch im Wildtyp?

3.2.8 Zelluläre Analyse der Region des Diastemas

Es ist bereits bekannt, dass in Wildtypen die Regression des rudimentären Zahnes unter anderem durch Apoptose stattfindet (Peterkova et al., 1996, 2000; Viriot et al., 2000) und das Vorhandensein dieses diastemalen Zahnes auf eine verringerte Apoptose und erhöhte Proliferation zurückzuführen ist (Peterkova et al., 2009). Aus diesem Grund wurde auch in der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante in dem Bereich, in welchem sich das Rudiment im Wildtyp zurückbildet eine Analyse der Apoptose und Proliferation durchgeführt (Abb. 3.25.).

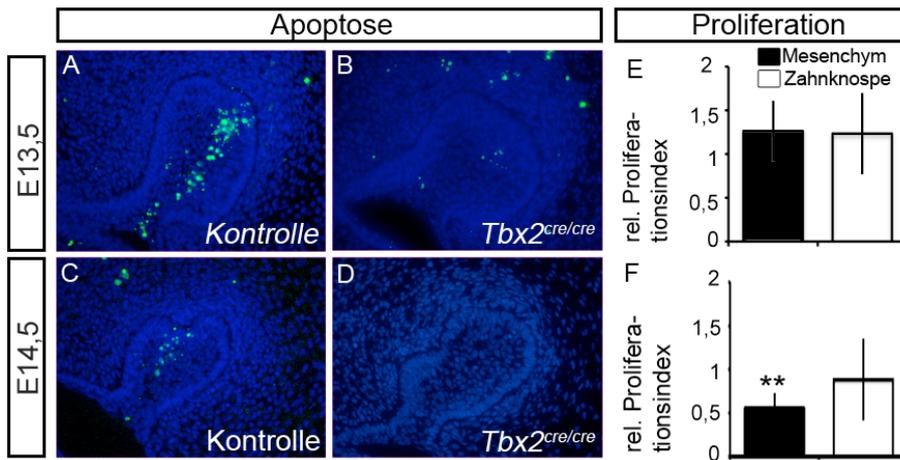


Abbildung 3.25. Analyse von Apoptose und Proliferation im Bereich des Diastemas

TUNEL Färbung zu den Zeitpunkten (A,B) 13,5 und (C,D) 14,5. (A,C) zeigen Beispiel für Kontrollen (B,D) Beispiel für Mutanten. (E) relativer Proliferationsindex bei E13,5 [Werte Mesenchym $1,26 \pm 0,34$ $p=0,14$; Zahnknospe $1,23 \pm 0,46$ $p=0,18$] (F) relativer Proliferationsindex bei E14,5 [Werte: Mesenchym $0,55 \pm 0,17$ $p < 0,005$; Zahnknospe $0,88 \pm 0,46$ $p=0,56$]. Bei E13,5 und E14,5 wurden die Werte der Kontrollen=1 gesetzt und die relative Proliferation in den Mutanten bestimmt. Der schwarze Balken stellt die relative Proliferation im Zahnmesenchym dar, der weiße Balken die in der Zahnknospe.

Wie in Abbildung 3.25. A-D zu erkennen ist das Innere der Zahnknospe in den Kontrollen bei E13,5 und bei E14,5 stark apoptotisch. Im Gegensatz dazu findet man in den Gewebeschnitten der Mutante keine bzw. nur vereinzelte apoptotische Zellen.

Allerdings sind die Daten aus der Proliferationsanalyse widersprüchlich zum Phänotyp, während bei 13,5 keinerlei Unterschiede in der Proliferation festgestellt werden konnten (Abb. 3.25. E). Wurde bei E14,5 sogar eine Verringerung der Proliferation um ca. 50% festgestellt (Abb. 3.25. F).

3.2.9 Molekulare Analyse

Die Analyse der Diastemaregion wurde bei E13,5 und E14,5 durchgeführt, da sich zwischen diesem Zeitpunkten das Zahnrudiment im Wildtyp zurückbildet, d.h. wenn es Veränderungen auf molekularer Ebene gibt, finden diese höchstwahrscheinlich innerhalb dieses Zeitfensters statt. Wie schon im Fall der Molaren wurde auch eine molekulare Analyse der diastemalen Region durchgeführt und verschiedene Signalwege getestet. Der erste aus dieser Reihe, ist der Bmp-Signalweg, woraus *Bmp4* und *Runx2* getestet wurden. *Bmp4* ist in Wildtypkontrollen im Mesenchym dorso-lateral zur Zahnknospe exprimiert. Am Tag E14,5 kann in den Kontrollgewebeschnitten noch immer die Expression im Mesenchym dorso-lateral, zu der sich nun zurückbildenden Zahnknospe erkannt werden. Diese Expression ist auch in den Mutante-Gewebeschnitten wiederzuerkennen, hier ist

allerdings aufgrund der bereits stattgefundenen morphologischen Veränderungen die Domäne in den Mutanten leicht vergrößert (Abb 3.26. A). *Runx2* ein Gen welches Bmp-Signale weiterleitet und mit dem Fgf-Signalweg verknüpft ist, ist ebenfalls ausschließlich im Mesenchym exprimiert, welches sich rund um die Zahnknospe befindet. Die Expression bei Tag E14,5 ist nicht mehr so großflächig, aber dennoch unverändert in der Mutante (Abb. 3.26. B).

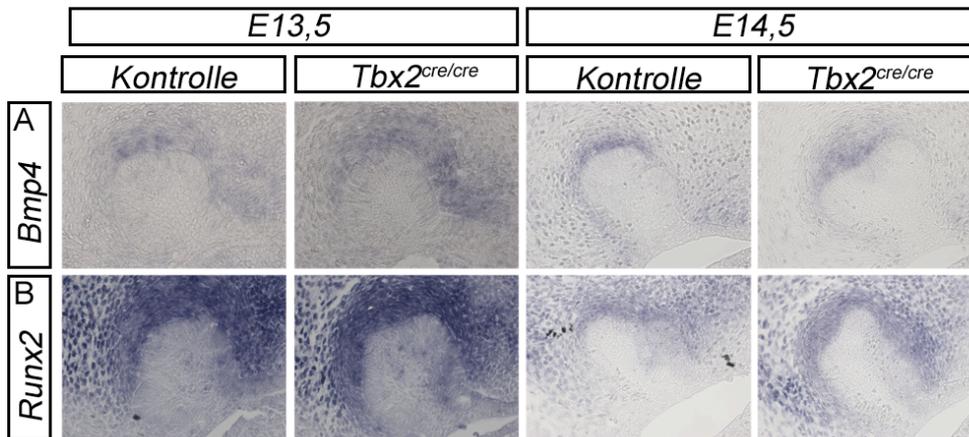


Abbildung 3.26. RNA *in situ* Hybridisierung für *Bmp4* und *Runx2* für die Region des Diastemas

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes von E13,5 und E14,5 Embryonen. Es wurden Schnitte aus dem anterioren Bereich der Molaren verwendet, welcher sich in den Kontrollen während dieser Zeit zurückbildet (A) *in situ* Hybridisierung gegen *Bmp4* (B) *in situ* Hybridisierung gegen *Runx2*.

Ebenfalls bei der molekularen Analyse der Diastemaregion wurde der FGF-Signalweg getestet. *Fgf3* kann man zum Zeitpunkt E13,5 in den Kontrollen nicht detektieren, in der Mutante allerdings ist *Fgf3* an der Position exprimiert wo sich der Schmelzknospe bilden wird und im umliegenden Mesenchym. Allerdings ist diese Expression am Tag E14,5 völlig verschwunden und es finden sich keine Unterschiede zwischen Wildtype und Mutante (Abb. 3.27. A). Anders verhält es sich mit den zwei Zielgenen. *Etv4* und *Etv5* kann man in den Kontrollschnitten nicht detektieren, dafür sind beide Gene im Zahnmesenchym der Mutanten stark aktiviert. Diese Hochregulation kann man im Gegensatz zu *Fgf3* auch bei E14,5 noch beobachtet werden. *Etv4* ist in dem Fall leicht im dorsalen Zahnmesenchym exprimiert, diese Expression erscheint verstärkt in der *Tbx2^{cre/cre}* Mutante, ist aber an der gleichen Position wie in der Kontrolle (Abb. 3.27. B). *Etv5* dagegen zeigt keine Expression in den Kontrollgewebeschnitten, dafür ist es aber in der Mutante im Mesenchym dorsal zur Zahnknospe exprimiert (Abb. 3.27. C).

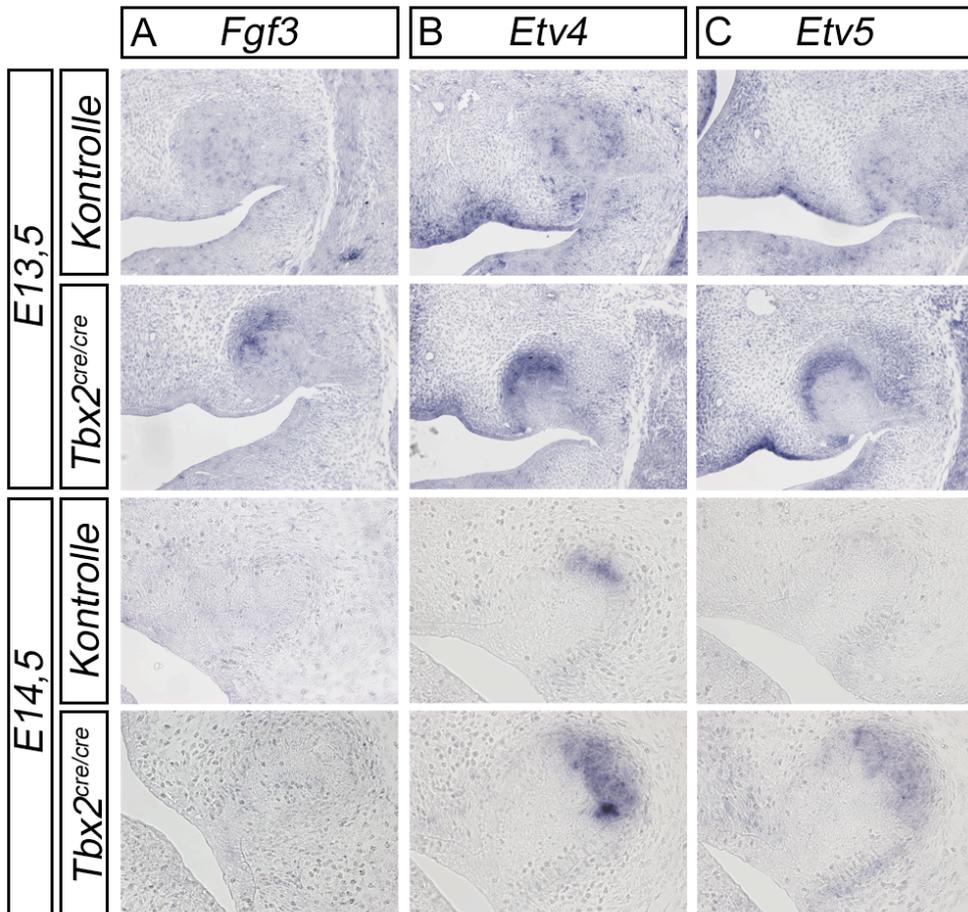


Abbildung 3.27. RNA *in situ* Hybridisierung für Gene des *Fgf*-Signalweges in der Region des Diastemas

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes von E13,5 (in der oberen Hälfte) und E14,5 (untere Hälfte) Embryonen. Es wurden Schnitte aus dem anterioren Bereich der Molaren verwendet, welcher sich in den Kontrollen während dieser Zeit zurückbildet (A) *in situ* Hybridisierung gegen *Fgf3* (B) *in situ* Hybridisierung gegen *Etv4* (C) *in situ* Hybridisierung gegen *Etv5*.

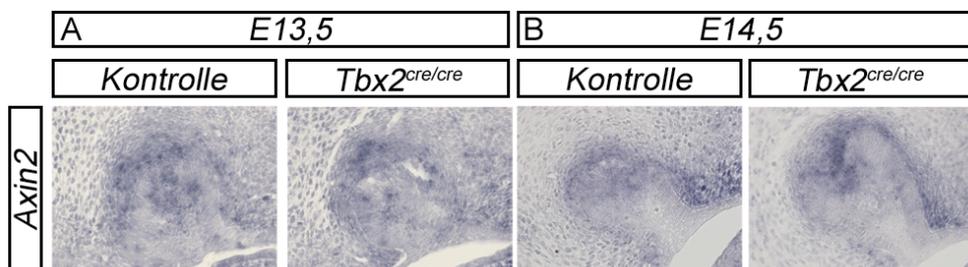


Abbildung 3.28. RNA *in situ* Hybridisierung für Axin2 ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges in der Region des Diastemas

RNA *in situ* Hybridisierung auf frontalen Gewebeschnitten des Kopfes von (A) E13,5 und (B) E14,5 Embryonen. Es wurden Schnitte aus dem anterioren Bereich der Molaren verwendet, welcher sich in den Kontrollen während dieser Zeit zurückbildet.

Da auch wie schon in der Entwicklung der Molaren der Wnt-Signalweg eine Rolle spielt, wurde auch für die Region des Rudiments *Axin2* untersucht. Zum Zeitpunkt E13,5 ist *Axin2* schwach im Mesenchym dorsal zur Zahnknospe und in der Zahnknospe selbst exprimiert. Am Embryonaltag E14,5 ist diese Expression etwas stärker und sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp im Mesenchym begrenzt auf das eng zur Zahnknospe benachbarte Mesenchym und auch in der Zahnknospe selbst, insbesondere an der Position des Schmelzknotens (Abb. 3.28.).

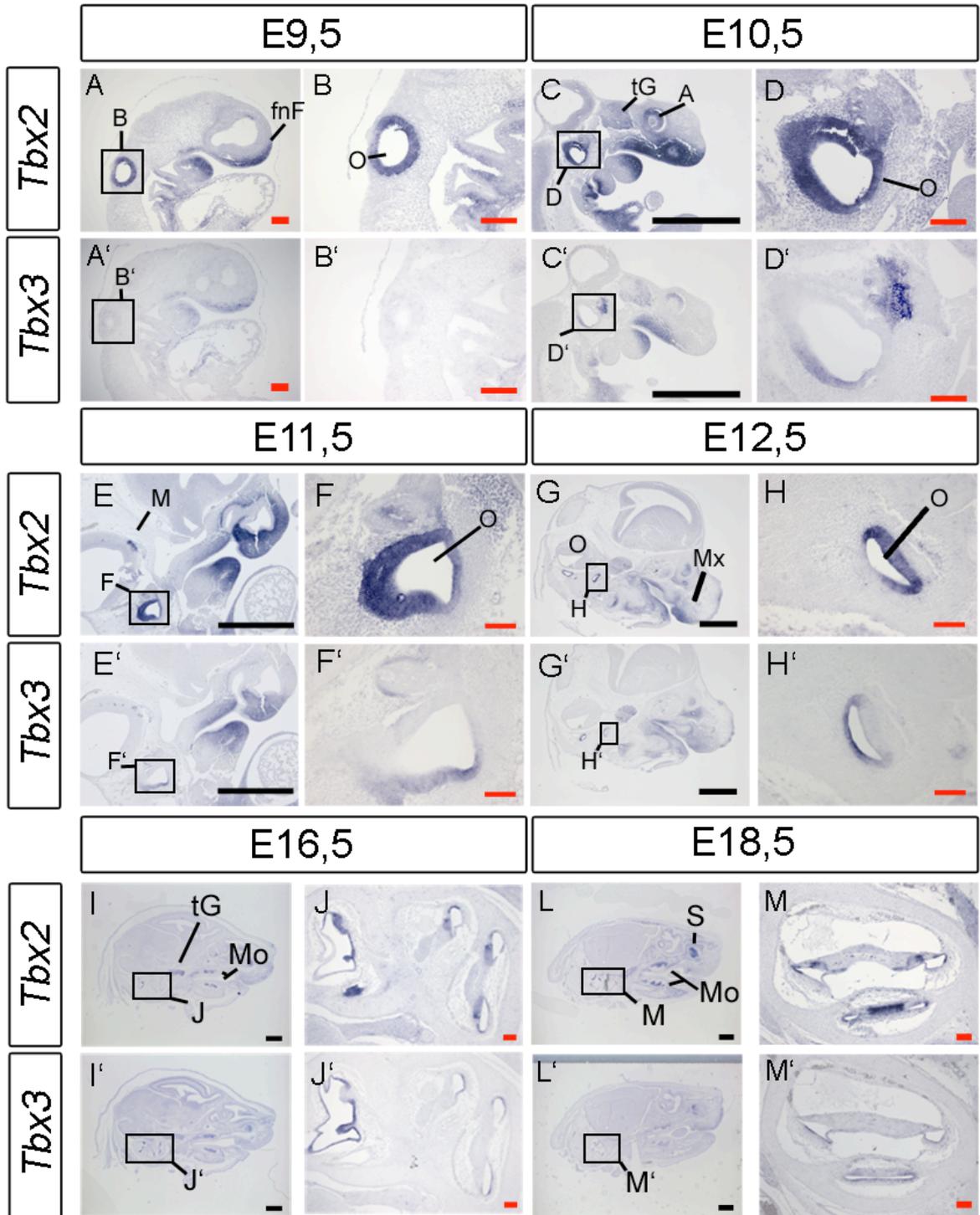
3.3 Analyse der *Tbx2* und *Tbx3* Expression im kraniofazialen Bereich

3.3.1 *Tbx2* und *Tbx3* sind exprimiert in der Anlage des Innenohres

In der otischen Plakode kann der Expression von *Tbx2* bereits bei Tag 9,5 beobachtet werden, während *Tbx3* zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert wird (Abb. 3.29. A,B, A',B'). Ab dem Emybronaltag 10,5 zeigen beide Gene Expressionsdomänen im Mesenchym der otischen Plakode. *Tbx2* zeigt hier wie auch schon zum Tag E9,5 eine Expression im gesamten Epithel der Plakode (Abb. 3.29. D). Die *Tbx3* Expression dagegen ist auf ventralen Bereich und das vestibulo-cochleäre Ganglion beschränkt (Abb. 3.29. D'). Diese ventrale Expression von *Tbx3* wird im Laufe der Entwicklung beibehalten (Abb. F',H',J',M). *Tbx2*, welches bisher im gesamten Epithel der otischen Plakode exprimiert war, zeigt ab E11,5 ebenfalls eine Regionalisierung seiner Expression. Bei E11,5 ist *Tbx2* im frontalen Bereich der Plakode nur noch schwach exprimiert (Abb. 3.29. F) und ab E12,5 kann man erkennen das es gegensätzlich zu *Tbx3* expimiert wird (Abb. 29. H,J,M).

Abbildung 3.29. Expression von *Tbx2* und *Tbx3* in der otischen Plakode

(A-M,A'-M') *In situ* Hybridisierung auf sagitalen Gewebenschnitten bei (A,B,A',B') E9,5 mit (B,B') als Ausschnittvergrößerungen des im Übersichtsbild gekennzeichneten Bereiches; (C,D,C',D') E10,5 mit (D,D') als Ausschnittsvergrößerungen, (E,F,E';F') E11,5 mit (F,F') als Ausschnittsvergrößerungen, (G,H,G',H') E12,5 mit (H,H') als Ausschnittsvergrößerungen (I,J,I',J') E16,5 mit (J,J') als Ausschnittsvergrößerungen, (L,M,L',M') E18,5 mit (M,M') als Ausschnittsvergrößerungen. (schwarzer Balken am unteren Bildrand entspricht 1mm, roter Balken entspricht 0,1mm) *Abkürzungen*: O-otische Plakode, Mx-Maxilla, fnF frontonasaler Fortsatz, Mo-Molar; S-Schneidezahn,



3.3.2 Die Expression von *Tbx2* und *Tbx3* im trigeminalen Ganglion und Metenzephalon

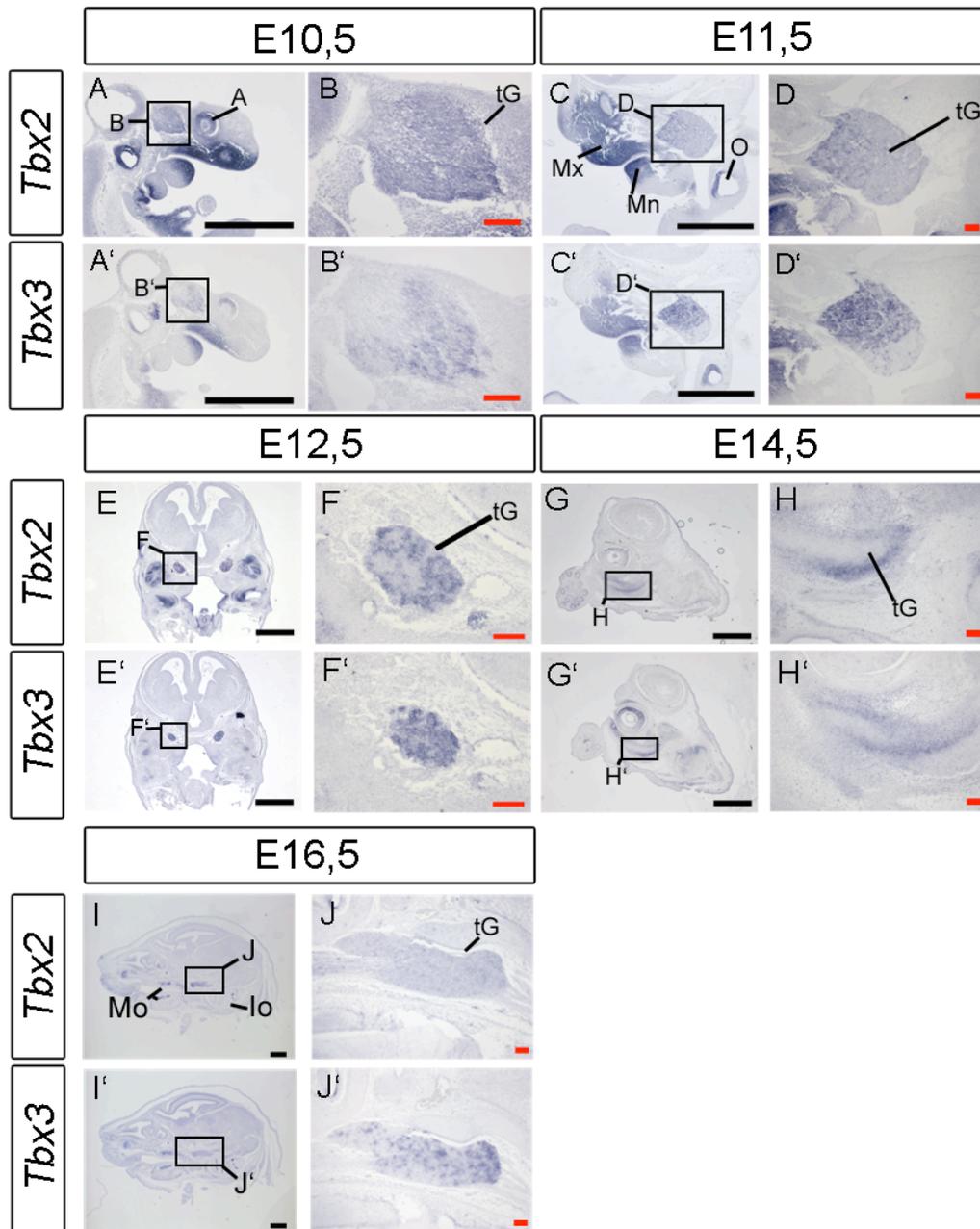


Abbildung 3.30. Expression von *Tbx2* und *Tbx3* während der Entwicklung des trigeminalen Ganglion

(A-J, A'-J') *In situ* Hybridisierung auf Gewebenschnitten bei (A,B,A',B') sagitaler Schnitt auf E10,5 Embryonen mit (B,B') als Ausschnittsvergrößerungen des im Übersichtsbild gekennzeichneten Bereiches; (C,D,C',D') sagitaler Schnitt auf E11,5 Embryonen mit (D,D') als Ausschnittsvergrößerungen, (E,F,E',F') frontaler Schnitt auf E12,5 Embryonen mit (F,F') als Ausschnittsvergrößerungen, (G,H,G',H') sagitaler Schnitt auf E14,5 Embryonen mit (H,H') als Ausschnittsvergrößerungen (I,J,I',J') sagitaler Schnitt auf E16,5 Embryonen mit (J,J') als Ausschnittsvergrößerungen, (schwarzer Balken am unteren Bildrand entspricht 1mm, roter Balken entspricht 0,1mm) *Abkürzungen*: A-Auge O-otische Plakode, Mx-Maxilla, Mn-Mandibula, tG-trigeminales Ganglion, Mo-Molar; Io-Innenohr.

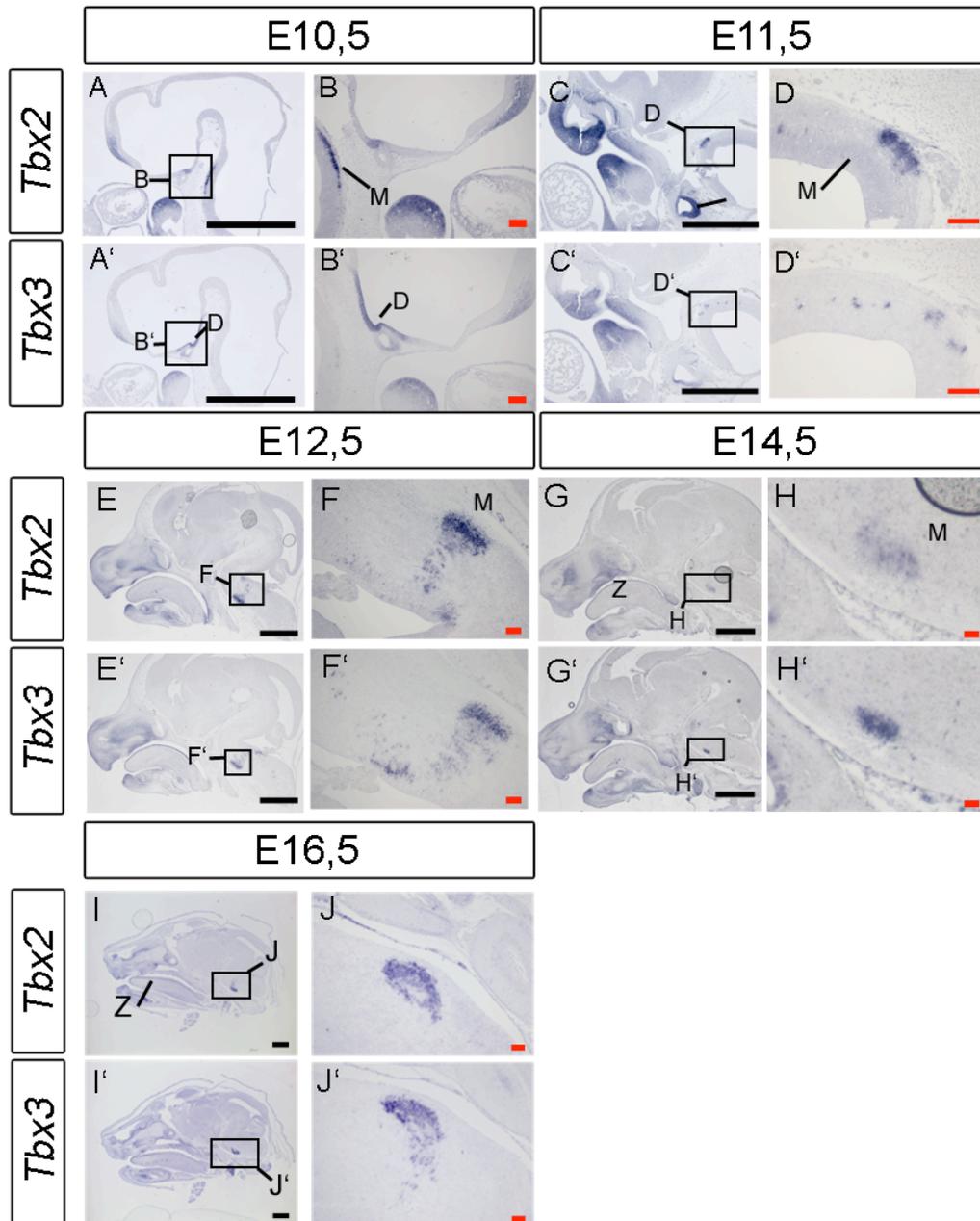


Abbildung 3.31. Expression von *Tbx2* und *Tbx3* während der Entwicklung des Methenzephalon

(A-J,A'-J') *In situ* Hybridisierung auf sagitalen Gewebenschnitten bei (A,B,A',B') von E10,5 Embryonen mit (B,B') als Ausschnittvergrößerungen des im Übersichtsbild gekennzeichneten Bereiches; (C,D,C',D') von E11,5 Embryonen mit (D,D') als Ausschnittvergrößerungen, (E,F,E',F') von E12,5 Embryonen mit (F,F') als Ausschnittvergrößerungen, (G,H,G',H') von E14,5 Embryonen mit (H,H') als Ausschnittvergrößerungen (I,J,I',J') von E16,5 Embryonen mit (J,J') als Ausschnittvergrößerungen, (schwarzer Balken am unteren Bildrand entspricht 1mm, roter Balken entspricht 0,1mm) *Abkürzungen*: Z-Zunge, M-Metenzephalon, D-Diencephalon.

Ab E10,5 werden 2 weitere Expressionsdomänen sichtbar, diese befinden sich im trigeminalen Ganglion und im Metenzephalon. *Tbx2* ist bei E10,5 im gesamten trigeminalen Ganglion exprimiert, mit einer stärkeren Expression im frontalen Bereich

(Abb. 3.30. A,B). Diese Expression hält sich bis E14,5 aufrecht. Ähnlich dazu die Expression von *Tbx3*, auch hier kann bereits bei Tag 10,5 die Expression im frontalen Bereich des trigeminalen Ganglions erkannt werden, welche sich wie *Tbx2* auch zu späteren Zeitpunkten finden lässt. Im Unterschied zu *Tbx2* ist *Tbx3* am Embryonaltag 16,5 noch exprimiert.

Eine weitere Expressionsdomäne, die im Bereich der Nerven- und Gehirnzellen gefunden wurde, befindet sich im Metenzephalon. *Tbx2* ist der Region bereits am Tag 10,5 zu erkennen (Abb. 3.31. A,B). Diese Region befindet sich kaudal zum Pontine Flexure, der Biegung des zentralen Nervensystems, zwischen Metenzephalon und Myelencephalon. Diese Expression von *Tbx2* wird bis E16,5 aufrechterhalten. (Abb. 3.31. C-J). *Tbx3* kann am Tag 10,5 noch nicht detektiert werden (Abb. 3.31. A',B'). Am Embryonaltag 11,5 ist die erste leichte Expression erkennbar, allerdings ist sie nur schwer einer Domäne zuzuordnen, da sie ein „Salz-und-Pfeffer“ Muster hat. D.h. ist sind nur einzelne verstreute Expressionen zu erkennen, die nicht zusammenhängend sind (Abb. 3.31. C',D'). Ab E12,5 bis E16,5 ist dann das selbe Muster wie für *Tbx2* zu erkennen, *Tbx3* ist in einer zum Pontine Flexure kaudal gelegenden Region exprimiert.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist in 3 unterschiedliche Teile gegliedert. Zum Einen befasst sie sich mit den Expressionsdomänen der beiden T-Box Faktoren *Tbx2* und *Tbx3*. Aufgrund dieser Daten wurden zwei noch nicht untersuchte Expressionsdomänen genauer analysiert. Die eine Domäne, der sekundäre Gaumen, ist notwendig um die Nasenhöhle von der Mundhöhle zu trennen, und damit das Säugetier an sich, zu einem Säugetier zu machen. Die zweite der Expressionsdomänen befindet sich im Mesenchym der Backenzähne. Hier konnte mit Hilfe der *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten gezeigt werden, dass es zur Ausbildung eines extra Zahnes anterior zum ersten Molar kommt. Die frühe Anlage dieses Zahnes kann man auch in Wildtypen finden, doch bildet sie sich hier zurück. Da dies in den Mutanten nicht der Fall ist kann es bei Weitererforschung des unterliegenden Netzwerkes als Modell zur Regeneration von Zähnen benutzt werden.

4.1 *Tbx2* während der Gaumentwicklung

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde die Rolle von *Tbx2* und *Tbx3* in der Gaumentwicklung analysiert. Beide Gene zeigen im Laufe der Entwicklung eine spezifische Expression im Mesenchym des Gaumenfortsatzes. Durch Analyse von Verlustmutanten konnte festgestellt werden, dass der Verlust von *Tbx2*, der Verlust von *Tbx3* und auch der Verlust von je einem Allel *Tbx2* und *Tbx3* zur Ausbildung einer Gaumenspalte führt. Auf zellulärer Ebene führt der Verlust von *Tbx2* zu erhöhter Apoptose und veränderter Proliferation, während man auf molekularer Ebene eine erhöhte Expression von *Bmp4* und *CyclinD1* erkennen kann. Einer der ersten Schritte in der Analyse der *Tbx2^{cre/cre}* Mutanten war es einzuordnen, in welchem der 3 Hauptschritte der Gaumentwicklung es eine Rolle spielt. Dabei konnte nach einer morphologischen und histologischen Analyse der einzelnen Entwicklungsschritte der Prozess der Fusion durch den Verlust von *Tbx2*, nicht beeinträchtigt werden. Ebenfalls konnte ausgeschlossen werden, dass der Prozess der Anhebung durch den Verlust von *Tbx2* nicht stattfinden kann, obwohl dieser in den Mutanten etwa einen halben Tag später stattfindet.

Daraus ließ sich schließen, dass der Effekt, den der Verlust von *Tbx2* verursacht, relativ früh in der Entwicklung des Gaumens stattfinden muss. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass insbesondere Apoptose von dem Verlust von *Tbx2* betroffen ist. Doch auch eine veränderte Proliferation scheint ein Effekt des *Tbx2*-Verlustes zu sein. Dies deutet darauf hin, dass

Tbx2 eine Rolle beim Aufrechterhalten der Zellzahl spielt. Bereits die einfache Veränderung der Zellzahl führt im Laufe der Entwicklung zu dem drastischen Phänotyp der Gaumenspalte. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch für *EphB2* und *EphB3* Doppelmutanten beschrieben (Orioli et al., 1996; Risley et al., 2009). Auch diese zeigen eine verringerte Größe der Gaumenfortsätze, wodurch sie zum entsprechenden Zeitpunkt aufgrund ihrer Entfernung nicht fusionieren konnten. Wie auch die *Tbx2*-Mutante, konnten auch bei der *EphB2/EphB3* Doppelmutante die Fortsätze in Zellkulturversuchen grundsätzlich fusionieren. Allerdings verhält es sich in *EphB2*^{-/-}, *EphB3*^{-/-} Embryonen auf zellulärem Level anders als in der *Tbx2*-Mutante. Die Gruppe um Risley et al., konnte keine Veränderungen der Apoptose feststellen und führen den Phänotyp auf einer reduzierte Zellproliferation zurück. Dies erklärt, warum keine Veränderungen in der Expression der beiden Gene in der *Tbx2* Mutante festzustellen waren.

Da in der *EphB2/EphB3* Doppelmutante der Phänotyp nur eine Penetranz von 50% hat, kann die Größe der Gaumenfortsätze allein nicht Ursache für die Ausbildung einer Gaumenspalte sein. Auch die verspätete Entwicklung der Gaumenfortsätze ist wohl einer der Gründe dafür. Da insbesondere in dieser Entwicklungsphase der Kopf rasant an Größe gewinnt, kann schon eine leichte Verspätung in der Entwicklung dazu führen, dass die Gaumenfortsätze sich nicht schließen. In Verbindung mit dem Kopf wird man auch darauf aufmerksam, dass beide T-box Faktoren nicht nur im Gaumen exprimiert sind sondern auch in anderen Bereichen des Kopfes exprimiert sind und die Gaumenentwicklung dabei nur ein Teil eines komplexen Netzwerkes von Wachstumsvorgängen ist. Kommt es nun in einem der anderen Wachstumsprozesse zu Fehlern, so kann sich das auch auf die Entwicklung des Gaumens auswirken (Chai und Maxson, 2006). Allerdings sind bei morphologischen und histologischen Untersuchungen der *Tbx2* Verlustmutante keine Veränderungen aufgefallen, die darauf hinweisen würden, dass ein anderer Prozess die Gaumenspalte verursacht.

Wie bereits in der Einleitung und in anderen Veröffentlichungen beschrieben, ist die Entwicklung des Gaumens auf molekularer Ebene aus einem komplizierten Netzwerk aufgebaut. Dazu gehören die Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym mittels verschiedenster Signalwege (Gritli-Linde, 2007). Die Expression von *Tbx2* und *Tbx3* ist im Mesenchym lokalisiert, wodurch auch ihre primäre Funktion auf das Mesenchym beschränkt ist. Insbesondere *Tbx3* wurde bereits auf seine Rolle während der Gaumenentwicklung untersucht. In einer Studie konnte mittels eines Organkultursystems gezeigt werden, dass *Tbx3* durch *Bmp4* induziert wird und *Tbx3* wiederum auf *Bmp4*

inhibierend wirkt (Lee et al., 2007). Ein ähnliches Ergebnis konnte in den vorliegenden Experimenten erzielt werden. Hier kann man in der *Tbx2^{cre/cre}* Situation eine Hochregulation von *Bmp4* beobachten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass *Tbx2* und *Tbx3* zum Einen redundante Funktionen haben und da *Tbx3* in dem Gewebe selbst durch *Bmp4* reguliert wird, dass beide Gene in einer Rückkopplungsschleife mit *Bmp4* interagieren. Das weder *Msx1* auf RNA Level noch die Antikörperfärbung gegen die phosphorylierten Formen der Smad 1, 5 und 8 eine Veränderung zeigen deutet darauf hin, dass ein alternativer dem Bmp-Signalweg nachgelagerter Signalweg verändert ist. Dies könnte unter anderem der p38 MAPK Signalweg sein (Xu et al., 2008). Ein weiteres Resultat, welches die Theorie einer Zusammenarbeit von *Tbx2/3* mit *Bmp4* unterstützt, ist die erhöhte Apoptose. Es wurde auch für erhöhte Level von *Bmp4* bereits beschrieben, dass diese zu einer erhöhten Apoptoserate in anderen Organsystemen führen (Kiyono und Shibuya, 2006; Koide et al., 2009; Lagna et al., 2006) wie beispielsweise im Mesenchym der Maxilla (Mukhopadhyay et al., 2006).

Von *Tbx2* und *Tbx3* ist bereits bekannt, dass sie innerhalb des Zellzyklus als Regulatoren dienen. Bereits die Wirkung auf *Bmp4*, welches selbst ein wirksames Mitogen ist (Hilliard et al., 2005; Zhang et al., 2002), unterstützt die Vermutung, dass dies auch hier der Fall ist. Zusätzlich zu der reprimierenden Wirkung von *Tbx2* und *Tbx3* auf *Bmp4*, hat zumindest *Tbx2* eine ähnliche Wirkung auf *CyclinD1*. *CyclinD1* kontrolliert als Untereinheit von des CDK4/6 Kinase Komplexes den Übergang von der G1 in die S-Phase. Die Hochregulation dieses Zellzyklusregulators in der *Tbx2*-Mutante passt zwar zusammen mit der erhöhten Proliferationsrate, ist jedoch nur schwer mit dem Phänotyp der Gaumenspalte übereins zu bringen. Eine Möglichkeit dies zu erklären wäre, dass es aufgrund der stark erhöhten Apoptose zu einer starken Verminderung von Zellen kommt und die erhöhte Proliferation eine Art Ausgleichsmechanismus ist um dem entgegen zu wirken. Allerdings spricht z.B. die Untersuchung der *Fgf10* Mutante dagegen. Hier verstärkten sich beide Vorgänge noch anstatt einander entgegenzuwirken. In der *Fgf10* Mutante kommt es ebenfalls zu einem vermehrten Zelltod und zusätzlich dazu noch zu einer verminderten Proliferationsrate (Rice et al., 2004). Auch in Überexpressionstudien mit *Tbx3* wurde beschrieben, dass dies zu einer erhöhten Proliferation führt (Lee et al., 2007). Hingegen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, bei der die *Tbx2^{cre/cre}* Mutante ebenfalls eine erhöhte Proliferationsrate aufweist stehen im Widerspruch dazu. Betrachtet man aber die Aktivierung von *Bmp4*, welches im Fall von *Tbx2* wahrscheinlich auch Smad-unabhängig agiert, kann man trotz der erhöhten Apoptose führt, die erhöhten Level von *CyclinD1* und damit auch die höhere

Proliferationsrate zumindest hypothetisch erklären. So könnten die erhöhten Level von *Bmp4* zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von p38 führen (Xu et al., 2008), welches selbst zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Cappellini et al., 2005). Auch wurde für p38 bereits beschrieben, dass es CyclinD1 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zur Ubiquitinylierung und damit Degradierung von CyclinD1 (Casanovas et al., 2000). Allerdings ist für p38 ebenfalls beschrieben, dass es einen anti-apoptischen Effekt hat (Cappellini et al., 2005). Um zu prüfen inwiefern p38 involviert ist, wäre es notwendig zu untersuchen ob es überhaupt zur Phosphorylierung von p38 kommt, was durch eine Antikörperfärbung erreicht werden könnte. Ist p38 involviert muss festgestellt werden ob es einen positiven oder negativen Effekt auf die mesenchymalen Zellen des Gaumens hat. Dafür kann in Organkulturen zum einen mit dem p38 Inhibitor (SB203580) gearbeitet werden, welcher lokal appliziert wird. Diese Kulturen werden anschließend auf Apoptose, Proliferation und *CyclinD1* RNA untersucht. Ähnlich könnte man die Aktivierung von p38 durch lokale Applikation von rekombinantem *Bmp4* in Organkulturen testen. Wobei anschließend ebenfalls Apoptose, Proliferation und *CyclinD1* RNA Level getestet werden. Zusätzlich dazu ist es notwendig, die Phosphorylierung von p38 zu testen, ob dieses ebenfalls induziert worden ist.

4.2 Der Einfluss von Tbx2 in der Zahnentwicklung

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wird der Einfluss von *Tbx2* auf die Zahnentwicklung untersucht. Dabei wurden zunächst 2 unterschiedliche Phänotypen unterteilt, zum Einen ist die gesamte Region des ersten Backenzahnes signifikant kleiner. Diese Größenunterschiede konnten bereits zu einem relativ frühen Stadium der Zahnentwicklung festgestellt werden. Zum anderen bildet sich im anterioren Bereich bzw. anterior von dem ersten Backenzahn eine Struktur heraus, die ein eigenes Signalzentrum besitzt und damit als diastemaler Zahn bezeichnet werden kann.

Als Erstes wurde hier der Größenunterschied untersucht. Dabei bestand die Möglichkeit, dass sich die Größenunterschiede auf Fehler in der Differenzierung zurückführen lassen. Allerdings zeigte keiner der getesteten Differenzierungsmarker eine Veränderung in der Mutante. Um nun festzustellen wie früh sich dieser Größenunterschied in der Entwicklung der Molaren manifestiert, wurden ähnliche Experimente bei E14,5 und E15,5 gemacht. Bei diesen Stadien war nur noch eine Veränderung im Volumen der Zahnanlage zu beobachten, während die Längen und Flächenverhältnisse keine signifikanten

Veränderungen aufwiesen. Um dem genauer auf den Grund zu gehen wurden Apoptose, Proliferation und verschiedene molekulare Marker getestet, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Zahnentwicklung spielen. Mittels TUNEL Experiment konnten keine Unterschiede gefunden werden. Allerdings zeigte die Analyse der Zellproliferation eine signifikante Erhöhung beim Stadium E15,5. Dies könnte aufgrund von erhöhten Fgf-Signalen sein (Kettunen et al., 2000), Diese sind bereits um E13,5 und E14,5 zu erkennen, so dass auch zu diesen Zeitpunkten Proliferation bereits verstärkt sein müsste. In der Expressionsanalyse wurden allerdings nur *Fgf3* und 2 Zielgene des Fgf-Signalweges getestet. Dies könnte auf unterschiedliche Regulation von *Fgf3* und *Fgf10* zurückgeführt werden. *Fgf3* ist im Zahnmesenchym mit *Fgf10* koexprimiert und verschiedenste Studien ließen vermuten, dass beide auch redundante Funktion in der Kontrolle der epithelialen Zahnmorphogenese zeigen, da Mutanten für jeweils eines der beiden Gene nur sehr milde bzw. keinen Phänotyp in der Zahnregion zeigen (Bei und Mass, 1998, Harada et al., 2002; Kettunen et al., 1998; Mansour et al., 1993). Obwohl *Fgf3* und *Fgf10* koexprimiert sind, muss *Fgf10* nicht durch *Tbx2* induzierbar sein. Denn trotz gemeinsamer Expression und wahrscheinlich redundanter Funktion werden beide Gene auf unterschiedliche Weise reguliert (Kettunen et al., 2000). So ist es möglich, dass die Proliferation während einzelner Entwicklungsstufen unterschiedlich reguliert wird. Ob der FGF-Signalweg insgesamt eine höhere Aktivität zeigt, müsste mittels der Phosphorylierung der ERK-Kinase untersucht werden.

Ein weiterer Spieler, der bei E14,5 in dem Bereich exprimiert ist, ist *Tbx3*. Es könnte ab dem Zeitpunkt zu dieser unterschiedlichen Regulation beitragen. *Tbx2* ist bereits von Beginn bei E12,5 an im lateralen Zahnmesenchym exprimiert und behält diese Expression auch weitgehend bei, bis E15,5 es zum Großteil im Mesenchym innerhalb der Zahnkrone exprimiert ist. Die Expression von *Tbx3* ist im Vergleich zu der von *Tbx2* erst ab E14,5 zu erkennen, wobei sie aber nur sehr schwach ist. Bei E15,5 ist diese um einiges verstärkt und kann ebenfalls zur Proliferation beitragen. Da wie oben beschrieben *Tbx3* als Zellzyklusregulator auch einen positiven Effekt auf die Zellproliferation hat (Davenport et al., 2003; Lee et al., 2006).

4.3 Das diastemale Zahn ist verantwortlich für die Größenreduktion

Aufgrund der bisher diskutierten Daten kann nicht erklärt werden, wie es nun zu dieser drastischen Größenveränderung der molaren Region kommt. Allerdings besteht der

Zahnphänotyp der *Tbx2*^{cre/cre} Mutante aus zwei verschiedenen Teilen, Teil eins ist der eben beschriebene Größenunterschied des Molaren. Teil zwei ist die extra Struktur anterior vom ersten Molar. Für diesen Phänotyp gibt es wenige weitere beschriebene Mutanten und drei von ihnen wurden gründlicher charakterisiert. Das wären zum Einen die *Spry2*-Verlustmutante (Klein et al., 2006, Peterkova et al., 2009), die *Lrp4*-Verlustmutante (Ohazama et al., 2008) und im Zusammenhang mit dieser die *Wise*-Verlustmutante (Ahn et al., 2010).

Für *Wise*- und *Spry2* -Verlustmutanten wurden ebenfalls eine Größenreduktion der molaren Region beschrieben. Dies kann auf zwei unterschiedliche Vorgänge zurückgeführt werden. Zum Einen ist bekannt, dass die Zahnanlage von anterior nach posterior eine reprimierende Wirkung auf die nächste posteriore Anlage haben (Kavanagh et al., 2007, wodurch der sich nun nicht zurückbildende Zahn eine repressorische Wirkung auf den ersten Molar ausübt. Ein weiterer Grund, ist das Schicksal dieses rudimentären Zahnes. Im Wildtyp entwickelt sich dieser Zahn nicht nur durch Apoptose zurück, wie bereits sehr früh beschrieben (Peterkova et al., 2003), sondern die Reste dieser Anlage fusionieren mit dem ersten Molar (Prochazka et al., 2010).

4.4 Der Verlust von *Tbx2* verhindert die Regression eines rudimentären Zahnes

Ursprünglich konnte man in allen Spezies eine komplette Zahnreihe vorfinden. Während verschiedener evolutionsbiologischer Schritte kam es häufig zu einer Veränderung der Anzahl der Zähne, die meist in einer Verminderung dieser endete. In der Maus gibt es daher in jedem Quadranten nur noch einen Schneidezahn und 3 Backenzähne. Zwischen diesen zwei Zahnarten befindet sich in der Maus eine Lücke. In dieser Lücke werden im anterioren Anteil keinerlei Zahnanlagen gebildet. Während im posterioren Part in der frühen Zahnentwicklung noch immer rudimentäre Anlagen gebildet werden, die sich aber im Laufe der Embryonalentwicklung zurückbilden. Diese Zurückbildung besteht wie oben beschrieben aus zwei verschiedenen Mechanismen der Apoptose (Peterkova et al., 2003) und der Fusion mit dem ersten Molar (Prochazka et al., 2010).

Dass in der *Tbx2*^{cre/cre} Mutante ein separater Zahn ausgebildet wird, kann man in sagitalen Gewebeschnitten und in 3D Rekonstruktion der molaren Anlage erkennen. Bereits zu sehr frühen Zeitpunkten ist es möglich zu erkennen, dass sich ein extra Zahn herausbilden wird. Da jeder Zahn ein eigenes Signalzentrum, den Schmelzknoten hat, war es möglich diesen

bereits bei E13,5 zu visualisieren. Während im Wildtyp in der Region des Diastemas keinerlei Färbung für den Schmelzknoten ausgemacht werden kann, sieht man diesen in den Mutanten deutlich. Auch entwickelt sich das Signalzentrum des diastemalen Zahnes in den Mutanten früher als der Schmelzknoten in den Molaren.

Dass das Hauptsignal zur Regression des rudimentären Zahnes aus dem Mesenchym stammt, ist bereits untersucht worden. Durch Gewebekombinationsexperimente konnten Yuan et al., 2008 zeigen, dass das Mesenchym aus der Region des Wildtyp Diastemas kein odontogenes Potential hat, während Mesenchym welches aus der Region der Molaren stammt, die Zahnknospe zum Weiterentwickeln anregt.

Die Proliferation in Epithel und Mesenchym des Diastemas zeigt bei E13,5 keine Veränderungen, während sie zum Zeitpunkt E14,5 eine signifikante Reduktion zeigt. Dies kann man damit erklären, dass sich im Wildtyp der Zahn bereits weitgehend zurückgebildet hat und eventuell bereits die Fusion mit dem ersten Molar eingeht. Daher ist es zu diesem Zeitpunkt bereits schwierig, die Region des rudimentären Zahnes von dem des Molaren zu unterscheiden. Die Apoptose dagegen ist dem Phänotyp entsprechend stark vermindert. Dies kann man sowohl zum Zeitpunkt E13,5, als auch bei E14,5 beobachten. Sie ist damit wahrscheinlich der Hauptgrund der zur Ausbildung des extra Zahnes führt. Die zweite in der Literatur beschriebene Ursache, die Fusion der rudimentären Zahnknospe mit dem ersten Molar konnte nicht untersucht werden.

Ebenso deutliche Unterschiede erkennt man in den molekularen Signalwegen. So sind Signale, die im Molaren für den Übergang vom Knospen- zum Kappenstadium benötigt werden, im Wildtyp inaktiv. So konnten bei Wildtypembryonen des Stadiums E13,5 und E14,5 keine Expression von *Fgf3* und Fgf-Zielgenen detektiert werden. Werden entsprechende Stadien der *Tbx2* Mutanten betrachtet, wird deutlich, dass der Fgf-Signalweg in den Mutanten aktiviert ist. Man erkennt, dass *Fgf3* und beide Zielgene *Etv4* und *Etv5* im Stadium E13,5 aktiviert sind. Auch während sich die Kappenform bereits zu bilden begonnen hat sieht man deutlich, dass der Fgf-Signalweg in der *Tbx2* Mutante aktiv ist, während im Wildtyp keine Expression erkennbar ist. Die Ergebnisse ähneln sehr den Ergebnissen, die mit den *Spry2* und *Spry4* Mutanten erzielt worden sind (Klein et al., 2006). Auch hier wurde festgestellt, dass der Verlust eines dieser Gene zu einer ektopischen Expression von *Fgf3* führt. *Fgf3* ist daraufhin in der Lage *Shh* zu aktivieren. Die Aktivierung von *Shh* führt zum Ausführen einer ganzen Kaskade, die zur Ausbildung des Zahnes führt. Auch das *Tbx2* und *Spry4* koexprimiert sind spricht für die Hypothese, dass beide eine ähnliche Funktion übernehmen. Um sich genauer anzuschauen in welchem

Zusammenhang diese Gene stehen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So z.B. die Expression von *Spry2* und *Spry4* in der *Tbx2* Mutante. Ebenfalls interessant zu untersuchen wäre ob der *Tbx2* Phänotyp durch Ausschalten oder Herunterregulieren der Fgf-Rezeptoren ebenso gerettet werden kann, wie der Phänotyp der *Spry2* Mutanten.

In *Wise* Mutanten dagegen konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp hauptsächlich durch die Deregulation des Wnt-Signalweges verursacht wurde. Dies konnte in der *Tbx2*-Mutante durch normale Expression des Wnt-Signalweges ausgeschlossen werden.

Die bisher erlangten Daten mit der *Tbx2* Verlustmutante, haben gezeigt, dass der Verlust von *Tbx2* zum Bilden einer Vorwärtsschleife führt (Abb. 4.1.). Diese ist ähnlich der Schleife im Molaren und der, die in der *Spry4* Mutante gebildet wird.

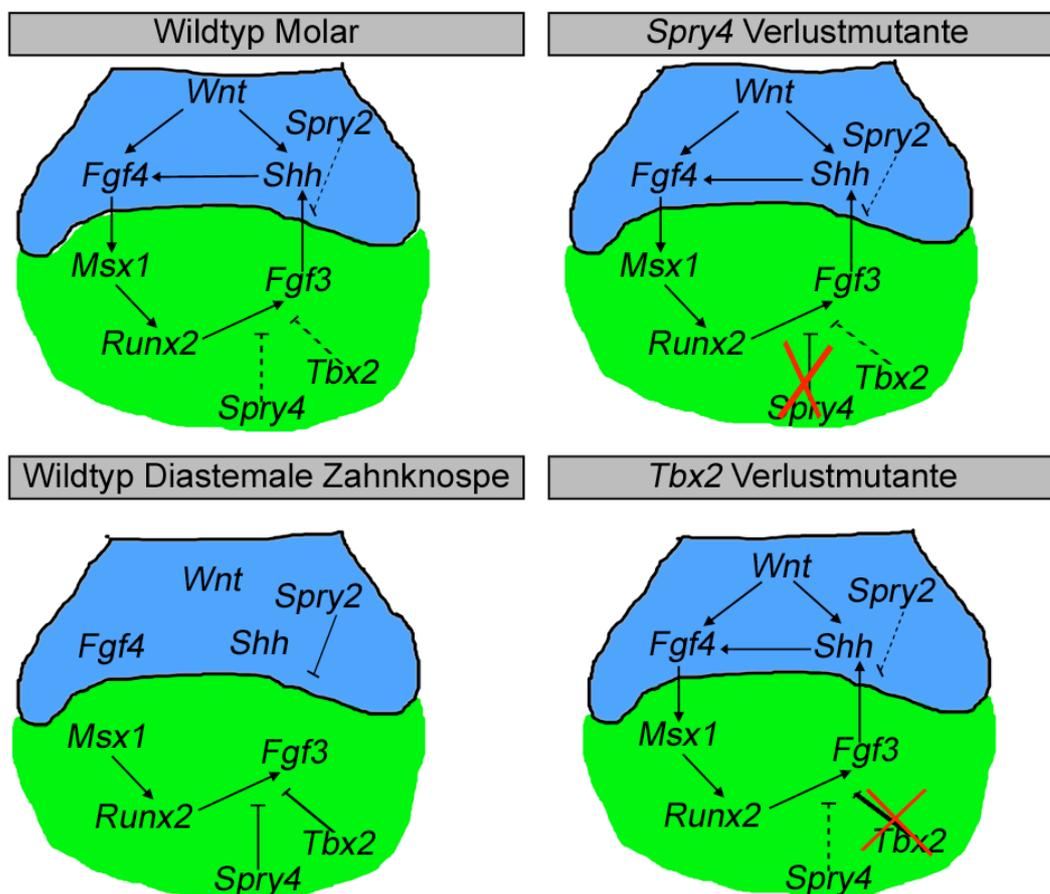


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der molekularen Netzwerke innerhalb der Zahnknospe

(A) Darstellung innerhalb der Zahnknospe (B) Darstellung des molekularen Zusammenhänge innerhalb der diastemalen Zahnknospe des Wildtypes (C) Molekulare Zusammenhänge innerhalb der diastemalen Zahnknospe in der *Spry4*-Verlustmutante (D) molekularen Zusammenhänge innerhalb der diastemalen Zahnknospe der *Tbx2* Verlustmutante. Die Pfeile zeigen einen induzierenden Effekt, \dashv zeigt einen inhibitorischen Effekt

4.5 Koexpression von *Tbx2* und *Tbx3* in verschiedenen kraniofazialen Strukturen

Als einen Teil dieser Doktorarbeit wurde die Expression von *Tbx2* und *Tbx3* während der embryonalen Entwicklung des Kraniofazialbereiches untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sie sich häufig im selben Organ bzw. dessen Anlage zu finden sind.

Eine der hier beschriebenen Domänen ist die Anlage des Innenohres. Hier konnte *Tbx2* bereits sehr früh bei E9,5 in der otischen Plakode festgestellt werden, erst bei E10,5 wurde auch *Tbx3* detektiert. Diese Expression wurde auch für andere Modellorgansimen bereits beschrieben, so z.B. für Zebrafisch (Ruvinsky et al., 2000) und *Xenopus* (Hayata et al., 1999) und Hühnchen (Gibson-Brown, 1998b).

Eine weitere Expressionsdomäne, die eine ähnlich starke Konservierung aufweist ist das trigeminale Ganglion, welches die Teilungsstelle des Nervus trigeminus darstellt. Dieser teilt sich hier in Nervus ophthalmicus, Nervus maxillaris und Nervus mandibularis. Ebenfalls im Bereich des Gehirns kann man die dritte, in dieser Arbeit beschriebene Expressionsdomäne finden, sie ist im Metenzephalon, kaudal zur „Brückenbiegung“ (engl. Pontine flexure) lokalisiert. Diese „Brückenbiegung“ befindet sich zwischen Metenzephalon und Myelencephalon, morphologisch ist sie gekennzeichnet durch eine Biegung des zentralen Nervensystems im Embryo.

Für diese Organanlagen sind, abgesehen von Expressionsanalysen, bisher keinerlei Studien bekannt. Wenn man allerdings andere Expressionsdomänen, wie die des Hypothalamus hinzuzieht, kann über Zusammenhänge mit dem Ulnar-Mammary Syndrome spekuliert werden. Eine Studie über den Einfluss von *Tbx3* auf den Hypothalamus hat gezeigt, dass *Tbx3* in adulten Mäusen im Nukleus von Neuronen zu finden ist. Anhand von Berichten, über Patienten mit dem Ulnar-Mammary Syndrome wurde geschlussfolgert, dass neuronale Störungen durch den Verlust von *Tbx3* verursacht werden (Eriksson und Mignot, 2009). Dies könnte auf das trigeminale Ganglion und den Bereich des Metenzephalon ebenso zutreffen, so dass beide Systeme mitverantwortlich sind für die neuronalen Störungen von Patienten mit Ulnar-Mammary Syndrome.

Neben *Tbx3* wurde auch für *Tbx2* eine Expression im Hypothalamus beschrieben. Eine Expressionsstudie von *Tbx2* und *Tbx3* in der Anlage des Hypothalamus hat gezeigt, dass *Tbx3* im Vergleich zu *Tbx2* bereits bei E9,5 eine wesentlich größere Expressionsdomäne einnimmt (Pontecorvi et al., 2008). Die Gruppe zeigte, dass *Tbx2* hier nur in einer kleinen Region des ventralen Dienzephalons exprimiert ist. Diese Expression beider Gene wird während der gesamten Hypothalamusentwicklung aufrecht erhalten. Die Funktion von

Tbx2 in dieser Domäne wurde bisher nur in Hühnerembryonen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Hochregulation von *Tbx2*, ein essentieller Schritt in der Entwicklung des Hypothalamus in Hühnchen ist und dieser zur Repression von *Shh* führt (Manning et al., 2006). *Shh* ist ebenfalls ein stark konservierter Signalmediator. Es ist bekannt, dass die Regulation von *Shh* notwendig ist, um Veränderungen der Zellproliferation zu steuern (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003; Scherz et al., 2004).

Eine weitere, bereits beschriebene Expressionsdomäne befindet sich in der Retina. Hier konnte für beide untersuchte Gene bereits bei E9,5 die Expression in der Augenanlage festgestellt werden (Chapman et al., 1996). Diese Expression beschränkte sich zu einem späteren Zeitpunkt auf die Retina. Bereits 1992 wurde für *Tbx2* die erste Funktion innerhalb des Auges gezeigt. Dies wurde zuerst im Modellorganismus *Drosophila* beschrieben. Das *Tbx2* Homolog heißt *optomotor blind (omb)*, und Mutationen dieses Gens führen zu Störungen der Optomotorik (Pflugfelder et al., 1992). Auch in anderen viel genutzten Modellorganismen wurde bereits eine Funktion für *Tbx2* im Auge beschrieben. So führt z.B. die Injektion von *Tbx2* oder *Tbx3* Morpholinos zum Fehler in der Pigmentierung der ventralen Retina und zur Verlagerung bzw. Fusion der Augenanlagen (Takabatake et al., 2002). Auch in der Maus wurde zumindest die Funktion von *Tbx2* im Auge bereits untersucht. Die Veröffentlichung von Behesti et al., 2009 beschrieb, dass *Tbx2* zum Aufrechterhalten der DV-Achse notwendig ist. Durch den Wegfall von *Tbx2* kommt es zu einer Beeinträchtigung des Retina Wachstums und damit zu Verkleinerung der gesamten optischen Anlage.

Viele der hier beschriebenen Expressionsdomänen können in anderen Organismen wiedergefunden werden. Dieser Fakt deutet auf eine starke Konservierung der Gene zwischen den Spezies hin (Chapman et al., 1996, Gibson-Brown et al, 1998, Hayata et al., 1999). Dadurch lässt sich vermuten, dass *Tbx2* und *Tbx3* in den jeweiligen Organen eine essentielle Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Punkt den man aus der Expressionsanalyse gewinnen kann ist, dass beide Faktoren häufig in Organanlagen exprimiert sind, welche durch Invagination entstehen. Dazu gehören das Innenohr, der Hypothalamus und die Zähne. Invagination ist einer der ersten Prozesse beim Entstehen von ektodermalen Organen. Dabei ist die Interaktion zwischen Mesenchym und Epithel grundlegend, um für diesen Einwanderungsprozess die richtige Lokalisation und Form festzulegen. Insbesondere die Form ist von Proliferation zu bestimmten Zeitpunkten und an bestimmten Stellen

abhängig. Da bereits bekannt ist, dass beide *T-box* Gene in der Zellzyklusregulation eine Rolle spielen, kann man vermuten, dass dies insbesondere in diesen Organen ihre Rolle ist.

4.6 T-box Gene in der Kopf Entwicklung

Tbx1 ist eines der Gene, die beschrieben sind im kraniofazialen Bereich exprimiert zu sein. Chapman et al., (1996) und Zoupa et al., (2006) haben gezeigt, dass es in der otischen Plakode, frontonasalen sowie in den lateralen Auswüchsen, im Gaumen und in den Anlagen der Zähne exprimiert ist. Alle Expressionsdomänen sind hier auf das Epithel beschränkt, welches hauptsächlich an Stellen exprimiert ist, die bekannt für ihre epitheliale-mesenchymale Interaktion ist. Mutation von *Tbx1* wurde in Verbindung gebracht mit dem DiGeorge Syndrome (Jerome and Papaioannou, 2001; Lindsay et al., 2001; Merscher et al., 2001, Arnold et al., 2006a). Das DiGeorge Syndrome ist, neben anderen Defekten charakterisiert durch Fehlbildungen des Gesichtes und die Ausbildung einer Gaumenspalte (Ryan et al., 1997). Mittels Mausmodellen, die eine *Tbx1* Mutation besaßen, konnte man den humanen Phänotyp rekapitulieren und genauer untersuchen (Lindsay et al., 1999, Jerome and Papaioannou, 2001). Diese Mäuse zeigen das gesamte Spektrum des DiGeorge Syndroms, und lassen weiter vermuten, dass *Tbx1* das zentrale Gen ist, dessen Mutation verantwortlich für das DiGeorge Syndrome ist.

Ein weiteres Gen, welches im kraniofazialen Bereich beschrieben ist, ist *Tbx10*. Der Einfluss von *Tbx10* in der kraniofazialen Entwicklung wurde aufgrund von Untersuchungen an der *Dancer* Mutante entdeckt. Diese Mutante entwickelt eine Gaumen- und Lippenspalte. Durch weitere Experimente wurde festgestellt, dass es sich bei der *Dancer* Mutante um eine Mutation handelt, die zur Überexpression von *Tbx10* führt (Bush et al., 2004). Das zeigt, dass nicht nur der Verlust eines Faktors, sondern auch die Überexpression zur Bildung einer Gaumenspalte führt. Wie genau *Tbx10* molekular agiert ist bisher noch nicht geklärt, es ist allerdings möglich, dass es mit anderen T-Box Faktoren um Bindungsstellen konkurriert, wie z.B. *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3* und *Tbx22*.

Tbx22 ist dabei ein weiteres wichtiges *T-box* Gen, welches in der Gaumenentwicklung eine Rolle spielt. Dieser Transkriptionsfaktor ist nur im posterioren Gaumen exprimiert, was dafür spricht, dass es eine wichtige Rolle in der Regionalisierung des Gaumens in anteriore und posteriore Hälfte inne hat (Arnold et al., 2006b, Braybrook et al., 2002; Bush et al., 2002, Herr et al., 2003). Die Analyse einer *Tbx22*-Mausmutante hat gezeigt, dass diese nur

einen sehr milden Phänotyp ausbildet, was darauf hindeutet, dass *Tbx22* nur eine kleinere Rolle während der Gaumenentwicklung spielt.

Tbx18 spielte bis vor kurzem keine Rolle in der kraniofazialen Entwicklung, bis Trowe et al., (2008) dessen Rolle in der Differenzierung der otischen Fibrozyten während der Innenohrentwicklung beschrieben haben. Der Verlust von *Tbx18* führt zu Veränderungen der Kompartimentalisierung und Differenzierung der otischen Fibrozyten, was zur Fehlbildung der Stria Vascularis führt. Diese zellulären Veränderungen führen in Konsequenz zum Hörverlust.

Ein weiteres Gen, welches im kraniofazialen Bereich bereits beschrieben wurde ist *Tbx19*, auch *TPit* genannt. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors ist auf den ventralen Bereich der anterioren Hypophyse und dem ventralen Diencephalon beschränkt (Lamolet et al., 2001; Liu et al., 2001). Es sind 7 unterschiedliche Mutationen im Menschen bekannt, die zu Fehlbildung der Hypophyse führen (Lamolet et al., 2001; Yi et al., 1999). Diese Mutationen führen zu einer verminderten Bindungsfähigkeit an die DNA und nicht zu einem verfrühten Transkriptionsabbruch.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *T-box* Gene einen wichtigen Einfluss auf die kraniofaziale Entwicklung haben, aber bisher noch viel zu wenig über deren Funktion bekannt ist.

5. Literatur

- Aanhaanen, W. T., J. F. Brons, J. N. Dominguez, M. S. Rana, J. Norden, R. Airik, V. Wakker, C. de Gier-de Vries, N. A. Brown, A. Kispert, A. F. Moorman, and V. M. Christoffels. "The Tbx2+ Primary Myocardium of the Atrioventricular Canal Forms the Atrioventricular Node and the Base of the Left Ventricle." *Circ Res* 104, no. 11 (2009): 1267-74.
- Agulnik, S. I., N. Garvey, S. Hancock, I. Ruvinsky, D. L. Chapman, I. Agulnik, R. Bollag, V. Papaioannou, and L. M. Silver. "Evolution of Mouse T-Box Genes by Tandem Duplication and Cluster Dispersion." *Genetics* 144, no. 1 (1996): 249-54.
- Ahn, Y., B. W. Sanderson, O. D. Klein, and R. Krumlauf. "Inhibition of Wnt Signaling by Wise (Sostdc1) and Negative Feedback from Shh Controls Tooth Number and Patterning." *Development* 137, no. 19 (2010): 3221-31.
- Alappat, S. R., Z. Zhang, K. Suzuki, X. Zhang, H. Liu, R. Jiang, G. Yamada, and Y. Chen. "The Cellular and Molecular Etiology of the Cleft Secondary Palate in Fgf10 Mutant Mice." *Dev Biol* 277, no. 1 (2005): 102-13.
- Andreou, A. M., E. Pauws, M. C. Jones, M. K. Singh, M. Bussen, K. Doudney, G. E. Moore, A. Kispert, J. J. Brosens, and P. Stanier. "Tbx22 Missense Mutations Found in Patients with X-Linked Cleft Palate Affect DNA Binding, Sumoylation, and Transcriptional Repression." *Am J Hum Genet* 81, no. 4 (2007): 700-12.
- Arnold, J. S., E. M. Braunstein, T. Ohyama, A. K. Groves, J. C. Adams, M. C. Brown, and B. E. Morrow. "Tissue-Specific Roles of Tbx1 in the Development of the Outer, Middle and Inner Ear, Defective in 22q11ds Patients." *Hum Mol Genet* 15, no. 10 (2006a): 1629-39.
- Arnold, J. S., U. Werling, E. M. Braunstein, J. Liao, S. Nowotschin, W. Edelmann, J. M. Hebert, and B. E. Morrow. "Inactivation of Tbx1 in the Pharyngeal Endoderm Results in 22q11ds Malformations." *Development* 133, no. 5 (2006b): 977-87.
- Ausubel, F. M. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons., 1994.
- Barrow, J. R., and M. R. Capecchi. "Compensatory Defects Associated with Mutations in Hoxa1 Restore Normal Palatogenesis to Hoxa2 Mutants." *Development* 126, no. 22 (1999): 5011-26.
- Behesti, H., V. E. Papaioannou, and J. C. Sowden. "Loss of Tbx2 Delays Optic Vesicle Invagination Leading to Small Optic Cups." *Dev Biol* 333, no. 2 (2009): 360-72.

- Bei, M., and R. Maas. "Fgfs and Bmp4 Induce Both Msx1-Independent and Msx1-Dependent Signaling Pathways in Early Tooth Development." *Development* 125, no. 21 (1998): 4325-33.
- Bellusci, S., J. Grindley, H. Emoto, N. Itoh, and B. L. Hogan. "Fibroblast Growth Factor 10 (Fgf10) and Branching Morphogenesis in the Embryonic Mouse Lung." *Development* 124, no. 23 (1997): 4867-78.
- Bollag, R. J., Z. Siegfried, J. A. Cebra-Thomas, N. Garvey, E. M. Davison, and L. M. Silver. "An Ancient Family of Embryonically Expressed Mouse Genes Sharing a Conserved Protein Motif with the T Locus." *Nat Genet* 7, no. 3 (1994): 383-9.
- Braat, A. K., S. van de Water, J. Korving, and D. Zivkovic. "A Zebrafish Vasa Morphant Abolishes Vasa Protein but Does Not Affect the Establishment of the Germline." *genesis* 30, no. 3 (2001): 183-5.
- Braybrook, C., S. Lisgo, K. Doudney, D. Henderson, A. C. Marcano, T. Strachan, M. A. Patton, L. Villard, G. E. Moore, P. Stanier, and S. Lindsay. "Craniofacial Expression of Human and Murine Tbx22 Correlates with the Cleft Palate and Ankyloglossia Phenotype Observed in Cpx Patients." *Hum Mol Genet* 11, no. 22 (2002): 2793-804.
- Brummelkamp, T. R., R. M. Kortlever, M. Lingbeek, F. Trettel, M. E. MacDonald, M. van Lohuizen, and R. Bernards. "Tbx-3, the Gene Mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, Is a Negative Regulator of P19arf and Inhibits Senescence." *J Biol Chem* 277, no. 8 (2002): 6567-72.
- Bush, J. O., Y. Lan, and R. Jiang. "The Cleft Lip and Palate Defects in Dancer Mutant Mice Result from Gain of Function of the Tbx10 Gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, no. 18 (2004): 7022-7.
- Bush, J. O., Y. Lan, K. M. Maltby, and R. Jiang. "Isolation and Developmental Expression Analysis of Tbx22, the Mouse Homolog of the Human X-Linked Cleft Palate Gene." *Dev Dyn* 225, no. 3 (2002): 322-6.
- Cappellini, A., P. L. Tazzari, I. Mantovani, A. M. Billi, C. Tassi, F. Ricci, R. Conte, and A. M. Martelli. "Antiapoptotic Role of P38 Mitogen Activated Protein Kinase in Jurkat T Cells and Normal Human T Lymphocytes Treated with 8-Methoxypsoralen and Ultraviolet-a Radiation." *Apoptosis* 10, no. 1 (2005): 141-52.
- Casanovas, O., F. Miro, J. M. Estanyol, E. Itarte, N. Agell, and O. Bachs. "Osmotic Stress Regulates the Stability of Cyclin D1 in a P38sapk2-Dependent Manner." *J Biol Chem* 275, no. 45 (2000): 35091-7.
- Cecconi, F., G. Alvarez-Bolado, B. I. Meyer, K. A. Roth, and P. Gruss. "Apaf1 (Ced-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development." *Cell* 94, no. 6 (1998): 727-37.

- Celli, G., W. J. LaRochelle, S. Mackem, R. Sharp, and G. Merlino. "Soluble Dominant-Negative Receptor Uncovers Essential Roles for Fibroblast Growth Factors in Multi-Organ Induction and Patterning." *EMBO J* 17, no. 6 (1998): 1642-55.
- Cerny, R., P. Lwigale, R. Ericsson, D. Meulemans, H. H. Epperlein, and M. Bronner-Fraser. "Developmental Origins and Evolution of Jaws: New Interpretation of "Maxillary" and "Mandibular"." *Dev Biol* 276, no. 1 (2004): 225-36.
- Chapman, D. L., N. Garvey, S. Hancock, M. Alexiou, S. I. Agulnik, J. J. Gibson-Brown, J. Cebra-Thomas, R. J. Bollag, L. M. Silver, and V. E. Papaioannou. "Expression of the T-Box Family Genes, Tbx1-Tbx5, During Early Mouse Development." *Dev Dyn* 206, no. 4 (1996): 379-90.
- Chen, J. R., B. Chatterjee, R. Meyer, J. C. Yu, J. L. Borke, C. M. Isales, M. L. Kirby, C. W. Lo, and R. J. Bollag. "Tbx2 Represses Expression of Connexin43 in Osteoblastic-Like Cells." *Calcif Tissue Int* 74, no. 6 (2004): 561-73.
- Christoffels, V. M., W. M. Hoogaars, A. Tessari, D. E. Clout, A. F. Moorman, and M. Campione. "T-Box Transcription Factor Tbx2 Represses Differentiation and Formation of the Cardiac Chambers." *Dev Dyn* 229, no. 4 (2004): 763-70.
- Chuang, P. T., T. Kawcak, and A. P. McMahon. "Feedback Control of Mammalian Hedgehog Signaling by the Hedgehog-Binding Protein, Hip1, Modulates Fgf Signaling During Branching Morphogenesis of the Lung." *Genes Dev* 17, no. 3 (2003): 342-7.
- Conlon, F. L., L. Fairclough, B. M. Price, E. S. Casey, and J. C. Smith. "Determinants of T Box Protein Specificity." *Development* 128, no. 19 (2001): 3749-58.
- Creuzet, S., G. Couly, and N. M. Le Douarin. "Patterning the Neural Crest Derivatives During Development of the Vertebrate Head: Insights from Avian Studies." *J Anat* 207, no. 5 (2005): 447-59.
- Cuervo, R., and L. Covarrubias. "Death Is the Major Fate of Medial Edge Epithelial Cells and the Cause of Basal Lamina Degradation During Palatogenesis." *Development* 131, no. 1 (2004): 15-24.
- Cuervo, R., C. Valencia, R. A. Chandraratna, and L. Covarrubias. "Programmed Cell Death Is Required for Palate Shelf Fusion and Is Regulated by Retinoic Acid." *Dev Biol* 245, no. 1 (2002): 145-56.
- D'Souza, R. N., and O. D. Klein. "Unraveling the Molecular Mechanisms That Lead to Supernumerary Teeth in Mice and Men: Current Concepts and Novel Approaches." *Cells Tissues Organs* 186, no. 1 (2007): 60-9.

- Dassule, H. R., and A. P. McMahon. "Analysis of Epithelial-Mesenchymal Interactions in the Initial Morphogenesis of the Mammalian Tooth." *Dev Biol* 202, no. 2 (1998): 215-27.
- Davenport, T. G., L. A. Jerome-Majewska, and V. E. Papaioannou. "Mammary Gland, Limb and Yolk Sac Defects in Mice Lacking *Tbx3*, the Gene Mutated in Human Ulnar Mammary Syndrome." *Development* 130, no. 10 (2003): 2263-73.
- De Moerlooze, L., B. Spencer-Dene, J. M. Revest, M. Hajihosseini, I. Rosewell, and C. Dickson. "An Important Role for the *Iiib* Isoform of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (*Fgfr2*) in Mesenchymal-Epithelial Signalling During Mouse Organogenesis." *Development* 127, no. 3 (2000): 483-92.
- DeAngelis, V., and J. Nalbandian. "Ultrastructure of Mouse and Rat Palatal Processes Prior to and During Secondary Palate Formation." *Arch Oral Biol* 13, no. 6 (1968): 601-8.
- Ding, H., X. Wu, H. Bostrom, I. Kim, N. Wong, B. Tsoi, M. O'Rourke, G. Y. Koh, P. Soriano, C. Betsholtz, T. C. Hart, M. L. Marazita, L. L. Field, P. P. Tam, and A. Nagy. "A Specific Requirement for *Pdgfr-C* in Palate Formation and *Pdgfr-Alpha* Signaling." *Nat Genet* 36, no. 10 (2004): 1111-6.
- Dobrovolskaia-Zavadskaia, N. "Sur La Mortification Spontan e De La Queue Chez La Souris Nouveau-N e Et Sur L'existence D'un Caracte`re (Facteur) He`re`Ditaire "Non Viable"." *C. R. Acad. Sci. Biol* 97 (1927): 114-16.
- Eriksson, K. S., and E. Mignot. "T-Box 3 Is Expressed in the Adult Mouse Hypothalamus and Medulla." *Brain Res* 1302 (2009): 233-9.
- Ferguson, M. W. "Palate Development." *Development* 103 Suppl (1988): 41-60.
- Ferguson, M. W., L. S. Honig, and H. C. Slavkin. "Differentiation of Cultured Palatal Shelves from Alligator, Chick, and Mouse Embryos." *Anat Rec* 209, no. 2 (1984): 231-49.
- Frebourg, T., C. Oliveira, P. Hochain, R. Karam, S. Manouvrier, C. Graziadio, M. Vekemans, A. Hartmann, S. Baert-Desurmont, C. Alexandre, S. Lejeune Dumoulin, C. Marroni, C. Martin, S. Castedo, M. Lovett, J. Winston, J. C. Machado, T. Attie, E. W. Jabs, J. Cai, P. Pellerin, J. P. Triboulet, M. Scotte, F. Le Pessot, A. Hedouin, F. Carneiro, M. Blayau, and R. Seruca. "Cleft Lip/Palate and *Cdh1/E-Cadherin* Mutations in Families with Hereditary Diffuse Gastric Cancer." *J Med Genet* 43, no. 2 (2006): 138-42.
- Gato, A., M. L. Martinez, C. Tudela, I. Alonso, J. A. Moro, M. A. Formoso, M. W. Ferguson, and C. Martinez-Alvarez. "Tgf-Beta(3)-Induced Chondroitin Sulphate Proteoglycan Mediates Palatal Shelf Adhesion." *Dev Biol* 250, no. 2 (2002): 393-405.

- Gibson-Brown, J. J., S. I. Agulnik, D. L. Chapman, M. Alexiou, N. Garvey, L. M. Silver, and V. E. Papaioannou. "Evidence of a Role for T-Box Genes in the Evolution of Limb Morphogenesis and the Specification of Forelimb/Hindlimb Identity." *Mech Dev* 56, no. 1-2 (1996): 93-101.
- Gibson-Brown, J. J., S. I. Agulnik, L. M. Silver, L. Niswander, and V. E. Papaioannou. "Involvement of T-Box Genes Tbx2-Tbx5 in Vertebrate Limb Specification and Development." *Development* 125, no. 13 (1998): 2499-509.
- Gibson-Brown, J. J., I. Agulnik S, L. M. Silver, and V. E. Papaioannou. "Expression of T-Box Genes Tbx2-Tbx5 During Chick Organogenesis." *Mech Dev* 74, no. 1-2 (1998): 165-9.
- Glücksmann, A. "Cell Death in Normal Vertebrate Ontogeny." *Biol.Rev.* 26 (1951): 59-86.
- Gritli-Linde, A. "Molecular Control of Secondary Palate Development." *Dev Biol* 301, no. 2 (2007): 309-26.
- Habets, P. E., A. F. Moorman, D. E. Clout, M. A. van Roon, M. Lingbeek, M. van Lohuizen, M. Campione, and V. M. Christoffels. "Cooperative Action of Tbx2 and Nkx2.5 Inhibits Anf Expression in the Atrioventricular Canal: Implications for Cardiac Chamber Formation." *Genes Dev* 16, no. 10 (2002): 1234-46.
- Harada, H., T. Toyono, K. Toyoshima, and H. Ohuchi. "Fgf10 Maintains Stem Cell Population During Mouse Incisor Development." *Connect Tissue Res* 43, no. 2-3 (2002): 201-4.
- Harrelson, Z., R. G. Kelly, S. N. Goldin, J. J. Gibson-Brown, R. J. Bollag, L. M. Silver, and V. E. Papaioannou. "Tbx2 Is Essential for Patterning the Atrioventricular Canal and for Morphogenesis of the Outflow Tract During Heart Development." *Development* 131, no. 20 (2004): 5041-52.
- Hayata, T., H. Kuroda, A. Eisaki, and M. Asashima. "Expression of Xenopus T-Box Transcription Factor, Tbx2 in Xenopus Embryo." *Dev Genes Evol* 209, no. 10 (1999): 625-8.
- Helms, J. A., D. Cordero, and M. D. Tapadia. "New Insights into Craniofacial Morphogenesis." *Development* 132, no. 5 (2005): 851-61.
- Herr, A., D. Meunier, I. Muller, A. Rump, R. Fundele, H. H. Ropers, and U. A. Nuber. "Expression of Mouse Tbx22 Supports Its Role in Palatogenesis and Glossogenesis." *Dev Dyn* 226, no. 4 (2003): 579-86.
- Hilliard, S. A., L. Yu, S. Gu, Z. Zhang, and Y. P. Chen. "Regional Regulation of Palatal Growth and Patterning Along the Anterior-Posterior Axis in Mice." *J Anat* 207, no. 5 (2005): 655-67.

- Hoogaars, W. M., A. Engel, J. F. Brons, A. O. Verkerk, F. J. de Lange, L. Y. Wong, M. L. Bakker, D. E. Clout, V. Wakker, P. Barnett, J. H. Ravesloot, A. F. Moorman, E. E. Verheijck, and V. M. Christoffels. "Tbx3 Controls the Sinoatrial Node Gene Program and Imposes Pacemaker Function on the Atria." *Genes Dev* 21, no. 9 (2007): 1098-112.
- Jacobs, J. J., P. Keblusek, E. Robanus-Maandag, P. Kristel, M. Lingbeek, P. M. Nederlof, T. van Welsem, M. J. van de Vijver, E. Y. Koh, G. Q. Daley, and M. van Lohuizen. "Senescence Bypass Screen Identifies Tbx2, Which Represses Cdkn2a (P19(Arf)) and Is Amplified in a Subset of Human Breast Cancers." *Nat Genet* 26, no. 3 (2000): 291-9.
- Jernvall, J., T. Aberg, P. Kettunen, S. Keranen, and I. Thesleff. "The Life History of an Embryonic Signaling Center: Bmp-4 Induces P21 and Is Associated with Apoptosis in the Mouse Tooth Enamel Knot." *Development* 125, no. 2 (1998): 161-9.
- Jernvall, J., P. Kettunen, I. Karavanova, L. B. Martin, and I. Thesleff. "Evidence for the Role of the Enamel Knot as a Control Center in Mammalian Tooth Cusp Formation: Non-Dividing Cells Express Growth Stimulating Fgf-4 Gene." *Int J Dev Biol* 38, no. 3 (1994): 463-9.
- Jernvall, J., and I. Thesleff. "Reiterative Signaling and Patterning During Mammalian Tooth Morphogenesis." *Mech Dev* 92, no. 1 (2000): 19-29.
- Jerome, L. A., and V. E. Papaioannou. "Digeorge Syndrome Phenotype in Mice Mutant for the T-Box Gene, Tbx1." *Nat Genet* 27, no. 3 (2001): 286-91.
- Jerome-Majewska, L. A., G. P. Jenkins, E. Ernstoff, F. Zindy, C. J. Sherr, and V. E. Papaioannou. "Tbx3, the Ulnar-Mammary Syndrome Gene, and Tbx2 Interact in Mammary Gland Development through a P19arf/P53-Independent Pathway." *Dev Dyn* 234, no. 4 (2005): 922-33.
- Johnston, M. C. "A Radioautographic Study of the Migration and Fate of Cranial Neural Crest Cells in the Chick Embryo." *Anat Rec* 156, no. 2 (1966): 143-55.
- Kaartinen, V., J. W. Voncken, C. Shuler, D. Warburton, D. Bu, N. Heisterkamp, and J. Groffen. "Abnormal Lung Development and Cleft Palate in Mice Lacking Tgf-Beta 3 Indicates Defects of Epithelial-Mesenchymal Interaction." *Nat Genet* 11, no. 4 (1995): 415-21.
- Kamijo, T., F. Zindy, M. F. Roussel, D. E. Quelle, J. R. Downing, R. A. Ashmun, G. Grosveld, and C. J. Sherr. "Tumor Suppression at the Mouse Ink4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product P19arf." *Cell* 91, no. 5 (1997): 649-59.

- Kantaputra, P., I. Miletich, H. J. Ludecke, E. Y. Suzuki, V. Praphanphoj, R. Shivdasani, M. Wuelling, A. Vortkamp, D. Napierala, and P. T. Sharpe. "Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome with Supernumerary Teeth." *J Dent Res* 87, no. 11 (2008): 1027-31.
- Kavanagh, K. D., A. R. Evans, and J. Jernvall. "Predicting Evolutionary Patterns of Mammalian Teeth from Development." *Nature* 449, no. 7161 (2007): 427-32.
- Keranen, S. V., P. Kettunen, T. Aberg, I. Thesleff, and J. Jernvall. "Gene Expression Patterns Associated with Suppression of Odontogenesis in Mouse and Vole Diastema Regions." *Dev Genes Evol* 209, no. 8 (1999): 495-506.
- Kettunen, P., J. Laurikkala, P. Itaranta, S. Vainio, N. Itoh, and I. Thesleff. "Associations of Fgf-3 and Fgf-10 with Signaling Networks Regulating Tooth Morphogenesis." *Dev Dyn* 219, no. 3 (2000): 322-32.
- Kettunen, P., and I. Thesleff. "Expression and Function of Fgfs-4, -8, and -9 Suggest Functional Redundancy and Repetitive Use as Epithelial Signals During Tooth Morphogenesis." *Dev Dyn* 211, no. 3 (1998): 256-68.
- Kiyono, M., and M. Shibuya. "Inhibitory Smad Transcription Factors Protect Arterial Endothelial Cells from Apoptosis Induced by Bmp4." *Oncogene* 25, no. 54 (2006): 7131-7.
- Klein, O. D., G. Minowada, R. Peterkova, A. Kangas, B. D. Yu, H. Lesot, M. Peterka, J. Jernvall, and G. R. Martin. "Sprouty Genes Control Diastema Tooth Development Via Bidirectional Antagonism of Epithelial-Mesenchymal Fgf Signaling." *Dev Cell* 11, no. 2 (2006): 181-90.
- Koide, Y., T. Kiyota, M. Tonganunt, D. Pinkaew, Z. Liu, Y. Kato, N. Hutadilok-Towatana, A. Phongdara, and K. Fujise. "Embryonic Lethality of Fortilin-Null Mutant Mice by Bmp-Pathway Overactivation." *Biochim Biophys Acta* 1790, no. 5 (2009): 326-38.
- Lagna, G., P. H. Nguyen, W. Ni, and A. Hata. "Bmp-Dependent Activation of Caspase-9 and Caspase-8 Mediates Apoptosis in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, no. 5 (2006): L1059-67.
- Lamolet, B., A. M. Pulichino, T. Lamonerie, Y. Gauthier, T. Brue, A. Enjalbert, and J. Drouin. "A Pituitary Cell-Restricted T Box Factor, Tpit, Activates Pomc Transcription in Cooperation with Pitx Homeoproteins." *Cell* 104, no. 6 (2001): 849-59.
- Lan, Y., P. D. Kingsley, E. S. Cho, and R. Jiang. "Osr2, a New Mouse Gene Related to Drosophila Odd-Skipped, Exhibits Dynamic Expression Patterns During Craniofacial, Limb, and Kidney Development." *Mech Dev* 107, no. 1-2 (2001): 175-9.

- Lan, Y., C. E. Ovitt, E. S. Cho, K. M. Maltby, Q. Wang, and R. Jiang. "Odd-Skipped Related 2 (Osr2) Encodes a Key Intrinsic Regulator of Secondary Palate Growth and Morphogenesis." *Development* 131, no. 13 (2004): 3207-16.
- Law, D. J., T. Gebuhr, N. Garvey, S. I. Agulnik, and L. M. Silver. "Identification, Characterization, and Localization to Chromosome 17q21-22 of the Human Tbx2 Homolog, Member of a Conserved Developmental Gene Family." *Mamm Genome* 6, no. 11 (1995): 793-7.
- Le Lievre, C. S. "Participation of Neural Crest-Derived Cells in the Genesis of the Skull in Birds." *J Embryol Exp Morphol* 47 (1978): 17-37.
- Le Lievre, C. S., and N. M. Le Douarin. "Mesenchymal Derivatives of the Neural Crest: Analysis of Chimaeric Quail and Chick Embryos." *J Embryol Exp Morphol* 34, no. 1 (1975): 125-54.
- Lee, J. M., J. Y. Kim, K. W. Cho, M. J. Lee, S. W. Cho, Y. Zhang, S. K. Byun, C. K. Yi, and H. S. Jung. "Modulation of Cell Proliferation During Palatogenesis by the Interplay between Tbx3 and Bmp4." *Cell Tissue Res* 327, no. 2 (2007): 285-92.
- Lee, S. H., O. Bedard, M. Buchtova, K. Fu, and J. M. Richman. "A New Origin for the Maxillary Jaw." *Dev Biol* 276, no. 1 (2004): 207-24.
- Lele, Z., J. Bakkers, and M. Hammerschmidt. "Morpholino Phenocopies of the Swirl, Snailhouse, Somitaun, Minifin, Silberblick, and Pipetail Mutations." *genesis* 30, no. 3 (2001): 190-4.
- Lindsay, E. A., A. Botta, V. Jurecic, S. Carattini-Rivera, Y. C. Cheah, H. M. Rosenblatt, A. Bradley, and A. Baldini. "Congenital Heart Disease in Mice Deficient for the Digeorge Syndrome Region." *Nature* 401, no. 6751 (1999): 379-83.
- Lindsay, E. A., F. Vitelli, H. Su, M. Morishima, T. Huynh, T. Pramparo, V. Jurecic, G. Ogunrinu, H. F. Sutherland, P. J. Scambler, A. Bradley, and A. Baldini. "Tbx1 Haploinsufficiency in the Digeorge Syndrome Region Causes Aortic Arch Defects in Mice." *Nature* 410, no. 6824 (2001): 97-101.
- Lingbeek, M. E., J. J. Jacobs, and M. van Lohuizen. "The T-Box Repressors Tbx2 and Tbx3 Specifically Regulate the Tumor Suppressor Gene P14arf Via a Variant T-Site in the Initiator." *J Biol Chem* 277, no. 29 (2002): 26120-7.
- Liu, J., C. Lin, A. Gleiberman, K. A. Ohgi, T. Herman, H. P. Huang, M. J. Tsai, and M. G. Rosenfeld. "Tbx19, a Tissue-Selective Regulator of Pomc Gene Expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 15 (2001): 8674-9.

- Manning, L., K. Ohyama, B. Saeger, O. Hatano, S. A. Wilson, M. Logan, and M. Placzek. "Regional Morphogenesis in the Hypothalamus: A Bmp-Tbx2 Pathway Coordinates Fate and Proliferation through Shh Downregulation." *Dev Cell* 11, no. 6 (2006): 873-85.
- Mansour, S. L., J. M. Goddard, and M. R. Capecchi. "Mice Homozygous for a Targeted Disruption of the Proto-Oncogene Int-2 Have Developmental Defects in the Tail and Inner Ear." *Development* 117, no. 1 (1993): 13-28.
- Martinez-Alvarez, C., R. Bonelli, C. Tudela, A. Gato, J. Mena, S. O'Kane, and M. W. Ferguson. "Bulging Medial Edge Epithelial Cells and Palatal Fusion." *Int J Dev Biol* 44, no. 3 (2000): 331-5.
- Martinez-Alvarez, C., C. Tudela, J. Perez-Miguelsanz, S. O'Kane, J. Puerta, and M. W. Ferguson. "Medial Edge Epithelial Cell Fate During Palatal Fusion." *Dev Biol* 220, no. 2 (2000): 343-57.
- Merscher, S., B. Funke, J. A. Epstein, J. Heyer, A. Puech, M. M. Lu, R. J. Xavier, M. B. Demay, R. G. Russell, S. Factor, K. Tokooya, B. S. Jore, M. Lopez, R. K. Pandita, M. Lia, D. Carrion, H. Xu, H. Schorle, J. B. Kobler, P. Scambler, A. Wynshaw-Boris, A. I. Skoultschi, B. E. Morrow, and R. Kucherlapati. "Tbx1 Is Responsible for Cardiovascular Defects in Velo-Cardio-Facial/Digeorge Syndrome." *Cell* 104, no. 4 (2001): 619-29.
- Miettinen, P. J., J. R. Chin, L. Shum, H. C. Slavkin, C. F. Shuler, R. Derynck, and Z. Werb. "Epidermal Growth Factor Receptor Function Is Necessary for Normal Craniofacial Development and Palate Closure." *Nat Genet* 22, no. 1 (1999): 69-73.
- Mikkola, M. L. "Genetic Basis of Skin Appendage Development." *Semin Cell Dev Biol* 18, no. 2 (2007): 225-36.
- Miletich, I., and P. T. Sharpe. "Neural Crest Contribution to Mammalian Tooth Formation." *Birth Defects Res C Embryo Today* 72, no. 2 (2004): 200-12.
- Miller, R. P., and B. A. Becker. "Teratogenicity of Oral Diazepam and Diphenylhydantoin in Mice." *Toxicol Appl Pharmacol* 32, no. 1 (1975): 53-61.
- Mogass, M., P. Bringas, Jr., and C. F. Shuler. "Characterization of Desmosomal Component Expression During Palatogenesis." *Int J Dev Biol* 44, no. 3 (2000): 317-22.
- Moorman, A. F., A. C. Houweling, P. A. de Boer, and V. M. Christoffels. "Sensitive Nonradioactive Detection of Mrna in Tissue Sections: Novel Application of the Whole-Mount in Situ Hybridization Protocol." *J Histochem Cytochem* 49, no. 1 (2001): 1-8.

- Mori, C., N. Nakamura, Y. Okamoto, M. Osawa, and K. Shiota. "Cytochemical Identification of Programmed Cell Death in the Fusing Fetal Mouse Palate by Specific Labelling of DNA Fragmentation." *Anat Embryol (Berl)* 190, no. 1 (1994): 21-8.
- Mukhopadhyay, P., S. Singh, R. M. Greene, and M. M. Pisano. "Molecular Fingerprinting of Bmp2- and Bmp4-Treated Embryonic Maxillary Mesenchymal Cells." *Orthod Craniofac Res* 9, no. 2 (2006): 93-110.
- Naiche, L. A., Z. Harrelson, R. G. Kelly, and V. E. Papaioannou. "T-Box Genes in Vertebrate Development." *Annu Rev Genet* 39 (2005): 219-39.
- Nasevicius, A., and S. C. Ekker. "Effective Targeted Gene 'Knockdown' in Zebrafish." *Nat Genet* 26, no. 2 (2000): 216-20.
- Nasevicius, A., and S. C. Ekker. "The Zebrafish as a Novel System for Functional Genomics and Therapeutic Development Applications." *Curr Opin Mol Ther* 3, no. 3 (2001): 224-8.
- Neubuser, A., H. Peters, R. Balling, and G. R. Martin. "Antagonistic Interactions between Fgf and Bmp Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation." *Cell* 90, no. 2 (1997): 247-55.
- Ohazama, A., C. J. Haycraft, M. Seppala, J. Blackburn, S. Ghafoor, M. Cobourne, D. C. Martinelli, C. M. Fan, R. Peterkova, H. Lesot, B. K. Yoder, and P. T. Sharpe. "Primary Cilia Regulate Shh Activity in the Control of Molar Tooth Number." *Development* 136, no. 6 (2009): 897-903.
- Ohazama, A., E. B. Johnson, M. S. Ota, H. Y. Choi, T. Porntaveetus, S. Oommen, N. Itoh, K. Eto, A. Gritli-Linde, J. Herz, and P. T. Sharpe. "Lrp4 Modulates Extracellular Integration of Cell Signaling Pathways in Development." *PLoS ONE* 3, no. 12 (2008): e4092.
- Ohuchi, H., T. Nakagawa, A. Yamamoto, A. Araga, T. Ohata, Y. Ishimaru, H. Yoshioka, T. Kuwana, T. Nohno, M. Yamasaki, N. Itoh, and S. Noji. "The Mesenchymal Factor, Fgf10, Initiates and Maintains the Outgrowth of the Chick Limb Bud through Interaction with Fgf8, an Apical Ectodermal Factor." *Development* 124, no. 11 (1997): 2235-44.
- Orioli, D., M. Henkemeyer, G. Lemke, R. Klein, and T. Pawson. "Sek4 and Nuk Receptors Cooperate in Guidance of Commissural Axons and in Palate Formation." *EMBO J* 15, no. 22 (1996): 6035-49.
- Papaioannou, V.E., and S.N. Goldin. "Introduction to the T-Box Genes and Their Roles in Developmental Signaling Pathways." In *Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis. Oxford Monogr. Med. Genet. No.49*, edited by C.J. Epstein, 686-96. Oxford: Oxford University Press, 2003.

- Peterkova, R., S. Churava, H. Lesot, M. Rothova, J. Prochazka, M. Peterka, and O. D. Klein. "Revitalization of a Diastemal Tooth Primordium in *Spry2* Null Mice Results from Increased Proliferation and Decreased Apoptosis." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B, no. 4 (2009): 292-308.
- Peterkova, R., H. Lesot, and M. Peterka. "Phylogenetic Memory of Developing Mammalian Dentition." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306, no. 3 (2006): 234-50.
- Peterkova, R., H. Lesot, J. L. Vonesch, M. Peterka, and J. V. Ruch. "Mouse Molar Morphogenesis Revisited by Three Dimensional Reconstruction. I. Analysis of Initial Stages of the First Upper Molar Development Revealed Two Transient Buds." *Int J Dev Biol* 40, no. 5 (1996): 1009-16.
- Peterkova, R., M. Peterka, and H. Lesot. "The Developing Mouse Dentition: A New Tool for Apoptosis Study." *Ann N Y Acad Sci* 1010 (2003): 453-66.
- Pflugfelder, G. O., H. Roth, and B. Poeck. "A Homology Domain Shared between *Drosophila* Optomotor-Blind and Mouse Brachyury Is Involved in DNA Binding." *Biochem Biophys Res Commun* 186, no. 2 (1992): 918-25.
- Pispa, J., and I. Thesleff. "Mechanisms of Ectodermal Organogenesis." *Dev Biol* 262, no. 2 (2003): 195-205.
- Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H. W. Lee, C. Cordon-Cardo, and R. A. DePinho. "The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, P19arf, Interacts with Mdm2 and Neutralizes Mdm2's Inhibition of P53." *Cell* 92, no. 6 (1998): 713-23.
- Pontecorvi, M., C. R. Goding, W. D. Richardson, and N. Kessar. "Expression of Tbx2 and Tbx3 in the Developing Hypothalamic-Pituitary Axis." *Gene Expr Patterns* 8, no. 6 (2008): 411-7.
- Prince, S., S. Carreira, K. W. Vance, A. Abrahams, and C. R. Goding. "Tbx2 Directly Represses the Expression of the P21(Waf1) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor." *Cancer Res* 64, no. 5 (2004): 1669-74.
- Prochazka, J., S. Pantalacci, S. Churava, M. Rothova, A. Lambert, H. Lesot, O. Klein, M. Peterka, V. Laudet, and R. Peterkova. "Patterning by Heritage in Mouse Molar Row Development." *Proc Natl Acad Sci USA* 107, no. 35 (2010): 15497-502.
- Proetzl, G., S. A. Pawlowski, M. V. Wiles, M. Yin, G. P. Boivin, P. N. Howles, J. Ding, M. W. Ferguson, and T. Doetschman. "Transforming Growth Factor-Beta 3 Is Required for Secondary Palate Fusion." *Nat Genet* 11, no. 4 (1995): 409-14.

- Ribeiro, I., Y. Kawakami, D. Buscher, A. Raya, J. Rodriguez-Leon, M. Morita, C. Rodriguez Esteban, and J. C. Izpisua Belmonte. "Tbx2 and Tbx3 Regulate the Dynamics of Cell Proliferation During Heart Remodeling." *PLoS ONE* 2, no. 4 (2007): e398.
- Rice, R., B. Spencer-Dene, E. C. Connor, A. Gritli-Linde, A. P. McMahon, C. Dickson, I. Thesleff, and D. P. Rice. "Disruption of Fgf10/Fgfr2b-Coordinated Epithelial-Mesenchymal Interactions Causes Cleft Palate." *J Clin Invest* 113, no. 12 (2004): 1692-700.
- Risley, M., D. Garrod, M. Henkemeyer, and W. McLean. "Ephb2 and Ephb3 Forward Signalling Are Required for Palate Development." *Mech Dev* 126, no. 3-4 (2009): 230-9.
- Ruvinsky, I., and L. M. Silver. "Newly Identified Paralogous Groups on Mouse Chromosomes 5 and 11 Reveal the Age of a T-Box Cluster Duplication." *Genomics* 40, no. 2 (1997): 262-6.
- Ryan, A. K., J. A. Goodship, D. I. Wilson, N. Philip, A. Levy, H. Seidel, S. Schuffenhauer, H. Oechsler, B. Belohradsky, M. Prieur, A. Aurias, F. L. Raymond, J. Clayton-Smith, E. Hatchwell, C. McKeown, F. A. Beemer, B. Dallapiccola, G. Novelli, J. A. Hurst, J. Ignatius, A. J. Green, R. M. Winter, L. Brueton, K. Brondum-Nielsen, P. J. Scambler, and et al. "Spectrum of Clinical Features Associated with Interstitial Chromosome 22q11 Deletions: A European Collaborative Study." *J Med Genet* 34, no. 10 (1997): 798-804.
- Sadaghiani, B., and C. H. Thiebaud. "Neural Crest Development in the *Xenopus Laevis* Embryo, Studied by Interspecific Transplantation and Scanning Electron Microscopy." *Dev Biol* 124, no. 1 (1987): 91-110.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory., 1989.
- Sanz-Ezquerro, J. J., and C. Tickle. "Digital Development and Morphogenesis." *J Anat* 202, no. 1 (2003): 51-8.
- Sarkar, L., and P. T. Sharpe. "Expression of Wnt Signalling Pathway Genes During Tooth Development." *Mech Dev* 85, no. 1-2 (1999): 197-200.
- Satokata, I., and R. Maas. "Msx1 Deficient Mice Exhibit Cleft Palate and Abnormalities of Craniofacial and Tooth Development." *Nat Genet* 6, no. 4 (1994): 348-56.
- Saunders, J. W., Jr. "Death in Embryonic Systems." *Science* 154, no. 749 (1966): 604-12.
- Scherz, P. J., B. D. Harfe, A. P. McMahon, and C. J. Tabin. "The Limb Bud Shh-Fgf Feedback Loop Is Terminated by Expansion of Former Zpa Cells." *Science* 305, no. 5682 (2004): 396-9.

- Shapiro, B. L., and L. Sweney. "Electron Microscopic and Histochemical Examination of Oral Epithelial-Mesenchymal Interaction (Programmed Cell Death)." *J Dent Res* 48, no. 5 (1969): 652-60.
- Simon, H. "T-Box Genes and the Formation of Vertebrate Forelimb- and Hindlimb Specific Pattern." *Cell Tissue Res* 296, no. 1 (1999): 57-66.
- Simpson, T., M. Gauthier, and A. Prochazka. "Evaluation of Tooth-Click Triggering and Speech Recognition in Assistive Technology for Computer Access." *Neurorehabil Neural Repair* 24, no. 2 (2010): 188-94.
- Sinha, S., S. Abraham, R. M. Gronostajski, and C. E. Campbell. "Differential DNA Binding and Transcription Modulation by Three T-Box Proteins, T, Tbx1 and Tbx2." *Gene* 258, no. 1-2 (2000): 15-29.
- Smiley, G. R., and A. D. Dixon. "Fine Structure of Midline Epithelium in the Developing Palate of the Mouse." *Anat Rec* 161, no. 3 (1968): 293-310.
- Smiley, G. R., and W. E. Koch. "A Comparison of Secondary Palate Development with Different in Vitro Techniques." *Anat Rec* 181, no. 4 (1975): 711-23.
- Smith, M. M., and Z. Johanson. "Separate Evolutionary Origins of Teeth from Evidence in Fossil Jawed Vertebrates." *Science* 299, no. 5610 (2003): 1235-6.
- Stock, D. W. "Zebrafish Dentition in Comparative Context." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308, no. 5 (2007): 523-49.
- Stott, F. J., S. Bates, M. C. James, B. B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K. H. Vousden, and G. Peters. "The Alternative Product from the Human Cdkn2a Locus, P14(Arf), Participates in a Regulatory Feedback Loop with P53 and Mdm2." *EMBO J* 17, no. 17 (1998): 5001-14.
- Suzuki, A., S. Sekiya, D. Buscher, J. C. Izpisua Belmonte, and H. Taniguchi. "Tbx3 Controls the Fate of Hepatic Progenitor Cells in Liver Development by Suppressing P19arf Expression." *Development* 135, no. 9 (2008): 1589-95.
- Takabatake, Y., T. Takabatake, and K. Takeshima. "Conserved and Divergent Expression of T-Box Genes Tbx2-Tbx5 in Xenopus." *Mech Dev* 91, no. 1-2 (2000): 433-7.
- Taniguchi, K., N. Sato, and Y. Uchiyama. "Apoptosis and Heterophagy of Medial Edge Epithelial Cells of the Secondary Palatine Shelves During Fusion." *Arch Histol Cytol* 58, no. 2 (1995): 191-203.

- Trowe, M. O., H. Maier, M. Schweizer, and A. Kispert. "Deafness in Mice Lacking the T-Box Transcription Factor Tbx18 in Otic Fibrocytes." *Development* 135, no. 9 (2008): 1725-34.
- Tucker, A., and P. Sharpe. "The Cutting-Edge of Mammalian Development; How the Embryo Makes Teeth." *Nat Rev Genet* 5, no. 7 (2004): 499-508.
- Tureckova, J., H. Lesot, J. L. Vonesch, M. Peterka, R. Peterkova, and J. V. Ruch. "Apoptosis Is Involved in the Disappearance of the Diastemal Dental Primordia in Mouse Embryo." *Int J Dev Biol* 40, no. 2 (1996): 483-9.
- Tyler, M. S., and W. E. Koch. "In Vitro Development of Palatal Tissues from Embryonic Mice. Iii. Interactions between Palatal Epithelium and Heterotypic Oral Mesenchyme." *J Embryol Exp Morphol* 38 (1977): 37-48.
- Tyler, M. S., and R. M. Pratt. "Effect of Epidermal Growth Factor on Secondary Palatal Epithelium in Vitro: Tissue Isolation and Recombination Studies." *J Embryol Exp Morphol* 58 (1980): 93-106.
- Vaahtokari, A., T. Aberg, J. Jernvall, S. Keranen, and I. Thesleff. "The Enamel Knot as a Signaling Center in the Developing Mouse Tooth." *Mech Dev* 54, no. 1 (1996): 39-43.
- Vainio, S., I. Karavanova, A. Jowett, and I. Thesleff. "Identification of Bmp-4 as a Signal Mediating Secondary Induction between Epithelial and Mesenchymal Tissues During Early Tooth Development." *Cell* 75, no. 1 (1993): 45-58.
- Vaziri Sani, F., K. Hallberg, B. D. Harfe, A. P. McMahon, A. Linde, and A. Gritli-Linde. "Fate-Mapping of the Epithelial Seam During Palatal Fusion Rules out Epithelial-Mesenchymal Transformation." *Dev Biol* 285, no. 2 (2005): 490-5.
- Viriot, L., H. Lesot, J. L. Vonesch, J. V. Ruch, M. Peterka, and R. Peterkova. "The Presence of Rudimentary Odontogenic Structures in the Mouse Embryonic Mandible Requires Reinterpretation of Developmental Control of First Lower Molar Histomorphogenesis." *Int J Dev Biol* 44, no. 2 (2000): 233-40.
- Wee, E. L., and E. F. Zimmerman. "Involvement of Gaba in Palate Morphogenesis and Its Relation to Diazepam Teratogenesis in Two Mouse Strains." *Teratology* 28, no. 1 (1983): 15-22.
- Wilkie, A. O., and G. M. Morriss-Kay. "Genetics of Craniofacial Development and Malformation." *Nat Rev Genet* 2, no. 6 (2001): 458-68.

- Xu, X., J. Han, Y. Ito, P. Bringas, Jr., C. Deng, and Y. Chai. "Ectodermal Smad4 and P38 Mapk Are Functionally Redundant in Mediating Tgf-Beta/Bmp Signaling During Tooth and Palate Development." *Dev Cell* 15, no. 2 (2008): 322-9.
- Yamada, M., J. P. Revelli, G. Eichele, M. Barron, and R. J. Schwartz. "Expression of Chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 Genes During Early Heart Development: Evidence for Bmp2 Induction of Tbx2." *Dev Biol* 228, no. 1 (2000): 95-105.
- Yi, C. H., J. A. Terrett, Q. Y. Li, K. Ellington, E. A. Packham, L. Armstrong-Buisseret, P. McClure, T. Slingsby, and J. D. Brook. "Identification, Mapping, and Phylogenomic Analysis of Four New Human Members of the T-Box Gene Family: Eomes, Tbx6, Tbx18, and Tbx19." *Genomics* 55, no. 1 (1999): 10-20.
- Yu, L., S. Gu, S. Alappat, Y. Song, M. Yan, X. Zhang, G. Zhang, Y. Jiang, Z. Zhang, Y. Zhang, and Y. Chen. "Shox2-Deficient Mice Exhibit a Rare Type of Incomplete Clefting of the Secondary Palate." *Development* 132, no. 19 (2005): 4397-406.
- Yuan, G. H., L. Zhang, Y. D. Zhang, M. W. Fan, Z. Bian, and Z. Chen. "Mesenchyme Is Responsible for Tooth Suppression in the Mouse Lower Diastema." *J Dent Res* 87, no. 4 (2008): 386-90.
- Zhang, Y., Y. Xiong, and W. G. Yarbrough. "Arf Promotes Mdm2 Degradation and Stabilizes P53: Arf-Ink4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and P53 Tumor Suppression Pathways." *Cell* 92, no. 6 (1998): 725-34.
- Zhang, Z., Y. Song, X. Zhao, X. Zhang, C. Fermin, and Y. Chen. "Rescue of Cleft Palate in Msx1-Deficient Mice by Transgenic Bmp4 Reveals a Network of Bmp and Shh Signaling in the Regulation of Mammalian Palatogenesis." *Development* 129, no. 17 (2002): 4135-46.
- Zirzow, S., T. H. Ludtke, J. F. Brons, M. Petry, V. M. Christoffels, and A. Kispert. "Expression and Requirement of T-Box Transcription Factors Tbx2 and Tbx3 During Secondary Palate Development in the Mouse." *Dev Biol* 336, no. 2 (2009): 145-55.
- Zoupa, M., M. Seppala, T. Mitsiadis, and M. T. Cobourne. "Tbx1 Is Expressed at Multiple Sites of Epithelial-Mesenchymal Interaction During Early Development of the Facial Complex." *Int J Dev Biol* 50, no. 5 (2006): 504-10.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, durch deren Unterstützung auf unterschiedlichste Weise diese Arbeit zustande gekommen ist. Mein ganz besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert, der mir diese interessanten Projekte gegeben hat. Auch dafür das er immer Zeit für Diskussionen hatte.

Herrn Prof. Dr. Manstein, für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Marianne Petry, dafür dass sie im Labor immer alles am Laufen gehalten hat und wenn Not am Mann war, auch immer eine helfende Hand bereit hatte.

Herrn Prof. Dr. Vincent Christoffels für die Bereitstellung der benutzten cre-Linien, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Kispert und dem gesamten IfM, insbesondere Timo Lüdtko für die gute Zusammenarbeit.

Juliane Hochschild, meinem Mann, meiner Mama und Frau Kott für das Korrekturlesen der Arbeit.

Meiner Familie, insbesondere meinem Mann für die ständige Geduld mit mir und dafür dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

DANKE!

7. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Susann Placzko geb. Zirzow
Strasse	Heinrich Böll Weg 6
Wohnort	30629 Hannover
E-Mail	SusannPlaczko@gmx.de
Geburtsdatum	03.12.1981
Geburtsort	Hoyerswerda
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Studium

2006 – 2011	Doktorarbeit, Medizinische Hochschule Hannover, IfM, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kispert
2005 – 2006	Masterarbeit, Rijksuniversitaet Groningen, Niederlande, Prof. Dr. Merrow
2004 – 2005	Masterstudium, Fachhochschule Lausitz, Senftenberg
2003 - 2004	Bachelorarbeit, Max-Planck-Insitut Dresden Dr. Dahmann
2000 – 2003	Bachelorstudium, Fachhochschule Lausitz, Senftenberg

Schulbildung

1991 – 2000	G.E. Lessing-Gymnasium, Hoyerswerda
1990 – 1991	Konrad-Zuse-Gymnasium, Hoyerswerda
1986 – 1990	24. OS „Wilhelm Pieck Oberschule“, Hoyerswerda

Veröffentlichung

Zirzow, S., Lüdtkke, T. H., Brons, J. F., Petry, M., Christoffels, V. M., and Kispert A. "Expression and Requirement of T-Box Transcription Factors Tbx2 and Tbx3 During Secondary Palate Development in the Mouse." *Dev Biol* 336, no. 2 (2009): 145-55. *