

„Untersuchungen zur Funktion der
Transkriptionsfaktoren
Tbx18 und Uncx4.1
in der Somitogenese 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

Diplom-Biologin Martina Karin Schmidt
geboren am 31.07.1980 in Berlin

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.09.2006 – 22.09.2010 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert im Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Andreas Kispert

Korreferentin: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn

Tag der Promotion: 20.12.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	V
1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary.....	3
3. Einleitung.....	4
3.1 Die Bildung der kranialen Somiten.....	5
3.2 Die Bildung der kaudalen Somiten.....	9
3.3 Die molekulare Kontrolle der Somitenbildung.....	10
3.4 Die Differenzierung der Somiten.....	15
3.5 Die Resegmentierung.....	17
3.6 Die anterior-posteriore Polarisierung der Somiten.....	18
3.7 Zielsetzung der Arbeit.....	22
4. Materialien und Methoden.....	24
4.1 Laborgeräte.....	24
4.2 Antikörper.....	25
4.3 Chemikalien.....	25
4.4 Enzyme.....	28
4.5 Größenmarker für die Gelelektrophorese.....	28
4.6 Kits.....	28
4.7 Nukleotide.....	29
4.8 Primer.....	30
4.9 Bakterienstämme.....	30
4.10 Gene und Vektoren.....	30
4.11 Versuchstiere.....	32
4.12 Zellen.....	32
4.13 Molekularbiologische Methoden.....	32
4.13.1 Klonierte Konstrukte.....	32
4.13.2 Restriktionsverdau.....	35
4.13.3 Dephosphorylierung des Vektors.....	35
4.13.4 Gelaufreinigung.....	35

4.13.5	Ligation.....	35
4.13.6	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen.....	36
4.13.7	Transformation chemisch-kompetenter Zellen.....	36
4.13.8	Herstellung von Plasmid-DNS.....	36
4.14	Zellbiologische Methoden.....	37
4.14.1	Reporterstudien.....	37
4.15	Mausmethoden.....	38
4.15.1	Verpaarungen.....	38
4.15.2	Gewinnung von Embryonen.....	39
4.15.3	Genotypisierung der Embryonen.....	39
4.15.4	PCRs.....	39
4.15.5	Anfertigung von Gewebedünnschnitten.....	45
4.15.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	45
4.15.7	LacZ-Färbung ganzer Embryonen.....	45
4.15.8	Antikörperfärbung auf ganzen Embryonen.....	46
4.15.9	RNS- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit ganzen Embryonen.....	47
4.15.10	Skelettpräparation.....	50
4.15.11	Nachweis von apoptotischen Zellen mittels LysoTracker.....	50
5.	Ergebnisse.....	51
5.1	Tbx18 und Tbx22 fungieren als Repressoren der <i>Dll1</i> -Transkription in der kranialen Hälfte der Somiten.....	51
5.1.1	Tbx18 und Tbx22 besitzen eine redundante Funktion bei der Somitogenese.....	51
5.1.2	Tbx18 und Tbx22 können direkt an den <i>Dll1</i> -Promotor binden.....	64
5.1.3	Die Rekombination des <i>Pax3-cre</i> - und <i>Tbx18^{cre}</i> -Mausstammes.....	66
5.1.4	Die Missexpression von <i>Tbx18</i> in der kranialen Somitenhälfte hatte keinen Einfluss auf die Somitogenese.....	68
5.1.5	Die Missexpression von <i>Tbx18</i> in der kaudalen Hälfte der Somiten war hinreichend, um einen Verlust der <i>Dll1</i> -Transkription zu verursachen.....	75
5.1.6	Die Expression eines dominant negativen Tbx18-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten war hinreichend, um die <i>Dll1</i> -	

Expression zu aktivieren.....	83
5.1.7 Tbx18 besitzt im Sklerotom eine antiapoptotische Funktion.....	93
5.2 Die Funktion des Notch-Signalweg in den Somiten	102
5.2.1 Der Notch-Signalweges ist im Sklerotom nicht funktionell aktiv.....	102
5.2.2 Die Posteriorisierung des Sklerotom der <i>Tbx18^{GFP/GFP}</i> -Mutante kann durch die Inaktivierung des Notch-Signalweges nicht reduziert werden.....	109
5.2.3 Der Notch-Signalweg ist an der Spezifizierung der kaudalen Hälfte der epithelialen Somiten beteiligt.....	114
5.3 Uncx4.1 ist an der Aufrechterhaltung der <i>Dll1</i> -Expression in den epithelialen Somiten beteiligt.....	119
5.3.1 <i>Uncx4.1</i> ist kein Zielgen des Notch-Signalweges.....	119
5.3.2 Die Missexpression von <i>Uncx4.1</i> in der kranialen Somitenhälfte war hinreichend, um eine Posteriorisierung zu verursachen.....	121
5.3.3 Die Expression von <i>Uncx4.1</i> im PSM beeinflusste nicht die Etablierung der A/P-Polarität.....	128
5.3.4 <i>Uncx4.1</i> fungiert als Repressor.....	136
5.3.5 Der gleichzeitige Verlust von <i>Uncx4.1</i> und <i>Tbx18</i> resultiert in der Abwesenheit der <i>Dll1</i> -Expression in den epithelialen Somiten.....	137
5.3.6 <i>Uncx4.1</i> aktiviert in Anwesenheit des Wnt-Signalweges den <i>Dll1</i> -Promotor <i>in vitro</i>	149
6. Diskussion.....	151
6.1 Die A/P-Polarität wird im PSM von Mausembryonen nicht irreversibel festgelegt.....	151
6.2 Tbx22 und Tbx18 besitzen eine redundante Funktion in der Somitogenese..	152
6.3 Tbx18 und Tbx22 beeinflussen nicht die Etablierung der A/P-Polarität.....	153
6.4 Tbx18 und Tbx22 könnten als Repressoren der <i>Dll1</i> -Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten fungieren.....	154
6.5 Tbx18 fungiert im Sklerotom als antiapoptotischer Faktor.....	158
6.6 Tbx18 ist für die Aufrechterhaltung der Spezifizierung der kranialen Somitenhälfte verantwortlich.....	159
6.7 Der Notch-Signalweg ist in den differenzierten Somiten nicht aktiv.....	160

6.8	Der Notch-Signalweg hat einen Einfluss auf die Differenzierung der Myoblasten.....	161
6.9	<i>Uncx4.1</i> ist kein Zielgen des Notch-Signalweges.....	162
6.10	<i>Uncx4.1</i> ist an der Aufrechterhaltung der <i>Dll1</i> -Expression in den epithelialen Somiten beteiligt.....	163
6.11	Die Regulation von <i>Tbx18</i> , <i>Tbx22</i> und <i>Uncx4.1</i>	165
6.12	<i>Uncx4.1</i> ist für die Aufrechterhaltung der Spezifizierung der kaudalen Somitenhälfte verantwortlich.....	166
6.13	Die Regulierung der Zelldichte der Kompartimente der Somiten ist für die Entwicklung der Wirbel von entscheidender Bedeutung.....	167
7.	Literatur.....	169
8.	Danksagung.....	186
9.	Erklärung.....	187
10.	Lebenslauf.....	188

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
a	anterior
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
AP	anterior-posterior
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	Rinderserumalbumin
ATP	Adenosin 5-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CMV	Cytomegalievirus
cDNS	komplementäre DNS
CO ₂	Kohlendioxid
cre	cyclization recombinase
DAB	3,3 - Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleinsäurephosphat
DTT	Dithiothreol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-Tetraessigsäure
et al.	et alii
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm

Abkürzungen

GFP	green fluorescent protein
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
k	Kilo
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
K ₄ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanidoferrat(II)
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
<i>LacZ</i>	β-Galaktosidase
LB	Luria-Broth-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol pro Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
mol	Mol
n	Nano
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ONPG	2-Nitrophenyl- B-D-galactopyranosid
p	pico
p	posterior
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

<i>p.c.</i>	post coitum
PCR	Ploymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PSM	präsomitisches Mesoderm
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Dodecylsulfatnatriumsalz
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro min
UV	ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
x	-fach
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indyl- β -Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro

1. Zusammenfassung

In den Vertebraten werden die Wirbelsäule, die Skelettmuskeln sowie das Bindegewebe der Haut aus den Somiten gebildet. Diese segmentalen Einheiten des paraxialen Mesoderms sind durch eine A/P-Polarität charakterisiert, die zu einer Unterteilung der Somiten in eine kraniale und eine kaudale Hälfte führt. Der Verlust der A/P-Polarität verursacht schwere Skelettdefekte. Somit ist die korrekte Ausbildung der Polarisierung der Somiten für die reguläre Entwicklung der Wirbel notwendig.

Die Etablierung der A/P-Polarität erfolgt in dem kranialen Bereich des PSM durch eine Interaktion des Notch-Signalweges mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor *Mesp2*. Die Expression von *Mesp2* wird in dem kranialen PSM durch den Notch-Signalweg und *Tbx6* induziert und anschließend auf die kraniale Hälfte des Somitomers S-1 begrenzt. In dieser Hälfte des zukünftigen Somiten stabilisiert *Mesp2* die Glykosyltransferase *Lfng*, welche die Notch-Rezeptoren moduliert und somit eine Inaktivierung des Notch-Signalweges in dieser Hälfte verursacht. In der kaudalen Hälfte des Somitomers S-1 bleibt die Aktivität des Notch-Signalweges erhalten. Die Begrenzung der *Mesp2*-Expression auf den Somitomeren S-1 bei einer Aufrechterhaltung der Aktivität des Notch-Signalweges in den epithelialen Somiten lässt vermuten, dass die Repression dieses Signalweges in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten durch einen anderen Faktor vermittelt wird. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass zwei T-Box-Transkriptionsfaktoren, *Tbx18* und *Tbx22*, welche in der kranialen Hälfte der Somiten exprimiert sind, für die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität durch die Repression der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten verantwortlich sind. *In vitro*-Daten lassen vermuten, dass *Tbx18* und *Tbx22* direkt an den *Dll1*-Promotor binden können. Weiterhin wurde in dieser Arbeit *Uncx4.1*, ein paired-related Homöobox-Transkriptionsfaktor, welcher in der kaudalen Hälfte der Somiten exprimiert ist, als ein Faktor, der an der Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten beteiligt ist, identifiziert. Der Verlust von *Uncx4.1* resultiert in einem Verlust der *Dll1*-Expression und einer Anteriorisierung der Somiten. *In vitro*-Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass *Uncx4.1* einen Repressor des Wnt-Signalweges reprimiert und somit die *Tbx6*/Wnt-Signalweg-vermittelte Aktivierung der *Dll1*-Transkription im PSM in den epithelialen Somiten aufrechterhält. Des Weiteren konnte gezeigt

1. Zusammenfassung

werden, dass der Notch-Signalweg in den epithelialen Somiten, jedoch nicht in den differenzierten Somiten für die Entwicklung der Wirbelsäule notwendig ist. Aus diesem Grund hat Tbx18 im Sklerotom eine andere Funktion als in den epithelialen Somiten. Im Sklerotom besitzt Tbx18 eine antiapoptotische Funktion und hält so die A/P-Polarität der Somiten aufrecht.

Folglich ist in dieser Arbeit gezeigt worden, dass ein Zusammenwirken transkriptioneller Regulatoren nicht nur bei der Etablierung der A/P-Polarität, sondern auch bei deren Aufrechterhaltung eine Rolle spielt.

Schlüsselbegriffe: Somiten, A/P-Polarität, *Tbx18*, *Uncx4.1*

2. Summary

In vertebrates, the axial skeleton, skeletal muscles and dorsal dermis arise from somites. These transient, segmentally organized mesodermal structures are polarized along their A/P-axis, leading to a subdivision into a cranial and a caudal somite compartment. Disruption of the somitic A/P polarity results in severe malformations of the axial skeleton indicating that this compartmentalization is essential for the proper formation of vertebrae and ribs.

A/P-polarization is established in the anterior PSM by an interaction of the Delta/Notch signalling pathway with *Mesp2*, a bHLH transcription factor. *Mesp2* expression is induced in the cranial part of the PSM by *Tbx6* and Notch signalling. Subsequently, the expression of *Mesp2* becomes restricted to the cranial half of somite S-1 where it stabilizes the glycosyltransferase, *Lfng*, a modulator of Notch receptors. As a consequence Notch signalling is suppressed in the cranial half of somite S-1 but is maintained in the caudal compartment. While the expression of *Mesp2* is restricted to somite S-1, Notch signalling, indicated by the expression of the Notch ligand *Dll1*, is maintained in the caudal halves of epithelial somites. The restriction of *Mesp2* expression to somite S-1 indicates that suppression of Notch signalling in the caudal half of epithelial somites is mediated by a different component. Our studies have shown that two T-box transcription factors, *Tbx18* and *Tbx22*, expressed in anterior somite halves, are crucial for the maintenance of the A/P polarity by repressing *Dll1* transcription in the cranial halves of epithelial somites. Loss of *Tbx18* or combined loss of *Tbx18* and *Tbx22* lead to a posteriorization of somites similar to loss of function mutants of Notch pathway components. *In vitro* data indicate that *Tbx18* and *Tbx22* can directly bind to the *Dll1* promoter. Furthermore, we have identified *Uncx4.1*, a paired-type homeodomain transcription factor, expressed in the posterior compartment of the somites, as a factor involved in maintaining the *Dll1* expression in epithelial somites. Loss of *Uncx4.1* results in a loss of *Dll1* expression and an anteriorization of the somites. *In vitro* data suggest that *Uncx4.1* represses a repressor of the Wnt pathway thereby maintaining the *Tbx6*/Wnt-mediated activation of *Dll1* expression of the PSM in the somites. We have further shown that Notch signaling in epithelial somites but not in differentiated somites is crucial for the development of the vertebral column. Therefore the function of *Tbx18* in the sclerotome is different to its function in epithelial somites. In the sclerotome, *Tbx18* prevent apoptosis of the cranial cells thereby maintaining A/P-polarization in this mesenchymal structure.

Our results suggest that a network of transcriptional modulators functions not only in establishing a AP-polarity in somites but also in maintaining this polarization.

Key words: somite, A/P-polarity, *Tbx18*, *Uncx4.1*

3. Einleitung

Ein Charakteristikum des Subphylums der Vertebraten (Phylum Chordata) ist der Besitz einer Wirbelsäule. Die Entstehung dieser inneren Stützstruktur ist aus evolutionsbiologischer Sicht eng mit einer Zunahme der Körpergröße gekoppelt. Bei Arthropoden, die sich durch den Besitz einer äußeren Stützstruktur, dem Exoskelett, auszeichnen, ist eine Größenzunahme der Organismen nur begrenzt möglich. Das Eigengewicht des Exoskeletts wäre für größere Tiere zu hoch und würde zudem die Fortbewegung stark beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu, erlaubt ein Endoskelett und seine assoziierte Axialmuskulatur dem Organismus neben der notwendigen Stabilität auch ein hohes Maß an Mobilität. Zusätzlich ermöglichte der evolutionsbiologische Erwerb einer inneren Stützstruktur dem Organismus ein kontinuierliches Wachstum während der Entwicklung (Milton 2003).

Das Endoskelett der Vertebraten, die Wirbelsäule, setzt sich aus mehreren einheitlichen knöchernen Elementen, den Wirbeln und den dazwischenliegenden knorpeligen Zwischenwirbelscheiben zusammen. Während der embryonalen Entwicklung der Vertebraten werden Vorläuferstrukturen dieser Skelettelemente angelegt, die Somiten. Die morphologischen und molekularen Vorgänge, die zur Bildung der Somiten führen, sind bereits gut erforscht worden, wobei der Modellorganismus Maus, aufgrund des hier gut etablierten genetischen Analyseverfahrens, eine wesentliche Rolle gespielt hat. Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass für die Entwicklung der Wirbel nicht nur die korrekte Bildung der Somiten, sondern auch die Etablierung einer dorso-ventralen und anterior-posterioren Achse (A/P-Achse) in diesen Vorläuferstrukturen eine entscheidende Rolle spielt (Takahashi et al. 2003). Die Störung dieser Polarisierung der Somiten verursacht häufig embryonale Letalität. Insofern ist die Erforschung der genetischen Wechselbeziehungen, die diese Kompartimentierung regulieren, von besonderem Interesse.

3.1 Die Bildung der kranialen Somiten

Die Vorläuferstrukturen der Wirbel, die Somiten, sind definiert als die segmentalen Einheiten des paraxialen (somitischen) Mesoderms. Das paraxiale Mesoderm wird zu beiden Seiten des Neuralrohrs und dem darunterliegenden axialen Mesoderm, dem Notochord, angelegt. Zusammen mit dem axialen Mesoderm und dem weiter lateral gelegenen intermediären Mesoderm und dem Seitenplattenmesoderm bildet das paraxiale Mesoderm die intraembryonale Mesodermischiicht der Amnioten (Abb.3.1.1) (Christ et al. 1995).

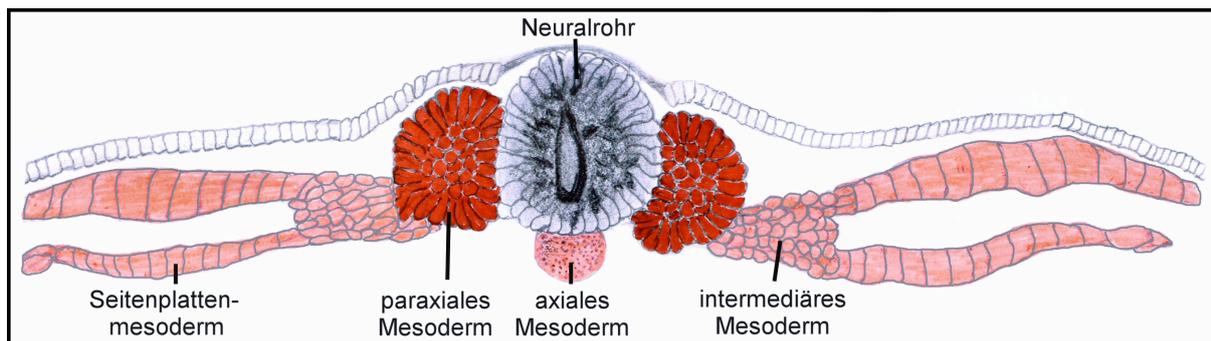


Abb.3.1.1: Schema der mesodermalen Komponenten eines amniotischen Embryos (in Anlehnung an Gilbert 2006 gezeichnet)

Das Mesoderm entwickelt sich bei dem Modelorganismus Maus aus Zellen des Epiblasten, die während der Gastrulation (embryonaler Tag 6.5-8.5) durch den Primitivstreifen einwandern und sich als Mesodermischiicht zwischen dem Ektoderm und dem Endoderm organisieren (Abb.3.1.2 A) (Poelmann et al. 1981; Tam et al. 2000). Der Zeitpunkt und die Position entlang der A/P-Achse, an der die Einwanderung der Zellen durch den Primitivstreifen stattfindet, haben einen Einfluss auf ihr mesodermales Schicksal. So werden die Zellen, die sich am ersten Tag der Gastrulation (E6.5-E7.5) zwischen dem Ektoderm und dem Endoderm einlagern, dem extraembryonischen, dem Kopf- und dem Herzmesoderm zugeordnet. Im weiteren Verlauf der Gastrulation (ab E7.5) wandern im kranialen Bereich des Primitivstreifens die ersten Vorläuferzellen des paraxialen Mesoderms ein. Diese Vorläuferzellen kondensieren entlang des axialen Mesoderms zu zwei longitudinalen Gewebestreifen, die den kranialen Bereich des paraxialen Mesoderms bilden. Zellen, die sukzessive weiter kaudal durch den Primitivstreifen einwandern, bilden nach und nach das lateral an das paraxiale Mesoderm angrenzende intermediäre Mesoderm und das Seitenplattenmesoderm (Abb.3.1.2 A) (Tam et al. 1987; Lawson et al. 1991; Lawson et al. 1992).

3. Einleitung

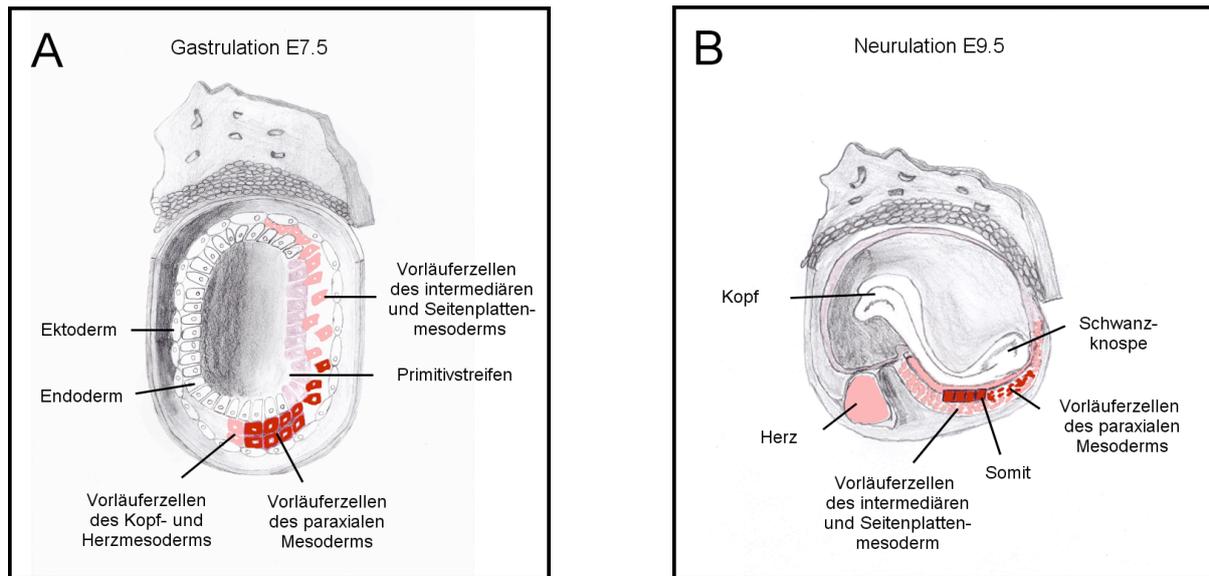


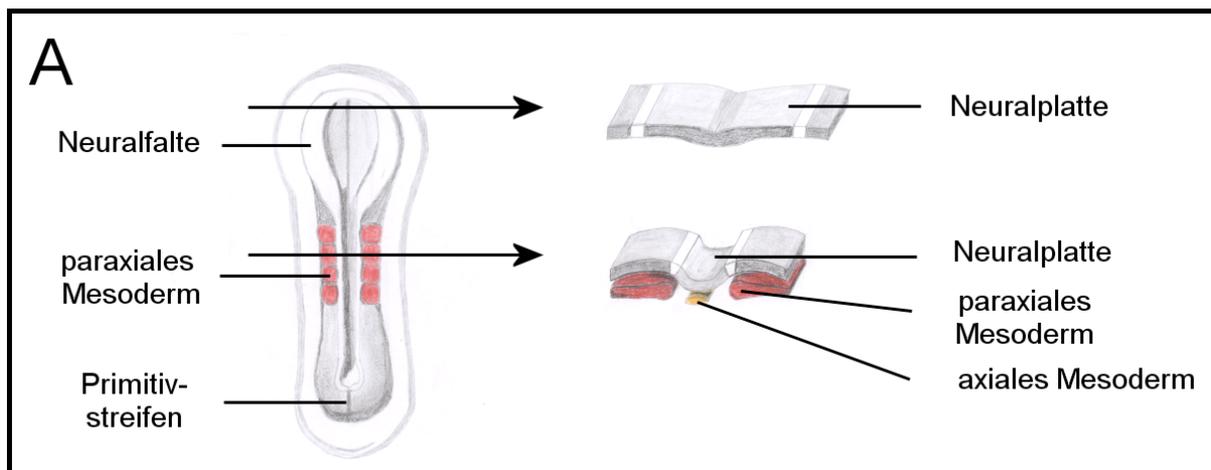
Abb.3.1.2: Gastrulation und Neurulation eines Mausembryos; A: Zellen des Ektoderms wandern bei der Gastrulation durch den Primitivstreifen ein und bilden das Mesoderm; B: Das bereits gebildete paraxiale Mesoderm segmentiert im kranialen Bereich des Embryos; Im kaudalen Bereich des Embryos wandern weitere mesodermbildende Zellen durch den Primitivstreifen ein; (in Anlehnung an Müller, Hassel 2003; Wolpert 2011 gezeichnet)

Im Verlauf der Neurulation wird der Primitivstreifen sukzessiv nach kaudal verlagert und nimmt nach und nach in seiner Gesamtlänge ab (Abb.3.1.3 A) (Poelmann et al. 1981). Dieser Prozess ist gleichbedeutend mit der Verlagerung der Einwanderung der Mesodermvorläuferzellen in den kaudalen Bereich des Embryos (Abb.3.1.2 B). Diese Vorläuferzellen bilden den weiter kaudal gelegenen Bereich des kranialen paraxialen Mesoderms. Jedoch bleiben Vorläuferzellen dieses Mesoderms mit Stammzellcharakter im Primitivstreifen auch nach dessen Zurückbildung über einen bestimmten Zeitraum erhalten (Tam et al. 1987; Tam et al. 1992; Wilson et al. 1996). Während so im kaudalen Bereich des Embryos weitere Vorläuferzellen des kranialen paraxialen Mesoderms durch den Primitivstreifen einwandern, werden kranial bereits die am meisten anterior gelegenen Somiten aus den ersten Mesodermzellen gebildet (Abb.3.1.2 B) (Gossler 2002).

Bei der Mesodermbildung spielen Zell-Zell-Interaktionen eine wichtige Rolle. Signalwege, die diese Interaktion vermitteln, gehören dem Wnt-Signalweg und dem Fgf-Signalweg an. Zudem wurde einem Protein aus der Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren, Tbx6, eine Funktion bei der Spezifizierung des Mesoderms zugeschrieben. Sowohl *Wnt3a*, wie auch *Fgfr1* bzw. *Tbx6* sind in den Zellen des Primitivstreifens exprimiert (Takada et al. 1994; Herrmann et al. 1991; Chapman et al. 1996; Yamaguchi et al. 1992). Mutationen in diesen Genen resultieren in ektopischen neuralen tubulären Strukturen ventral des Notochords, die auf eine Akkumulation der einwandernden Zellen um den Primitivstreifen und eine

Differenzierung dieser Zellen in neurale Strukturen anstelle paraxialem Mesoderm zurückzuführen sind (Yamaguchi et al. 1992; Yoshikawa et al. 1997; Yamaguchi et al. 1999; Chapman et al. 1998). Somit haben diese Gene einen Einfluss auf die Migration der einwandernden Zellen und auf ihre Differenzierung zu paraxialem Mesoderm.

Weiterhin ändern zu diesem Zeitpunkt die Zellen des Ektoderms, die sich dorsal zu dem axialen Mesoderm befinden und somit der Neuralplatte zugeordnet sind, ihre Gestalt. Diese Zellen, aus denen das Neuralrohr hervorgeht, werden im Vergleich zu den ektodermalen Zellen der zukünftigen Epidermis durch Zellbewegungen stark verlängert und verdichtet. Zusätzlich initiiert das Notochord die Formänderung der Zellen in der Mittellinie der Neuralplatte. Diese verringern ihre Ausdehnung und nehmen eine keilförmige Gestalt an (Smith et al. 1989; Straaten et al. 1988). Die Gestaltänderung der Zellen wird durch die Umorganisation von Mikrofilamenten erreicht. Cytochalasin B inhibiert die Bildung kontraktile Mikrofilamente und verhindert die Entstehung keilförmiger Zellen in der Mittellinie der Neuralplatte, was zu Neuralrohrdefekten führt (Burnside et al. 1973; Karfunkel et al. 1971; Nagele et al. 1987). Durch die Formänderung der Zellen in der Mittellinie der Neuralplatte biegen sich die lateralen Bereiche der Neuralplatte nach oben und verschmelzen im Bereich der dorsalen Mittellinie zum Neuralrohr (Abb.3.1.3 A; B; C). Infolge dieser Zellbewegungen wird das paraxiale Mesoderm zu beiden Seiten des Neuralrohrs positioniert (Smith et al. 1997).



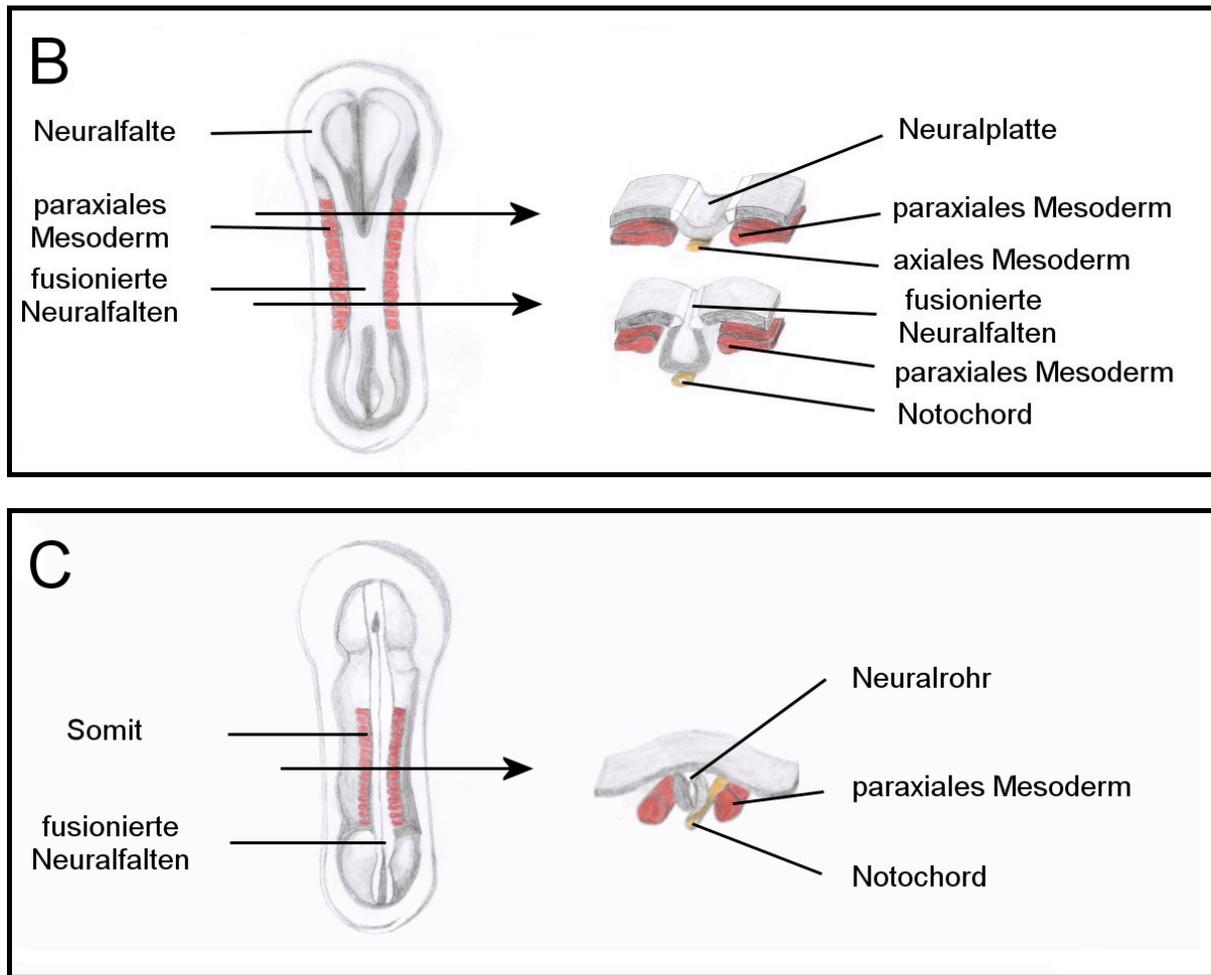


Abb.3.1.3: Neurulation eines Mausembryos; A: Der Primitivstreifen wird sukzessiv nach kaudal verlagert; Die Zellen der Neuralplatte verändern ihre Form; B: Durch die Formänderung der Zellen der Neuralplatte biegen sich die lateralen Bereiche der Neuralplatte nach oben; C: Die lateralen Bereiche der Neuralplatte verschmelzen im Bereich der dorsalen Mittellinie zum Neuralrohr; (gezeichnet nach Gammill et al. 2003;Hansen 2005)

Am Ende der Neurulation hat sich der Primitivstreifen in der Maus, bis auf einen schmalen Bereich am kaudalen Ende des Embryos, der Schwanzknospe, komplett zurückgebildet (Schoenwolf et al. 1984; Griffith et al. 1992). Die weitere Produktion der Vorläuferzellen des paraxialen Mesoderms ist somit vom Embryonaltag 9.5 an bis zu dessen vollständiger Bildung am Embryonaltag E13.5 auf den kaudalen Bereich des Embryos begrenzt. Aus den Zellen, die aus der Schwanzknospe hervorgehen, entsteht das kaudale paraxiale Mesoderm. Die Bildung dieser Mesodermvorläuferzellen in der Schwanzknospe erfolgt auf dieselbe Weise wie im Primitivstreifen: durch Einwanderung ektodermaler Zellen in das Innere des Embryos bzw. durch Teilung von Zellen mit Stammzellcharakter (Tam et al. 1992). Im Zuge der Verlängerung der A/P-Achse werden die in der Schwanzknospe gebildeten Mesodermvorläuferzellen sukzessiv dem kaudalen unsegmentierten Bereich des paraxialen

Mesoderms, dem sogenannten präsomitischen Mesoderm (PSM), zugeordnet (Griffith et al. 1992).

3.2 Die Bildung der kaudalen Somiten

Die kaudalen Somiten werden als segmentalen Einheiten des PSM definiert. Diese Somiten werden am kranialen Ende des PSM gebildet, indem sich eine Gruppe von Zellen von dieser mesodermalen Struktur separiert. Die so entstehenden Somiten, besitzen ein Epithel, das ein Lumen bestehend aus mesenchymalen Zellen, das Somitocoel, umfasst. Somiten sind durch den Besitz einer Basallamina charakterisiert, die über extrazelluläre Matrixkomponenten mit den sie umgebenden Strukturen verbunden ist (Jacob et al. 1982).

Bevor die Zellen des PSM zur Bildung eines Somiten beitragen, durchlaufen sie einen Reifungsprozess. Dadurch erwerben sie die Fähigkeit, sich an dessen kranialen Ende abgrenzen zu können. Als erstes morphologisches Anzeichen der regelmäßigen Segmentierung des kranialen PSM konnte mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie die Unterteilung dieses Bereiches in Somitomere nachgewiesen werden. Ein Somitomer ist durch die lose Anordnung mesenchymaler Zellen um einen zentralen Punkt gekennzeichnet, der auf veränderte adhäsive Eigenschaften dieser Zellen schließen lässt (Tam et al. 1994; Tam et al. 1986). Diese veränderten Adhäsionskräfte führen zu einer Mesenchym-Epithel-Transformation der Oberflächenzellen des PSM, wodurch sich diese Gruppe von Zellen von diesem separiert und einen epithelialen Somiten bildet. Für die bessere Unterscheidung der einzelnen Somiten entlang der A/P-Achse wurde eine Nomenklatur eingeführt. Der als letztes abgetrennte Somit wird gemäß dieser Nomenklatur als S+1 bezeichnet. Demzufolge wird der am meisten kranial gelegene Bereich des PSM als S0 benannt, gefolgt von den sich anschließenden Somitomeren S-1, S-2, usw (Abb.3.2.1) (Pourquie et al. 2001).

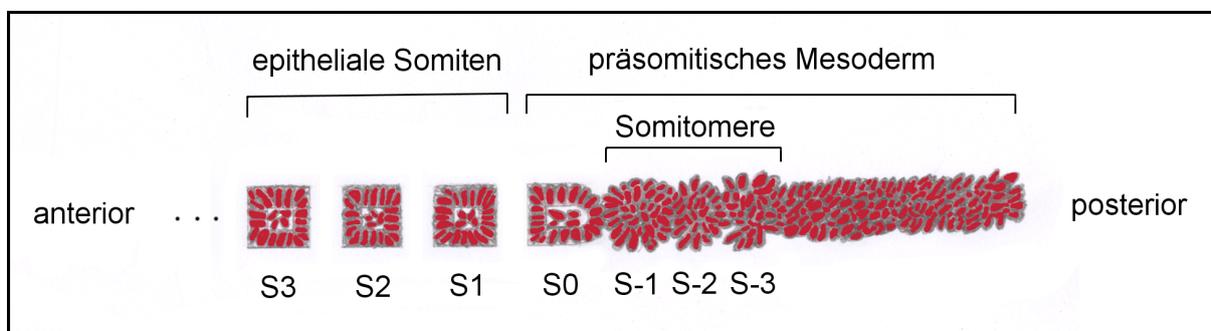


Abb.3.2.1: Schematische Darstellung der Bildung der Somiten am kranialen Ende des PSM (in Anlehnung an Gossler 2002 gezeichnet)

Der Prozess der Somitenbildung findet synchron in beiden paraxialen Mesodermstreifen statt und wiederholt sich im Modellorganismus Maus alle 2h bis am Embryonaltag 13.5 alle 65 Somiten gebildet wurden (Gossler 2002). Um zu gewährleisten, dass die Somitenbildung bis zu diesem Entwicklungsstadium fortschreiten kann, wird die Anzahl der Zellen, die bei der Bildung eines Somitenpaares am kranialen Ende des PSM abgetrennt wird, von der Schwanzknospe dem kaudalen Ende wieder hinzugefügt (Griffith et al. 1992).

3.3 Die molekulare Kontrolle der Somitenbildung

Theoretische Modelle wurden postuliert, welche die periodische Bildung von Somiten erklären sollen. Neuste Forschungsergebnisse favorisieren das „Clock and Wavefront“ („Uhr und Wellenfront,“) –Modell (Crooke et al. 1976). Nach diesem Modell hängt die Segmentierung des PSM von zwei Faktoren ab: von oszillierenden Genen (welche die Funktion einer intrinsischen Uhr haben) und von Genen mit einem kaudal-kranialen Expressionsgradienten (der Wellenfront). Dieser Gradient verursacht eine Reifung der Zellen, so dass sie nach dem Durchlaufen der Wellenfront die Fähigkeit zur Somitenbildung besitzen. Gene, die einen kaudal-kranialen Gradienten hinsichtlich ihrer Expression im PSM besitzen, sind *Fgf8* und *Wnt3a* (Debrulle et al. 2004; Aulehla et al. 2008). Dieser Gradient entsteht durch die Begrenzung der Genexpression auf die Zellen der Schwanzknospe. Werden diese Zellen dem PSM zugeordnet, wird die Expression von *Wnt3a* und *Fgf8* beendet. Somit wird zeitlich versetzt ebenfalls die Proteinsynthese unterbunden, sodass ein Konzentrationsgradient des Proteins entlang der kaudal-kranialen Achse entsteht (Debrulle et al. 2004; Aulehla et al. 2008). Da der Verlust von *Wnt3a* in Mausmutanten in einer Abwesenheit des Fgf-Liganden resultiert, scheint die Expression von *Fgf8* abhängig von *Wnt3a* zu sein (Aulehla et al. 2003). Ein weiterer Faktor, der die Genexpression von *Fgf8* auf den kaudalen Bereich des PSM begrenzt, ist Retinsäure. Das Enzym, welches die Synthese von Retinsäure katalysiert, das Genprodukt von *Raldh2*, wird ebenfalls als Gradient, jedoch in kranialer-kaudaler Richtung, im PSM exprimiert (Vermot et al. 2005). Die Anwesenheit von Retinsäure in diesem Bereich resultiert in einer Inhibierung von *Fgf8* im kranialen PSM. Experimente im Modellorganismus Hühnchen zeigten, dass die Missexpression von Retinsäure mit Hilfe von Retinsäure-getränkten Kügelchen im kaudalen PSM zu einem Verlust von *Fgf8* führt (Corral 2003). Gleichzeitig reguliert *Fgf8* CYP26, ein Enzym, welches für den Abbau von Retinsäure verantwortlich ist (Abu-Abed 2001). Somit wirken *Fgf8* und Retinsäure antagonistisch aufeinander und gewährleisten, dass lediglich im kranialen Bereich des PSM die Expression von *Fgf8* unter einen definierten Schwellenwert sinkt (Abb.3.3.1).

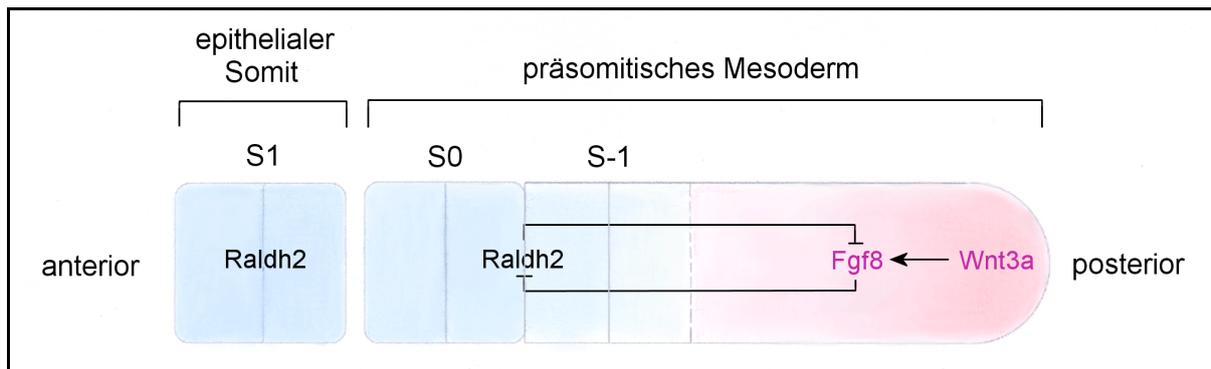


Abb.3.3.1: Schematische Darstellung des antagonistischen Zusammenwirkens von *Wnt3a/Fgf8* und Retinsäure im PSM

Diese Reduzierung der Proteinkonzentration von Fgf8 und die damit verbundene Herunterregulierung der Expression von Zielgenen des Fgf-Signalweges (z.B. *Snai*-Gene (Dale et al. 2006)) im kranialen Bereich des PSM korreliert mit der Induktion der Genexpression von Adhäsionsmolekülen, wie *Integrinen* und *Cadherinen* (Linask et al. 1998; Duband et al. 1987; Horikawa et al. 1999). Die Aktivierung der Adhäsionsmoleküle geht mit der Ablagerung einer Basallamina einher, die als Zeichen der beginnenden Epithelialisierung im Zuge der Somitenbildung die Oberflächenzellen des kranialen PSM umgibt. Die Geschwindigkeit, mit der die Zellen des PSM den Gradienten (die Wellenfront) von kaudal nach kranial durchlaufen, bestimmt die Größe der Somiten. So führt die Inhibierung des Fgf-Signalweges zu einer Verkürzung der Wellenfront, was die Bildung breiterer Somiten bewirkt (Dubrulle et al. 2001; Sawada 2001). Umgekehrt verursacht die Missexpression von Fgf im kranialen Bereich des PSM im Hühnchen eine Verlängerung der Wellenfront und somit die Bildung schmalere Somiten (Dubrulle et al. 2001; Sawada 2001). Demnach ist die Wellenfront für die Inhibierung der Somitenbildung im kaudalen PSM und für die Bildung von Somiten einer bestimmten Größe notwendig.

Der zweite die Segmentierung des PSM beeinflussende Faktor, der Oszillator, ist für die periodische Bildung der Somiten verantwortlich. Zyklische Gene im PSM gehören sowohl dem Notch-Signalweg als auch dem Wnt-Signalweg bzw. dem Fgf-Signalweg an. Nach Postulierung des „Clock and Wavefront“ („Uhr und Wellenfront,“) -Modells wurde der Notch-Signalweg als die zentrale Komponente der intrinsischen Uhr angesehen, da sowohl die Zielgene des Signalweges *Hes1*, *Hes5*, *Hes7*, *Hey1* (Jouve et al. 2000; Bessho et al. 2001b) als auch *lunatic fringe* (*Lfng*) (Forsberg et al. 1998), eine Glykosyltransferase, die den Notch-Rezeptor modifizieren kann, eine zyklische Expression im PSM aufweisen. Die Oszillation der Notch-Signalweg-Komponenten wird über ihre eigene Proteinaktivität reguliert. So

3. Einleitung

kodieren die *Hes*-Gene für Transkriptionsrepressoren, die, nachdem ihre Konzentration mit anhaltender Aktivität des Notch-Signalweges während eines Zyklus einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, ihre eigene Transkription (Bessho et al. 2001b; Hirata et al. 2002) wie auch die von *Lfng* hemmen (Bessho et al. 2001b). Für die letztendliche Inhibierung der Aktivität des Signalweges glykosyliert *Lfng* den Notch-Rezeptor (Bessho et al. 2001b; Morimoto et al. 2005; Niwa et al. 2007). Dadurch wird die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden, Delta-like1 (*Dll1*), unterbunden. Die mRNA von *Lfng* als auch das Protein sind durch eine kurze Halbwertszeit charakterisiert. Infolgedessen wird gewährleistet, dass nach kurzer Zeit die Inhibition des Notch-Rezeptors aufgehoben wird und ein neuer Zyklus beginnen kann (Abb.3.3.2).

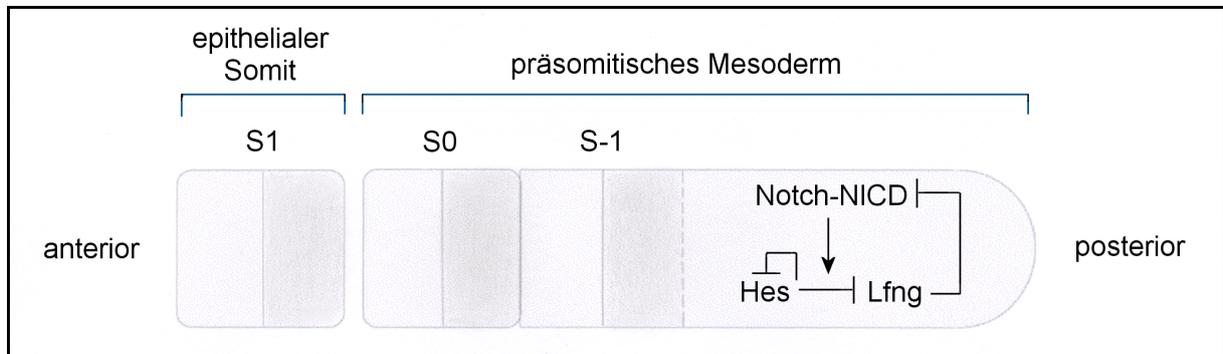


Abb.3.3.2: Schematische Darstellung der zyklischen Aktivierung des Notch-Signalweges im PSM; Die Oszillation der Komponenten dieses Signalweges wird über ihre eigene Proteinaktivität reguliert

Zu den zyklischen Komponenten des Wnt-Signalweges gehören unter anderem *Axin2*, *dapper homologue 1 (Dact1)* und *dickkopf homologue 1 (Dkk1)* (Dequeant et al. 2006), die, ähnlich wie die *Hes*-Gene des Notch-Signalweges, die Aktivität des eigenen Signalweges inhibieren können. Eine vergleichbare Situation entsteht beim Fgf-Signalweg. Inhibitoren dieses Signalweges mit zyklischer Expression im PSM sind *sprouty homologue 2 (Spry2)* und *dual specificity phosphatase 6 (Dusp6)* (Dequeant et al. 2006). Neuste Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die drei Signalwege netzwerkartig miteinander verbunden sind. Mausembryonen, die durch einen Verlust des Fgf-Signalweges charakterisiert sind, weisen keine zyklische Expression von *Lfng* auf (Wahl et al. 2007). Andererseits führt die Abwesenheit der Aktivität des Notch-Signalweges zu einer Herunterregulierung von Fgf-Zielgenen, wie *Dusp6* (Ferjentsik et al. 2009). Weiterhin ist für die Expression einiger Zielgene des Notch-Signalweges, wie *Dll1* und *Lfng* (Hofmann et al. 2004; Galceran 2004), bzw. der des Fgf-Signalweges, wie *Fgf8* und *Dusp6* (Aulehla et al. 2003; Dale et al. 2006), die Aktivität des Wnt-Signalweges erforderlich. Im Gegensatz dazu, ist die Expression von

Axin2, als Zielgen des Wnt-Signalweges, in Mausembryonen, die durch einen Verlust des Notch-Signalweges (Ferjentsik et al. 2009) bzw. des Fgf-Signalweges (Wahl et al. 2007) gekennzeichnet sind, stark beeinträchtigt (Abb.3.3.3).

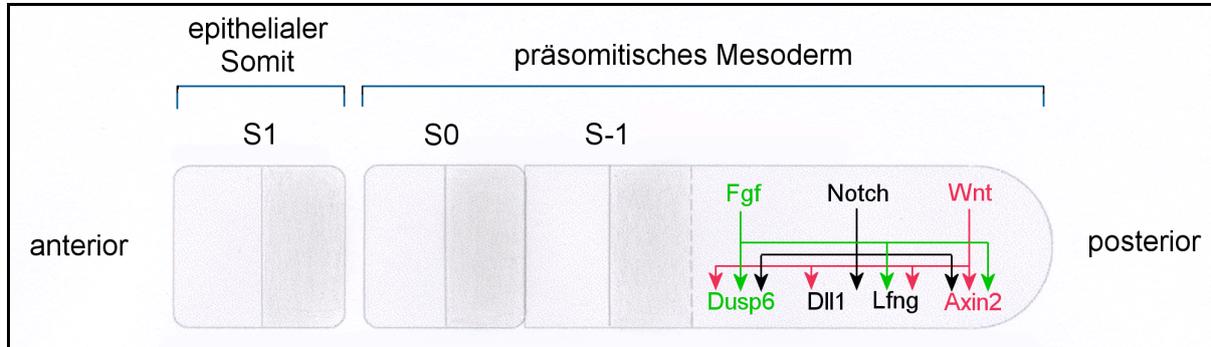


Abb.3.3.3: Schematische Darstellung der Wechselbeziehungen zwischen dem Notch-, dem Fgf- und dem Wnt-Signalweges

Aufgrund dieser Wechselbeziehungen zwischen den drei Signalwegen kann der Notch-Signalweg nicht als alleinige Komponente der intrinsischen Uhr angesehen werden. Vielmehr führt die gemeinsame Aktivität mehrerer Oszillatoren im PSM dazu, dass in dessen kranialen Bereich die Expression zyklischer Gene stabilisiert wird, wie z.B. die von *Lfng*, bzw. Gene induziert werden, die für die Bildung und Kompartimentierung eines Somiten notwendig sind. Eines der Schlüsselveile, welches sowohl die Kompartimentierung als auch die Abgrenzung eines epithelialen Somiten vom PSM reguliert, ist *mesoderm posterior 2 (Mesp2)*. Dieser Transkriptionsfaktor wird von dem Notch-Signalweg zusammen mit *Tbx6*, dessen Expression in den Zellen, die von der Schwanzknospe dem PSM zugeordnet werden, erhalten bleibt, aktiviert (Yasuhiko et al. 2006). Die anfängliche *Mesp2*-Expression erstreckt sich über die gesamte Breite des Somitomers S-2 (Morimoto et al. 2005; Takahashi et al. 2000). Im kaudalen Bereich des PSM wird die Expression dieses Transkriptionsfaktors durch die Anwesenheit von *Fgf8* inhibiert (Yasuhiko et al. 2006; Delfini et al. 2005). Im Zuge der Kompartimentierung der Somiten wird *Mesp2* auf die kraniale Hälfte des Somitomers S-1 begrenzt (Morimoto et al. 2005; Takahashi et al. 2000). In dieser Hälfte des zukünftigen Somiten induziert *Mesp2* die Genexpression des *Ephrin-Rezeptors A4 (EphA4)* (Nakajima et al. 2006). Die Bindung des Liganden *EphrinB2* an diesen Rezeptor verursacht über dessen Phosphorylierung der Tyrosinreste die Aktivierung des Ephrin-Signalweges. Dieser kontrolliert die Reduktion der Genexpression einer GTPase der Rho-Familie, der *cell division cycle 42 homologue (Cdc42)* (Watanabe et al. 2009; Nakaya et al. 2004). Experimente in Hühnchenembryonen zeigten, dass die reduzierte Aktivität von *Cdc42* an der kaudalen

3. Einleitung

Grenze des Somitomers S0 für die Mesenchym-Epithel-Transformation notwendig ist (Nakaya et al. 2004). Im Modellorganismus *Xenopus laevis* bewirkt die Aktivierung des Ephrin-Signalweges darüber hinaus eine Ansammlung von Integrin α 5 an der kranialen Grenze des PSM (Kragtorp et al. 2007). Integrine sind Rezeptoren für extrazelluläre Matrixkomponenten, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen. Zu den extrazellulären Matrixkomponenten, die im murinen kranialen PSM nachgewiesen wurden, gehört Fibronectin (Georges-Labouesse et al. 1996). Die Bindung dieses Glykoproteins an den Integrin α 5-Rezeptor resultiert in der Ablagerung einer Basallamina um diese Zellen, welche zudem über den Rezeptor an das Zytoskelett der Zellen gebunden wird. Die Ablagerung der Basallamina um die Zellen des kranialen PSM ist eine Voraussetzung für die Mesenchym-Epithel-Transformation im Zuge der Somitenbildung (Abb.3.3.4).

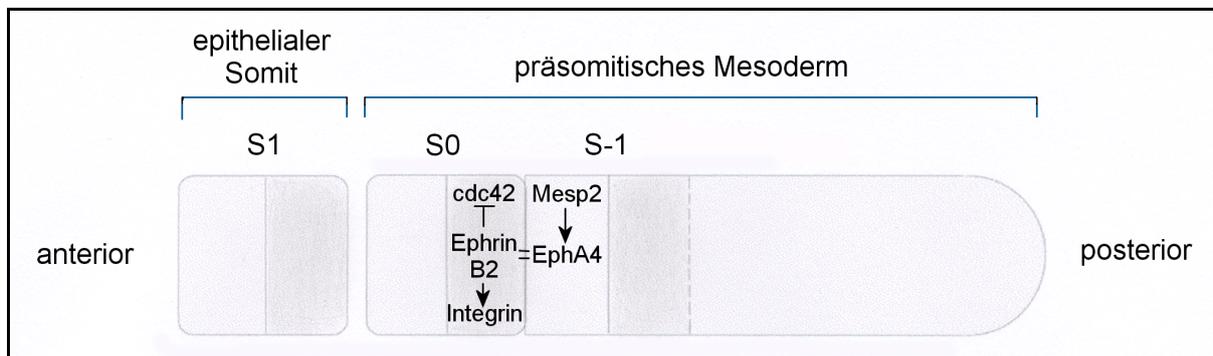


Abb.3.3.4: Schematische Darstellung des Zusammenwirkens zwischen Mesp2 und den Komponenten des Ephrin-Signalweges bei der Abtrennung der Somiten vom PSM

Zusätzlich ist für die Epithelialisierung der Oberflächenzellen des PSM eine erhöhte Expression der Zelladhäsionsmoleküle *neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1)* und *cadherin2 (Cdh2)* notwendig (Duband et al. 1987; Duband et al. 1988; Probstmeier et al. 1994). Als Konsequenz der Expression dieser Adhäsionsproteine organisieren sich die mesenchymalen Zellen zu einem Epithel. Genetische Analysen deuten ferner darauf hin, dass ein weiterer Transkriptionsfaktor, *transcription factor 15 (Tcf15)*, eine Funktion bei der Epithelbildung des kranialen PSM hat. Mausmutanten, die durch einen Verlust von *Tcf15* gekennzeichnet sind, bilden somitenähnliche mesenchymale Zellaggregate, die von keiner Epithelschicht umgeben sind (Burgess et al. 1996). Für die Aktivität von *Tcf15* ist eine zweite GTPase der Rho-Familie, *ras-related C3 botulinum strubstrate1 (rac1)*, relevant (Nakaya et al. 2004).

3.4 Die Differenzierung der Somiten

Epitheliale Somiten sind transiente Strukturen, die bereits kurze Zeit nach ihrer Abtrennung vom PSM im Zuge eines Differenzierungsprozesses in zwei Kompartimente, dem Sklerotom und dem Dermomyotom, unterteilt werden. Der dorsalen Bereich des Somiten, das Dermomyotom, behält seinen epithelialen Charakter und differenziert weiter in das Dermatome, welches das Bindegewebe der Haut bildet, und in das Myotome, aus dem die gestreifte Muskulatur hervorgeht. Der ventrale Bereich des Somiten wird einer Epithel-Mesenchym-Transformation unterzogen und anschließend als Sklerotom bezeichnet. Aus dem Sklerotom gehen die Elemente des axialen Körperskeletts hervor (Abb.3.4.1) (Christ et al. 2000).

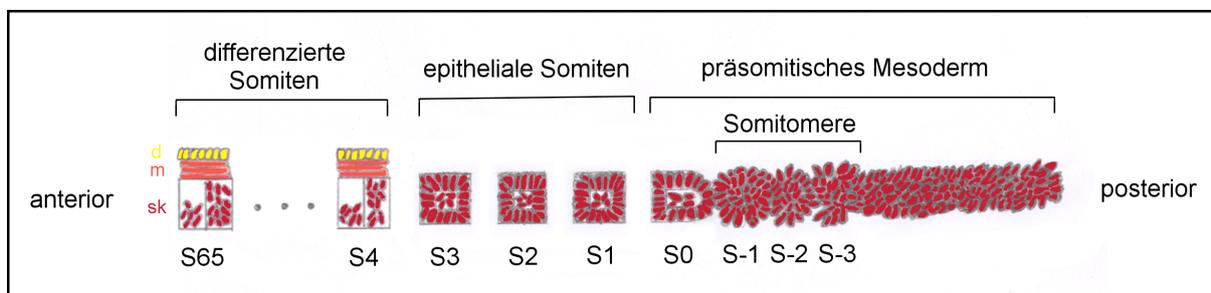


Abb.3.4.1: Schematische Darstellung der Bildung und der Differenzierung der Somiten (m= Myotom; d= Dermatome; sk = Sklerotom) (in Anlehnung an Gossler 2002 gezeichnet)

Die Epithel-Mesenchym-Transformation der Zellen des ventralen epithelialen Somiten geht mit einer Reduktion der Genexpression von Zelladhäsionsmolekülen, wie *Ncam1* und *Cdh2*, einher (Duband et al. 1987; Hatta et al. 1987). Der Verlust dieser Adhäsionsproteine resultiert in einer Abnahme der Zellkontakte und erlaubt folglich eine Zunahme der Zellmobilität. Gleichzeitig wird die Basallamina abgebaut. Im Gegensatz dazu, zeichnet sich das Dermomyotom durch die Aufrechterhaltung der Expression dieser Adhäsionsmoleküle aus, wodurch dessen epithelialer Charakter bestehen bleibt (Duband et al. 1987; Hatta et al. 1987). Die Größe des Sklerotoms ist das Resultat der Balance zwischen dorsalen Signalen der Dachplatte des Neuralrohrs bzw. dem Oberflächenektoderm und ventralen Signalen der Bodenplatte des Neuralrohrs bzw. des Notochords (Lee et al. 2000). Dorsale Signale fördern die Entwicklung des Dermomyotoms und verhindern die Sklerotomentstehung. Diese Signale gehören dem Wnt-Signalweg an. Experimente in Hühnchenembryonen zeigten, dass sowohl die Missexpression von *Wnt1* als auch die von *Wnt3a* bzw. *Wnt4* ventral der epithelialen Somiten eine Vergrößerung des Dermomyotoms hervorruft, während die Ausdehnung des Sklerotoms reduziert ist (Wagner et al. 2000). Im Gegensatz dazu, induzieren die ventralen

Signale die Epithel-Mesenchym-Transformation und initiieren so die Sklerotomentstehung. Zu diesen Signalmolekülen gehören Sonic hedgehog (Shh) und Noggin (Fan et al. 1994; Fan et al. 1995; Johnson et al. 1994; Müller et al. 1996; McMahon et al. 1998). Im weiteren Verlauf der Differenzierung des Sklerotoms wandern die Zellen, die sich durch einen neuerworbenen mesenchymalen Charakter auszeichnen, in den perinotochordalen Raum ein (Abb.3.4.2 A). Extrazelluläres Material verbindet diese Sklerotomzellen mit dem Notochord und fungiert als Substrat für die einwandernden Zellen (Jacob et al. 1975b). Zusätzlich produzieren die Zellen eine hyaluronreiche extrazelluläre Matrix, die sich durch Hydratation ausdehnt und auf diese Weise die Bewegung der Zellen zum Notochord vermittelt (Jacob et al. 1975b) (Abb.3.4.2 B). Im Zuge der Differenzierung des Sklerotoms wird die Expression von sklerotomspezifischen Genen, wie *Pax1* und *Pax9*, in den ventralen Zellen der epithelialen Somiten induziert (Müller et al. 1996). Die Induktion dieser Gene ist unter der Kontrolle von sonic hedgehog (Shh) und Noggin (Müller et al. 1996). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren erhöht die Proliferationsrate der sie exprimierenden Zellen (Furumoto et al. 1999). Als Resultat dieser erhöhten Proliferation bilden die eingewanderten sklerotomalen Zellen des ventralen Bereiches der Somiten eine tubuläre Struktur um das Notochord, die Perichordalröhre, aus welcher später die Wirbelkörper und die Zwischenwirbelscheiben hervorgehen (Abb.3.4.2 C; D) (Christ et al. 1992; Christ et al. 2000). Die Zellen des zentralen Sklerotoms konzentrieren sich seitlich des Neuralrohrs und bilden im Verlauf der Chondrogenese die lateralen Elemente der Wirbel, die Pedikel und die proximalen Rippen (Christ et al. 1992) (Abb.3.4.2 C; D). Die Differenzierung des dorsalen und des lateralen Bereiches des Sklerotoms ist unabhängig von Signalen des Notochords, was in einer Reduktion der *Pax1*- und *Pax9*-Expression in diesen Kompartimenten resultiert (Ebensperger et al. 1995). Als Konsequenz führt eine Mutation des *Pax1*-Gens bzw. die Doppelmutation des *Pax1*- und des *Pax9*-Gens in Mausembryonen zu einem Verlust der Wirbelkörper, der Zwischenwirbelscheiben und der proximalen Rippen, Elemente, welche ausschließlich von dem ventralen und dem zentralen Sklerotom gebildet werden (Peters et al. 1999). Der dorsale Bereich der Wirbel mit dem Dornfortsatz ist nicht betroffen. Dieser Bereich entwickelt sich aus den dorsalen Sklerotomzellen unter dem Einfluss eines Proteins der Tgf β -Familie, des *bone morphogenetic proteins4* (*Bmp4*), welches von der Dachplatte des Neuralrohrs und dem Seitenplattenmesoderm gebildet wird (Monsoro-Burq et al. 1996). Im ventralen und zentralen Sklerotom wird dieser Einfluss durch den Bmp-Antagonisten Noggin unterbunden (Monsoro-Burq et al. 2000). *Bmp4* induziert in den dorsalen Sklerotomzellen die Expression von *Msx1* und *Msx2* (Monsoro-Burq et al. 1996). Diese Zellen migrieren

anschließend in den dorsalen Bereich des Embryos und gruppieren sich zwischen dem Neuralrohr und dem Ektoderm (Monsoro-Burq et al. 1994) (Abb.3.4.2 C; D). Die Differenzierung der lateralen Bereiche des Sklerotoms ist ebenfalls abhängig von Bmp4 und resultiert in der Bildung der distalen Rippen und der Sehnen (Pourquie et al. 1995; Pourquie et al. 1996; Olivera-Martinez et al. 2000, Brent et al. 2003) (Abb.3.4.2 C; D).

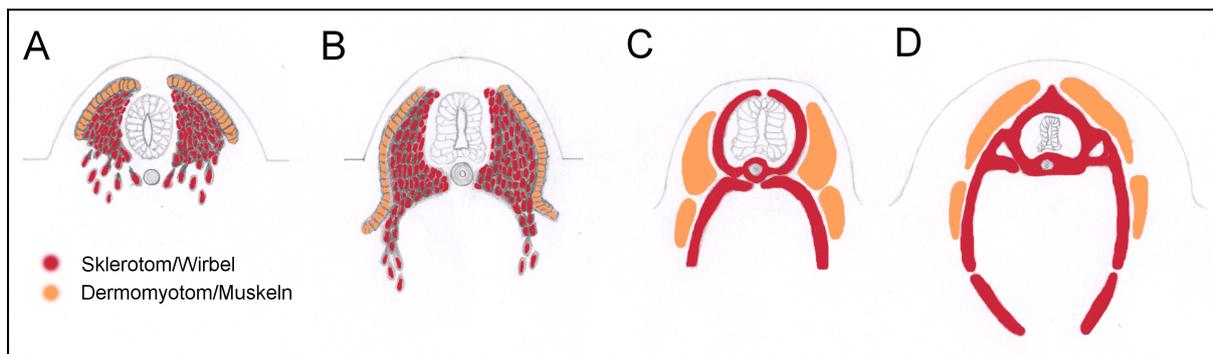


Abb.3.4.2: Schematische Darstellung der Sklerotomdifferenzierung; A: Die mesenchymalen Sklerotomzellen beginnen zu Migrieren; B: Die eingewanderten Sklerotomzellen umgeben das Notochord und das Neuralrohr; C: Die Perichodalaröhre entsteht; Die Sklerotomzellen kondensieren; D: Im Zuge der Chondrogenese werden die Wirbel und die Rippen gebildet; (in Anlehnung an Christ et al. 2000 gezeichnet)

Der Beginn der Chondrogenese der Sklerotomzellen ist abhängig von der Expression des Homöobox-Gens *Nkx3.2* (Murtaugh et al. 2001). *Nkx3-2* ist ein Zielgen der Transkriptionsfaktoren Pax1 und Pax9 (Rodrigo et al. 2003). Weiterhin ist seine Expression abhängig von einem Homöobox-Protein, *mesenchyme homeobox1 (Meox1)* (Rodrigo et al. 2004). *Nkx3.2* fungiert als Repressor eines Inhibitors des *SRY-box containing gene 9 (Sox9)* (Zeng et al. 2002). *Sox9* aktiviert die Expression von Chondrogenese-relevanten Genen, wie *Aggrecan* und *Kollagen* und gewährleistet somit die Initiation der Chondrogenese. Die *Sox9*-Expression ist, wie die von *Nkx3-2*, unter der Kontrolle von *Shh* (Zeng et al. 2002).

3.5 Die Resegmentierung

Im Verlauf der Chondrogenese findet die Resegmentierung statt. Dieser Prozess der Neugliederung beschreibt die Bildung eines Wirbels aus der kaudalen Sklerotomhälfte des einen Somiten und der kranialen Sklerotomhälfte des benachbarten Somiten. Somit sind die Wirbel gegenüber den Somiten um ein halbes Segment verschoben. Da das Myotom nicht resegmentiert wird, sind die Rückenmuskeln mit je zwei benachbarten Wirbeln verbunden und ermöglichen die Bewegung dieser beiden gegeneinander (Huang et al. 1996, Huang et al. 2000a; Evan et al. 1992; Ayoama et al. 2000) (Abb.3.5.1). Als Resultat dieses Prozesses

erhält die Wirbelsäule trotz ihrer Stabilität auch ein hohes Maß an Mobilität.

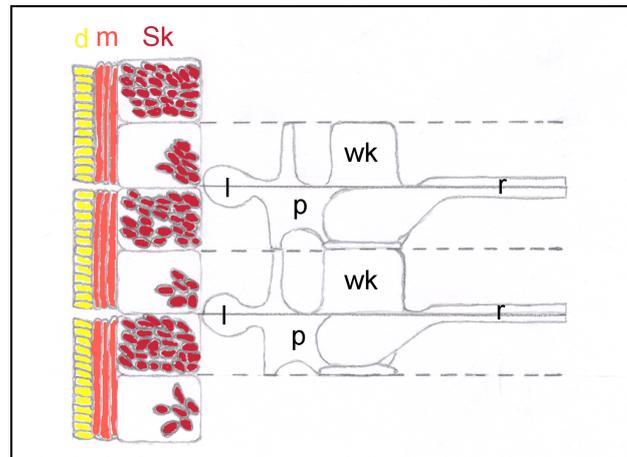


Abb.3.5.1: Schematische Darstellung der Resegmentierung; Ein Wirbel wird aus der kaudalen Sklerotomhälfte des einen Somiten und der kranialen Sklerotomhälfte des benachbarten Somiten gebildet; Das Myotom wird nicht resegmentiert; (m= Myotom; d= Dermatom; sk = Sklerotom; l= Lamina; p= Pedikel; r= Rippen; wk= Wirbelkörper) (in Anlehnung an Gossler 2002 gezeichnet)

3.6 Die anterior-posteriore Polarisierung der Somiten

Im Zuge der Untersuchung der Resegmentierung wurde gezeigt, dass die lateralen Bereiche der Wirbel, die Pedikel und die proximalen Rippen, ausschließlich aus der kaudalen Hälfte des Sklerotoms hervorgehen, während zu den anderen Bereichen der Wirbel beide Sklerotomkompartimente beitragen (Ayoama et al. 2000). Diese Ergebnisse zeigten, dass neben der dorso-ventralen Kompartimentierung der Somiten zusätzlich eine anterior-posteriore Polarität (A/P-Polarität) besteht.

Die A/P-Polarisierung des Sklerotoms ist morphologisch an der „von Ebner's Spalte“, bestehend aus verlängerten, transversal angeordneten Sklerotomzellen, erkennbar (Christ et al. 1975). Weiterhin unterscheiden sich die beiden Kompartimente des Sklerotoms hinsichtlich ihrer Zelldichte. Die Zellen des kaudalen Sklerotomkompartiments haben eine höhere Proliferationsrate als Zellen der kranialen Hälfte, was in einer höheren Zelldichte in diesem Kompartiment resultiert (Wilting et al. 1994). Wie bereits erwähnt, wird die Proliferationsrate der Zellen, über die Induktion der *Pax*-Gene, von Shh kontrolliert (Furumoto et al. 1999). Zusätzlich aktiviert Shh die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box C2* (*Foxc2*) im Sklerotom, welcher für die Aufrechterhaltung der Proliferation notwendig ist (Furumoto et al. 1999). Der Zelldichteunterschied der beiden Kompartimente wird durch eine hohe Apoptoserate im kranialen Bereich der Somiten S+1 bis S+18 verstärkt (Sanders et al. 1997). Diese A/P-Polarisierung der Somiten beeinflusst neben der Anordnung der Muskeln die Organisation des Nerven- und Blutgefäßsystems. Infolge repulsiver Signale

in der kaudalen Hälfte der Somiten, durchziehen die Motoneurone ausschließlich dessen kraniale Hälfte (Keynes et al. 1984; Rickmann et al. 1985; Kuan et al. 2004).

Die Etablierung der A/P-Polarität findet bereits im kranialen PSM, im Somitomer S-1, statt. Wie bereits erwähnt, ist dieser zukünftige Somit durch die Expression von *Mesp2* in seiner kranialen Hälfte charakterisiert. In dieser Hälfte des zukünftigen Somiten destabilisiert *Mesp2* mastermind-like1 (*Maml1*), einen Koaktivator der Notch-Rezeptoren, der an der Komplexbildung zwischen NICD/Rbpj/*Maml1* beteiligt ist (Sasaki et al. 2011) und stabilisiert die Expression von *Lfng*, was beides in einer Inhibierung des Notch-Signalweges in diesem Kompartiment resultiert. In der kaudalen Hälfte hingegen bleibt die Aktivität des Notch-Signalweges erhalten (Abb.3.6.1) (Morimoto et al. 2005). Mutationen im murinen *Mesp2*-Gen verursachen eine Ausweitung der Expression des Notch-Liganden *Dll1* in die kraniale Hälfte der Somiten, was eine Posteriorisierung der Somiten zur Folge hat (Saga et al. 1997). Im umgekehrten Fall führt der Verlust von *Dll1* zu einer Ausdehnung der Genexpression von *Mesp2* in den kaudalen Bereich der Somiten und somit zu einer Anteriorisierung der Somiten (Takahashi et al. 2003). Schlussfolgernd daraus, ist *Mesp2* für die Spezifizierung der kranialen Somitenhälfte und der Notch-Signalweg für die des kaudalen Kompartiments der Somiten relevant.

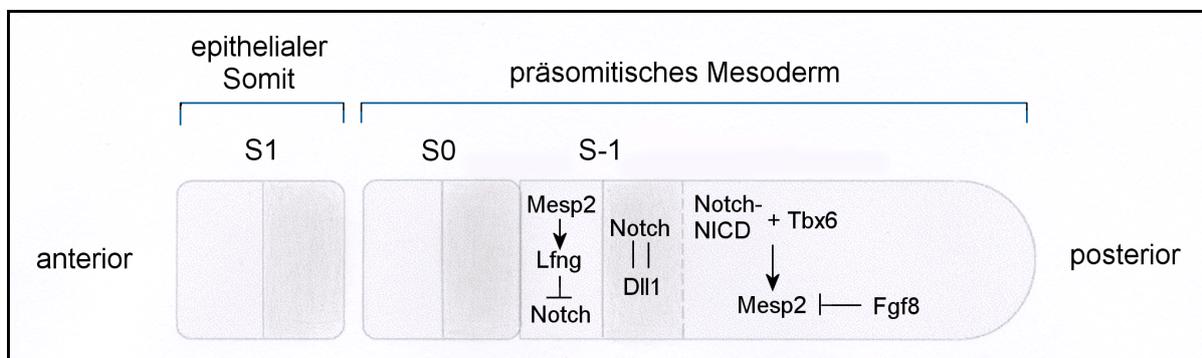


Abb.3.6.1: Schematische Darstellung des Zusammenwirkens des Notch-Signalweges mit Tbx6, Fgf8 und Mesp2 bei der Etablierung der A/P-Polarität der Somiten

Genetische Analysen in Mausembryonen weisen ferner darauf hin, dass für die korrekte Entwicklung der Wirbelsäule die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität von entscheidender Bedeutung ist. Zwei Transkriptionsfaktoren, denen eine Funktion bei diesem Prozess zugeschrieben wurde, sind *Uncx4.1* und *Tbx18*. Das murine *Uncx4.1*-Gen wurde erstmals 1996 von Rovescalli kloniert (Rovescalli et al. 1996). Dieses Gen besteht aus zwei Exons, die einen Bereich von 138 Basenpaaren und 151 Basenpaaren umfassen und durch ein Intron voneinander getrennt sind. Die Exons kodieren für die Homöodomäne, eine DNS-

Bindedomäne, welche am N-Terminus des Proteins lokalisiert ist und durch welche das Protein der Familie der paired-related Homöobox-Transkriptionsfaktoren zugeordnet wurde (Rovescalli et al. 1996; Mansouri et al. 1997). Die Aminosäuresequenz von *Uncx4.1* zeigt eine Identität von 88% zu der des homologen Proteins des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, *Unc-4*. (Rovescalli et al. 1996; Miller et al. 1992; Mansouri et al. 1997; Neidhardt et al. 1997). Analysen zur Funktion dieses Proteins in *Caenorhabditis elegans* zeigten, dass *Unc-4* einen Proteinkomplex mit dem Homologen des Korepressors *groucho*, *Unc-37*, bildet und als Repressor bei der Spezifizierung von Motoneuronen in diesem Modellorganismus fungiert (Von Stetina et al. 2007). Übereinstimmend mit der Expressionsdomäne in den Motoneuronen von *Caenorhabditis elegans* konnte auch in Mausembryonen eine Expression von *Uncx4.1* im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Weiterhin ist *Uncx4.1* in der Region der sich entwickelnden Niere, im ersten Branchialbogen, im ersten Finger der Vordergliedmaßen und in den Somiten exprimiert (Abb.3.6.2 A) (Mansouri et al. 1997; Neidhardt et al. 1997). In den Somiten wird die Expression dieses Transkriptionsfaktors in der kaudalen Hälfte des Somiten S0 initiiert und in diesem Kompartiment bis zum Embryonaltag 13.5 aufrechterhalten. Genetische Analysen in Mausembryonen zeigten, dass der Verlust dieses Genes zu Skelettdefekten führt. Neugeborene *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten sind durch die Abwesenheit der lateralen Bereiche der Wirbel, der Pedikel, und der proximalen Rippen über den gesamten Bereich der Wirbelsäule gekennzeichnet, verursacht durch eine Anteriorisierung der Somiten (Abb.3.6.2 B; C). Diese Anteriorisierung ist bereits in den epithelialen Somiten zu erkennen und setzt sich im Sklerotom fort. Die neugeborenen Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund von respiratorischer Insuffizienz (Mansouri et al. 2000; Leitges et al. 2000). Weiterhin zeigten genetische Analysen, dass die Expression von *Uncx4.1* von der Aktivität Notch-Signalweges abhängig ist, da der Verlust des Notch-Liganden *Dll1* zur Abwesenheit von *Uncx4.1* führt (Barrantes et al. 1999).

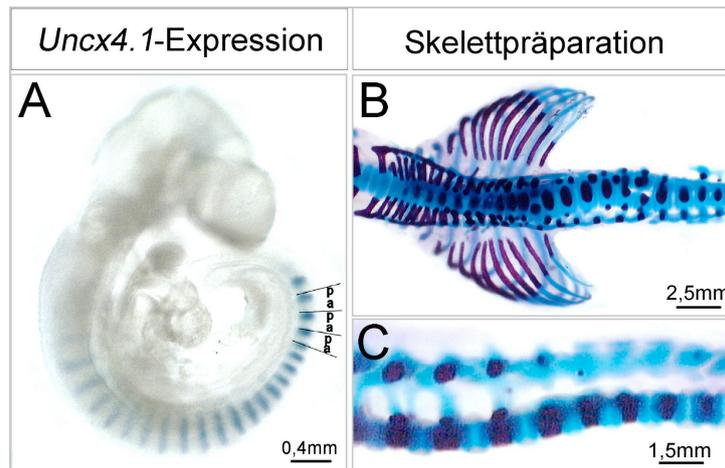


Abb.3.6.2: A: Die Expressionsdomänen von *Uncx4.1* (RNS-*in situ*-Hybridisierung); B; C: Skelettpräparation E18,5 von *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, proximale Rippen und Pedikel fehlen

Das zweite Protein, welchem eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der A/P-Polarität der Somiten zugeschrieben wurde, *Tbx18*, gehört zur Familie der T-box-Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine für sie spezifische DNS-Bindedomäne, der namensgebenden T-Box, aus (Kispert et al. 1993; Kispert et al. 1995). Die T-Box wird von dem zweiten und dritten Exon der insgesamt acht Exons des Gens kodiert (Farin et al. 2007). Des Weiteren ist *Tbx18* durch den Besitz eines eh1-Motivs, welches diesen Transkriptionsfaktor als einen groucho-abhängigen Repressor kennzeichnet, charakterisiert (Farin et al. 2007). Neben der Expression im Proepikardialorgan, im Epikard des Herzens, in den Vordergliedmaßenknospen bzw. der Vorläuferzellen des Ureters und in den otischen Fibrozyten konnte auch für *Tbx18* eine Genaktivität in den Somiten nachgewiesen werden (Kraus et al. 2001). Die Expression in diesen Vorläuferstrukturen der Wirbel ist auf das kraniale Kompartiment begrenzt (Abb.3.6.3 A). Somit besitzt *Tbx18* ein komplementäres Expressionsmuster zu *Uncx4.1*. Initiiert wird die Expression dieses T-Box-Gens im PSM, in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1. Die Genaktivität wird in dieser Hälfte in den epithelialen Somiten und in dem Sklerotom aufrechterhalten und erst bei der Induktion der Chondrogenese herunterreguliert (Kraus et al. 2001). In Mausembryonen verursacht der Verlust von *Tbx18* die Entstehung ektopischer Pedikel und proximaler Rippen, hervorgerufen durch eine Posteriorisierung des Sklerotoms (Abb.3.6.3 B;C) (Bussen et al. 2004). Im Gegensatz zu *Uncx4.1*-Mutanten verläuft die anfängliche Etablierung der A/P-Polarität der Somiten im kranialen Bereich des PSM in *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten normal, ebenso wie die Aufrechterhaltung derselben in den epithelialen Somiten. Der Verlust der Polarisierung ist in diesen Mutanten ausschließlich auf das Sklerotom begrenzt. Als Resultat dieser Anfangs vorhandenen A/P-Polarität ist der Phänotyp dieser Mutanten auf den Hals- und Thoraxbereich

3. Einleitung

der Wirbelsäule beschränkt. Trotz der räumlichen Begrenzung des Phänotyps sterben *Tbx18*-Mutanten ebenfalls kurz nach der Geburt an respiratorischer Insuffizienz (Bussen et al. 2004). In Übereinstimmung mit den weiteren Expressionsdomänen sind *Tbx18*-Verlustmutanten zusätzlich durch Herzdefekte, Innenohrdefekte, einen Hydroureter und Hydronephrose gekennzeichnet (Christoffels et al. 2006; Trowe et al. 2008; Airik et al. 2006).

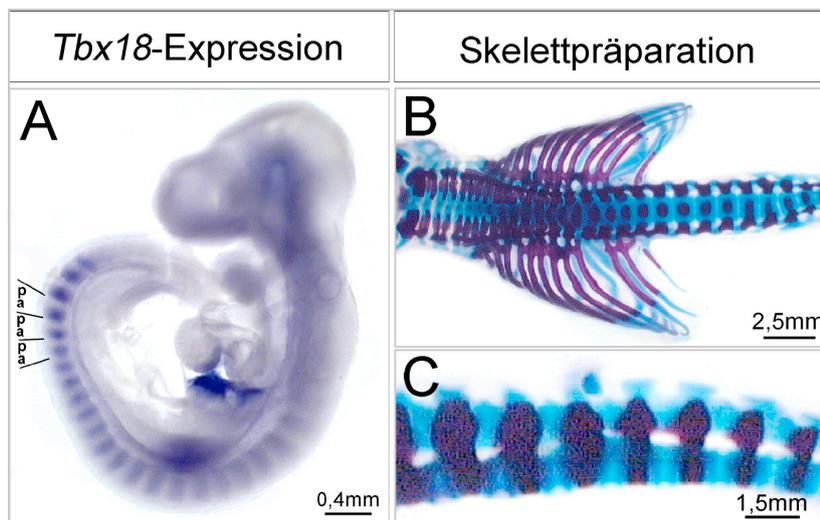


Abb.3.6.3: A: Die Expressionsdomänen von *Tbx18* (RNS-*in situ*-Hybridisierung); B; C: Skelettpräparation E18,5 von *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten; die proximale Rippen und Pedikel sind expandiert

Neben *Tbx18* ist ein weiterer T-Box-Transkriptionsfaktor, *Tbx22*, in den Somiten exprimiert (Bush et al. 2002). *In vitro*-Bindungsstudien zeigten, dass dieser Transkriptionsfaktor ebenfalls als Repressor fungiert (Andreou et al. 2007). *Tbx22* ist mit *Tbx18* in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 und S0 sowie in dem kranialen Kompartiment der epithelialen Somiten S1 und S2 koexprimiert (Bush et al. 2002). Weiterhin weist dieses Gen eine starke kraniofaziale Expression auf, deren Verlust in Mäusen mit einer Mutation im *Tbx22*-Gen zur Ausbildung einer Gaumenspalte führt (Pauws et al. 2009).

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Der komplementäre Phänotyp der Mausmutanten von *Tbx18* und *Uncx4.1* lässt vermuten, dass die beiden Transkriptionsfaktoren bei der Aufrechterhaltung der A/P-Polarität der Somiten zusammenwirken. Da es zu keiner Überlappung der Expressionsdomänen der beiden Gene kommt, liegt die Vermutung nahe, dass das murine *Uncx4.1* ebenfalls als Repressor fungiert und beide Transkriptionsfaktoren eine antagonistische Wirkung aufeinander haben. Dadurch könnte die Identität der beiden Kompartimente der Somiten aufrechterhalten werden. Diese Hypothese soll mit Hilfe von Mausembryonen, die durch den gleichzeitigen Verlustes

von *Tbx18* und *Uncx4.1* charakterisiert sind, bestätigt werden. Einen weiteren Hinweis auf eine antagonistische Funktion der beiden Gene soll die Missexpression von *Uncx4.1* im kranialen Bereich der Somiten bzw. von *Tbx18* in deren kaudaler Hälfte liefern. In diesem Zusammenhang sollen ebenfalls Zielgenen der beiden Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, um die regulatorischen genetischen Wechselbeziehungen bei der Aufrechterhaltung der A/P-Polarisierung aufzeigen zu können.

Der Notch-Signalweg könnte neben seiner Funktion bei der Etablierung der A/P-Polarität der Somiten ebenfalls eine Rolle bei deren Aufrechterhaltung spielen. Eine Expression des Notch-Liganden *Dll1* bzw. des Rezeptors *Notch1* in der kaudalen Hälfte epithelialer Somiten ist bereits nachgewiesen worden (Bettenhausen et al. 1995; Réaume et al. 1992). Eine Erhaltung der Aktivität dieses Signalweges im Sklerotom könnte für die Aufrechterhaltung der A/P-Polarisierung der Somiten relevant sein. Um eine mögliche Funktion des Notch-Signalweges im Sklerotom nachweisen zu können, soll dieser begrenzt in der kranialen Hälfte dieser Struktur aktiviert werden. Weiterhin soll versucht werden, die Posteriorisierung der Somiten im *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutantenhintergrund durch Inaktivieren des Notch-Signalweges in der kranialen Hälfte der Somiten aufzuheben und eine A/P-Polarität zurückzuerhalten.

Ein weiterer Aspekt der Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Erklärung der Begrenzung der Skelettdefekte der *Tbx18*-Verlustmutante auf den Hals- und Thoraxbereich. Diese Begrenzung des Phänotyps lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein redundanter Faktor die A/P-Polarität der epithelialen Somiten in diesen Mutanten aufrechterhält. Ein Kandidatengen ist *Tbx22*, welches mit *Tbx18* im PSM und in den ersten beiden epithelialen Somiten koexprimiert ist (Bush et al. 2002). Um zu überprüfen, ob *Tbx22* eine redundante Funktion zu *Tbx18* hat, wurden Mausembryonen generiert, die eine Mutation im *Tbx18*-Gen als auch im *Tbx22*-Gen aufwiesen.

Somit soll diese Doktorarbeit genetische Interaktionen aufzeigen, die die Aufrechterhaltung der A/P-Polarisierung der Somiten zur Folge haben.

4. Materialien und Methoden

4.1 Laborgeräte

Gerät	Modell; Hersteller
Binokular	MZ75, Leica
Computer	Apple iMac, PC mit MS-Windows Software: Office:mac v.X.; Office 2003 (Microsoft), MacVector 10.5.2 (Accelrys); Filemaker pro 9.0 (Filemaker); Photoshop CS (Adobe)
Elektroporationsküvetten	Biorad
Elisa-Reader	Titertek Multiscan Plus, Thermo Fisher
Geldokumentation	Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE
Gelelektrophoresezubehör	Eigenbau, Biorad
Heizplatte	Schott
Hybridisierungsöfen	Amersham, Biometra
Inkubatoren	GfL, Infors HT, Memmert
Luminometer	Turner BioSystems
Makroskop	Leica M420 mit der Kamera Fujix digital HC-300Z
Mikroliterpipetten	Rotilabo®-Mikroliterpipetten Proline®, variabel der Firma Carl Roth
Mikroskop	Mikroskop Leica Axioplan 5000 B mit der Kamera DFC300 FX Leica MZ75
Mikrotom	RM2155, Leica
Mikrowellenofen	LG
Netzteil	Biorad Powerpack
Objektträger	Superfrost Plus, Menzel
PCR-Maschinen	peqStar der Firma peqlab
pH-Meter	WTW
Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus Hirschmann Laborgeräte
Plastikwaren	Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Schüttler /Rührer	Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL

Gerät	Modell; Hersteller
Thermomixer	Eppendorf 5436, HLC
Trockenplatte	Medax
Waagen	Kern
Zentrifugenzubehör	Beckman
Zentrifugen	Eppendorftischzentrifuge 5415D, Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20; Heraeus Biofuge 13 und Biofuge15

4.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Digoxigenin-AP	Roche
Anti-Neurofilament 2H3 Hybridom-Überstand	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Uncx4.1	Gundula Griesel
Schaf-anti-Maus-HRP	Amersham

4.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenosin 5-triphosphat (ATP)	Appllichem
Agar	Appllichem
Agarose	Invitrogen
Alizarinrot	Sigma-Aldrich
Alzianblau	Sigma-Aldrich
Ampizillin	Roth
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich
Benzylbenzoat	Sigma-Aldrich
Blockierungsreagenz	Roche
BM Purple	Roche
5-Brom-4-Chlor-3-indyl- β -Galaktopyranosid (X-Gal)	Appllichem
BSA (100x)	NEB
Chloroform	Baker

4. Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
Diethylpyrocarbonat	Applichem
DIG-Reaktionsmix	Roche
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Applichem
Dimethylsulfoxid	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Applichem
Dithiothreitol (DTT)	Roth
D-Luziferin	Roth
Eosin Y	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Baker
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem
Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)- Tetraessigsäure (EGTA)	Applichem
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza
Formaldehyd	Merck
Formamid	Applichem
G418-BC	Biochrom
Gill's Hematoxylin No3	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycylglyzin	Applichem
Glyzerin	Applichem
Hefeextrakt	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Applichem
Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($K_3Fe(CN)_6$)	Roth
Kaliumhexacyanidoferrat(II) ($K_4Fe(CN)_6$)	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Applichem
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)	Applichem
Litiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich
LysoTracker	Invitrogen
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Applichem

Chemikalie	Hersteller
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Applichem
Maleinsäure	Roth
Methanol	Merck
Natriumacetat	Applichem
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem
Natriumdeoxycholat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumzitat	Applichem
2-Nitrophenyl- B-D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Nonidet P40	Applichem
Paraformaldehyd (PFA)	Applichem
PEG4000	Roth
Penizillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
Permout	Fisher Scientific
Phenol	Roth
2-Propanol	Baker
Puffer für Restriktionsemzyme (10x)	NEB
Roti-Histol	Roth
RPMI-Medium	Invitrogen
Salzsäure 37%	Baker
Schafserum	Sigma-Aldrich
T4-Ligasepuffer (10x)	NEB
6-Thioguanine	Sigma-Aldrich
Transkriptionspuffer (10x)	Roche
Tris-Base	Applichem
Trypton	Applichem
Tween20	Applichem
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Applichem

4. Material und Methoden

4.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase 10 U/ μ l	Roche
Proteinase K	Applichem
Restriktionsenzyme	NEB
RNase	Roth
RNasin	Promega
SP6-Polymerase	NEB
Taq-Polymerase	Selbsterstellung
T3-Polymerase	Roche
T4-Ligase	NEB
T7-Polymerase	NEB

4.5. Größenmarker für die Gelelektrophorese

Größenmarker	Hersteller
DNS-Längenstandard	Invitrogen

4.6 Kits

Kit	Hersteller
Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems
DAB substrate KIT	Vector Lab
Nucleobond AX	Macherey & Nagel
NucleoSpin	Macherey & Nagel
Phusion High Fidelity PCR Kit	NEB
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Hiss Diagnostic

4.7 Nukleotide

Nukleotide	Hersteller
dNTP Set	PeqLab

4.8 Primer

Primer	Hersteller
CCG GCT TTG GTG ATG ATC	Sigma-Aldrich
GAC AAC CAC TAC CTG AGC AC	Sigma-Aldrich
CAG CTT CCA AAA CAG TGG AG	Sigma-Aldrich
GAA GGG ACT GGC TGC TAT TG	Sigma-Aldrich
CAG CTT CCA AAA CAG TGG AG	Sigma-Aldrich
CTG TTG ACT GTC CCT AGA AG	Sigma-Aldrich
CAG ATC TCG GGA GGC ATC G	Sigma-Aldrich
ATT CTC CCA CCG TCA GTA CG	Sigma-Aldrich
CCT GTC CAC CCT TCT CTT GAG	Sigma-Aldrich
TCC ATG AGT GAA CGA ACC TG	Sigma-Aldrich
GCA GTG AGG TAA GCC CAA CGC	Sigma-Aldrich
AGG GTC TAT TTC TCC TAA GG	Sigma-Aldrich
CGT CAT TGA CGT CAA TAG GG	Sigma-Aldrich
GCG CGG AAA AGG GCT CGG	Sigma-Aldrich
AGG AAG CTA CTG TCT GGG G	Sigma-Aldrich
AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	Sigma-Aldrich
GAA AGA CCG CGA AGA GTT TG	Sigma-Aldrich
TAA GCC TGC CCA GAA GAC TC	Sigma-Aldrich
AAG CCC CTT TCT TTG TGC GTG C	Sigma-Aldrich
ATG CTC CCC ACT GTT GTG AAC TGG	Sigma-Aldrich
ATC CCT GGG TCT TTG AAG AAG	Sigma-Aldrich
CAA ATT CAG ACG GCA AAC	Sigma-Aldrich
CTG CTG CGC GGT GGA GGG AGG	Sigma-Aldrich
GGA GTC GAC ACC CAG CAC TGG CG	Sigma-Aldrich
CTG CTT CCT TCAC GAC ATT CAA C	Sigma-Aldrich

Primer	Hersteller
TTC TTG CTC TAC CCC ATC ACG C	Sigma-Aldrich
AGG ATC TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC CTG	Sigma-Aldrich
TTTC GAG CCT CGG CAG CC	Sigma-Aldrich
GGT GTC GCC CAA GGA GTC	Sigma-Aldrich

4.9 Bakterienstämme

E.coli XL10 gold *endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetr F'[proAB lacI_qZΔM15 Tn10(Tetr Amy Cm_R)]*

4.10 Gene und Vektoren

Gene, die bei der RNS-*in situ* Hybridisierung verwendet wurden:

Gen	Vektor	von
<i>Cer1</i>	<i>pSport1.mCer1</i>	A. Gossler
<i>Dll1</i>	<i>pdll1 #15-1,1</i>	A. Gossler
<i>Dll3</i>	<i>pMDelta3.cDNA</i>	A. Gossler
<i>EphA4</i>	<i>pKS.EphA4</i>	A. Gossler
<i>EphrinB2</i>	<i>pcDNA3.EphrinB2(0.7)</i>	B. Hogan
<i>GFP</i>	<i>pKS.eGFP(0.8)</i>	A. Gossler
<i>Hey1</i>	<i>psHlox1.Hey1</i>	A. Gossler
<i>LacZ</i>	<i>pKS.lacZ.Cla-Xba(3.0)</i>	A. Gossler
<i>Mesp2</i>	<i>pSK.MesP2.c10</i>	A. Gossler
<i>Mox1</i>	<i>pKS.Mox1.Pst/EcoRI(0.5)</i>	R. Wright
<i>Myogenin</i>	<i>pMyogenin</i>	E. Olson
<i>Notch1</i>	<i>pnotch1 cDNA</i>	T. Gridley
<i>Notch2</i>	<i>pnotch2 cDNA</i>	T. Gridley
<i>Pax1</i>	<i>pPax1</i>	R. Balling
<i>Pax3</i>	<i>pPax3 in situ</i>	R. Balling
<i>Pax9</i>	<i>pPax-9.wm</i>	R. Balling

Gen	Vektor	von
<i>Tbx18</i>	<i>pKS.tbx18.cDNA(2.0)</i>	A. Kispert
<i>Tbx22</i>	<i>pKS.Tbx22(0.6)</i>	R. Jiang
<i>Uncx4.1</i>	<i>pPHD-1 (zebra)</i>	L. Neidhardt

Gene, die bei den Reporterexperimenten verwendet wurden:

Gen	Vektor	von
<i>β-Catenin</i>	<i>b-catS33A</i>	B. Herrmann
<i>β-Galaktosidase</i>	<i>pCMVβ</i>	K-H. Klempnauer
<i>cre</i>	<i>pCAG::turbo-cre</i>	A. Gossler
<i>Dll1, luciferase</i>	<i>pKS.Dll1.prmsdwt800wtluc/5</i>	B. Herrmann
<i>GAL4</i>	<i>pcDNA3.GAL4-DNA-BD</i>	H. Farin
<i>Gal4, E1b, firefly</i>		
<i>Luciferase, UAS</i>	<i>p5xGal4-E1b-lucII</i>	L. Klein-Hitpass
<i>GFP</i>	<i>pd2EGFP-N1</i>	M. Ehlers
<i>Tbx6</i>	<i>pcDNA3.Tbx6/3</i>	B. Herrmann
<i>Tbx18</i>	<i>pcDNA3.G.Tbx18(full)myc</i>	H. Farin
<i>Tbx18-Gal4</i>	<i>pcDNA3.Gal4-BD.myc.Tbx18(full)</i>	H. Farin
<i>Tbx18 VP16</i>	<i>pcDNA3.G.Tbx18(full).VP16.myc</i>	H. Farin
<i>Tbx22</i>	<i>pCDNA.HA.Tbx22</i>	R. Singh
<i>Tcf</i>	<i>Tcf1E</i>	B. Herrmann
<i>Uncx4.1</i>	<i>pcDNA3.Uncx4.1.myc</i>	H. Farin
<i>Uncx4.1-Gal4</i>	<i>pcDNA3.G4.Uncx4.1</i>	M. Schmidt
	<i>cDNA3</i>	Invitrogen
	<i>pGBKT7</i>	Clontech
	<i>pSL1180</i>	GE-healthcare

4.11 Versuchstiere

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

Allel	MGI-Synonym	Literatur
<i>Dll1^{lacZ}</i>	MGI: <i>Dll1^{tm1Gos}</i>	Hrabe de Angelis et al. 1997
<i>Hprt^{Tbx18}</i>		Trowe et al. 2010
<i>Hprt^{Tbx18VP16}</i>		Trowe et al. 2010
<i>Hprt^{Uncx4.1}</i>		unten beschrieben
<i>Rosa^{NICD}</i>	MGI: <i>Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Notch1)Dam}</i>	Murtaugh et al. 2003
<i>Rbp^{flox}</i>	MGI: <i>Rbpj^{tm1Hon}</i>	Han et al. 2002
<i>Rosa26^{lacZ}</i>	MGI: <i>Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}</i>	Soriano et al. 1999
<i>Pax3-cre</i>	MGI: <i>Tg(Pax3-cre)1Joe</i>	Li et al. 2000
<i>Tbx18^{cre}</i>	MGI: <i>Tbx18^{tm4(cre)Akis}</i>	Trowe et al. 2010
<i>Tbx18^{GFP}</i>	MGI: <i>Tbx18^{tm2Akis}</i>	Trowe et al. 2008
<i>Tbx22</i>	MGI: <i>Tbx22^{tm1.1Sta}</i>	Pauws et al. 2009
<i>Uncx4.1^{lacZ}</i>	MGI: <i>Uncx^{tm1Akis}</i>	Leitges et al. 2000

4.12 Zellen

Zellen	Zellart	Hersteller
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	DSMZ; Braunschweig

4.13 Molekularbiologische Methoden

4.13.1 Klonierte Konstrukte

Folgende Klonierungen wurden durchgeführt:

- 1) Gal4-Uncx4.1-Fusionsplasmid

Für dieses Konstrukt wurde der Protein-kodierende Bereich des *Uncx4.1*-Gens an das 3'-Ende des DNA-bindenden Bereiches des *Gal4*-Gens in den *pGBKT7*-Vektor kloniert. Anschließend wurde ein cDNA-Fragment, welches die Bindedomäne des *Gal4*-Gens, den Protein-kodierenden Bereich des *Uncx4.1*-Gens sowie das SV40-Kernlokalisierungssignal enthielt, über die 5'-HindIII/SalI-3'-Schnittstellen aus dem *pGBKT7*-Vektor geschnitten und über die 5'-HindIII/XhoI-3'-Schnittstellen in den *cDNA3*-Vektor integriert (Abb. 4.13.1.1).

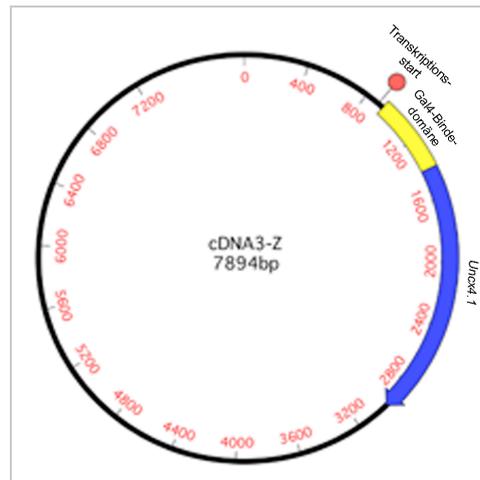


Abb. 4.13.1.1: Schematische Darstellung des *Gal4-Uncx4.1*-Fusionskonstruktes. Der Protein-kodierende Bereich des *Uncx4.1*-Gens wurde an das 3'-Ende des DNA-bindenden Bereiches des *Gal4*-Gens kloniert

2) $Hprt^{Uncx4.1}$ -Allel

Für die Herstellung des konditionellen Missexpressionsallels für *Uncx4.1* wurde der Protein-kodierenden Bereiches des *Uncx4.1*-Gens in den X-chromosomal-gelegenen *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (*Hprt*)-Lokus integriert. Der Endvektor, welcher für die homologe Rekombination eingesetzt wurde, ersetzt den größten Teil des 1.Exon des *Hprt*-Lokus, einschließlich des ATGs, durch eine Genkassette, die eine cre-vermittelte Missexpression von Genen auslösen kann (Abb.4.13.1.2) (Luche et al. 2007). Die homologe Rekombination des Endvektors resultiert in einem funktionellen *Hprt*-Nullallel, welches die direkte Selektion transgener ES-Zellen mittels Thioguanin ermöglicht (Referenz: Aravind Sekars Doktorarbeit). Dieser Vektor bestand aus einer 2,2 kb großen 5'-Homologieregion gefolgt von einem ubiquitär exprimierten CMV enhancer/chicken β actin (CAG)-Promoter, der Genexpressionskassette und einem 3'-gelegenden Homologiebereich. Um das $Hprt^{Uncx4.1}$ -Allel herzustellen, wurde zuerst der Protein-kodierende Bereich des *Uncx4.1*-Gens in den pSL1180-Vektor (GE-healthcare), an das 5'-Ende des *IRES-EGFP* kloniert und anschließend als 5'-NheI-*Uncx4.1-IRES-EGFP*-MluI-3' Fragment in die MluI/NheI-Restriktionsschnittstellen des Endvektors kloniert. Dieses resultiert in einer reversen Orientierung des Protein-kodierenden Bereiches des *Uncx4.1*-Gens im Verhältnis zum CAG-Promoter, was eine unspezifische Expression des Konstruktes verhindert (Abb.4.13.1.2). Nach der cre-vermittelten Umkehrung der Orientierung des Protein-kodierenden Bereiches befindet sich dieser 3' des CAG-Promoters gelegen (Abb.4.13.1.2). Zur Überprüfung des Endvektors wurden HeLa-Zellen mit diesem bzw. zusammen mit einem cre-Expressionsplasmid (pCAG::turbo-cre, von Achim Gossler) mittels dem FuGene HD Transfection Reagent transfiziert. Für den Nachweis

4. Material und Methoden

der Expression des Transgens wurden die Zellen 96 h nach Transfektion lysiert. Das Lysat wurde mittels eines Western Blots, bei dem ein spezifischer Uncx4.1-Antikörper (von Gundula Griesel) verwendet wurde, auf Transgenexpression untersucht. Des Weiteren wurde der Endvektor durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung erfolgte im Haus unter Verwendung des Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems). Der verifizierte Endvektor wurde anschließend linearisiert und mittels Elektroporation in *Hprt*-positive SV129 ES-Zellen gebracht. Die Selektion für transgene ES-Zellen begann 24 h nach der Elektroporation durch Zugabe von 100 µg/ml G418 in das Medium. Nach 5 Tagen wurden zusätzlich 1.67 µg/ml 6-Thioguanine in das Medium gegeben. Die überlebenden Klone wurden expandiert und mittels PCR genotypisiert.

PCR:	1 µl DNA (1:20 verdünnt)	Programm:	98°C	1 min
	1 µl Primer: TGAGTGGGGGGTGTGATAATCTTGG	30x:	98°C	15s
	1 µl Primer: ATTTACCGTCATTGACGTC AATAGGG		58°C	15s
	0,5 µl 10mM dNTPs		72°C	2 min
	5 µl HF-Puffer		72°C	5 min
	1 µl DMSO		8°C	∞
	0,25 µl Phusion-Taq-Polymerase			
	15,25 µl Wasser			

(Die Endprimerkonzentration wurde auf 10pmol eingestellt.)

Die positiven ES-Zell-Klone wurden in CD1-Mausblastozysten injiziert. Die Chimären wurden mit NMRI-Tieren verpaart, um heterozygote F1-Nachkommen zu erhalten.

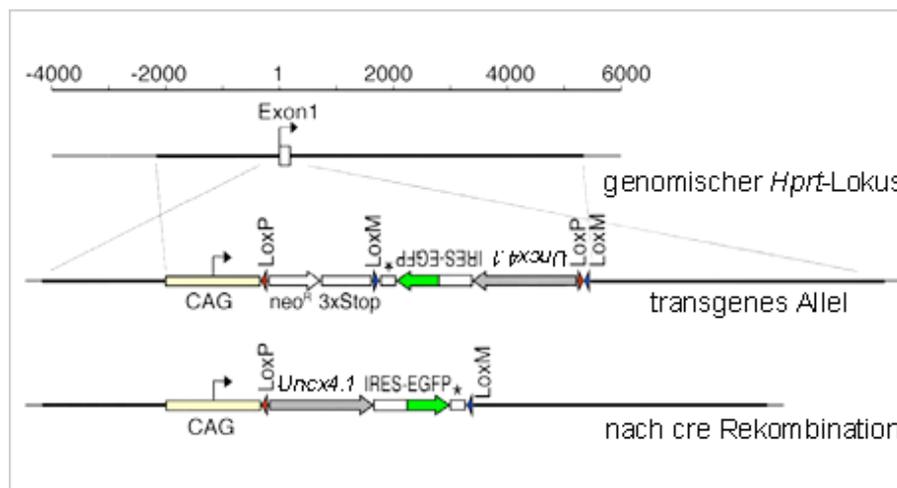


Abb. 4.13.1.2: Schematische Darstellung des transgenen *Hprt*^{*Uncx4.1*}-Allels. Das Allel, bestehend aus einer 2,2 kb großen 5'-Homologieregion gefolgt von einem ubiquitär exprimierten CMV enhancer/chicken β actin (CAG)-Promoter, dem Protein-kodierenden Bereiches des *Uncx4.1*-Gens und einem 3'-gelegenden Homologiebereich, wurde in reverser Orientierung in den *Hprt*-Lokus kloniert. Nach der cre-vermittelten Umkehrung der Orientierung des Protein-kodierenden Bereiches befindet sich dieser 3' des CAG-Promoters gelegen.

4.13.2 Restriktionsverdau

Lösung: 50 x TAE 2M Tris-Acetat; 0.05M EDTA, pH8,0

Die für die Klonierung benötigten Plasmide des Inserts und des Vektors wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurden 2-3 µg des Vektors bzw. 3-5 µg Insert, 10 µl 10 x Puffer, 100 µl 100 x BSA und 3 µl Enzym zusammenpipettiert und das Volumen auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt. Dieser Restriktionsansatz inkubierte für 2h bei 37°C. Im Anschluss wurden 10 µl des Ansatzes auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen.

4.13.3 Dephosphorylierung des Vektors

Um den Vektor vor der Dephosphorylierung aufzureinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde zu dem Ansatz 100 µl einer 1:1-Phenol-Chloroform-Mischung gegeben. Nach gründlicher Vermischung der beiden Phasen, wurde der Ansatz 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen. Zu dieser wurden 10 µl 3M Natriumacetat und 220 µl Ethanol gegeben. Dieser Ansatz wurde 1h bei -80°C inkubiert. Um die DNA zu fällen, wurde im Anschluss eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm durchgeführt. Das erhaltende DNS-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen. Dazu wurde die DNS erneut für 5 min bei 4°C und 13000 Upm zentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde zum Schluss in 43 µl Wasser gelöst. Um den Vektor zu dephosphorylieren, wurden 10 µl des 10 x Alkalischen Phosphatasepuffers und 2 µl der Alkalischen Phosphatase zugegeben. Dieser Ansatz inkubierte für 1h bei 37°C.

4.13.4 Gelaufreinigung

Um die entsprechenden DNS-Banden zu isolieren, wurde der Restriktionsansatz des Inserts und der Dephosphorylierungsansatz des Vektors auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mittel des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit aus dem Gel eluiert (Protokoll ist beigefügt). 2 µl der eluierten Banden wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Auf Grundlage eines DNS-Standards mit bekannter Konzentration der Banden erfolgte eine Konzentrationsabschätzung der eluierten DNS-Banden.

4.13.5 Ligation

Für die Ligation wurden etwa 100 ng des linearisierten und dephosphorylierten Vektors und die dreifache Menge an geschnittenem Insert eingesetzt. Darüber hinaus enthielt der Ligationsansatz 2 µl 10 x T4-Ligasepuffer und 1µl T4-Ligase. Das Volumen wurde auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ligationsansatz inkubierte über Nacht bei 4°C, wenn durch den

Restriktionsverdau glatte Enden, und bei 16°C, wenn „klebenden Enden“ erzeugt wurden. Im Anschluss wurde der Ansatz mittels chemischer Transformation in die *E.coli* XL10 gold-Bakterien eingebracht.

4.13.6 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Lösungen: TSB 10% PEG(3500); 5% DMSO; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄

LB-Medium pro Liter: 10 g NaCl; 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; pH 7

Bereits hergestellte kompetente Zellen wurden auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Von dieser Platte wurde mit einer Kolonie eine 5ml Übernachtskultur angeimpft. 4ml der Übernachtskultur wurden benutzt, um 250ml LB-Medium anzupfen. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0.9 bei 37°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 2500 Upm wurden die Bakterien sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 25ml TSB-Puffer (eiskalt) resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

4.13.7 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Lösung: 5xKCM: 500 mM KCl; 150 mM CaCl₂; 250 mM MgCl₂

Ein Aliquot der chemisch-kompetenten *E.coli* XL10 gold-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der Ligationsansatz (20 µl) bzw. 100 ng Plasmid-DNS und 20 µl der 5-fachen KCM-Lösung zusammenpipettiert und das Volumen mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Zu diesem Reaktionsansatz wurden 100 µl der Bakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde für 20 min auf Eis und dann für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1ml LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für 1h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien pelletiert, indem sie für 5 min bei 3000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl LB-Medium aufgenommen und auf die LB-Platte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert. Diese LB-Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.13.8 Herstellung von Plasmid-DNS

Für die Herstellung von Plasmid-DNS wurden die Kits von Macherey & Nagel verwendet. Dazu wurde für eine Mini-Präparation eine 5 ml-Bakterienkultur bzw. für eine Midi-Präparation eine 100 ml-Bakterienkultur angeimpft. Für eine Mini-Präparation wurde die DNS mit dem NucleoSpin-Kit (Macherey & Nagel) aufgearbeitet, für eine Midi-Präparation

mit dem Nucleobond AX-Kit. Die erhaltene DNS-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

4.14 Zellbiologische Methoden

4.14.1 Reporterstudien

Lösungen: PBS s.o.

Lysepuffer 1% Triton X-100; 25 mM Glycylglyzin pH 7,8; 15 mM MgSO₄; 4 mM EGTA; 1 mM DTT

Luziferasepuffer 25 mM Glycylglyzin pH 7,8; 15 mM KPO₄ pH 7,8 ; 15 mM MgSO₄; 4 mM EGTA; 2 mM ATP; 1 mM DTT

Luziferasestock-

lösung 1 mM D-Luziferin; 25 mM Glycylglyzin pH 7,8; 10 mM DTT

2 x β -Galpuffer 200 mM NaPO₄; 20 mM KCl; 1 x ONPG

Die HeLa-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS und 1 x Penizillin-Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für diese Experimente wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, so dass sie zu 30-40% konfluent waren. Die Transfektion erfolgte mit dem FuGene HD Transfection Reagent nach der beigefügten Anweisung. Alle Ansätze enthielten 40 ng des pCMV-Vektors sowie 150 ng des *pKS.Dll1.prmsdwt800wtluc/5*-Plasmids bzw. 250 ng des *p5xGal4-E1b-lucII*-Plasmids. Von dem *b-catS33A*-Plasmid; dem *Tcf1E*-Plasmid bzw. dem *pcDNA3.Tbx6/3*-Plasmid wurden jeweils 200 ng für die Transfektion eingesetzt. Um konzentrationsabhängige Effekte der untersuchten Proteine an dem *Dll1*-Promotor nachweisen zu können, wurden von dem *pcDNA3.G.Tbx18(full)myc*-Plasmid; dem *pcDNA3.G.Tbx18(full).VP16.myc*-Plasmid, dem *pCDNA.HA.Tbx22*-Plasmid und dem *pcDNA3.Uncx4.1.myc*-Plasmid 100 ng, 200 ng, 400 ng und 800 ng für die Transfektion verwendet. Für die Gal4-Bindungsstudie wurden 20 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng des *pcDNA3.GAL4-DNA-BD*-Plasmides, des *pcDNA3.Gal4-BD.myc.Tbx18(full)*-Plasmides und des *pcDNA3.G4.Uncx4.1*-Plasmides eingesetzt. Alle Ansätze wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Die Luziferase- und β -Galaktosidaseaktivitäten wurden 48h nach der Transfektion gemessen. Dazu wurden die Zellen, nachdem sie in eiskaltem PBS gewaschen wurden, in 100 μ l Lysepuffer aufgenommen und für die bessere Lyse 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellfragmente durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C pelletiert. Jeweils 25 μ l des Lysates wurden für die Messung der Luziferase- und β -Galaktosidaseaktivitäten eingesetzt. Für die Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden zu diesen 25 μ l Lysat 25 μ l 2x β -Galpuffer gegeben. Nach

4. Material und Methoden

Gelbfärbung der Ansätze wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl NaCO₃ gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm. Für die Messung der Luziferaseaktivität wurden 25 µl Lysat, 90 µl des Luziferasepuffers und 25 µl der Luziferasestocklösung vermischt und anschließend die Lumineszenz bestimmt. Nach Normalisierung der Lumineszenzwerte mittels der β-Galaktosidaseaktivität konnten die Effekte der untersuchten Proteine ausgewertet werden und die Standardabweichungen bestimmt werden.

4.15 Mausmethoden

4.15.1 Verpaarungen

Embryonen für die Expressionsanalysen gingen aus folgenden Verpaarungen hervor.

Embryonen	Männchen	Weibchen
1) <i>Tbx18</i> ^{GFP/GFP} ; <i>Tbx22</i> ^{-/-}	<i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Tbx22</i> ^{-/+}	<i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Tbx22</i> ^{-/+}
2) <i>Tbx18</i> ^{cre/+} ; <i>Hprt</i> ^{Tbx18/+ o. (Y)}	<i>Tbx18</i> ^{cre/+}	<i>Hprt</i> ^{Tbx18/+ o. (Y)}
3) <i>Tbx18</i> ^{cre/+} ; <i>Hprt</i> ^{Tbx18VP16/+ o. (Y)}	<i>Tbx18</i> ^{cre/+}	<i>Hprt</i> ^{Tbx18VP16/+ o. (Y)}
4) <i>Pax3-cre</i> ^{+/+} ; <i>Hprt</i> ^{Tbx18/+ o. (Y)}	<i>Pax3-cre</i> ^{+/+}	<i>Hprt</i> ^{Tbx18/+ o. (Y)}
5) <i>Pax3-cre</i> ^{+/+} ; <i>Hprt</i> ^{Tbx18VP16/+ o. (Y)}	<i>Pax3-cre</i> ^{+/+}	<i>Hprt</i> ^{Tbx18VP16/+ o. (Y)}
6) <i>Tbx18</i> ^{cre/+} ; <i>Rosa26</i> ^{NICD/+}	<i>Tbx18</i> ^{cre/+}	<i>Rosa26</i> ^{NICD/NICD}
7) <i>Tbx18</i> ^{cre/GFP} ; <i>Rbpj</i> ^{flox/flox}	<i>Tbx18</i> ^{cre/+} ; <i>Rbpj</i> ^{flox/+}	<i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Rbpj</i> ^{flox/+}
8) <i>Pax3-cre</i> ^{+/+} ; <i>Rosa26</i> ^{NICD/+}	<i>Pax3-cre</i> ^{+/+}	<i>Rosa26</i> ^{NICD/NICD}
9) <i>Tbx18</i> ^{GFP/GFP} ; <i>Dll1</i> ^{lacZ/lacZ}	<i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Dll1</i> ^{lacZ/+}	<i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Dll1</i> ^{lacZ/+}
10) <i>Tbx18</i> ^{cre/+} ; <i>Hprt</i> ^{Uncx4.1/+ o. (Y)}	<i>Tbx18</i> ^{cre/+}	<i>Hprt</i> ^{Uncx4.1/+ o. (Y)}
11) <i>Pax3-cre</i> ^{+/+} ; <i>Hprt</i> ^{Uncx4.1/+ o. (Y)}	<i>Pax3-cre</i> ^{+/+}	<i>Hprt</i> ^{Uncx4.1/+ o. (Y)}
12) <i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/lacZ} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/GFP}	<i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/+} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/+}	<i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/+} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/+}
13) <i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/lacZ} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/GFP} ; <i>Tbx22/Tbx22</i>	<i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/+} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Tbx22/Tbx22</i>	<i>Uncx4.1</i> ^{lacZ/+} ; <i>Tbx18</i> ^{GFP/+} ; <i>Tbx22/Tbx22</i>

Als Kontrollembryonen wurden Wildtypembryonen verwendet.

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. In dieser Arbeit wurden 9,5; 10,5; 12,5; 14,5, 18,5 Tage alte Embryonen verwendet.

4. Material und Methoden

***Dll^{lacZ}*-Wildtyp-PCR**

PCR-Produkt: 425bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>5 min</u>
	1 µl Primer: CTGCTGCGCGGTGGAGGGAGG	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: GGAGTCGACACCCAGCACTGGCG		<u>70°C</u>	<u>2 min</u>
	1 µl 10mM dNTPs		72°C	10 min
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Dll^{lacZ}*-Mutanten-PCR**

PCR-Produkt: 600bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>5 min</u>
	1 µl Primer: ATCCCTGGGTCTTTGAAGAAG	30x:	94°C	30 s
	1 µl Primer: CAAATTCAGACGGCAAAC		53°C	60 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>30 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	10 min
	1 µl Taq-Polymerase		8°C	∞
	40 µl Wasser			

***Hprt*-Wildtyp-PCR**

PCR-Produkt: 550bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CCAAGTAGGAAAGTCCCATAAAGTC	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: AGGGTCTATTTCTCCTAAGG		54°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>1,45 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	15 min
	1 µl Taq-Polymerase		8°C	∞
	40 µl Wasser			

***Hprt*-Mutanten-PCR**

PCR-Produkt: 750bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CGTCATTGACGTCAATAGGG	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: AGGGTCTATTTCTCCTAAGG		54°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>1,45 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	15 min
	1 µl Taq-Polymerase		8°C	∞
	40 µl Wasser			

***Hprt*^{Uncx4.1}-PCR**

PCR-Produkt: 1000bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CTGCTTCCTTCACGACATTCAAC	35x:	94°C	30 s
	1 µl Primer: TTCTTGCTCTACCCCATCACGC		60°C	30 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>45 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 35% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	5 min
	1 µl Taq-Polymerase		8°C	∞
	40 µl Wasser			

***Pax3-cre*-PCR**

PCR-Produkt: 1000bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CCTGTCCACCCTTCTCTTGAG	30x:	94°C	35 s
	1 µl Primer: TCCATGAGTGAACGAACCTG		61°C	35 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>35 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	5 min
	1 µl Taq-Polymerase		8°C	∞
	40 µl Wasser			

4. Material und Methoden

***Rbpj^{flax}*-PCR**

PCR-Produkt: Wildtyp: 185bp/ Mutante: 215bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>3 min</u>
	1 µl Primer: AAGCCCCTTTCTTTGTGCGTGC	40x:	94°C	30 s
	1 µl Primer: ATGCTCCCCACTGTTGTGAACTGG		53°C	35 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>40 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	5 min
			8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Rosa^{NICD}*-PCR**

PCR-Produkt: Wildtyp: 220bp/ Mutante: 320bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	30x:	94°C	30 s
	1 µl Primer: GAAAGACCGCGAAGAGTTTG		52°C	30 s
	1 µl Primer: TGAGCGCGCGTCCCCCACC		<u>72°C</u>	<u>35 s</u>
	5 µl 10mM dNTPs		72°C	5 min
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 5% DMSO; 50mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Tbx18^{cre}*-PCR**

PCR-Produkt: 700bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CAGATCTCGGGAGGCATCG	30x:	94°C	35 s
	1 µl Primer: ATTCTCCCACCGTCAGTACG		61°C	35 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>35 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	10 min
			8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Tbx18^{GFP}*-Wildtyp-PCR**

PCR-Produkt: 700bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: GCGCGGAAAAGGGCTCGG	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: AGGAAGCTACTGTCTGGGG		55°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>2,30 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 9,5; 50% DMSO;		72°C	10 min
	20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Tbx18^{GFP}*-Mutanten-PCR**

PCR-Produkt: 1000bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CCGGCTTTGGTGATGATC	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: GACAACCACTACCTGAGCAC		58°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>2,30 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO;		72°C	10 min
	20mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Tbx22*-Wildtyp-PCR**

PCR-Produkt: 660bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CAGCTTCCAAAACAGTGGAG	35x:	94°C	60 s
	1 µl Primer: CTGTTGACTGTCCCTAGAAG		55°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>60 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 35% DMSO;		72°C	10 min
	10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

4. Material und Methoden

***Tbx22*-Mutanten-PCR**

PCR-Produkt: 1050bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: CAGCTTCCAAAACAGTGGAG	35x:	94°C	60 s
	1 µl Primer: GAAGGGACTGGCTGCTATTG		55°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>60 s</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 35% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	10 min
			8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Uncx4.1^{lacZ}*-Wildtyp-PCR**

PCR-Produkt: 270bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: GGTGTCGCCCAAGGAGTC	30x:	94°C	45 s
	1 µl Primer: TTTCGAGCCTCGGCAGCC		55°C	45 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>2,30 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 50% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)		72°C	10 min
			8°C	∞
	1 µl Taq-Polymerase			
	40 µl Wasser			

***Uncx4.1^{lacZ}*-Mutanten-PCR**

PCR-Produkt: 1000bp

PCR:	1 µl DNA	Programm:	<u>94°C</u>	<u>4 min</u>
	1 µl Primer: AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG	8x:	94°C	40 s
	1 µl Primer: TTTCGAGCCTCGGCAGCC		55°C	40 s
	1 µl 10mM dNTPs		<u>72°C</u>	<u>2 min</u>
	5 µl Puffer (100mM, Tris pH 8,5; 35% DMSO; 10mM MgCl ₂ ; 500 KCl)	24x:	94°C	40 s
			56°C	40 s
	1 µl Taq-Polymerase		<u>72°C</u>	<u>2 min</u>
	40 µl Wasser		72°C	15 min
			8°C	∞

4.15.5 Anfertigung von Gewebedünnschnitten

Die in 100% Methanol gelagerten Embryonen wurden in 1:1 Methanol/Ethanol, dann in 100% Ethanol, anschließend in 1:1 Ethanol/2-Propanol und zum Schluss in 100% 2-Propanol überführt. Nach Erwärmung der Embryonen auf 65°C, wurden sie schrittweise in 25% Paraffin, 50% Paraffin, 75% Paraffin und 100% Paraffin überführt und in Formen entsprechend der gewünschten Schnittebene ausgerichtet. Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden am Mikrotom geschnitten, wobei die Schnittdicke 5 µm betrug. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 42 °C getrocknet. Im Anschluss wurden sie bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

4.15.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde auf 5 µm dicken Gewebeschnitten 10,5 Tage alter Embryonen durchgeführt. Das Gewebe wurde mittels Roti-Histol deparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Verdünnungsreihe (100%; 75%; 50%; 25% Ethanol) rehydriert. Nach 2 x Waschen des Gewebes in Wasser, wurde dieses für etwa 45 s in Hämatoxylinlauge gefärbt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte gründlich mit Wasser gespült und für 1 min in 0,5 % Natriumacetat inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in Wasser für je 1 min, wurden die Schnitte für 90 s in Eosin Y gefärbt und anschließend erneut gründlich in Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal für zwei bis drei Minuten in Ethanol dehydriert, bevor sie zweimal für 10 min in Roti-Histol überführt wurden und zuletzt mit Permount eingedeckelt wurden.

4.15.7 LacZ-Färbung ganzer Embryonen

Lösungen: PBS s.o.
Fixativ 1% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 2mM MgCl₂; 5mM EGTA;
 0,02% Nonidet P40
Färbelösung 5mM K₃Fe(CN)₆; 5mM K₄Fe(CN)₆; 2mM MgCl₂; 0,01% Natrium-
 deoxycholat; 0,02% Nonidet P40; 1mg/ml X-Gal
4 % PFA s.o.

Für diese Methode wurden die frisch präparierten 10,5 Tage alten Embryonen für 10 min in PBS gewaschen und anschließend 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min, wurden die Embryonen in die Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgte bei 37°C. Nach Beendigung der Färbung wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in 4% PFA

fixiert. Am nächsten Tag wurden sie erneut in PBS gewaschen und schrittweise in 80% Glycerin überführt. Die Dokumentation erfolgte am Makroskop.

4.15.8 Antikörperfärbung auf ganzen Embryonen

Lösungen: PBS	s.o.
PBST	PBS mit 0,2% Tween20
4% PFA	s.o.
Blocklösung:	PBST; 1% Schafserum; 10% FCS

Für dieses Experiment wurden in 4% PFA fixierte und in 100% Methanol gelagerte 10,5 Tage alte Embryonen verwendet. Die Embryonen wurden in einem ersten Schritt in einer absteigenden Methanol-Verdünnungsreihe (75%; 50%; 25% Methanol) rehydriert. Im Anschluss wurden sie 2 x 15 min in PBS gewaschen und während dieser Waschschrte im Kopfbereich angestochen, um eine Präzipitation des DAB in diesem Gewebe zu verhindern. Um endogene Peroxidasen zu inaktivieren, wurden die Embryonen 1h in 4% H₂O₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 15 min wurden die Embryonen anverdaut. Um eine Diffusion der 1:1000fachen ProteinaseK/PBST-Lösung in die Embryonen zu gewährleisten, wurden diese für 20 min in dieser Lösung auf Eis inkubiert. Der Verdau erfolgte im Anschluss für 5 min bei 37°C. Die ProteinaseK-haltige Lösung wurde durch dreimaliges Waschen in PBST für je 10 min auf Eis vollständig entfernt. Anschließend wurden die Embryonen bei Raumtemperatur in 4% PFA für 30 min fixiert. Nach weiteren Waschschrten in PBST (3x 10 min), wurden die Embryonen für 1h in PBST; 1% Schafserum; 10% FCS geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-Neurofilament; Verdünnung 1:20 in der Blocklösung) erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde der primäre Antikörper durch 4 x 20 min Waschen in PBST entfernt. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation in der Blocklösung, wurde der sekundäre Antikörper (Schaf-anti-Maus-HRP; Verdünnung 1:500) für 4h zu den Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Embryonen erneut 4 x 20 min in PBST und dann für 20 min in der DAB-Lösung (Kit) ohne H₂O₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mittels des DAB-Kits. Nach Beendigung der Färbung wurden die Embryonen mehrmals in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen schrittweise in 80% Glycerin überführt. Die Dokumentation erfolgte am Makroskop. Die Methode wurde in ähnlicher Weise bei Swiatek et al. 1993 beschrieben.

4.15.9 RNS-*in situ*-Hybridisierung mit ganzen Embryonen

Folgende Gene wurden verwendet. Das entsprechende Restriktionsenzym für die Linearisierung des Plasmids und die verwendete RNS-Polymerase sind der Tabelle zu entnehmen.

Gen	Vektor	Linearisierungsenzym	RNA-Polymerase
<i>Cer1</i>	<i>pSport1.mCer1</i>	Sall	SP6
<i>Dll1</i>	<i>pdll1 #15-1,1</i>	Sall	T3
<i>Dll3</i>	<i>pMDelta3.cDNA</i>	NotI	T7
<i>EphA4</i>	<i>pKS.EphA4</i>	HindIII	T7
<i>EphrinB2</i>	<i>pcDNA3.EphrinB2(0.7)</i>	XbaI	T7
<i>GFP</i>	<i>pKS.eGFP(0.8)</i>	BamHI	T7
<i>Hey1</i>	<i>pShlox1.Hey1</i>	EcoRI	SP6
<i>LacZ</i>	<i>pKS.lacZ.Cla-Xba(3.0)</i>	ClaI	T7
<i>Mesp2</i>	<i>pSK.MesP2.c10</i>	BamHI	T7
<i>Mox1</i>	<i>pKS.Mox1.Pst/EcoRI(0.5)</i>	PstI	T3
<i>Myogenin</i>	<i>pMyogenin</i>	HindIII	T3
<i>Notch1</i>	<i>pnotch1 cDNA</i>	ClaI	T7
<i>Notch2</i>	<i>pnotch2 cDNA</i>	NotI	T7
<i>Pax1</i>	<i>pPax1</i>	HindIII	T7
<i>Pax3</i>	<i>pPax3 in situ</i>	HindIII	T7
<i>Pax9</i>	<i>pPax-9.wm</i>	EcoRI	T7
<i>Tbx18</i>	<i>pKS.tbx18.cDNA(2.0)</i>	HindIII	T7
<i>Tbx22</i>	<i>pKS.Tbx22(0.6)</i>	BamHI	T3
<i>Uncx4.1</i>	<i>pPHD-1 (zebra)</i>	Sall	T7

Linearisierung von Plasmiden

Lösung: TE s.o.

Für den Linearisierungsansatz wurden 10 µg Plasmid-DNS in einem Endvolumen von 100 µl eingesetzt. Zu der DNS wurden 10 µl des 10 x Puffers, 1 µl 100 x BSA und 3 µl Enzym gegeben. Der Ansatz wurde auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt und 2h bei 37°C inkubiert. Für die Aufreinigung des Linearisierungsansatzes wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 100 µl eines 1:1 Phenol-Chloroform-Gemisches zu dem Verdau gegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde dieser für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert.

4. Material und Methoden

Nach Abnahme der oberen Phase wurden 10 µl Natriumacetat und 220 µl 100% Ethanol zugegeben und der Ansatz für 1h auf -80°C gestellt. Anschließend wurde die DNS durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und zum Schluss in 20 µl TE gelöst. Auf das Kontrollagarosegel wurde 1 µl der Linearisierung aufgetragen.

RNS-Sondensynthese

Lösung: DEPC-Wasser 0,01% DEPC

Für die Herstellung der RNS-Sonden wurden 1 µl des linearisierten Plasmides, 1 µl des 10 x Transkriptionspuffers, 1 µl des 10 x DIG-Reaktionsmix, 1 µl 0,1 mM DTT, 0,3 µl RNasin und 0,5 µl Polymerase zusammenpipettiert. Das Volumen wurde auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde die DNS-Matrize mittels eines DNase-Verdau abgebaut (5 U). Dazu wurde nach Zugabe der DNase, der Ansatz erneut für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 100 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Für die Fällung der RNS-Sonden wurden 10 µl Lithiumchlorid und 300 µl 100% Ethanol zu dem Ansatz gegeben. Dieser wurde für 1h auf -80°C gestellt. Anschließend wurden die RNS-Sonden durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und zum Schluss in 60 µl DEPC-Wasser gelöst. Auf das Kontrollagarosegel wurden 3 µl der RNS-Sonde aufgetragen.

RNS-*in situ*-Hybridisierung auf Ganzkörperpräparaten

Lösungen: PBS /PBST	s.o.
PFA	s.o.
RIPA	0,05% SDS; 150mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0,5% Natriumdeoxycholat; 1mM EDTA; 50mM Tris pH 8,0
20 x SSC	300 mM Natriumzitat; 3M NaCl pH 7,0
Hybridisierungspuffer	50% Formamid; 25% 20 x SSC; 0,1% Tween 20; pH 6 Moorman et al. (2001)
SSC/Formamid	50% Formamid; 10% 20 x SSC; 0,1% Tween 20
TBST	1,4M NaCl; 25mM KCl; 25% Tris pH 7,5; 0,1% Tween 20
RNaselösung	500mM NaCl; 10mM Tris pH 7,5; 0,1% Tween 20
MABT	100mM Maleinsäure; 150mM NaCl; 0,1% Tween-20, pH 7,5
Alkalischer	

Phosphatase-
puffer 100 mM NaCl; 100 mM Tris pH 9,5; 50 mM MgCl₂,
 0,1% Tween 20

Für dieses Experiment wurden in 4% PFA fixierte und in 100% Methanol gelagerte 9,5 bzw. 10,5 Tage alte Embryonen verwendet. Für jeden Ansatz wurden mindestens 2 Embryonen eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25%) rehydriert. Jeder Schritt wurde für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Embryonen 2 x 10 min in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1h in 6% H₂O₂/PBST, um endogene Peroxidase zu inhibieren. Um das H₂O₂ vollständig zu entfernen, wurden die Embryonen erneut 3 x 10 min in PBST gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe 3 x 5 min in RIPA-Puffer inkubiert, 3x5 min in PBST gewaschen und für 20 min in 4% PFA/0,02% Glutaraldehyd fixiert. Um das Fixativ zu entfernen, wurden die Embryonen erneut 3 x 5 min in PBST gewaschen. Vor Zugabe der Sonden zu den Embryonen wurden diese für 2h in Hybridisierungspuffer bei 70°C prähybridisiert. Die Inkubation mit den RNS-Sonden erfolgte über Nacht bei 70°C. Von den RNS-Sonden wurden meistens 6 µl auf 500 µl Hybridisierungspuffer eingesetzt. Vor der Zugabe der Sonden zu den Embryonen, wurden die Sonden für 5 min auf 80°C erwärmt. Am folgenden Tag wurden die Embryonen 2 x 30 min bei 70°C mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Durch den sich anschließenden RNaseA-Verdau (100 µl/ ml) wurde die nicht spezifisch gebundene RNS verdaut. Dieser Verdau wurde für 2 x 30 min bei 37°C durchgeführt. Um die Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten, wurden die Embryonen weitere Stunden bei 70°C in SSC/Formamid/Tween gewaschen. Während dieser Zeit wurde die Lösung mehrmals mit länger werdenden Intervallen (2 x 5 min; 3 x 10 min, 9 x 20 min) gewechselt. Um das Formamid zu entfernen wurden die Embryonen 2 x 10 min in TBST und anschließend 2 x 10 min in MABT gewaschen. Im Anschluss wurden die Embryonen für 1h in 5% der Blockierungsreagenz geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Dieser wurde in einer 1:5000 Verdünnung (in 1% Blockierungsreagenz) eingesetzt. Am dritten Tag wurden die Embryonen 3 x 5 min und anschließend 8 x 1h in TBST gewaschen, um den unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Vor der Färbung wurden die Embryonen 3 x 20 min in alkalischen Phosphatase-Puffer gewaschen. Für die Färbung wurde BM Purple eingesetzt. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Embryonen in PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden sie schrittweise in 80% Glycerin überführt werden. Die Dokumentation erfolgte am Makroskop.

4.15.10 Skelettpräparation

Lösung Alzianblau 80% Ethanol; 20% Essigsäure; 150 mg/l Alzianblau
Alizarinrot 0,1% KOH; 50 mg/l Alizarinrot

Im Zuge der Skelettpräparation am Embryonaltag 18,5 wurden die Embryonen, nachdem das extraembryonale Gewebe vollständig entfernt wurde, für 2 min in 65°C warmes Leitungswasser gegeben. Dadurch konnte im Anschluss die Haut entfernt werden. Weiterhin wurden die Innereien herausgenommen. Ein Teil der Lunge wurde hierbei für die spätere Genotypisierung verwendet. Die so vorbereiteten Embryonen wurden in 100% Ethanol über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden sie in die Alzianblau-Lösung gegeben und darin 4 Tage inkubiert, wobei einmal die Lösung ausgetauscht wurde. Um die Alzianblau-Lösung anschließend gründlich zu entfernen, wurden die Präparate für 2 Tage in 100% Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das Gewebe der Embryonen stark anverdaut. Dieses geschah mit 0,5% KOH-Lösung, in welcher die Embryonen für 3h inkubierten. Danach wurden die Skelette bis zum nächsten Tag in die Alizarinrot-Lösung gegeben. Nach Färbung der Knochen wurden die Skelette vorsichtig weiterverdaut, bis das Gewebe möglichst vollständig entfernt war.

Bei einer Skelettpräparation am Embryonaltag 14,5 wurden die Embryonen, nachdem sie 4 Tage in der Alzianblau-Lösung inkubiert wurden, für mehrere Stunden in 100% Methanol und anschließend in 2:1 Benzylbenzoat/Benzylalkohol überführt.

Die Dokumentation der Skelette erfolgte am Makroskop. Die Methode wurde in ähnlicher Weise bei Mallo und Brändlin 1997 beschrieben.

4.15.11 Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Lyso Tracker

Die frisch präparierten Embryonen wurden in die vorgewärmte Färbelösung überführt, bestehend aus 2,5 μM des Lyso Trackers in PBS, und für 30 min auf 37°C gestellt. Im Anschluss wurden die Embryonen 3 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend sofort am Makroskop dokumentiert.

5. Ergebnisse

5.1 Tbx18 und Tbx22 fungieren als Repressoren der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten

5.1.1 Tbx18 und Tbx22 besitzen eine redundante Funktion bei der Somitogenese

Mehrere Gene der Familie der T-Box Transkriptionsfaktoren sind im paraxialen (somitischen) Mesoderm des Mausembryos exprimiert. Neben *Tbx6* und *T*, deren Expression auf den kaudalen Bereich des paraxialen Mesoderms, dem PSM, begrenzt ist, weisen *Tbx18* und *Tbx22* eine Genaktivität in dieser mesodermalen Struktur auf (Kraus et al. 2001). In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen, konnte auch in dieser Arbeit am Embryonaltag 9,5 und 11,5 mittels RNS-*in situ* Hybridisierung sowohl die mRNA von *Tbx18* als auch die von *Tbx22* in der kranialen Hälfte der zukünftigen Somiten S-1 und S0 sowie in diesem Kompartiment der ersten beiden epithelialen Somiten, S1 und S2, nachgewiesen werden (5.1.1.1 E-H). Im Zuge der Differenzierung der Somiten blieb die Expression von *Tbx18* in der kranialen Hälfte des Sklerotoms erhalten (5.1.1.1 A; C). Im Gegensatz dazu, war *Tbx22* in den differenzierten Somiten im Myotom, jedoch nicht im Sklerotom exprimiert (5.1.1.1 B; D). Weiterhin konnten die bereits beschriebenen Expressionsdomänen für *Tbx18* im Proepikardialorgan, im Mandibularbogen und in den Vordergliedmaßenknospen am Embryonaltag 9,5 detektiert werden (5.1.1.1 A). Am Embryonaltag 11,5 war eine weitere *Tbx18*-Expressionsdomäne im Urogenitalsystem zu erkennen (5.1.1.1 C). Ebenso konnte für *Tbx22* die bereits beschriebene kraniofaziale Expression in den beiden untersuchten Entwicklungsstadien erfasst werden (5.1.1.1 B; D).

Erste Hinweise zur Regulation von *Tbx18* lieferte die Analyse von Bussen et al. (2004). Die Autoren konnten zeigen, dass der Verlust von *Uncx4.1* in einer Ausweitung der *Tbx18*-Expression in die kaudale Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S3, resultierte. Hingegen war die Expression von *Tbx18* in den Somitomeren S-1 und S0 bzw. in den epithelialen Somiten S1 und S2 weiterhin auf das kraniale Kompartiment dieser Mutanten begrenzt (5.1.1.1 I; K). Vergleichbar mit diesem Ergebnis war die Expression von *Tbx22* in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten ebenfalls unverändert (5.1.1.1 J; L). Eine Genaktivität in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 sowie in diesem Kompartiment in den Somiten S1 und S2 war in diesen Mutanten sowohl am Embryonaltag 9,5 als auch am Embryonaltag 11,5 sichtbar.

5. Ergebnisse

Ferner konnten die Autoren beobachten, dass der Verlust von *Dll1* eine frühe Expansion der *Tbx18*-Expression in den kaudalen Bereich der Somiten verursacht (Bussen et al. 2004). In *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten war *Tbx18* ektopisch im kaudalen Kompartiment der zukünftigen Somiten S-1 und S0 bzw. in diesem in den epithelialen Somiten und im Sklerotom exprimiert (5.1.1.1 M). Gleichermäßen war in diesen Mutanten auch die Expression von *Tbx22* im PSM und in den epithelialen Somiten auf die kaudale Hälfte ausgeweitet (5.1.1.1 N). Aufgrund der frühen Letalität der *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten konnte die Analyse nur am Embryonaltag 9,5 durchgeführt werden (Harbe de Angelis et al. 1997).

Die Koexpression und die ähnliche Regulation der beiden T-Box Transkriptionsfaktoren im paraxialen Mesoderm lassen auf eine mögliche kooperative Funktion bei der Somitogenese schließen.

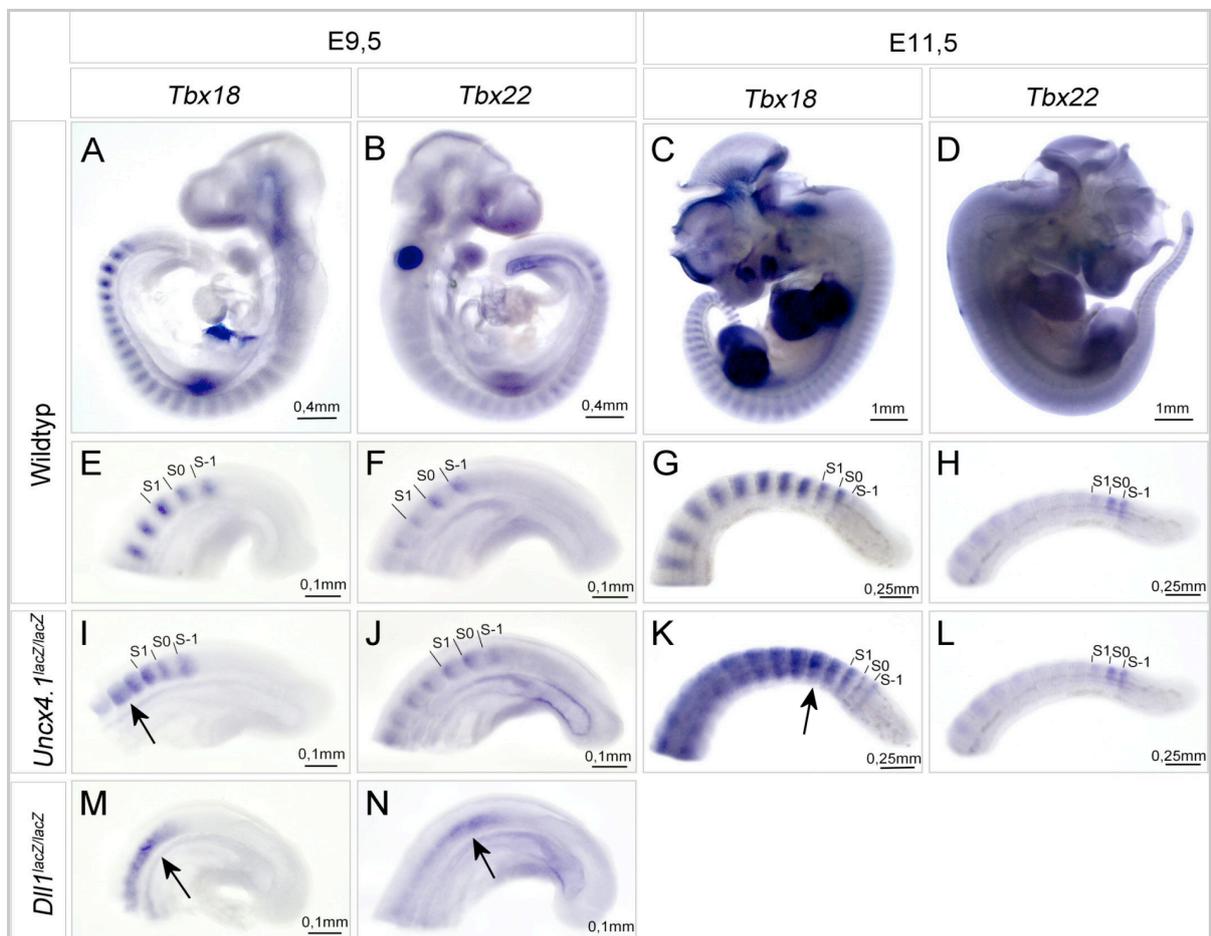
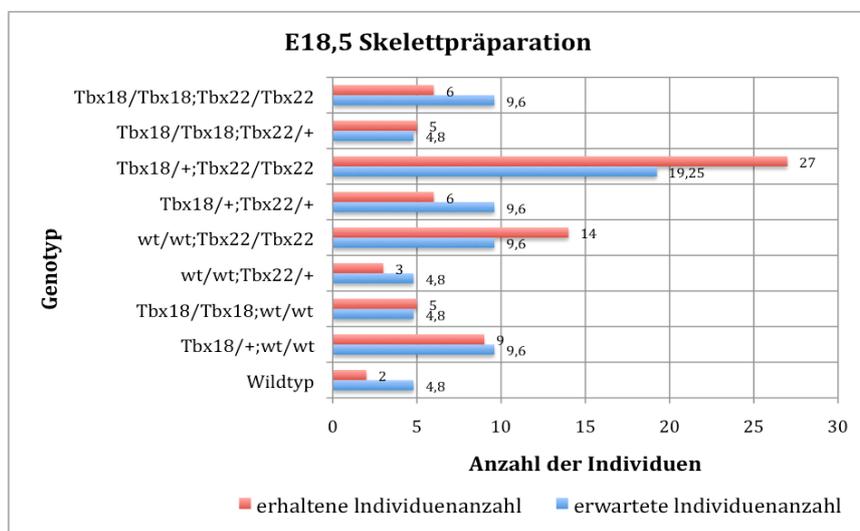


Abb.5.1.1.1: **Die Expression und Regulation von *Tbx18* und *Tbx22* in der Somitogenese.** Die Analyse der Expression von *Tbx18* und *Tbx22* erfolgte mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung in kompletten 9,5 (A; B) bzw. 11,5 (C; D) Tage alten Wildtypembryonen bzw. Mutanten. Die Abb.5.1.1.1 E-N zeigen Ausschnittsvergrößerungen der kaudalen Körperregion von E9,5 (E; F) bzw. E11,5 (G; H) Wildtypembryonen sowie E9,5 (I; J) bzw. E11,5 (K; L) *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten als auch E9,5 (M; N) *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Die Pfeile verweisen auf die ausgeweitete Expression von *Tbx18* in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante und *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutante bzw. die von *Tbx22* in der *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutante.

Um überprüfen zu können, ob *Tbx18* und *Tbx22* eine redundante Funktion bei der Somitogenese ausüben, wurde ein Mausstamm hergestellt, der sowohl eine Mutation im *Tbx18*-Allel als auch im *Tbx22*-Allel aufwies. Die Skelettdefekte der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen am Embryonaltag 18,5 wurden mit denen von *Tbx18^{GFP/GFP}*-Embryonen und *Tbx22^{-/-}*-Embryonen auf ihren Schweregrad hin verglichen. Bei einer kooperativen Funktion der beiden T-Box-Transkriptionsfaktoren in der Somitogenese sollten die *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen einen stärkeren Phänotyp aufweisen, als der alleinige Verlust von *Tbx18* verursacht.

Für die Züchtung der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen wurden *Tbx18^{GFP/+};Tbx22^{+/-}*-Weibchen mit *Tbx18^{GFP/+};Tbx22^{+/-}*-Männchen verpaart. Das mutante *Tbx18*-Allel konnte nur im heterozygoten Zustand gezüchtet werden, da *Tbx18^{GFP/GFP}*-Embryonen kurz nach der Geburt aufgrund von respiratorischer Insuffizienz sterben (Bussen et al. 2004). Die Verteilung der Nachkommen aus dieser Verpaarung folgte dem Mendelschen Verteilungsgesetz zweier unabhängig voneinander vererbter Allele, wovon eines X-chromosomal (*Tbx22*) vererbt wird (Diagramm 5.1.1.1). Die Anzahl der erhaltenen Individuen pro Genotyp ließ darauf schließen, dass weder *Tbx18^{GFP/GFP}*-Embryonen oder *Tbx22^{-/-}*-Embryonen noch *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen vor dem Embryonaltag 18,5 embryonal letal waren. Diese Resultate stützen bereits veröffentlichte Analysen der *Tbx18^{GFP/GFP}*- bzw. *Tbx22^{-/-}*-Mausmutanten, bei denen ebenfalls keine embryonale Letalität festgestellt wurde (Bussen et al. 2004; Pauws et al. 2009).

Diagramm 5.1.1.1: Die Verteilung der Genotypen der Züchtung der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 77 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen. (Die Analyse der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Skelettdefekte wurde von Tanja Matkovic durchgeführt.)



Pauws et al. (2009) konnten nachweisen, dass *Tbx22*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5, bis auf die Ausbildung einer Gaumenspalte, phänotypisch unauffällig waren und keine Skelettdefekte hatten. Des Weiteren konnten Bussen et al. (2004) beobachten, dass auch *Tbx18*^{GFP/+}-Mutanten keine Skelettdefekte aufwiesen. Im Gegensatz dazu, waren *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten durch ektoische Skelettelemente charakterisiert. Der Verlust von *Tbx18* führte bei individuellen Wirbeln des Hals- und Thoraxbereiches der Wirbelsäule zu expandierten proximalen Rippen und der Bildung ektoischer Pedikel (Bussen et al. 2004). Weiterhin konnten im Lenden- und Schwanzwirbelbereich ektoische Knorpelstrukturen nachgewiesen werden, welche die Pedikel untereinander verbinden (Bussen et al. 2004). Zudem waren die Zwischenwirbelscheiben dieser *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten im Vergleich zu Wildtypembryonen kleiner, was eine verkürzte Körperachse zur Folge hatte (Bussen et al. 2004). Die Analyse der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5 zeigte ähnliche, aber stärker ausgeprägte Skelettdefekte. So war im Vergleich zu *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten jeder Wirbel des Hals- und Thoraxbereiches durch die Expansion der proximalen Rippen und die Bildung ektoischer Pedikel gekennzeichnet (Abb.5.1.1.2 D). Als Resultat wurde aus diesen fusionierten Skelettelementen ein zusammenhängendes Knochenband im Hals- und Thoraxbereich der Wirbelsäule gebildet. Die Expansion der Pedikel war zudem nicht nur auf diesen Bereich der Wirbelsäule begrenzt, sondern auch im Lenden- und Schwanzwirbelbereich zu finden (Abb.5.1.1.2 H). Die Zunahme des Schweregrades der Skelettdefekte ließ die Schlussfolgerung zu, dass *Tbx18* und *Tbx22* eine redundante Funktion in der Somitogenese ausüben. Ähnlich wie die *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten, starben neugeborene *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Jungtiere infolge respiratorischer Insuffizienz. (Die Analyse der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Skelettdefekte wurde von Tanja Matkovic durchgeführt.)

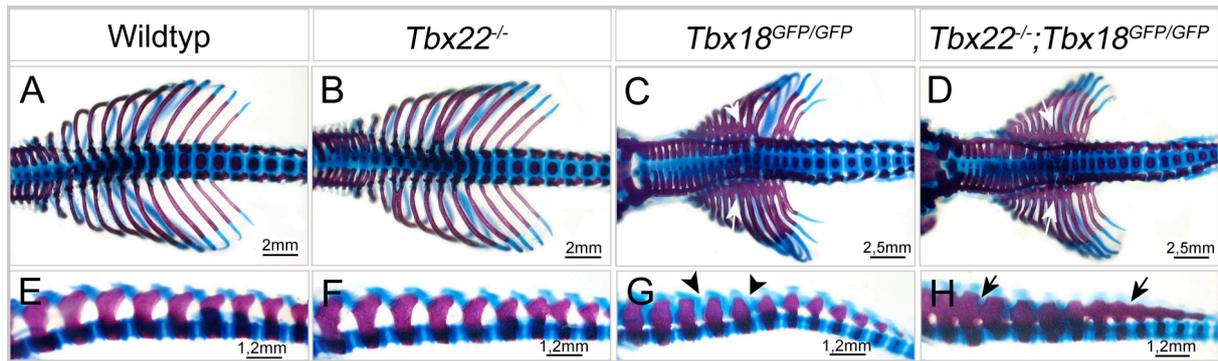


Abb.5.1.1.2: Skelettdefekte der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5.

Die Abb.5.1.1.2 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.1.1.2 E-H die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E), die *Tbx22*^{-/-}-Mutante (B; F), die *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante (C; G) und die *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante (D; H). Die Pfeile markieren die ektopischen Knochenelemente, die Pfeilköpfe die ektopischen Knorpel Elemente der Mutanten. (Die Analyse der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Skelettdefekte wurde von Tanja Matkovic durchgeführt.)

Die Ursache der Skelettdefekte der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten konnte auf den Verlust der A/P-Polarität der Somiten im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung zurückgeführt werden (Bussen et al. 2004). Die histologische Analyse der differenzierten Somiten am Embryonaltag 10,5 hatte gezeigt, dass die Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Embryonen durch eine gleichmäßige Verteilung der Zelldichte in den beiden Kompartimenten des Sklerotoms charakterisiert waren (Bussen et al. 2004). Der Verlust der Kompartimentierung dieses Derivates der Somiten war auch in *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Embryonen sichtbar. Das Sklerotom dieser Doppelmutanten zeichnete sich ebenfalls durch eine einheitlich hohe Zelldichte in seinen beiden Kompartimenten aus (Abb.5.1.1.3 D). *Tbx22*^{-/-}-Embryonen dagegen wiesen, wie für Wildtypembryonen charakteristisch, eine A/P-Polarität der Somiten auf, morphologisch an einer höheren Zelldichte in der kaudalen Sklerotomhälfte zu erkennen (Abb.5.1.1.3 A; B).

Weiterhin konnte bei Bussen et al. (2004) nachgewiesen werden, dass der Verlust der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Embryonen sich auf die Organisation der Spinalnerven auswirkte. Aufgrund repulsiver Signale in der kaudalen Hälfte der Somiten durchziehen diese ausschließlich das kraniale Kompartiment (Keynes et al. 1984; Rickmann et al. 1985; Kuan et al. 2004). *Tbx22*^{-/-}-Embryonen zeigten eine regelmäßige Anordnung der Spinalnerven in der kranialen Hälfte der Somiten am Embryonaltag 10,5, nachgewiesen durch eine Antikörperfärbung gegen Neurofilament, den Intermediärfilamenten der Nervenzellen (Abb.5.1.1.3 F; J). Im Gegensatz dazu, durchzogen weniger stark ausgeprägte Spinalnerven in unregelmäßigem Abstand die Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten (Abb.5.1.1.3 G; K). Der gemeinsame Verlust von *Tbx18* und *Tbx22* resultierte in der Abwesenheit der Spinalnerven in allen Somiten dieser Embryonen, was auf die Anwesenheit starker repulsiver Signale, nicht

5. Ergebnisse

nur in der kaudalen Hälfte, sondern auch in der kranialen Hälfte, und somit auf eine komplette Posteriorisierung dieser mesodermalen Strukturen schließen lässt (Abb.5.1.1.3 H; L). (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

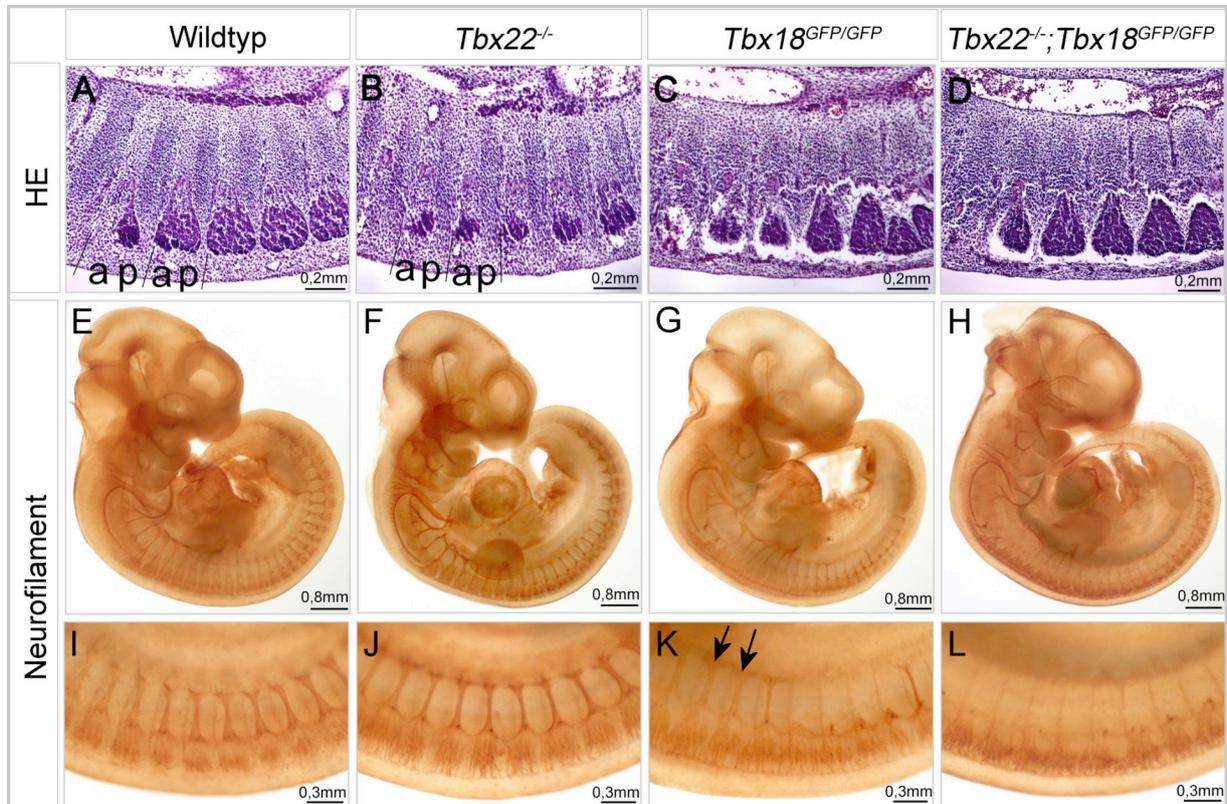


Abb.5.1.1.3: Die histologische Analyse der A/P-Polarität in $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.1.3 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der histologischen Färbung der differenzierten Somiten in der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und der $Tbx22^{-/-}$ -Mutante ist eingezeichnet. Die Abb.5.1.1.3 E-L stellen eine Antikörperfärbung gegen Neurofilament dar, bei E-H in gesamten Embryonen am Embryonaltag 10,5, bei I-L als Ausschnittsvergrößerung der differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I), die $Tbx22^{-/-}$ -Mutante (B; F; J), die $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante (C; G; K) und die $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante (D; H; L). Die Pfeile markieren die schwächeren Nervenstränge in der $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

Aufgrund der Expression von $Tbx18$ und $Tbx22$ im kranialen PSM in den Somitomeren S-1 und S0 wie auch in den epithelialen Somiten S1 und S2, könnte ein Verlust dieser Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Differenzierung der Somiten haben und auf diese Weise die Bildung des Myotoms und Dermatoms beeinflussen. Um festzustellen, ob eine Beeinträchtigung des Differenzierungsprozesses in der $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante oder der $Tbx22^{-/-}$ -Mutante bzw. in der $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante vorlag, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierung die Expression einiger Gene am Embryonaltag 10,5 analysiert, die

spezifisch in den Derivaten der epithelialen Somiten, dem Dermatome, dem Myotome und dem Sklerotome, induziert werden.

Pax3, ein Marker gen für das Dermomyotome (Goulding et al. 1994), war im Wildtypembryo wie auch in den drei Mutanten regulär im Dermomyotome der differenzierten Somiten exprimiert, was an der stärkeren Expression in den dermomyotomalen Lippen zu erkennen war (Abb.5.1.1.4 A-D). Auch der weitere Verlauf der Differenzierung der Somiten war in der *Tbx22*^{-/-}-Mutante, der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante nicht beeinflusst. Die Expression von *Myogenin*, einem Marker des myotomalen Kompartiments (Edmondson et al. 1989), war in allen drei Mutanten (Abb.5.1.1.4 E-H) unverändert. Bei einer genaueren Betrachtung der Expression von *Pax1*, einem paired-Box-Transkriptionsfaktor, welcher spezifisch im ventralen Sklerotome exprimiert ist, war jedoch auffällig, dass die stärkere Expression, charakteristisch für die kaudale Hälfte des Sklerotoms (Deutsch et al. 1988), in der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und in der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante auf die kraniale Hälfte ausgeweitet war (Abb.5.1.1.4 I; K; L). Ebenso war die Expression eines weiteren paired-Box-Transkriptionsfaktor, *Pax9*, und die von *Mox1*, einem Homöobox-Gen, in diesen beiden Mutanten durch eine gleichmäßig hohe Intensität in beiden Kompartimenten des Sklerotoms gekennzeichnet (Abb.5.1.1.4 M-T), die bei dem Wildtypembryo typisch für die kaudale Sklerotomhälfte war (Neubüser et al. 1995; Candia et al. 1992). Diese unterschiedlich starke Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in den beiden Kompartimenten des Sklerotoms wurde durch den Verlust von *Tbx22* nicht beeinflusst (Abb.5.1.1.4 J; N; R). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Differenzierung der Somiten in der *Tbx22*^{-/-}-Mutante, der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante nicht beeinträchtigt war. Wie bereits die histologische Analyse der Mutanten zeigte, ging jedoch die Kompartimentierung des Sklerotoms bei einem Verlust von *Tbx18* bzw. in der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante verloren.

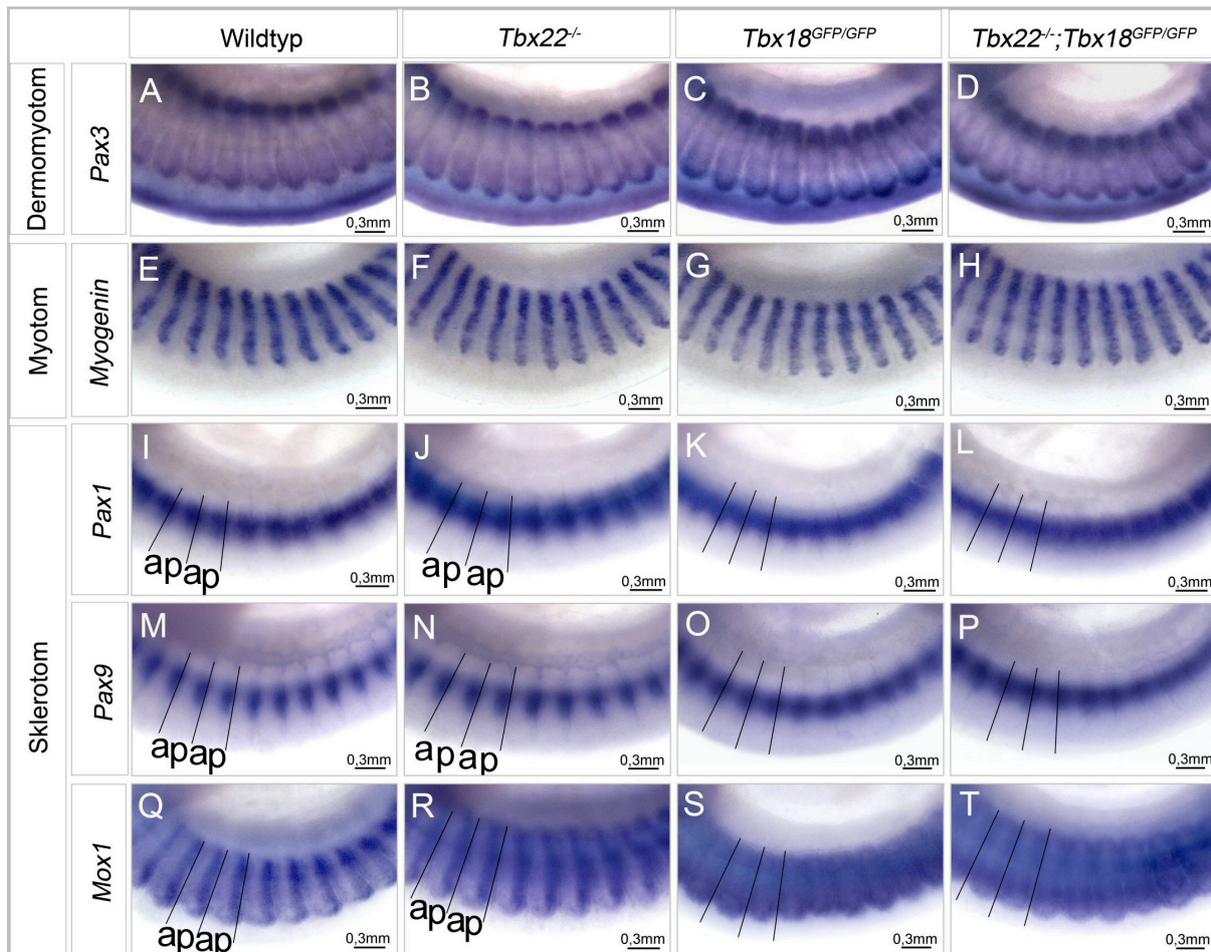


Abb.5.1.1.4: Die Differenzierung der Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Embryonen. Die Abb.5.1.1.4 A-T zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.1.4 A-D stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.1.1.4 E-H die *Myogenin*-Expression, Abb.5.1.1.4 I-L die *Pax1*-Expression, Abb.5.1.1.4 M-P die *Pax9*-Expression und Abb.5.1.1.4 Q-T die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M; Q), die *Tbx22*^{-/-}-Mutante (B; F; J; N; R), die *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante (C; G; K; O; S) und die *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante (D; H; L; P; T). Die Pfeile markieren die ausgeweitete Expression der Gene in die kraniale Hälfte der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und der *Tbx22*^{-/-}-Mutante sowie die Somitengrenzen der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante sind bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet.

Um den Verlust der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante genauer untersuchen zu können, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 die Expression der beiden Gene analysiert, die in den Somiten spezifisch in der kranialen Hälfte bzw. in dem kaudalen Kompartiment exprimiert werden, *Tbx18* und *Uncx4.1*. Die Expression von *Tbx18* wurde in der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante durch den Nachweis der GFP-Aktivität des *Tbx18*^{GFP}-Allels sichtbar gemacht.

In Übereinstimmung mit der veränderten Expression der Sklerotom-spezifischen Gene konnte auch eine Ausweitung der Expression von *Uncx4.1* in die kraniale Hälfte des Sklerotoms der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante am Embryonaltag 10,5 nachgewiesen werden (Abb.5.1.1.5 A-D). Bei einem Vergleich der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante mit der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante war auffällig, dass die differenzierten Somiten bei einem alleinigen Verlust von *Tbx18* weiterhin eine leicht stärkere Expression von *Uncx4.1* in der kaudalen Sklerotomhälfte aufwiesen, während die *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutanten durch eine gleichmäßig starke Expression dieses Homöobox-Transkriptionsfaktor in beiden Kompartimenten charakterisiert waren (Abb.5.1.1.5 C; D). Die Genaktivität von *Uncx4.1* in *Tbx22^{-/-}*-Mutanten war unverändert (Abb.5 B). Die Ausweitung der Expression von *Uncx4.1* in die kraniale Hälfte der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante ging mit einem Verlust der *Tbx18*-Expression in diesen Mutanten einher, erkennbar anhand der Abwesenheit der GFP-Expression des *Tbx18^{GFP}*-Allels (Abb.5.1.1.5 G; H). In der *Tbx22^{-/-}*-Mutante war die Expression von *Tbx18* weiterhin auf die kraniale Hälfte des Sklerotoms begrenzt (Abb.5.1.1.5 F).

Um zu bestimmen, ab welchem Somiten der Verlust der A/P-Polarität begann, wurde die Expression von *Uncx4.1* und *Tbx18* in den am weitesten kaudal gelegenen Somiten der Schwanzregion am Embryonaltag 10,5 analysiert. Wie bereits bei Bussen et al. (2004) beschrieben wurde, war die Expression von *Uncx4.1* in den zuletzt gebildeten Somiten der Schwanzregion der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante auf die kaudale Hälfte derselben begrenzt. Eine Ausweitung der Expression war erst in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule nachweisbar. Der zusätzliche Verlust von *Tbx22* in einem *Tbx18*-homozygoten Mutantenhintergrund resultierte jedoch in einer frühen Expansion von *Uncx4.1* in die kraniale Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S1 (Abb.5.1.1.5 L). Entsprechend war diese Doppelmutante durch den Verlust der *Tbx18*-Expression, ab dem Somiten S2, gekennzeichnet (Abb.5 P). Lediglich in den Somitomeren S-1 und S0 und dem Somiten S1 war eine schwache Expression dieses T-Box-Gens weiterhin in der kranialen Hälfte detektierbar. Der alleinige Verlust von *Tbx18* hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression dieses T-Box-Transkriptionsfaktors in den Somiten der Schwanzregion der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (Abb.5.1.1.5 O). Sowohl die Expression von *Tbx18* als auch die von *Uncx4.1* sind in *Tbx22^{-/-}*-Mutanten unverändert (Abb.5.1.1.5 J; N).

Zusammenfassend ist die *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante durch eine, im Vergleich zu der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante, früher einsetzende Posteriorisierung der Somiten charakterisiert. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

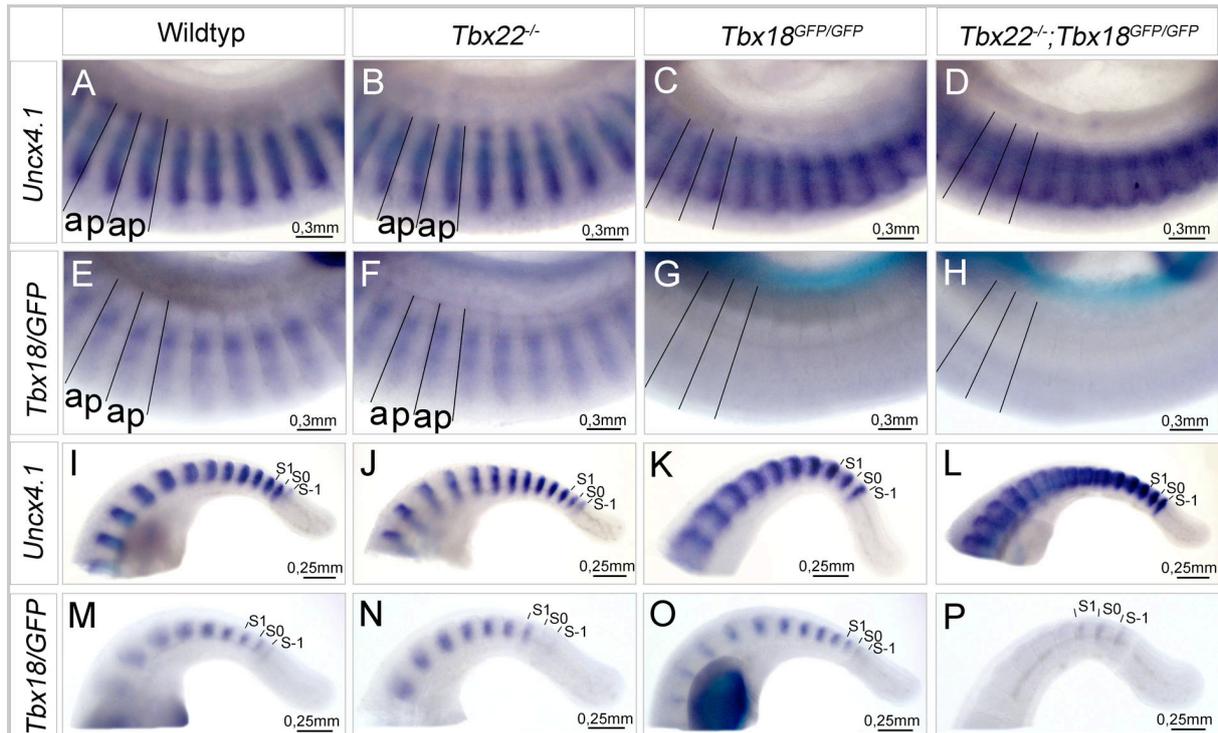


Abb.5.1.1.5: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.1.5 A-H zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (A-D) und *Tbx18* (E-H) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und der $Tbx22^{-/-}$ -Mutante sowie die Somitengrenzen der $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante und der $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante sind eingezeichnet. Die Abb.5.1.1.5 I-P stellt die Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M), die $Tbx22^{-/-}$ -Mutante (B; F; J; N), die $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante (C; G; K; O) und die $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante (D; H; L; P). Die Pfeile verweisen auf die leicht stärkere *Uncx4.1*-Expression in der kaudalen Sklerotomhälfte der $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante und auf die Ausweitung in der $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

Für die präzisere Analyse der A/P-Polarisierung der Somitomere und der epithelialen Somiten der $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierung die Expression von Genen am Embryonaltag 10,5, die in den Somitomeren S-1 und S0 sowie in den epithelialen Somiten S1 und S2 exprimiert sind, untersucht.

Das Homöobox-Gen, *Mox1* war in Wildtypembryonen, ab dem Somiten S0, stärker in der kaudalen Hälfte der Somiten exprimiert (Candia et al. 1992). Die Analyse der Expression von *Mox1* in den Somiten der Schwanzregion der $Tbx22^{-/-}$ -Mutante und der $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante zeigte, dass das kaudale Kompartiment weiterhin eine höhere Genaktivität besaß (Abb.5.1.1.6 F; G). Der zusätzliche Verlust von *Tbx22* im $Tbx18$ -homozygoten Mutantenhintergrund resultierte dagegen in der Ausweitung des für die kaudale Somitenhälfte charakteristischen hohen Expressionslevels in die kraniale Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S1 (Abb.5.1.1.6

H). Eine ähnliche Situation unterlag dem paired-Box-Transkriptionsfaktor, *Pax9*. Die Genexpression von *Pax9* wurde jedoch erst in dem Somiten S2 initiiert (Neubüser et al. 1995). Eine gleichmäßig hohe Expression dieses Transkriptionsfaktors in den Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante war daher bereits unmittelbar nach dessen Induktion, ab dem Somiten S2, sichtbar (Abb.5.1.1.6 D). Die *Tbx22^{-/-}*-Mutante und die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante waren durch eine für Wildtypembryonen charakteristisch höhere *Pax9*-Expression in der kaudalen Somitenhälfte und ein geringeres Expressionslevel dieses Transkriptionsfaktors in dem kranialen Kompartiment charakterisiert (Abb.5.1.1.6 B; C). Ein weiteres Gen, welches in der kaudalen Hälfte der Somiten exprimiert ist, ist ein Mitglied des Ephrin-Signalweges, *EphrinB2* (Wang et al. 1997). *EphrinB2* ist in der kaudalen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 sowie in diesem Kompartiment in den epithelialen Somiten der Schwanzregion eines Embryos exprimiert (Wang et al. 1997). Diese Expressionsdomänen wurde durch den Verlust von *Tbx22* bzw. *Tbx18* nicht beeinflusst (Abb.5.1.1.6 J; K). Im Gegensatz dazu, war die Expression des Liganden des Ephrin-Signalweges, ähnlich wie die von *Pax9* und *Mox1*, in der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante in die kraniale Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S1, ausgeweitet (Abb.5.1.1.6 L). Das Gen, welches den Rezeptor für *EphrinB2*, *EphA4*, kodiert, war in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 exprimiert (Nieto et al. 1992). Des Weiteren war in dieser Hälfte des zukünftigen Somiten S-1 die Expression des Transkriptionsfaktors, *Mesp2*, und die von *Cer1*, welches zudem eine Genaktivität in dem kranialen Kompartiment des Somitomers S0 und in diesem in dem Somiten S1 aufwies, nachzuweisen (Saga et al. 1997; Biben et al. 1998) (Abb.5.1.1.6 Q; U). Die Expression dieser Gene war in allen drei untersuchten Mutanten weiterhin auf die kraniale Hälfte der Somitomere und der epithelialen Somiten begrenzt (Abb.5.1.1.6 M-X).

Diese Expressionsanalyse zeigte, dass die A/P-Polarität im kranialen Bereich des PSM in der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante etabliert wurde, in den Somiten jedoch nicht aufrechterhalten wurde. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

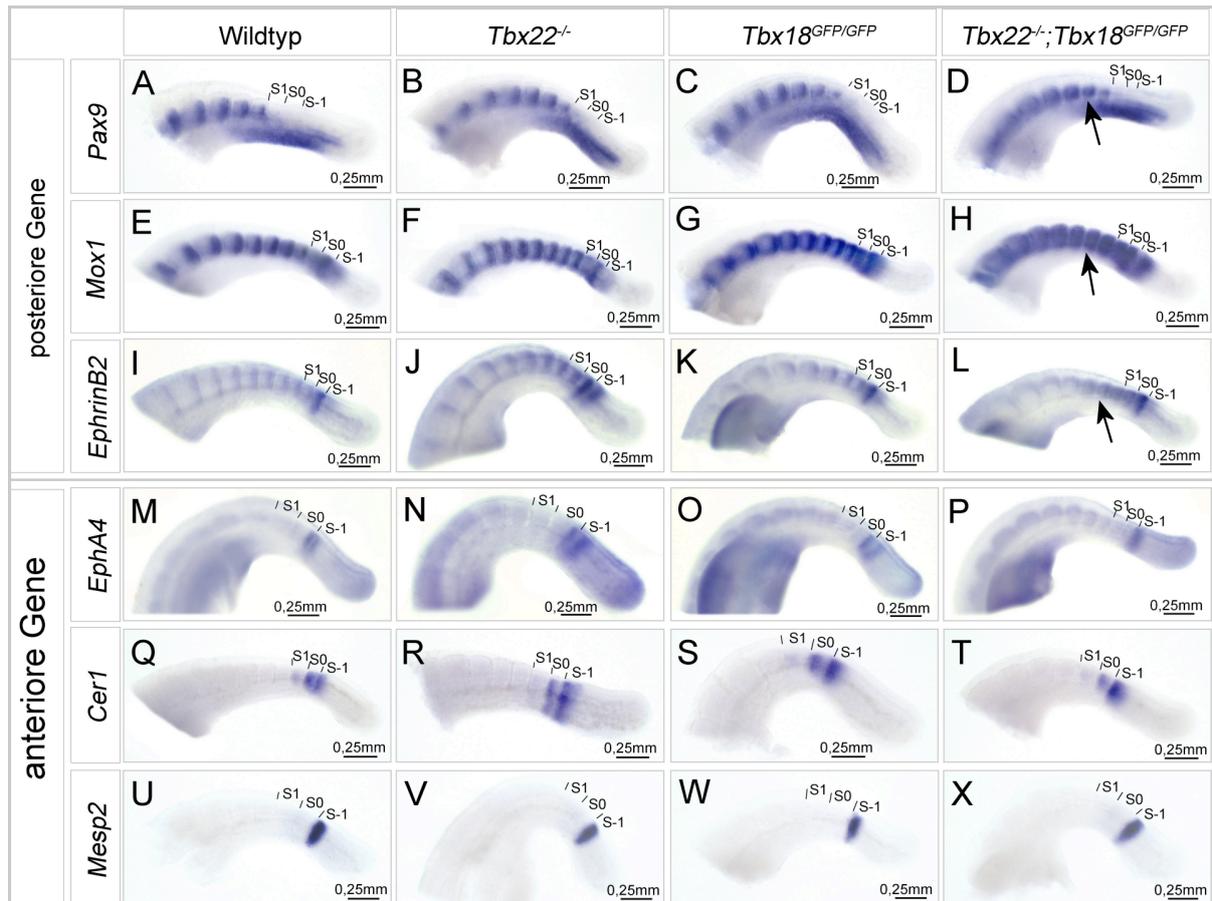


Abb.5.1.1.6: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen. Die Abb.5.1.1.6 A-X zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind; Abb.5.1.1.6 A-D stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.1.1.6 E-H die *Mox1*-Expression, Abb.5.1.1.6 I-L die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.1.1.6 M-P die *EphA4*-Expression, Abb.5.1.1.6 Q-T die *Cer1*-Expression und die Abb.5.1.1.6 U-X die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M), die *Tbx22^{-/-}*-Mutante (B; F; J; N), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C; G; K; O) und die *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante (D; H; L; P). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression kaudal exprimierter Gene in die kraniale Hälfte der Somiten. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

Die Etablierung der A/P-Polarität ist das Resultat der genetischen Interaktion des Transkriptionsfaktors, *Mesp2*, mit dem Notch-Signalweg. Insofern könnte eine veränderte Expression einer oder mehrerer Komponenten dieses Signalweges die Ursache für den Verlust der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Mutante sein. Deshalb wurde die Genaktivität der in den Somiten exprimierten Komponenten des Notch-Signalweges mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 analysiert.

Rezeptoren des Notch-Signalweges mit einer Expression in dem kranialen bzw. kaudalen Kompartiment der Somiten sind *Notch1* und *Notch2* (Réaume et al. 1992; Williams et al.

1995). *Notch1* ist im gesamten PSM mit der stärksten Intensität in dem Somitomer S-1 exprimiert. In den Somiten wird die Genaktivität von *Notch1* auf den dorsalen Bereich begrenzt und zeichnet sich durch eine stärkere Expression in dem kaudalen Kompartiment aus. Ab dem Somiten S5 kann keine Genaktivität von *Notch1* in diesen Strukturen mehr nachgewiesen werden (Réaume et al. 1992). *Notch2* hingegen wird im PSM ausschließlich in den Somitomeren S-1 und S0 exprimiert und besitzt in deren kranialer Hälfte eine höhere Expression als in dem kaudalen Kompartiment. Die Expression dieses Rezeptors ist ab dem Somiten S4 ebenfalls nicht mehr detektierbar (Williams et al. 1995). Zu den Liganden, die eine Expression in der kranialen bzw. kaudalen Hälfte der Somiten aufweisen, zählen *Dll1* und *Dll3* (Bettenhausen et al. 1995; Donwoodie et al. 1997). Beide Gene sind durch eine starke Expression im PSM charakterisiert. *Dll3* weist zudem eine schwache Expression in der kranialen Hälfte des Somitomers S0 und in dieser in den Somiten S1 und S2 auf (Donwoodie et al. 1997). Die Expression von *Dll1* ist dagegen auf die kaudale Hälfte des Somitomers S0 und der Somiten S1 bis S4 begrenzt (Bettenhausen et al. 1995). Das einzige beschriebene Zielgen des Notch-Signalweges mit einer Expression in einer der Somitenhälften ist *Hey1* (Katho et al. 2007). *Hey1* weist eine zyklische Expression im PSM auf, die in dessen kranialem Bereich auf die kaudale Hälfte des Somitomers S-1 begrenzt wird. In diesem Kompartiment wird die Expression von *Hey1* in dem Somitomer S0 und den Somiten S1 bis S4 aufrechterhalten (Katho et al. 2007). Die Analyse der Expression dieser Komponenten des Notch-Signalweges zeigte, dass die Genaktivität der beiden Rezeptoren durch den Verlust von *Tbx18* oder *Tbx22* bzw. durch den gemeinsamen Verlust von *Tbx18* und *Tbx22* nicht beeinflusst wurde (Abb.5.1.1.7 A-H). Desgleichen war die Expression von *Dll3* in der *Tbx22*^{-/-}-Mutante, der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante nicht verändert (Abb.5.1.1.7 I-L). Jedoch konnte eine Ausweitung, der in Wildtypembryonen auf die kaudale Hälfte der Somiten begrenzten Expression von *Dll1* und *Hey1*, in die kraniale Hälfte, ab dem Somiten S1, in der *Tbx18*^{GFP/GFP};*Tbx22*^{-/-}-Mutante beobachtet werden (Abb.5.1.1.7 P; T). In diesem Zusammenhang sollte auch eine Ausweitung der kaudal begrenzten Expression von *Notch1* in den Somiten S1- S4 gesehen werden. Aufgrund der starken Expression dieses Gens im Neuralrohr und der Begrenzung auf den dorsalen Bereich der Somiten, war diese Veränderung der Genaktivität jedoch schlecht nachweisbar (Abb.5.1.1.7 D). Die Expression von *Dll1* und *Hey1* in der *Tbx22*^{-/-}-Mutante und der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante war unverändert (Abb.5.1.1.7 N; O; R; S).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Tbx18* gemeinsam mit *Tbx22* möglicherweise die Expression von *Dll1* in der kranialen Hälfte der Somiten reprimieren und somit die Aktivität

5. Ergebnisse

des Notch-Signalweges auf das kaudale Kompartiment der Somiten begrenzen kann. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

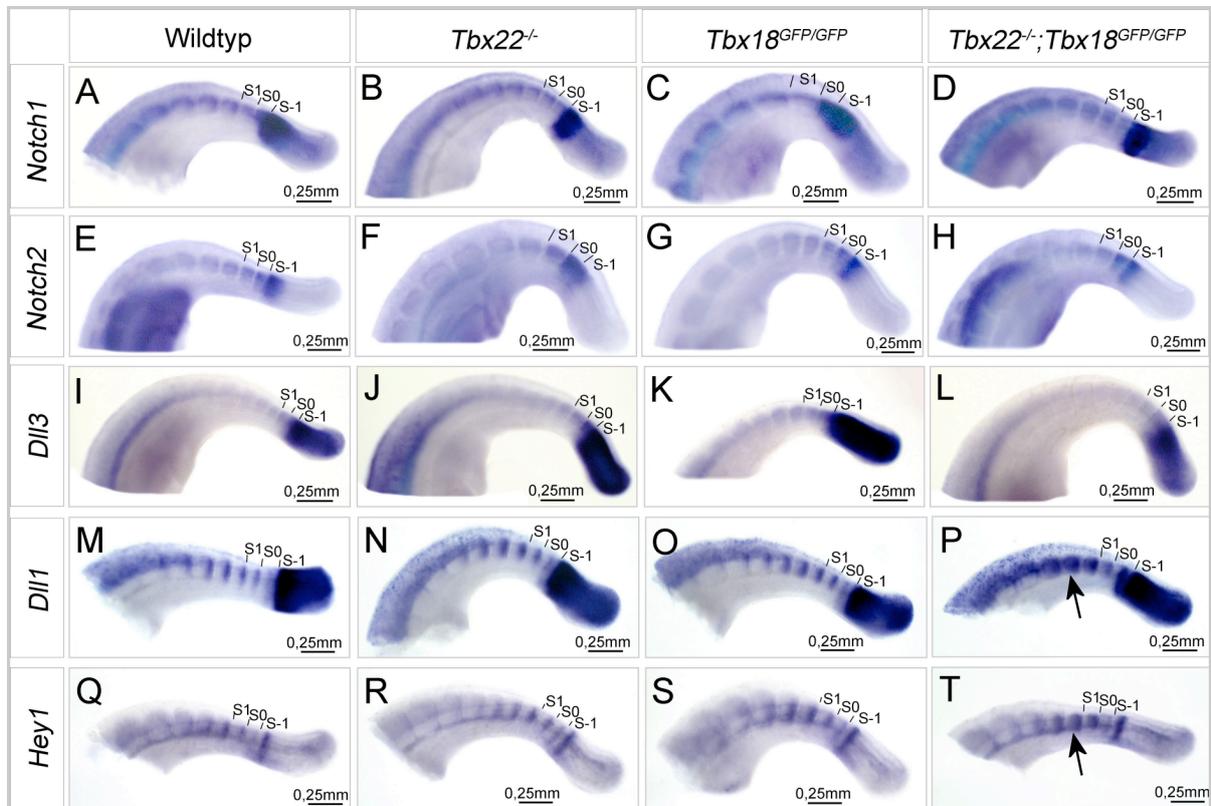


Abb.5.1.1.7: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.1.7 A-T zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.1.7 A-D stellt die *Notch1*-Expression, Abb.5.1.1.7 E-H die *Notch2*-Expression, Abb.5.1.1.7 I-L die *Dll3*-Expression, Abb.5.1.1.7 M-P die *Dll1*-Expression und Abb.5.1.1.7 Q-T die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M; Q), die $Tbx22^{-/-}$ -Mutante (B; F; J; N; R), die $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante (C; G; K; O; S) und die $Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}$ -Mutante (D; H; L; P; T). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression kaudal exprimierter Gene in die kraniale Hälfte der Somiten. (Die Experimente wurden in Kooperation mit Tanja Matkovic durchgeführt.)

5.1.2 Tbx18 und Tbx22 können direkt an den *Dll1*-Promotor binden

Um nachzuweisen, ob die Transkriptionsfaktoren Tbx18 und Tbx22 direkt an die Promotorregion des *Dll1*-Gens binden können, wurde ein Transaktivierungsexperiment in HeLa-Zellen durchgeführt. Das hierfür verwendete Reportergenkonstrukt bestand aus dem Luziferase-Gen, welches an das 3'-Ende des *Dll1*-Minimalpromotors kloniert wurde. Dieses Fusionskonstrukt stand unter der Kontrolle des *Dll1*-Enhancers, auch *msd*-Fragment genannt (Abb.5.1.2.1 A). Das *msd*-Fragment war hinreichend, um eine Expression von *Dll1* im PSM, den epithelialen Somiten und in deren Derivaten zu induzieren. Hofmann et al. (2004)

konnten zeigen, dass dieser Enhancer sechs T-Box-Bindestellen und vier Tcf/Lef-Bindestellen enthält. Entsprechend konnten die Autoren nachweisen, dass eine Kotransfektion von *Tbx6* und *Tcf1e/β-Catenin* dieses Reporterkonstrukt konzentrationsabhängig aktiviert. *Tbx6* und die alleinige Transfektion der Komponenten des Wnt-Signalweges hatten dagegen keinen Effekt auf die Reporteraktivität (Hofmann et al. 2004).

Um die Funktion von *Tbx18* und *Tbx22* als Repressoren von *Dll1* in der kranialen Somitenhälfte nachweisen zu können, wurde die bei Hofmann et al. (2004) beobachtete Aktivierung des Reporterkonstruktes verwendet. Ähnlich wie in dieser Publikation beschrieben, wurde eine fünffache Aktivierung durch die Kotransfektion von 200ng *Tbx6* und je 200ng *Tcf1e/β-Catenin* erreicht. (Die Basalaktivität des Reporters ist auf 1 gesetzt worden.) Diese Aktivierung des Reporters konnte durch die zusätzliche Transfektion von *Tbx18* bzw. *Tbx22* konzentrationsabhängig reprimiert werden. Nach Transfektion der höchsten eingesetzten Konzentration (800ng) der beiden T-Box-Transkriptionsfaktoren wurde die durch *Tbx6*- und dem Wnt-Signalweg vermittelte Aktivierung des Reporters vollständig reprimiert. Die Kotransfektion von *Tbx18* und *Tbx22* verursachte eine stärkere Repression der Reporteraktivität als durch die alleinige Expression eines der T-Box-Gene erreicht wurde. Beide Transkriptionsfaktoren hatten auf die Basalaktivität des Reporters bzw. auf die durch *Tcf1e/β-Catenin*-vermittelte leichte Aktivierung des Reporterkonstruktes lediglich einen geringfügig reprimierenden Effekt (Abb.5.1.2.1 B).

Zusammenfassend zeigte diese Promotorstudie, dass *Tbx18* und *Tbx22* die durch *Tbx6*- und dem Wnt-Signalweg vermittelte Aktivierung des *Dll1*-Promotors konzentrationsabhängig *in vitro* hemmen können, wobei die stärkste Repression durch die kooperative Aktivität beider T-Box-Gene erreicht wurde. (Dieses Transaktivierungsexperiment wurde von Dr. Henner Farin durchgeführt.)

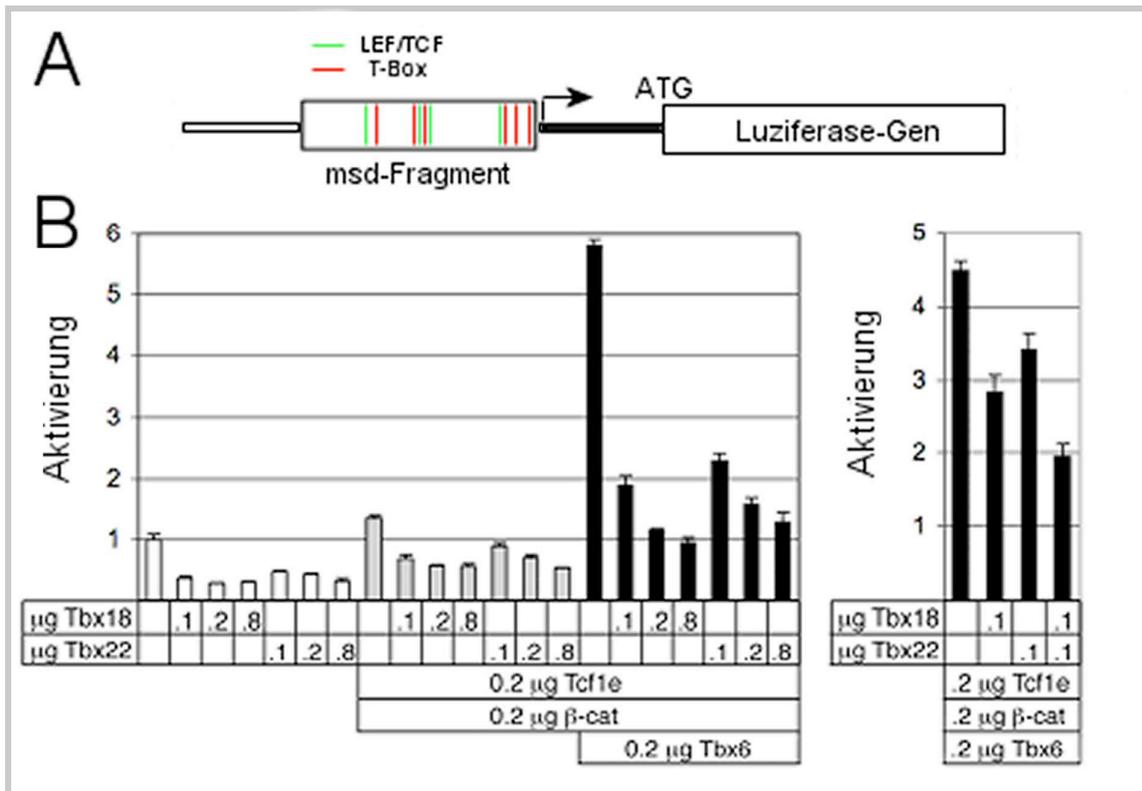


Abb.5.1.2.1: Tbx18 und Tbx22 reprimieren die durch Tbx6- und den Wnt-Signalweg vermittelte Aktivierung des *Dll1*-Minimalpromoters. Abb.5.1.2.1 A zeigt ein Schema des pKS.msd-Luziferase-Reporterplasmid, welches aus dem Luziferase-Gen fusioniert mit dem *Dll1*-Minimalpromotor unter der Kontrolle des *msd*-Enhancers besteht. Die Position der T-Box- und LEF/TCF-Bindestellen des *msd*-Fragments in der *Dll1*-Promotorregion sind farblich gekennzeichnet. Abb.5.1.2.1 B stellt die Effekte von *Tbx18* oder *Tbx22* bzw. die gemeinsamen Effekte beider T-Box-Gene auf die Basalaktivität des Reporters bzw. auf die *Tcf1e*/ β -Catenin- und die *Tbx6*- und Wnt-Signalweg vermittelte Aktivierung des Reporters dar. (Dieses Transaktivierungsexperiment wurde von Dr. Henner Farin durchgeführt.)

5.1.3 Die Rekombination des *Pax3-cre*-Mausstammes und des *Tbx18^{cre}*-Mausstammes

Um den Nachweis erbringen zu können, dass *Tbx18 in vivo* die Transkription von *Dll1* in der kranialen Somitenhälfte reprimieren kann, sollte dieser T-Box-Transkriptionsfaktor im paraxialen Mesoderm fehlexprimiert werden. Dieses ermöglichte das *cre/LoxP*-Rekombinationssystem. In diesem Zusammenhang wurde eine beidseitig durch *LoxP*-Sequenzen begrenzte bicistronische Transgen-Kassette bestehend aus dem Protein-kodierenden Bereich des *Tbx18*-Gens (*Tbx18-ORF*) und dem 3'-gelegenen *IRES-EGFP* hergestellt. Dieses Konstrukt wurde, um eine unspezifische Expression dieser Proteine zu unterbinden, in reverser Orientierung (3'-5') und mit einer 5'-gelegenen ebenfalls mit *LoxP*-Sequenzen flankierten Neomycin-3xStopp-Kassette in den ubiquitär exprimierten *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (Hprt)*-Lokus integriert (welches im Folgenden als *Hprt^{Tbx18}*-Allel bezeichnet wurde) (Airik et al. 2010). Durch die gewebespezifische

Expression einer Cre-Rekombinase wurden zwei Rekombinationsereignisse hervorgerufen: Die Entfernung der Neomycin-3xStopp-Kassette und die Umkehrung der Orientierung des transgenen Konstruktes, wodurch die gewebespezifische Fehlexpression von *Tbx18* induziert wurde.

Für die Missexpression von *Tbx18* wurde neben der *Pax3-cre*-Mauslinie die *Tbx18^{cre}*-Mauslinie verwendet. Um bestimmen zu können, in welchen Geweben des Embryos diese beiden Cre-Mausstämme rekombinieren, wurden *Pax3-cre/+* bzw. *Tbx18^{cre/+}*-Männchen mit *Rosa26^{lacZ/lacZ}*-Weibchen verpaart. Das *Rosa26^{lacZ}*-Allel besteht aus einer mit *LoxP*-Sequenzen flankierten Phosphoglyceratkinase-Neomycin-Stop-Kassette fusioniert mit dem β -Galaktosidase-Gen. Nach Cre-Rekombinase-abhängiger Entfernung der Phosphoglyceratkinase-Neomycin-Stop-Kassette an den *LoxP*-Schnittstellen wurde das β -Galaktosidase-Gen transkribiert. Somit zeigte die Enzymaktivität der β -Galaktosidase die Gewebe des Embryos an, in denen die homologe Rekombination stattgefunden hatte.

In Übereinstimmung mit der bereits veröffentlichten Analyse des *Pax3-cre*-Mausstammes (Li et al. 2000) konnte eine Rekombination dieser *Cre*-Mauslinie am Embryonaltag 9,5 im Mesenchym der gesamten sich kaudal der Vordergliedmaßenknospen befindenden Körperregion nachgewiesen werden (Abb. 5.1.3.1 A). Im Gegensatz dazu, war die Rekombination des *Tbx18^{cre}*-Mausstammes an diesem Embryonaltag auf die kraniale Hälfte der Somiten, beginnend in dem epithelialen Somiten S2, begrenzt. Weiterhin konnte eine Rekombination in Proepikardialorgan detektiert werden (Abb. 5.1.3.1 B).

Somit konnte der *Pax3-cre*-Mausstamm für die Rekombination im PSM, in den epithelialen Somiten sowie im Myotom, im Dermatome und im Sklerotome der zukünftigen Lenden- und Schwanzwirbelregion bis einschließlich des zukünftigen unteren Thoraxbereiches der Wirbelsäule verwendet werden. Die Rekombination des *Tbx18^{cre}*-Mausstammes war dagegen auf die kraniale Hälfte des Sklerotoms begrenzt. Da diese in dem Somiten S1 nicht und in dem Somiten S2 schwach im kranialen Kompartiment stattfand, die Differenzierung jedoch in dem Somiten S3 beginnt, sollte mittels der *Tbx18^{cre}*-Mauslinie nur eine geringe Rekombination im Dermatome und im Myotome auftreten.

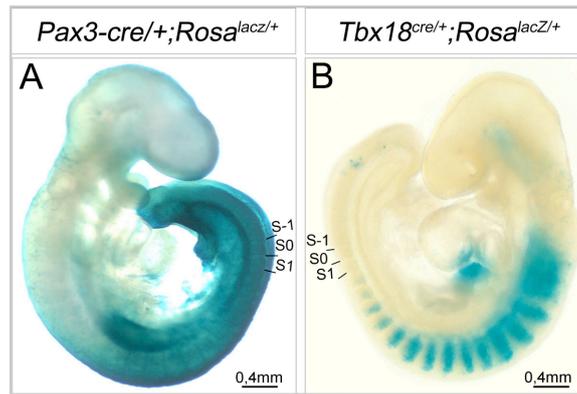


Abb. 5.1.3.1: Die Analyse der *Pax3-cre*- bzw. *Tbx18^{cre}*-vermittelten Rekombination im paraxialen Mesoderm am Embryonaltag 9,5. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde durch eine X-Gal-Färbung in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{lacZ/+}*- (Abb. 5.1.3.1 A) bzw. in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{lacZ/+}*-Embryonen (Abb. 5.1.3.1 B) nachgewiesen.

5.1.4 Die Missexpression von *Tbx18* in der kranialen Somitenhälfte hatte keinen Einfluss auf die Somitogenese

Um ausschließen zu können, dass die Analyse der Missexpression von *Tbx18* im paraxialen Mesoderm auf einen unspezifischen Effekt des bicistronisch exprimierten *Tbx18*- und EGFP-Proteins basierte, wurde dieses Transgen in der ursprünglichen *Tbx18*-Expressionsdomäne, der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten und des Sklerotoms, mit Hilfe des *Tbx18^{cre}*-Mausstammes fehlexprimiert. Die Expression des transgenen *Tbx18*-Proteins bzw. die des EGFP-Proteins zusätzlich zu dem endogenen *Tbx18*-Protein sollte die Entwicklung der Wirbelsäule in diesen Embryonen nicht beeinflussen.

Da der *Hprt*-Lokus X-chromosomal lokalisiert ist, wiesen weibliche Nachkommen der Kreuzung *Tbx18^{cre/+}*-Männchen mit *Hprt^{Tbx18/Tbx18}*-Weibchen, aufgrund der X-Chromosom-Inaktivierung, eine mosaikförmige Expression des *Hprt^{Tbx18}*-Allels in den Zellen des rekombinierten Gewebes auf (wurden im Folgenden als *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bezeichnet), während in hemizygoten Männchen dieses Transgen in allen Zellen transkribiert wurde (wurden im Folgenden als *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen bezeichnet).

Die Expression des transgenen *Tbx18*-Proteins konnte über die EGFP-Epifluoreszenz des mit diesem koexprimierten EGFP-Proteins sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise konnte die Genaktivität des Transgens in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4 (Abb.5.1.4.1 P; R), in den weiblichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und mit einer stärkeren Intensität, aufgrund der einheitlichen Expression im rekombinierten Gewebe, in den männlichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5 nachgewiesen werden (Abb.5.1.4.1 D; F; J; L).

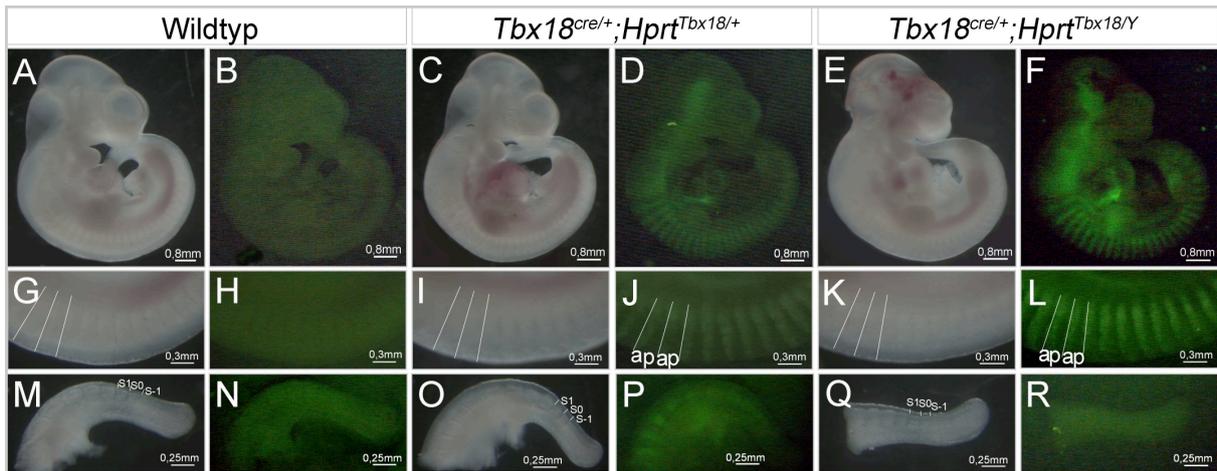
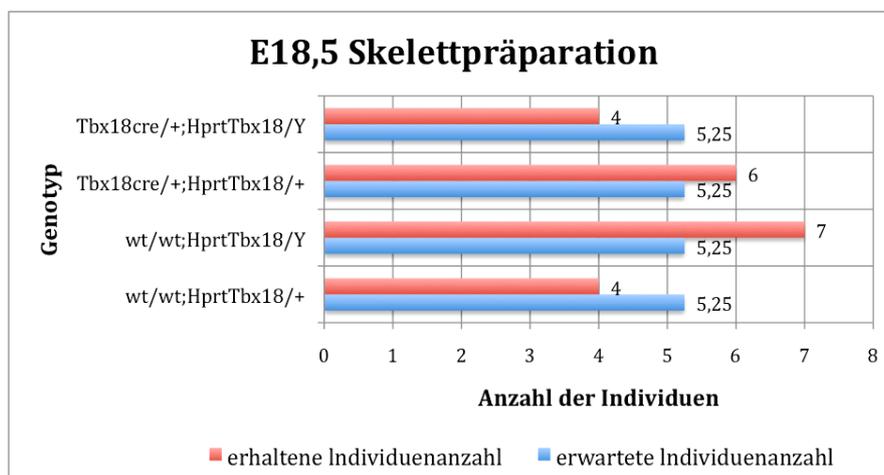


Abb.5.1.4.1: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.1.4.1 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (C; D) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (E; F). Die Abb.5.1.4.1 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule von Wildtypembryonen (G; H), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (I; J) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (K; L) und die Abb.10M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion von Wildtypembryonen (M; N), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (O; P) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sowie die Somitengrenzen sind eingezeichnet.

Die Verteilung der Individuenanzahl der Nachkommen aus der Verpaarung $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18/Tbx18}$ -Weibchen folgte den Mendelschen Gesetzen (Diagramm 5.1.4.1). Die Anzahl der erhaltenen Individuen pro Genotyp ließ darauf schließen, dass die Missexpression von $Tbx18$ in der kranialen Hälfte der Somiten vor dem Embryonaltag 18,5 keine embryonale Letalität verursachte.

Diagramm 5.1.4.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18/Tbx18}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 21 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



5. Ergebnisse

Die Analyse der Skelette der weiblichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen als auch der männlichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass die proximalen Rippen dieser transgenen Embryonen regulär gebildet wurden und mit dem Wirbelkörper und dem Querfortsatz der Pedikel, dem Processus transversus, verbunden waren (Abb.5.1.4.2 B; C). Ebenso entwickelten sich die Pedikel normal (Abb.5.1.4.2 E; F). Somit verursachte die Missexpression von $Tbx18$ in der ursprünglichen $Tbx18$ -Expressionsdomäne keine Skelettdefekte.

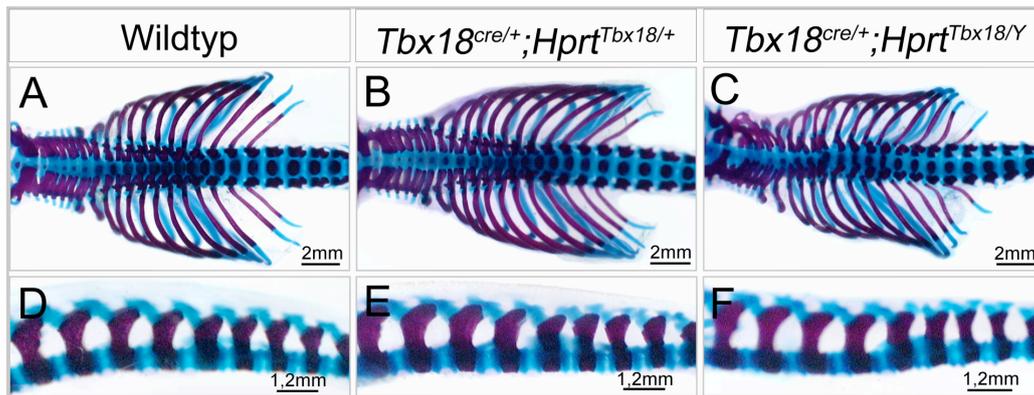


Abb.5.1.4.2: Skelette der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.1.4.2 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.1.4.2 D-F die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (B; E) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (C; F).

Aufgrund der in der kranialen Hälfte des Somiten S4 beginnenden Rekombination der $Tbx18^{cre/+}$ -Mauslinie, könnte diese nicht nur auf das Sklerotom begrenzt sein, sondern ebenfalls in dem Dermomyotom stattfinden und die Differenzierung der Somiten beeinträchtigen. Um einen möglichen Einfluss der Missexpression von $Tbx18$ auf diesen Prozess feststellen zu können, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierung die Expression der oben beschriebenen Gene, die spezifisch in dem Dermatome, dem Myotome und dem Sklerotome, induziert wurden am Embryonaltag 10,5 analysiert.

Sowohl die Expression von $Pax3$ im Dermatome (Abb.5.1.4.3 A-C), als auch die von $Myogenin$ im myotomalen Kompartiment der Somiten (Abb.5.1.4.3 D-F) sowie die der Sklerotom-spezifischen Gene $Pax1$ (Abb.5.1.4.3 G-I), $Pax9$ (Abb.5.1.4.3 J-L) und $Mox1$ (Abb.5.1.4.3 M-O) war in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen bzw. in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen nachweisbar. Eine Veränderung der entsprechenden Expressionsdomänen war nicht sichtbar. Auch die A/P-Polarität der Somiten wurde durch die Missexpression von $Tbx18$ in der kranialen Somitenhälfte nicht beeinflusst, zu erkennen an

der höheren Intensität der Expression von *Pax1* (Abb.5.1.4.3 I), *Pax9* (Abb.5.1.4.3 L) und *Mox1* (Abb.5.1.4.3 O) in der kaudalen Hälfte des Sklerotoms im Vergleich zu dessen kranialem Kompartiment.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Missexpression von *Tbx18* in der kranialen Hälfte der Somiten keinen Einfluss auf die Differenzierung hatte.

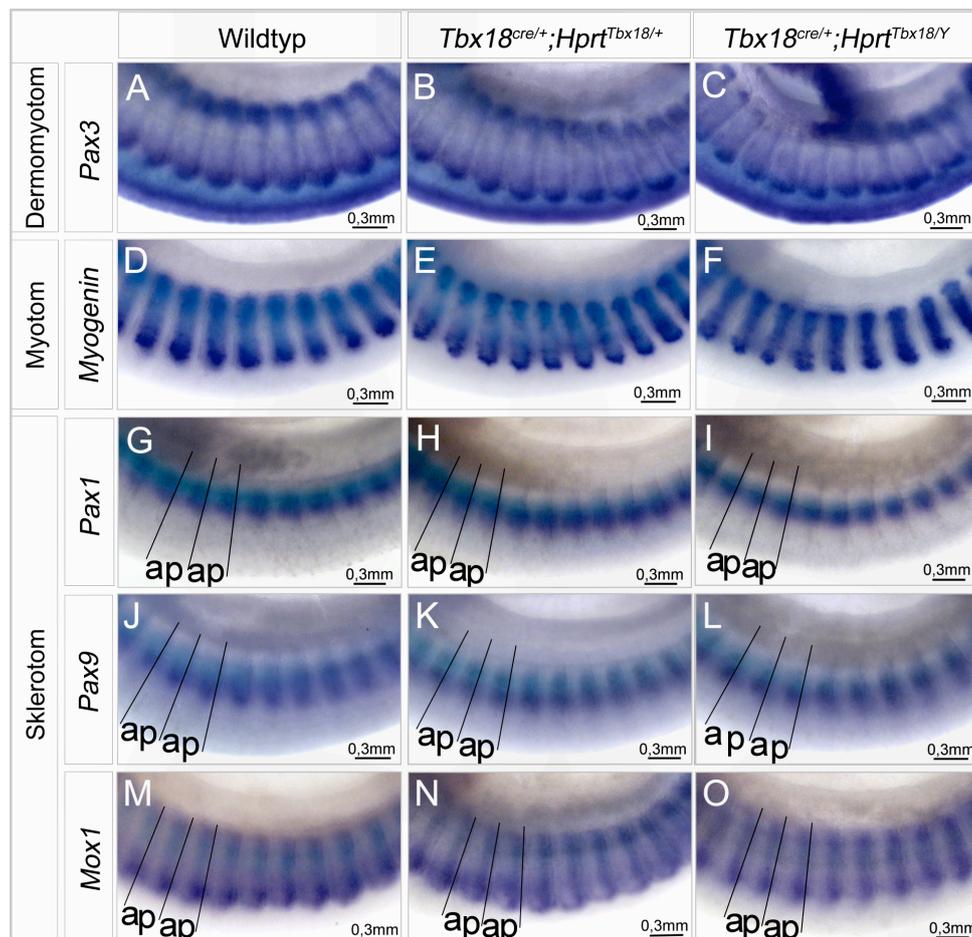


Abb.5.1.4.3: Die Differenzierung der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.4.3 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.4.3 A-C stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.1.4.3 D-F die *Myogenin*-Expression, Abb.5.1.4.3 G-I die *Pax1*-Expression, Abb.5.1.4.3 J-L die *Pax9*-Expression und Abb.5.1.4.3 M-O die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die A/P-Polarität der Somiten ist bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet.

Um eindeutig nachweisen zu können, dass die Missexpression von *Tbx18* in der kranialen Hälfte der Somiten keinen Einfluss auf die A/P-Polarität hatte, wurde die Expression von

Tbx22 und *Uncx4.1* mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bzw. in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen untersucht.

Der Nachweis der GFP-Expression des mit dem transgenen *Tbx18* koexprimierten EGFP-Proteins zeigte, dass die Missexpression von *Tbx18* in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bzw. in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen ausschließlich in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4, stattfand (Abb.5.1.4.4 A-C; G-I) Aus diesem Grund war die Expression von *Uncx4.1* in den epithelialen Somiten und dem Sklerotom weiterhin in der kaudalen Hälfte dieser transgenen Embryonen nachweisbar (Abb.5.1.4.4 D-F; J-L). Ebenso war die Expression von *Tbx22* in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 sowie den epithelialen Somiten S1 und S2 in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen unverändert (Abb.5.1.4.4 M-O).

Diese Ergebnisse zeigten, dass keine Beeinflussung von *Tbx22* durch die Expression des transgenen *Tbx18*-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten stattfand. Weiterhin besaßen diese transgenen Embryonen eine regulär etablierte A/P-Polartät. Ein Nachweis der endogenen *Tbx18*-Expression war nicht möglich, da eine 5'- bzw. 3'-UTR-Sonde das transgene *Tbx18* ebenfalls nachwies.

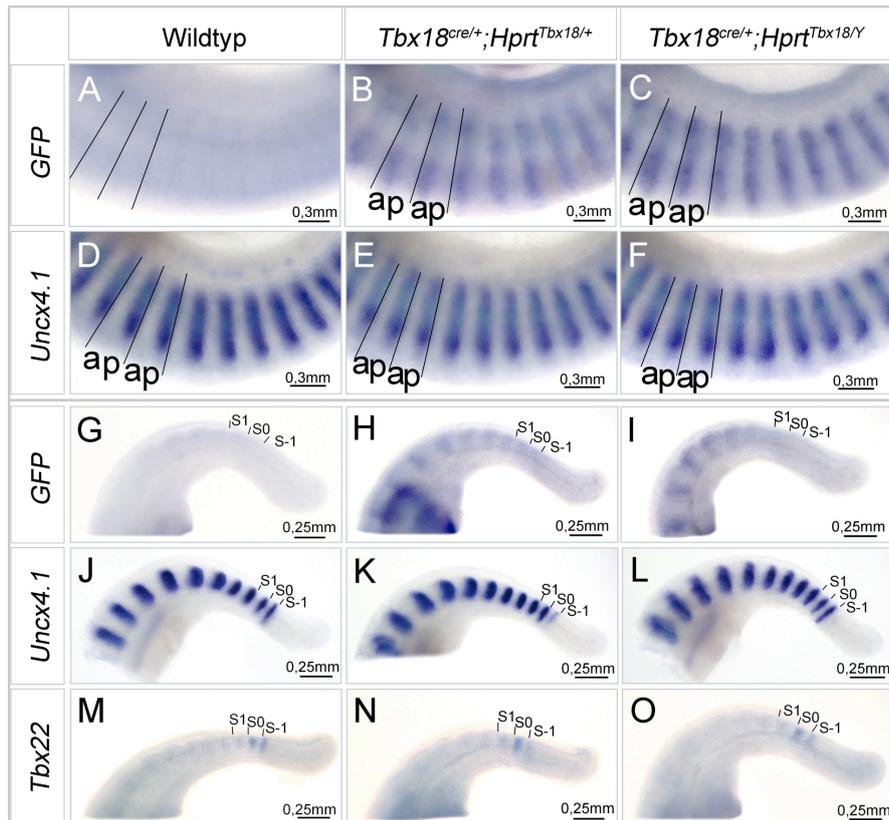


Abb.5.1.4.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.4.4 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Misexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (D-F) mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten ist eingezeichnet. Die Abb.5.1.4.4 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (B; E; H; K; N) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (C; F; I; L; O).

Um festzustellen, ob durch eine nicht detektierbare Rekombination der $Tbx18^{cre/+}$ -Mauslinie im PSM die Etablierung der A/P-Polarität beeinflusst wurde, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierung die Expression der oben beschriebenen Genen, die in den Somitomeren S-1 und S0 sowie in den epithelialen Somiten S1 und S2 exprimiert sind, untersucht.

Die Expression von *Pax1* und *Pax9* wies in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen bzw. in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen weiterhin in der kaudalen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und der Somiten der Schwanzregion eine höhere Intensität als in deren kranialer Hälfte auf (Abb.5.1.4.5 A-F). In gleicher Weise war auch für *EphrinB2* die Expression in der kaudalen Hälfte der Somiten detektierbar (Abb.5.1.4.5 G-I). Des Weiteren war die Expression von *Mesp2* in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 (Abb.5.1.4.5 P-R) wie auch die *EphA4*-Expression in dieser Hälfte der Somitomere S-1 und S0 (Abb.5.1.4.5 J-L) und die Expression

5. Ergebnisse

von *Cer1* in diesem Kompartiment der Somitomere S-1 und S0 und des Somiten S1 unverändert (Abb.5.1.4.5 M-O).

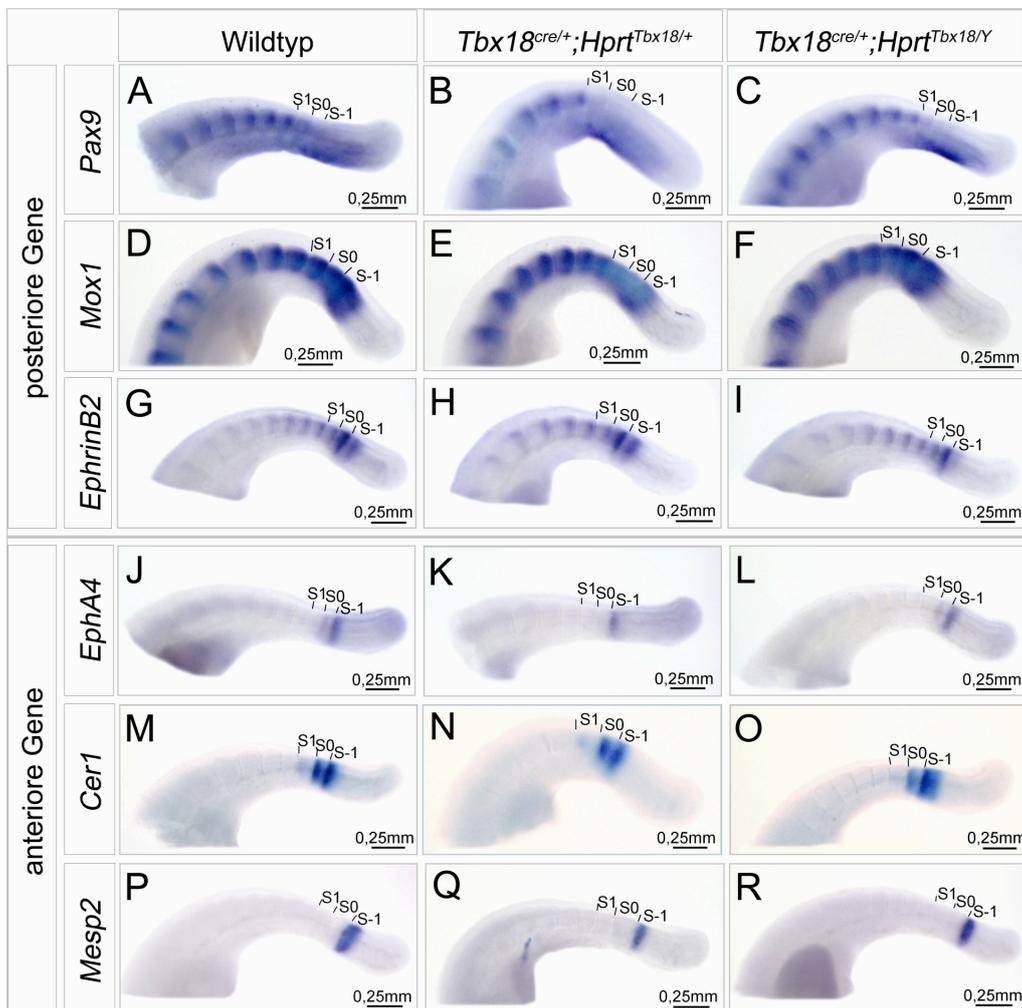


Abb.5.1.4.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.4.5 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.1.4.5 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.1.4.5 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.1.4.5 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.1.4.5 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.1.4.5 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.1.4.5 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M; P), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N; Q) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O; R).

Folglich war auch die Expression von *Dll1* und *Hey1* regulär in der kaudalen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten S1-S4 in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bzw. den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen detektierbar (Abb.5.1.4.6 A-F).

Die Etablierung der A/P-Polarität im kranialen Bereich des PSM und deren Aufrechterhaltung in den epithelialen Somiten wurde somit durch die Missexpression von *Tbx18* in der ursprünglichen *Tbx18*-Expressionsdomäne nicht beeinflusst.

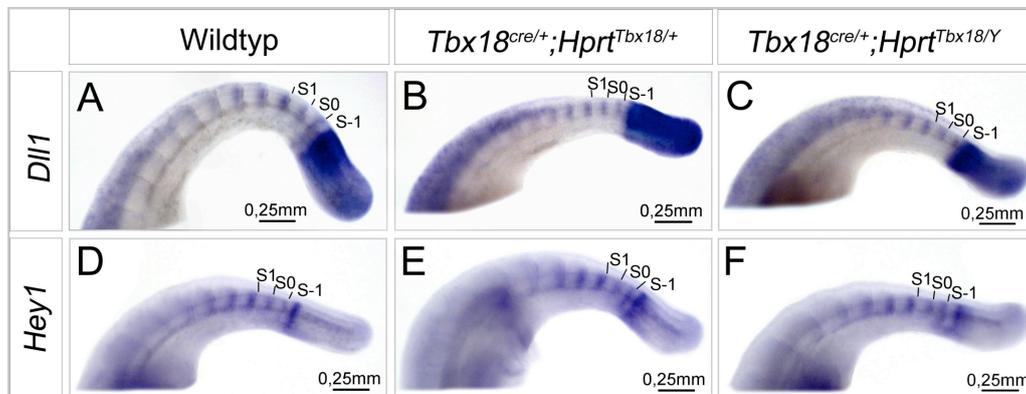


Abb.5.1.4.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18/+}-Embryonen und der *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18/Y}-Embryonen. Die Abb.5.1.4.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.4.6 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.1.4.6 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18/+}-Embryonen (B; E) und die *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18/Y}-Embryonen (C; F).

Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Expression des transgenen *Tbx18*-Proteins keine unspezifischen Effekte hervorrief.

5.1.5 Die Missexpression von *Tbx18* in der kaudalen Hälfte der Somiten war hinreichend, um einen Verlust der *Dll1*-Expression zu verursachen

Um den Beweis zu erbringen, dass *Tbx18* *in vivo* die *Dll1*-Transkription reprimieren kann, sollte dieser T-Box-Transkriptionsfaktor mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie in der kaudalen Hälfte der Somiten fehlexprimiert werden.

Die EGFP-Epifluoreszenz des mit dem transgenen *Tbx18* koexprimierten EGFP-Proteins zeigte, dass die Expression des Transgens in den weiblichen *Pax3-cre/+*;*Hprt*^{Tbx18/+}-Embryonen und in den männlichen *Pax3cre/+*;*Hprt*^{Tbx18/Y}-Embryonen im PSM (Abb.5.1.5.1 P; R), in den epithelialen Somiten (Abb.5.1.5.1 P; R) sowie im Myotom, im Dermatome und im Sklerotome der zukünftigen Lenden- und Schwanzwirbelregion bis einschließlich des zukünftigen unteren Thoraxbereiches der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5 stattfand (Abb.5.1.5.1 D; F; J; L).

5. Ergebnisse

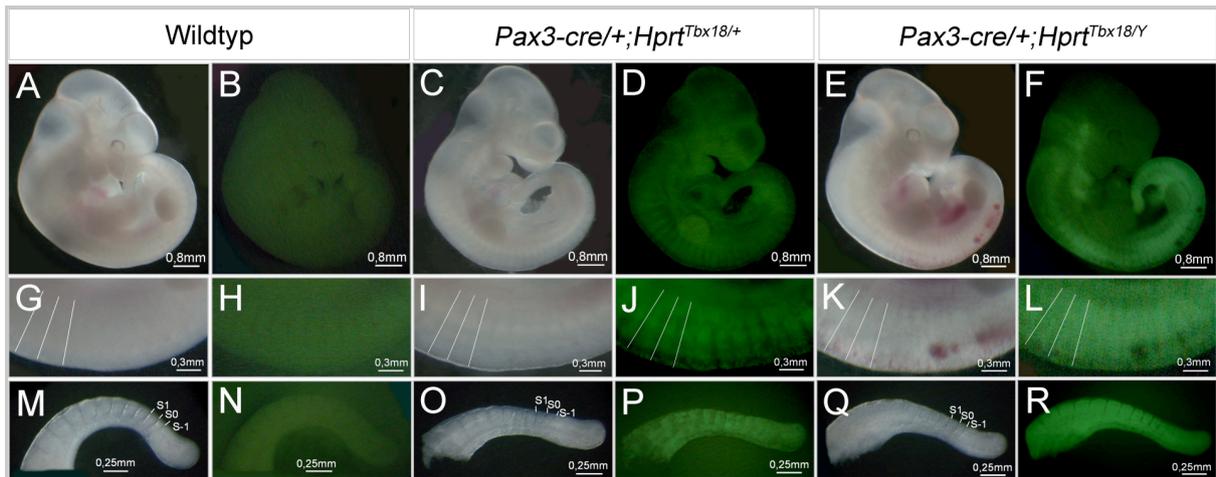
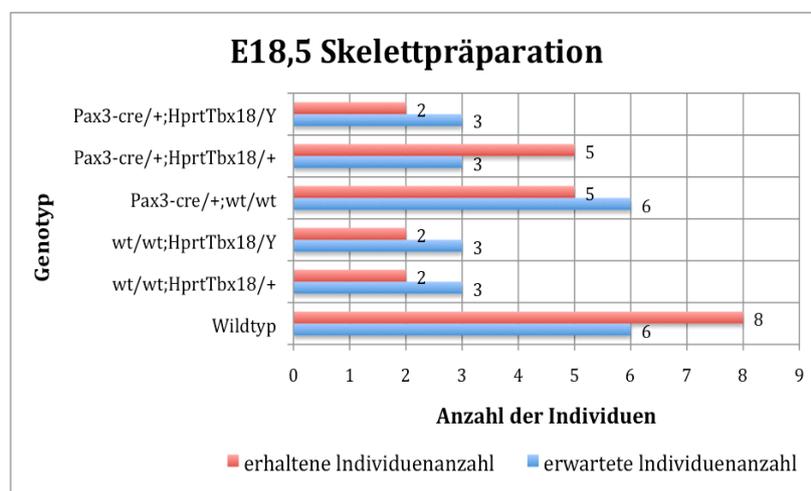


Abb.5.1.5.1: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen und $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.1.5.1 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (C; D) und $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (E; F). Die Abb.5.1.5.1 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule der Wildtypembryonen (G; H), $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (I; J) und $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (K; L) und die Abb.5.1.5.1 M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion der Wildtypembryonen (M; N), $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (O; P) und $Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 wie auch die des Somiten S1 sowie die Somitengrenzen sind eingezeichnet.

Die Verteilung der Nachkommen aus der Verpaarung $Pax3-cre/+$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18/+}$ -Weibchen wich nicht von den Mendelschen Gesetzen ab (Diagramm 5.1.5.1). Infolgedessen konnte geschlossen werden, dass die Missexpression von $Tbx18$ im PSM, wie auch in den epithelialen und differenzierten Somiten vor dem Embryonaltag 18,5 keine embryonale Letalität verursachte.

Diagramm 5.1.5.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung $Pax3-cre/+$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18/+}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 24 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



Die Analyse der Skelette am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass die Missexpression von *Tbx18* in der unteren Körperregion eines Embryos zu starken Skelettdefekten führte. Bereits in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen, die sich durch eine mosaikartige Expression des Transgens in dem rekombinierten Gewebe auszeichneten, war der Verlust großer Bereiche der Rippen der unteren Thoraxregion der Wirbelsäule zu erkennen (Abb.5.1.5.2 B). Lediglich die ersten sechs Rippen wurden regulär gebildet, da in der oberen Körperregion der Embryonen keine Rekombination stattfand (Abb.5.1.5.2 B). Weiterhin war die Form der Pedikel im Lenden- und Schwanzwirbelbereich der Wirbelsäule verändert (Abb.5.1.5.2 E). Die *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen waren durch den vollständigen Verlust der Rippen der unteren Thoraxregion der Wirbelsäule gekennzeichnet (Abb.5.1.5.2 C). Des Weiteren wiesen diese transgenen Embryonen unregelmäßige und in einigen Bereichen geteilte Wirbelkörper im Lenden- und Schwanzwirbelbereich auf (Abb.5.1.5.2 C). Dieser Bereich der Wirbelsäule war ferner durch die vollständige Abwesenheit der Pedikel charakterisiert (Abb.5.1.5.2 F). Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Missexpression von *Tbx18* im PSM und in den epithelialen und differenzierten Somiten die Entwicklung des gesamten Wirbels beeinflusst war.

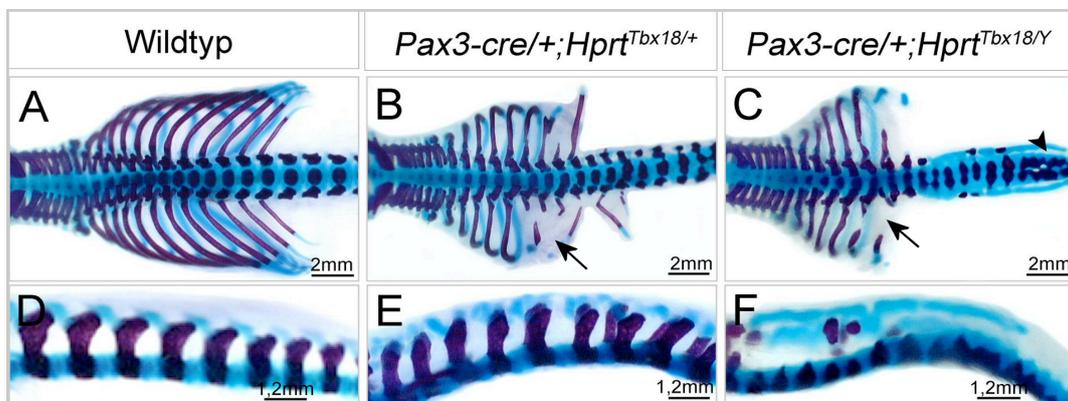


Abb.5.1.5.2: Skelette der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.1.5.2 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.1.5.2 D-F die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; E) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F). Der Pfeilkopf markiert die geteilten Wirbelkörper der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen, die Pfeile den Verlust bestimmter Bereich der Rippen in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bzw. den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen.

Aufgrund der Verwendung der *Pax3-cre*-Mauslinie, wurde *Tbx18* ebenfalls im Dermomyotom und im Myotom missexprimiert. Um zu überprüfen, ob die Expression des T-Box-Gens in diesen Kompartimenten einen Effekt hervorruft, wurde die Expression von *Pax3* und *Myogenin* untersucht.

Die *Myogenin*-Expression in dem myotomalen Kompartiment der Somiten war sowohl in *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen als auch in *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen unverändert (Abb.5.1.5.3 E; F). *Pax3* wies in den transgenen Weibchen ebenfalls eine normale Expression im Dermomyotom auf (Abb.5.1.5.3 B). In den männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen dagegen war die Expression von *Pax3* in den dermomyotomalen Lippen der zukünftigen unteren Thoraxregion der Wirbelsäule reduziert (Abb.5.1.5.3 C). Weiterhin war die Expression der Sklerotom-spezifischen Gene *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in der kaudalen Hälfte der Somiten in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen reduziert (Abb.5.1.5.3 I; L; O). Die Expression dieser Gene war in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen jedoch unbeeinflusst. Eine stärkere Genaktivität in dem kaudalen Kompartiment im Vergleich zu der kranialen Hälfte konnte sowohl für *Pax1* als auch für *Pax9* und *Mox1* nachgewiesen werden (Abb.5.1.5.3 H; K; N).

Insofern hatte die Missexpression von *Tbx18* in der unteren Körperregion nur eine geringfügige Auswirkung auf die Differenzierung der Somiten. Weitaus stärker wurde jedoch die Kompartimentierung der Somiten beeinflusst.

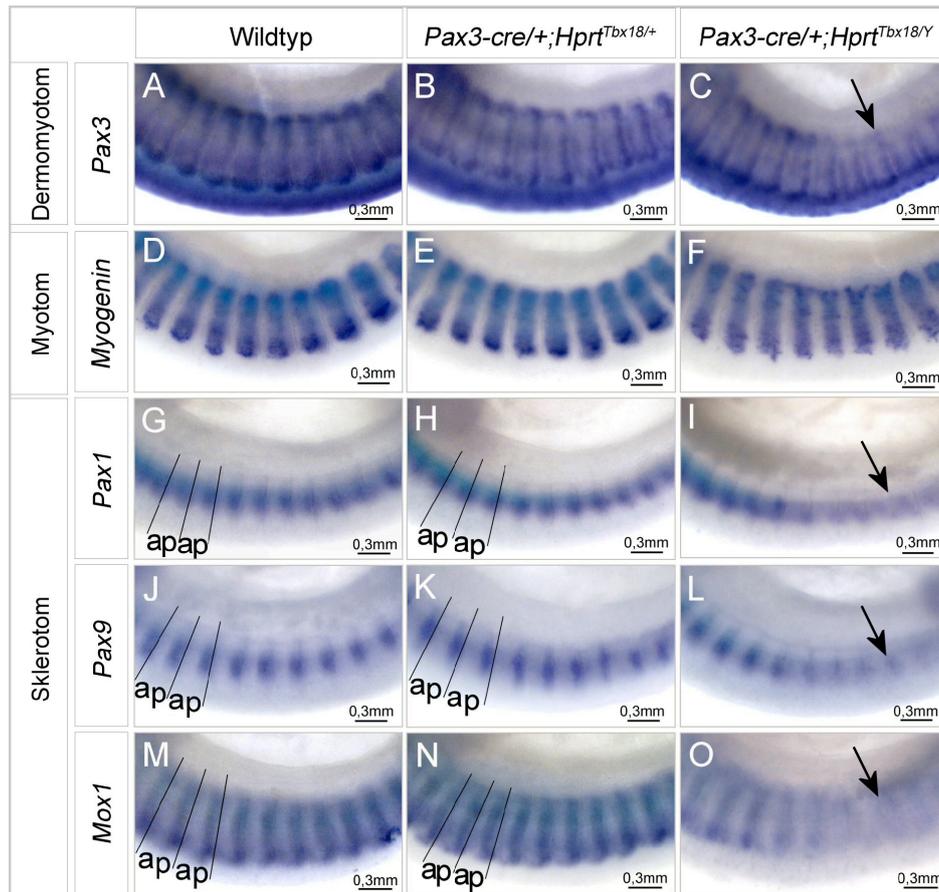


Abb.5.1.5.3: Die Differenzierung der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.5.3 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.5.3 A-C stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.1.5.3 D-F die *Myogenin*-Expression, Abb.5.1.5.3 G-I die *Pax1*-Expression, Abb.5.1.5.3 J-L die *Pax9*-Expression und Abb.5.1.5.3 M-O die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; F) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F). Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtypen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen, sowie die Somitengrenzen der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen ist eingezeichnet. Die Pfeile markieren die schwächere Expression von *Pax3* in den dermomyotomalen Lippen und die der Sklerotom-spezifischen Gene der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen.

Für die genauere Untersuchung der fehlenden Kompartimentierung der Somiten der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen, wurde die Expression von *Tbx22* und von *Uncx4.1* analysiert. Die Expression des transgenen *Tbx18* wurde in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen bzw. in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen durch den Nachweis der GFP-Aktivität des mit dem Transgen koexprimierten EGFP-Proteins sichtbar gemacht.

Interessanterweise resultierte die mosaikartige Missexpression von *Tbx18* in der unteren Körperregion der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen in einer Ansammlung der das Transgen exprimierenden Zellen in der kranialen Hälfte dieser Strukturen (Abb.5.1.5.4 B; H). Als Resultat war *Uncx4.1* in diesen Embryonen regulär in der kaudalen Hälfte der epithelialen

5. Ergebnisse

Somiten und in dieser im Sklerotom nachweisbar (Abb.5.1.5.4 E; K). In den männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen, bei denen alle Zellen das Transgen exprimierten (Abb.5.1.5.4 C; I), war dagegen die Genaktivität des Homöobox-Gens sowohl in den epithelialen Somiten als auch im rekombinierten Bereich des Sklerotoms kaum detektierbar (Abb.5.1.5.4 F; L). Die Expression von *Tbx22* wurde durch die Missexpression von *Tbx18* im PSM und in den epithelialen und differenzierten Somiten nicht beeinflusst (Abb.5.1.5.4 N; O).

Somit resultierte die ektopische Expression von *Tbx18* in der kaudalen Hälfte der Somiten in einer Anteriorisierung dieser mesodermalen Strukturen.

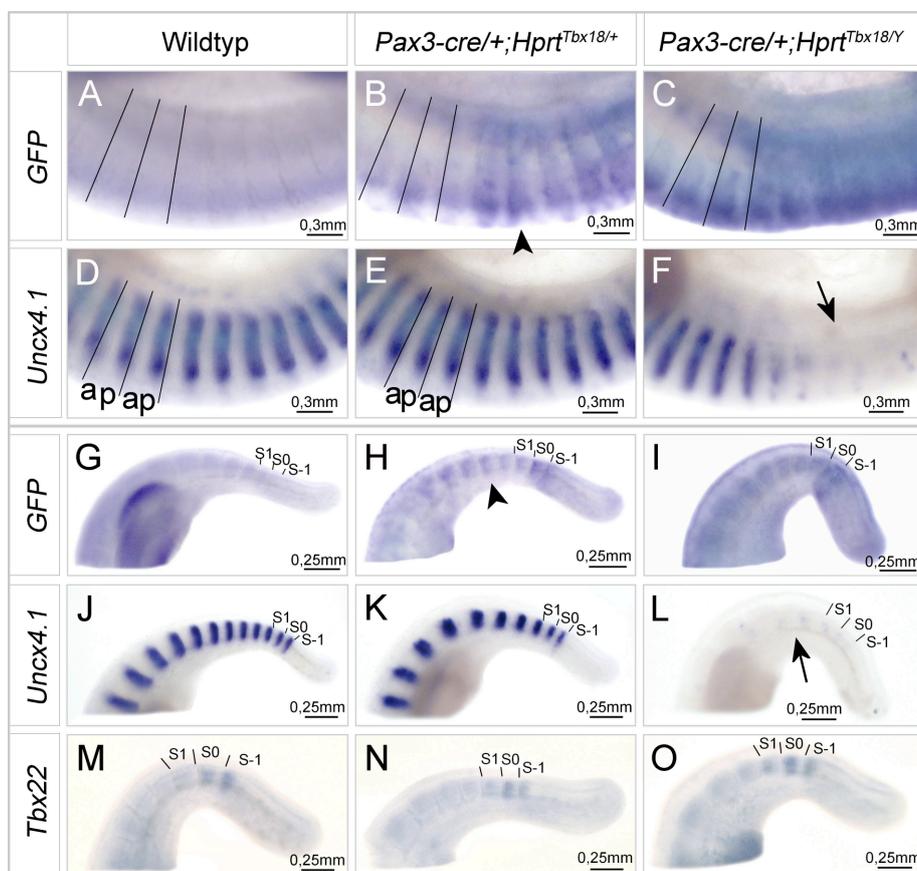


Abb.5.1.5.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.5.4 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (D-F) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten bzw. die Somitengrenzen sind eingezeichnet. Die Abb.5.1.5.4 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeilköpfe markieren die Ansammlung der das Transgen-exprimierenden Zellen in der kranialen Hälfte der Somiten bzw. des Sklerotoms in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen, die Pfeile den Verlust der *Uncx4.1*-Expression in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen.

Des Weiteren wurde der Beginn der Anteriorisierung der Somiten und deren Auswirkung auf die Expression weiterer für die Bildung und Kompartimentierung dieser mesodermalen Strukturen notwendigen Gene in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen untersucht.

In Übereinstimmung mit der reduzierten Expression von *Pax9* und *Mox1* im Sklerotom der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen, war auch die Genaktivität dieser beiden paired-Box-Transkriptionsfaktoren in der kaudalen Hälfte der Somiten der Schwanzregion der männlichen transgenen Embryonen vermindert. Die Reduzierung der *Mox1*-Expression begann in dem Somiten S1, die der *Pax9*-Expression, aufgrund der späteren Induktion der Expression, in dem Somiten S2 (Abb.5.1.5.5 C; F). In ähnlicher Weise war die Expression von *EphrinB2* in diesen transgenen Embryonen in der kaudalen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S1, nicht mehr detektierbar (Abb.5.1.5.5 I). In den Somitomeren S-1 und S0 blieb die Genaktivität dieses Liganden des Ephrin-Signalweges jedoch im kaudalen Kompartiment erhalten (Abb.5.1.5.5 I). Ferner war die *Mox1*-Expression in diesem Bereich des PSM unverändert (Abb.5.1.5.5 F). Aufgrund der Ansammlung der das Transgen-exprimierenden Zellen in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten und des Sklerotoms in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen besaßen diese Embryonen das für Wildtypembryonen charakteristische Expressionsmuster für *Mox1*, *Pax9* und *EphrinB2* (Abb.5.1.5.5 B; E; H). Die Analyse der Expression von *Mesp2* (Abb.5.1.5.5 P-R), *EphA4* (Abb.5.1.5.5 J-L) und *Cer1* (Abb.5.1.5.5 M-O) in den Somitomere S-1 und S0 und im Somiten S1 in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen zeigte keine Veränderungen der Expressionsdomänen.

Somit wurde die Etablierung der A/P-Polarität durch die Missexpression von *Tbx18* im PSM, in den epithelialen und differenzierten Somiten nicht beeinträchtigt. Die Kompartimentierung der Somiten wurde jedoch nicht aufrechterhalten und resultierte in einer Anteriorisierung der Somiten, ab dem Somiten S1.

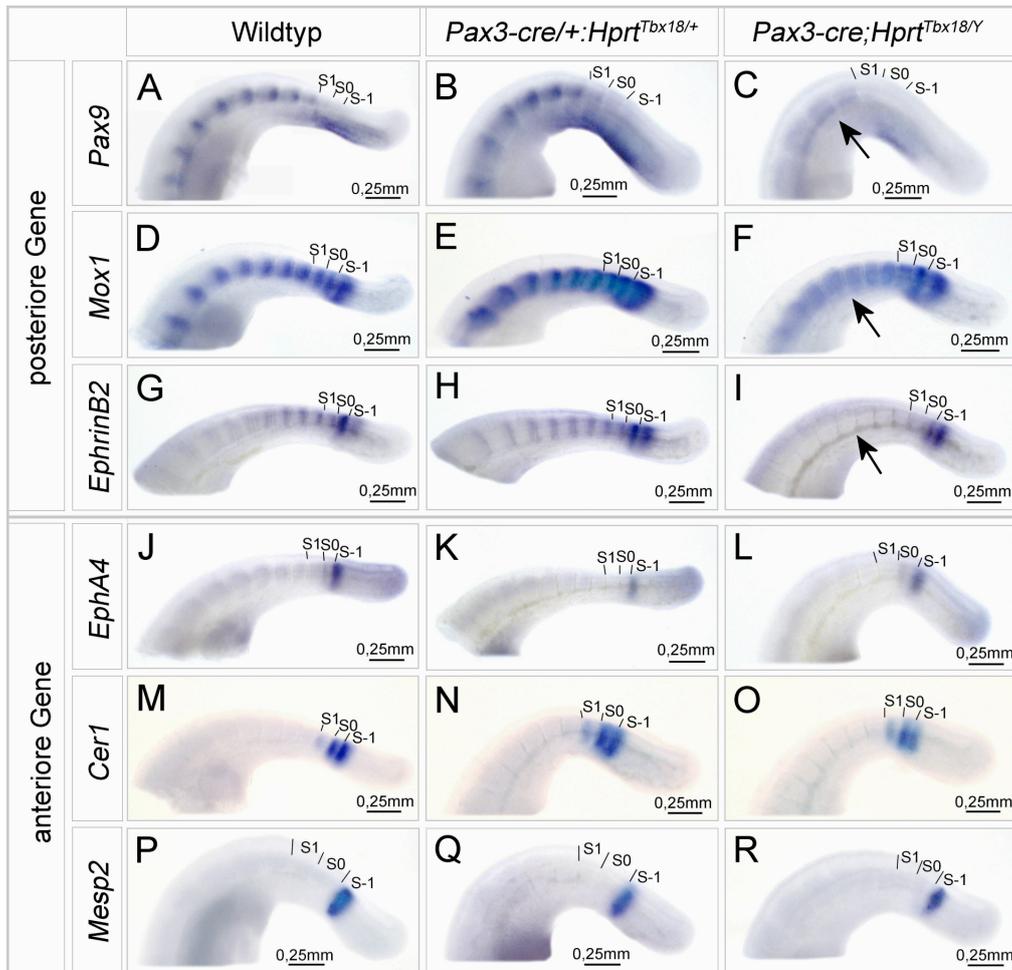


Abb.5.1.5.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität der Somiten in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen und den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.5.5 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.1.5.5 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.1.5.5 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.1.5.5 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.1.5.5 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.1.5.5 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.1.5.5 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile markieren den Verlust der kaudal exprimierten Gene in den Somiten in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen.

Die Anteriorisierung der Somiten der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen könnte das Resultat der Repression der *Dll1*-Transkription durch *Tbx18* in der kaudalen Hälfte der Somiten sein, da *Dll1* für die Spezifizierung der kaudalen Hälfte notwendig ist. Um dieses zu überprüfen, wurde die Expression von *Dll1* sowie von *Hey1* in diesen transgenen Embryonen mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 analysiert.

Wie vermutet, waren die *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen durch eine Reduktion der *Dll1*- bzw. der *Hey1*-Expression in den Somiten der Schwanzregion gekennzeichnet (Abb.5.1.5.6 C;

F). In den $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen war die Expression der Komponenten des Notch-Signalweges unverändert (Abb.5.1.5.6 B; E).

Somit war die ektopische Expression von $Tbx18$ in der kaudalen Hälfte der Somiten hinreichend, um die Transkription von $Dll1$ zu reprimieren und damit eine Reduzierung der Aktivität des Notch-Signalweges in dieser Hälfte der Somiten zu erreichen, was zu einem Verlust der kaudalen Identität dieses Kompartiments führte.

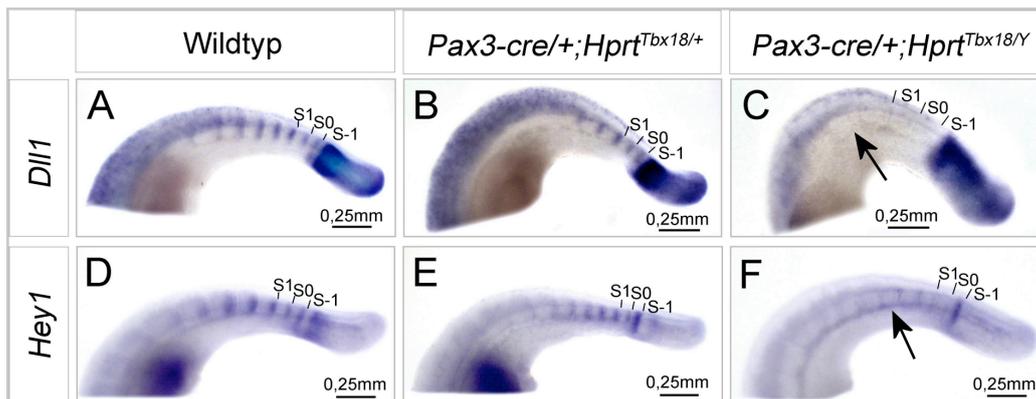


Abb.5.1.5.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen und der $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.5.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von $Dll1$ und $Hey1$ im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.5.6 A-C stellt die $Dll1$ -Expression und die Abb.5.1.5.6 D-F die $Hey1$ -Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/+}$ -Embryonen (B; E) und die $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen (C; F). Die Pfeile markieren den Verlust von $Dll1$ und $Hey1$ in den Somiten der $Pax3\text{-cre}/+;Hprt^{Tbx18/Y}$ -Embryonen.

5.1.6 Die Expression eines dominant negativen $Tbx18$ -Allels in der kranialen Hälfte der Somiten war hinreichend, um die $Dll1$ -Expression zu aktivieren

Um in einem weiteren Experiment nachweisen zu können, dass $Tbx18$ *in vivo* die $Dll1$ -Transkription in der kranialen Hälfte der Somiten reprimieren kann, wurde nach dem Prinzip des oben beschriebenen $Hprt^{Tbx18}$ -Allels ein dominant negatives Allel für $Tbx18$ (welches im Folgenden als $Hprt^{Tbx18VP16}$ -Allel bezeichnet wurde) generiert. Hierfür wurde ebenfalls ein beidseitig durch $LoxP$ -Sequenzen begrenztes bicistronisches Konstrukt bestehend aus dem Protein-kodierenden Bereich des $Tbx18$ -Gens ($Tbx18\text{-ORF}$) fusioniert mit der VP16-Aktivator-domäne und dem 3'-gelegenen $IRES\text{-EGFP}$ hergestellt. Dieses Konstrukt wurde, um eine unspezifische Expression dieses Transgens zu unterbinden, in reverser Orientierung (3'-5') und mit einer 5'-gelegenen ebenfalls mit $LoxP$ -Sequenzen flankierten Neomycin-3xStopp-Kassette in den ubiquitär exprimierten *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* ($Hprt$)-Lokus integriert (Airik et al. 2010). Die antagonistische Wirkung des dominant negativen

Tbx18-Proteins auf das Tbx18-Wildtypprotein sollte, bei einer reprimierenden Funktion von *Tbx18*, in einer Aktivierung der *Dll1*-Expression in der kranialen Hälfte der Somiten resultieren.

Um nachzuweisen, dass das *Hprt*^{*Tbx18VP16*}-Konstrukt die *Dll1*-Transkription induzieren kann, wurde ein Transaktivierungsexperiment in HeLa-Zellen mit dem oben beschriebenen Reportergenkonstrukt bestehend aus dem Luziferase-Gen, welches an das 3'-Ende des *Dll1*-Minimalpromotors kloniert wurde, der unter der Kontrolle des *Dll1*-Enhancers steht, durchgeführt.

Im Gegensatz zu der durch Tbx18 erreichten dosisabhängigen Repression der Basalaktivität des Reporters, aktivierte das Tbx18VP16-Konstrukt dieses Reporterkonstrukt ebenfalls konzentrationsabhängig. Die Aktivierung des Reporters durch das dominant negative Protein von Tbx18 war stärker als dessen Aktivierung durch Tbx6. Nach Transfektion der höchsten eingesetzten Konzentration (800ng) wurde durch Tbx18VP16 eine zweifache Aktivierung des Reporters erreicht, Tbx6 verdoppelte jedoch nur die Basalaktivität. (Die Basalaktivität des Reporters war auf 1 gesetzt worden.) Die fünffache Aktivierung des Reporters durch die Kotransfektion von 800ng Tbx6 und je 200ng Tcf1e/β-Catenin, konnte durch die Transfektion von 800ng Tbx18VP16 zu den je 200ng der Wnt-Signalweg-Komponenten nicht beobachtet werden. Jedoch verursachte die Kotransfektion von Tbx18VP16 mit Tcf1e/β-Catenin eine höhere Aktivierung der Reporteraktivität als die alleinige Expression des dominant negativen Proteins von *Tbx18* bewirkte (Abb.5.1.6.1).

Zusammenfassend zeigte diese Promotorstudie, dass das dominant negative Protein von Tbx18 antagonistisch zu dem Tbx18-Protein wirkte und auf diese Weise als Aktivator der *Dll1*-Transkription *in vitro* fungieren konnte. (Dieses Transaktivierungsexperiment wurde von Dr. Henner Farin durchgeführt.)

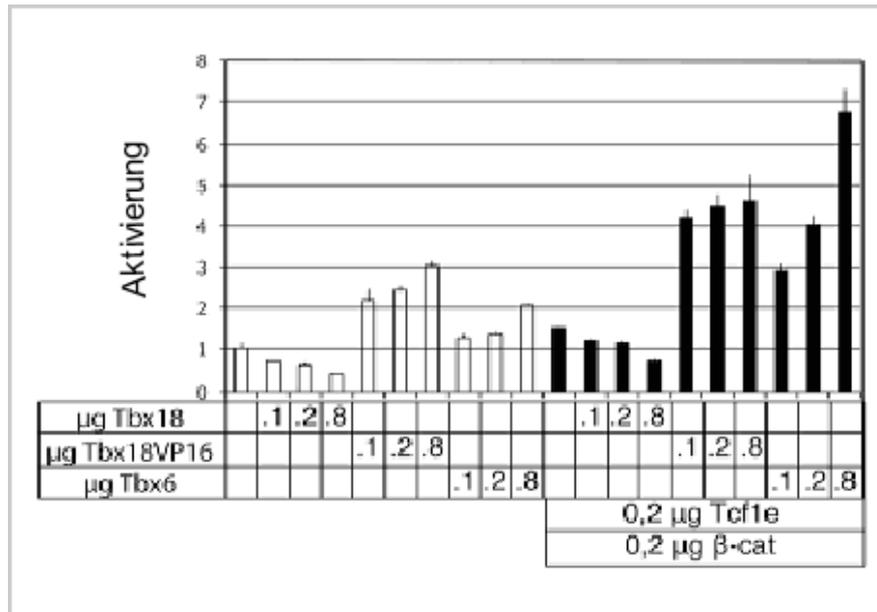


Abb.5.1.6.1: Tbx18VP16 vermittelte Aktivierung des *Dll1*-Minimalpromoters. Die Abb.5.1.6.1 stellt die Effekte von Tbx18 bzw. Tbx18VP16 und Tbx6 auf die Basalaktivität des Reporters bzw. auf die Tcf1e/β-Catenin vermittelte Aktivierung des Reporters dar. (Dieses Transaktivierungsexperiment wurde von Dr. Henner Farin durchgeführt.)

Um *in vivo* nachweisen zu können, dass das Tbx18VP16-Protein die *Dll1*-Transkription induzieren kann, wurde das dominant negative Allel von *Tbx18* mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie in den Somiten der unteren Körperregion exprimiert.

Durch die EGFP-Epifluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass das Tbx18VP16-Protein in den weiblichen *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und in den männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen im PSM (Abb.5.1.6.2 P; R), in den epithelialen Somiten (Abb.5.1.6.2 P; R) sowie im Myotom, im Dermatome und im Sklerotome der unteren Körperregion am Embryonaltag 10,5 exprimiert wurde (Abb.5.1.6.2 D; F; J; L).

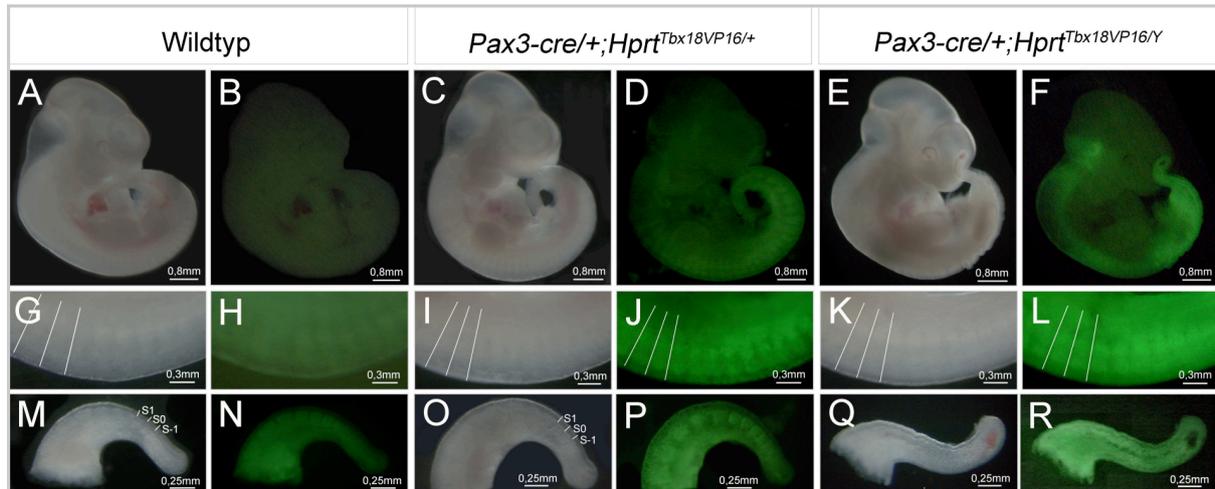
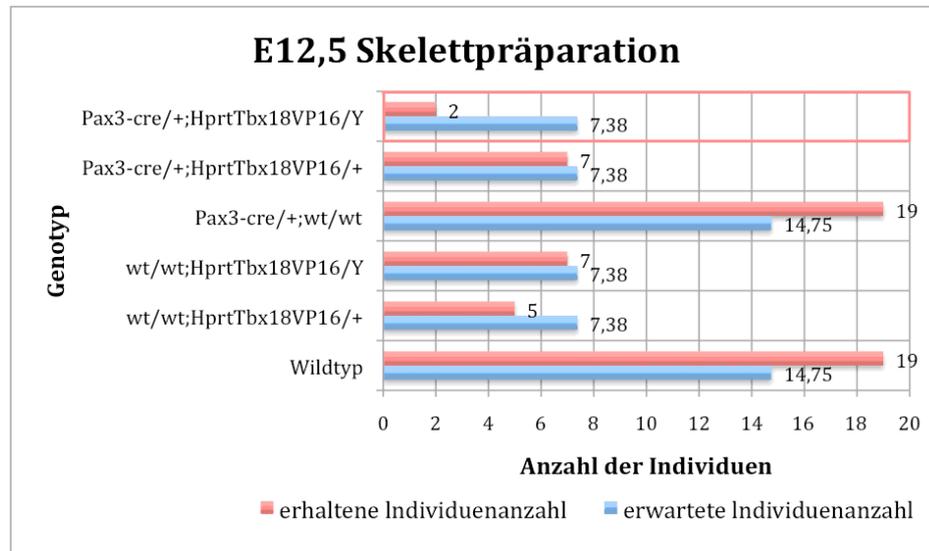


Abb.5.1.6.2: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.1.6.2 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (C; D) und *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (E; F). Die Abb.5.1.6.2 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule der Wildtypembryonen (G; H), *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (I; J) und *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (K; L) und die Abb.5.1.6.2 M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion der Wildtypembryonen (M; N), *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (O; P) und *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sowie die Somitengrenzen sind eingezeichnet.

Die Anzahl der erhaltenden Nachkommen pro Genotyp aus der Verpaarung *Pax3-cre/+*-Männchen mit *Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Weibchen wies nach, dass die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 im PSM und in den epithelialen und differenzierten Somiten um den Embryonaltag 12,5 embryonale Letalität verursachte, da nur 2 der nach Mendel zu erwartenden 7,38 *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen in den präparierten Würfeln enthalten waren.

Diagramm 5.1.6.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung *Pax3-cre/+*-Männchen mit *Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 59 Embryonen des Embryonalstadiums 12,5 aufgenommen. Die geringere als erwartete Individuenanzahl der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen ist rot umrandet



Aufgrund der frühen embryonalen Letalität wurde die Skelettpräparation am Embryonaltag 12,5 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt differenzieren die sklerotomalen Zellen zu Chondroblasten und bilden die Knorpelanlagen der Wirbelsäule, welche im weiteren Verlauf der Entwicklung sukzessiv mittels endochondraler Ossifikation in Knochengewebe umgewandelt werden.

Die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 in der unteren Körperregion führte zu einer Fusion der Knorpelanlagen in der Lenden- und Schwanzwirbelregion der männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (Abb.5.1.6.3 C; F). In den weiblichen *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen wurden diese Vorläuferstrukturen der Wirbel regulär angelegt (Abb.5.1.6.3 B; E).

Da die *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen bereits am Embryonaltag 10,5 häufig infolge des offenen Neuralrohrs eine starke morphologische Veränderung der unteren Körperregion aufwiesen, wurde die weitere Analyse dieser transgenen Embryonen am Embryonaltag 9,5 durchgeführt.

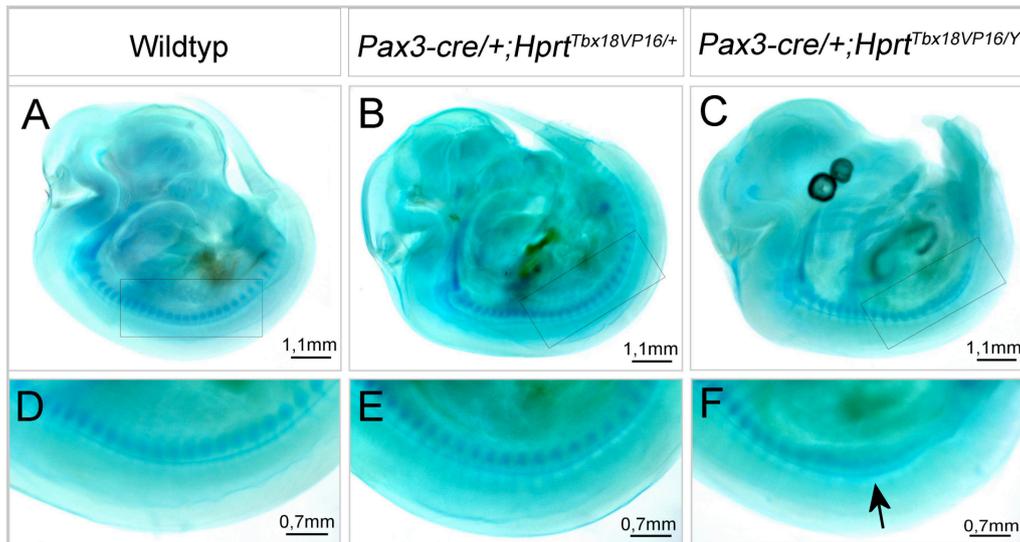


Abb.5.1.6.3: Skelette der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 12,5. Die Abb.5.1.6.3 A-C zeigen die Skelettpräparation der kompletten Wildtypembryonen (A), *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B) und *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C); die Abb.5.1.6.3 D-F eine Ausschnittsvergrößerung des Thorax- und Lendenwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; F) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F). Der Pfeil markiert die fusionierten Knorpelanlagen der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen.

Da eine Rekombination mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie auch im Dermomyotom und im Myotom stattfand, könnte die Expression des dominant negativen Tbx18-Proteins Muskeldefekten verursachen.

Entsprechend war die stärkere Expression von *Pax3* in den dermomyotomalen Lippen der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen reduziert (Abb.5.1.6.4 A-C). Weiterhin setzte die Differenzierung des Myotoms verspätet ein. In den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen wie auch in *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen war die Expression von *Myogenin* erst im Bereich der sich entwickelnden Vordergliedmaßen nachweisbar, während in dem Wildtypembryo bereits kaudal der sich entwickelnden Vordergliedmaßen eine starke *Myogenin*-Expression detektierbar war (Abb.5.1.6.4 D-F). Des Weiteren war die Expression der Sklerotom-spezifischen Gene, *Pax1*, *Pax9* und *Mox1*, in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen bzw. in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen verändert. Die stärkere Expression dieser Gene, charakteristisch für die kaudale Hälfte des Sklerotoms, war in beiden transgenen Embryonen in die kraniale Hälfte ausgeweitet (Abb.5.1.6.4 G-O).

Somit beeinflusste die Expression des dominant negativen Proteins von Tbx18 in der unteren Körperregion sowohl die Differenzierung als auch die A/P-Polarisierung der Somiten.

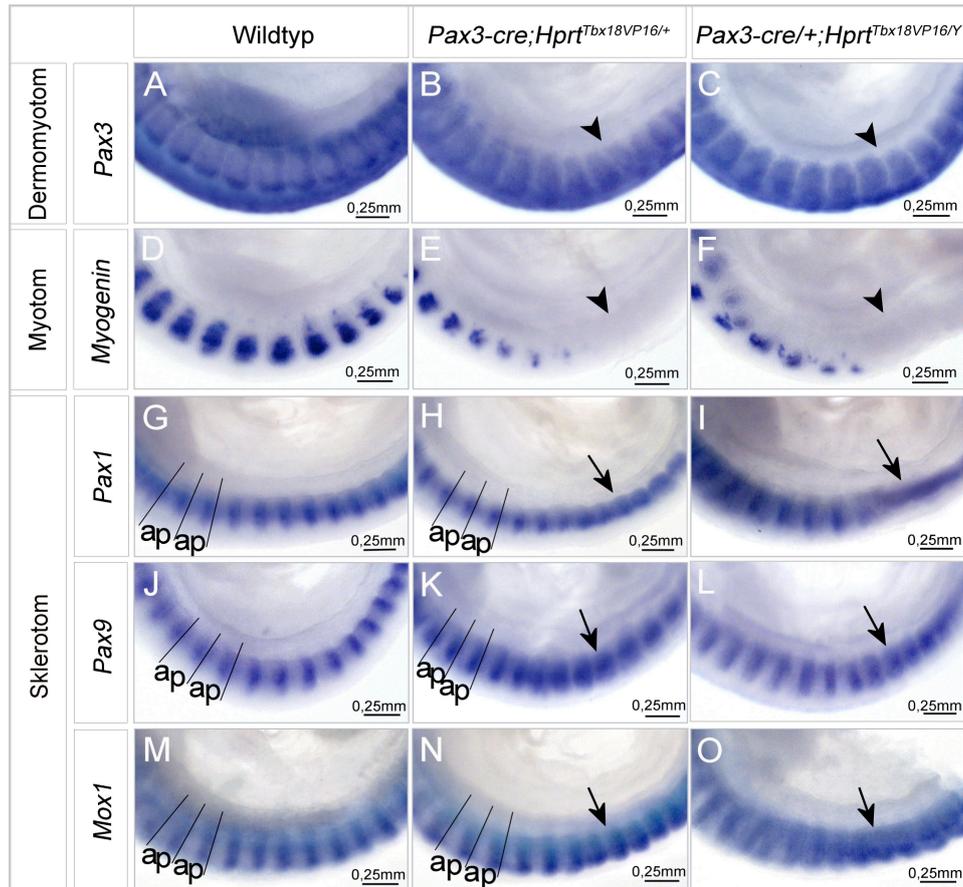


Abb.5.1.6.4: Die Differenzierung der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.6.4 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Abb.5.1.6.4 A-C stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.1.6.4 D-F die *Myogenin*-Expression, Abb.5.1.6.4 G-I die *Pax1*-Expression, Abb.5.1.6.4 J-L die *Pax9*-Expression und Abb.5.1.6.4 M-O die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; F; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtypen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen ist eingezeichnet. Die Pfeilköpfe markieren die schwächere Expression von *Pax3* in den dermomyotomalen Lippen wie auch die verspätete *Myogenin*-Expression, die Pfeile die ausgeweitete Expression der Sklerotom-spezifischen Gene in der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen.

Für die Analyse der veränderten A/P-Polarisierung in den Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen wurde die Expression von *Tbx22* und *Uncx4.1* untersucht. Die Expression des dominant negativen *Hprt^{Tbx18VP16}*-Allels wurde in den transgenen Embryonen durch den Nachweis der GFP-Expression sichtbar gemacht.

Sowohl die mosaikartige Expression des dominant negativen Proteins von *Tbx18* in der unteren Körperregion der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen als auch die Expression des Transgens in allen Zellen dieses rekombinierten Gewebes in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-

5. Ergebnisse

Embryonen (Abb.5.1.6.5 B; C; H; I) resultierte in einer Ausweitung der *Uncx4.1*-Expression in den kranialen Bereich der Somiten, beginnend in dem Somitomer S0 (Abb.5.1.6.5 E; F; K; L). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war die Expression von *Tbx22* in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in dieser in den Somiten S1 und S2 in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen reduziert (Abb.5.1.6.5 N; O).

Folglich verursachte die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 im PSM, wie auch in den epithelialen und differenzierten Somiten eine Posteriorisierung der Somiten.

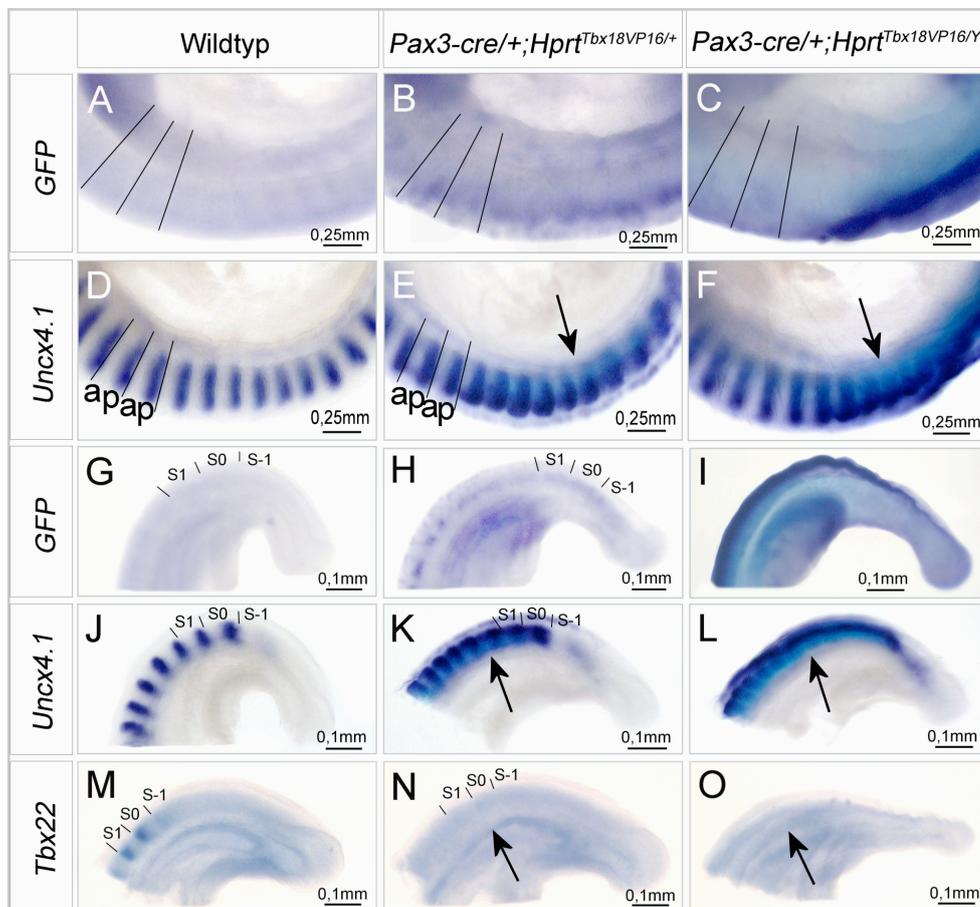


Abb.5.1.6.5: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.6.5 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (D-F) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Die A/P-Polarität der Somiten bzw. die Somitengrenzen sind eingezeichnet. Die Abb.5.1.6.5 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; F; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Uncx4.1* bzw. den Verlust von *Tbx22* in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen.

Die Reduzierung der *Tbx22*-Expression ab dem Somitomer S-1 ließ vermuten, dass bereits die Etablierung der A/P-Polarität gestört war.

Die Analyse der Expression von *Mox1* in den Somiten der Schwanzregion der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen zeigte, dass eine Ausweitung des für die kaudale Somitenhälfte charakteristischen hohen Expressionslevels in die kraniale Hälfte der Somiten erst ab dem Somiten S1 in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (Abb.5.1.6.6 E) auftrat, in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen jedoch bereits ab dem Somitomer S-1 (Abb.5.1.6.6 F). In ähnlicher Weise zeichneten sich die Somiten dieser transgenen Embryonen durch eine einheitlich hohe Genexpression von *Pax9* aus. Aufgrund der späteren Induktion dieses Gens, war die Expansion der Expression erst ab dem Somiten S2 in beiden transgenen Embryonen sichtbar (Abb.5.1.6.6 B; C). Weiterhin war die Expression von *EphrinB2* in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen ab dem Somiten S1 und in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen ab dem Somitomer S-1 auf die kraniale Hälfte der Somiten ausgeweitet (Abb.5.1.6.6 H; I). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war die Expression von *EphA4* sowie die von *Mesp2* als auch die Expression von *Cer1* in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in dieser in dem Somiten S1 in den transgenen weiblichen Embryonen nachzuweisen (Abb.5.1.6.6 K; N; Q). In den männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen war die Expression dieser Gene kaum detektierbar (Abb.5.1.6.6 L; O; R).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression des dominant negativen Proteins von Tbx18 im PSM, wie auch in den epithelialen und differenzierten Somiten die Etablierung der A/P-Polarität beeinflusst und bereits in dem Somitomer S-1 eine Posteriorisierung der Somiten hervorrief.

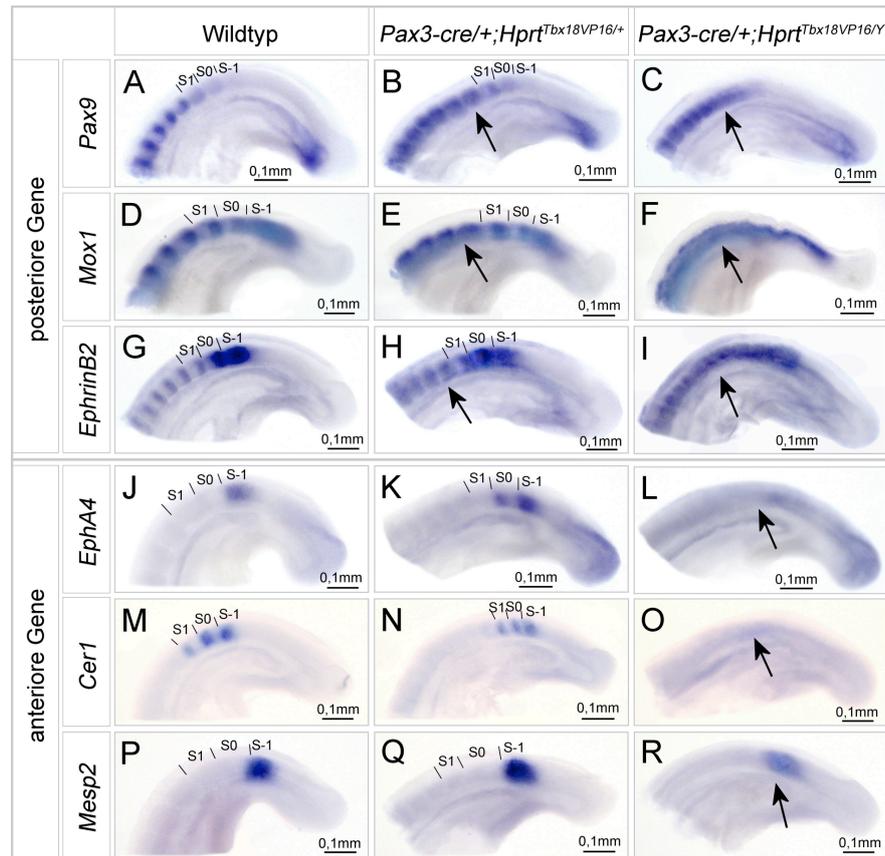


Abb.5.1.6.6: Die Analyse der A/P-Polarität des kranialen PSM der *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.6.6 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.1.6.6 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.1.6.6 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.1.6.6 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.1.6.6 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.1.6.6 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.1.6.6 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; F; H; K; N) und die *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete bzw. reduzierte Expression der Gene in den *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und den *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen.

Die Posteriorisierung der Somiten sollte, infolge der antagonistischen Wirkung des dominant negativen Tbx18-Proteins auf das Tbx18-Protein, bei einer reprimierenden Funktion von *Tbx18* auf die *Dll1*-Transkription, das Resultat einer Aktivierung der Expression des Notch-Liganden in der kranialen Hälfte der Somiten sein.

Entsprechend konnte eine Expression von *Dll1* bzw. von *Hey1* in den beiden Hälften der Somiten, beginnend in dem Somitomer S1, in den *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen bzw. in dem Somitomer S-1 in den *Pax3-cre+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen nachgewiesen werden (Abb.5.1.6.7 B; C; E; F).

Folglich führte die Expression des dominant negativen Proteins von Tbx18 in der unteren Körperregion zu einer Aktivierung der *Dll1*-Transkription. Insofern kann geschlussfolgert

werden, dass *Tbx18* auch *in vivo* als Repressor von *Dll1* in der kranialen Hälfte der Somiten fungieren kann.

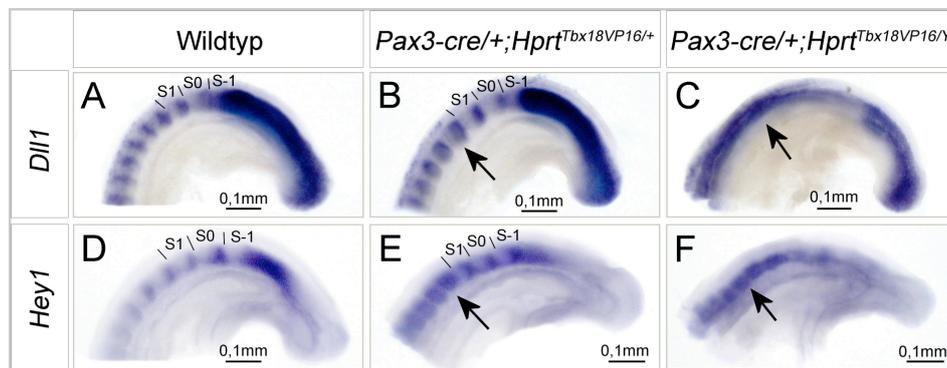


Abb.5.1.6.7: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.6.7 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Abb.5.1.6.7 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.1.6.7 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; E) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Dll1* und *Hey1* in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen.

5.1.7 *Tbx18* besitzt im Sklerotom eine antiapoptotische Funktion

Die Begrenzung der Expression von *Dll1* auf das PSM und auf die Somiten S0 bis S4 lässt vermuten, dass *Tbx18*, aufgrund der Aufrechterhaltung der Expression im Sklerotom, neben der Funktion als Repressor von *Dll1* in den epithelialen Somiten, eine weitere Funktion in den differenzierten Somiten besitzt. Um die Funktion von *Tbx18* im Sklerotom zu analysieren, wurde mittels der *Tbx18^{cre}*-Mauslinie die Expression des Tbx18VP16-Proteins in der kranialen Hälfte des Sklerotoms induziert.

Durch die EGFP-Epifluoreszenz des EGFP-Proteins konnte nachgewiesen werden, dass das dominant negative Protein in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4 (Abb.5.1.7.1 P; R), in den weiblichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und in den männlichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5 exprimiert wurde (Abb.5.1.7.1 D; F; J; L).

5. Ergebnisse

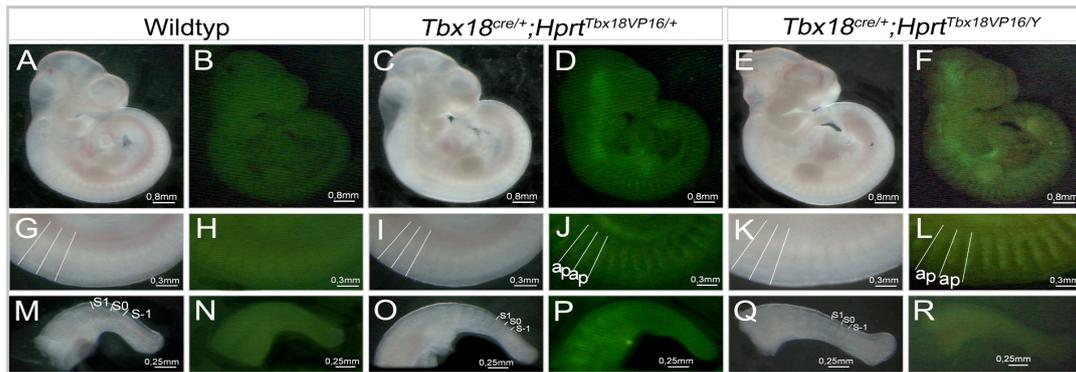
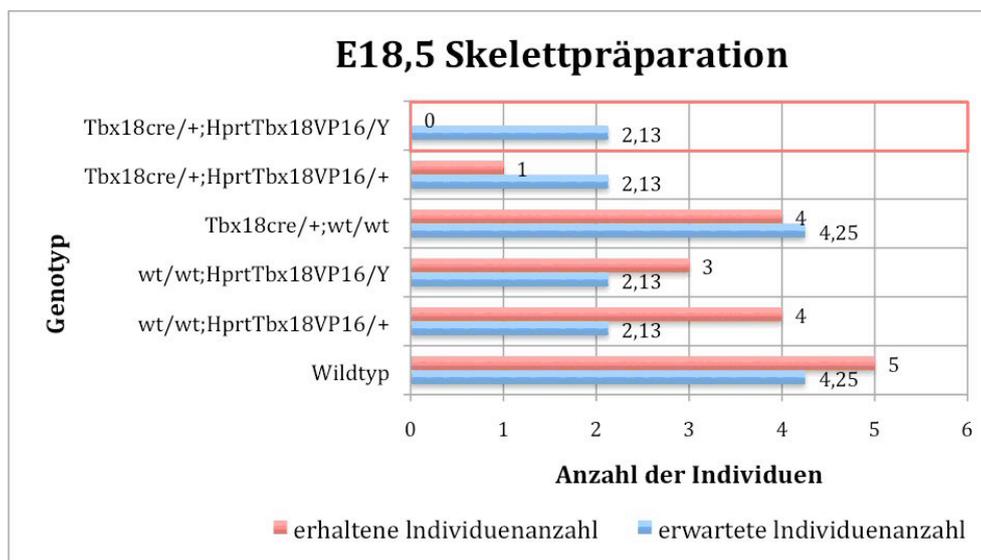


Abb.5.1.7.1: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.1.7.1 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (C; D) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (E; F). Die Abb.5.1.7.1 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule von Wildtypembryonen (G; H), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (I; J) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (K; L) und die Abb.5.1.7.1 M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion von Wildtypembryonen (M; N), $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (O; P) und $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sowie die Somitengrenzen sind eingezeichnet.

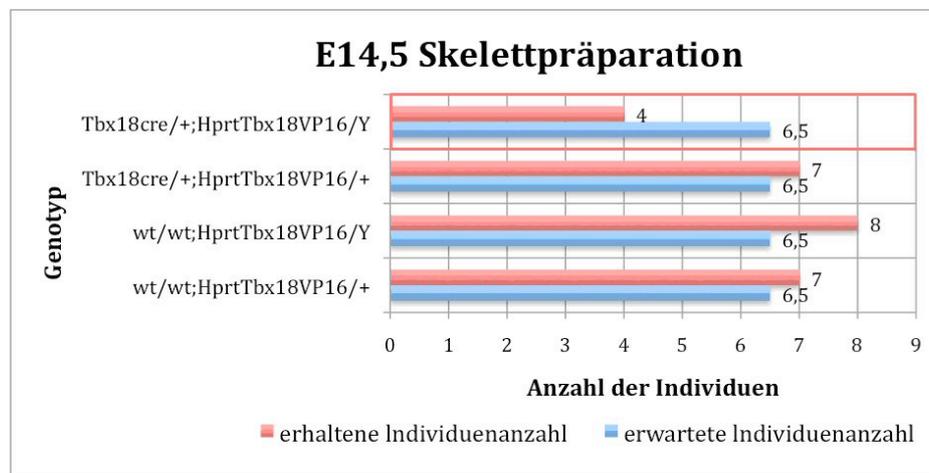
Am Embryonaltag 18,5 konnten keine $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen aus der Verpaarung $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18VP16/Tbx18VP16}$ -Weibchen gewonnen werden (Diagramm 5.1.7.1). Folglich verursachte die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 im Sklerotom embryonale Letalität.

Diagramm 5.1.7.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 17 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen. Die geringere als erwartete Individuenanzahl der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen ist rot umrandet.



Jedoch konnten am Embryonaltag 14,5 $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen erhalten werden, allerdings in einer geringeren Anzahl als nach Mendel zu erwarten war. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass die Expression des dominant negativen Tbx18-Proteins im Sklerotom in diesem Entwicklungsstadium embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.1.7.2).

Diagramm 5.1.7.2: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Tbx18VP16/Tbx18VP16}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 26 Embryonen des Embryonalstadiums 14,5 aufgenommen. Die geringere als erwartete Individuenanzahl der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen ist rot umrandet.



Die Analyse der Skelette der weiblichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass sowohl die proximalen Rippen als auch die Pedikel in diesen transgenen Embryonen regulär gebildet wurden (Abb.5.1.7.2 B; D). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis besaßen die weiblichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen auch am Embryonaltag 14,5 keine Veränderungen individueller Bereiche der Wirbel (Abb.5.1.7.2 F; I). Folglich führte die mosaikartige Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4, zu keinen Skelettdefekten. Im Gegensatz dazu, war das Skelett der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen in diesem Entwicklungsstadium durch die Expansion der proximalen Rippen charakterisiert. Eine Beeinflussung der Pedikel war dagegen nicht zu beobachten (Abb.5.1.7.2 G; J).

Somit erzeugte die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4, einen schwächeren Phänotyp wie der Verlust dieses T-Box-Gens verursachte. Da $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutanten erst nach der Geburt infolge respiratorischer Insuffizienz starben, die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen bei

5. Ergebnisse

einem schwächeren Skelettphänotyp jedoch nur das Entwicklungsstadium 14,5 erreichten, war die Letalität dieser Embryonen nicht auf Defekte der Wirbelsäule zurückzuführen.

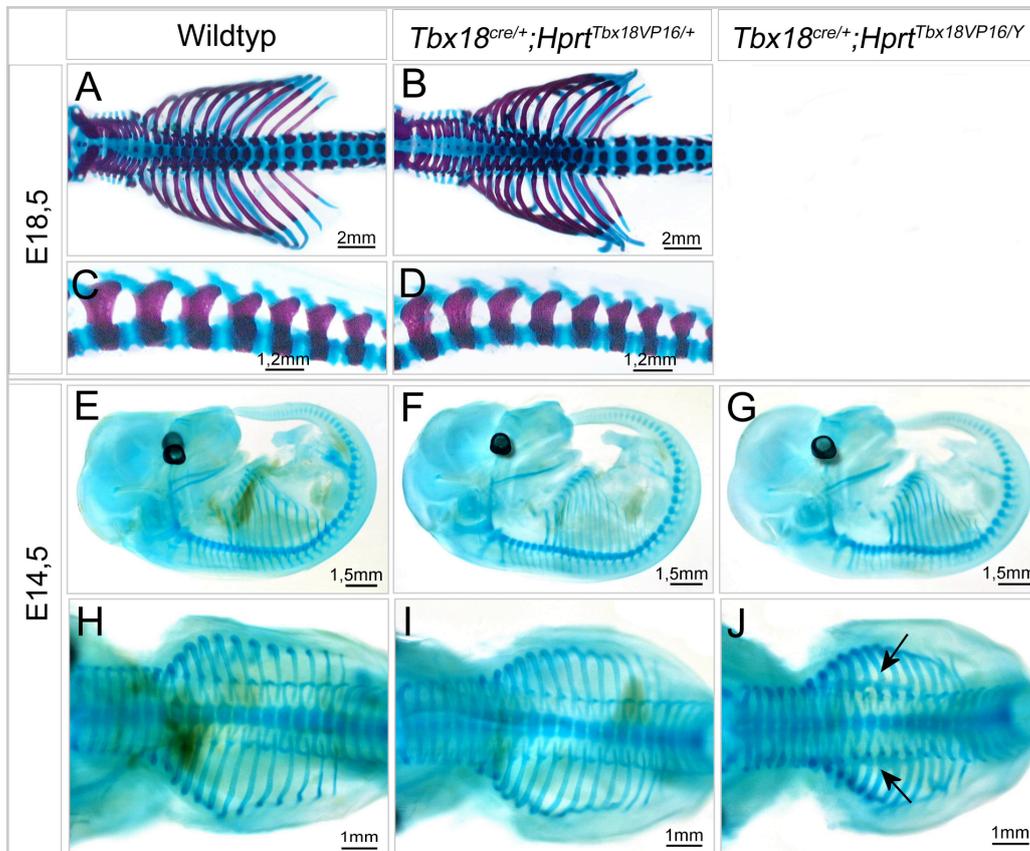


Abb.5.1.7.2: Skelette der *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/+}-Embryonen und der *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/Y}-Embryonen am Embryonaltag 14,5 bzw. 18,5. Die Abb.5.1.7.2 A; B zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches am Embryonaltag 18,5, die Abb.5.1.7.2 C; D die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.1.7.2 E-F stellen Skelette kompletter Embryonen am Embryonaltag 14,5, die Abb.5.1.7.2 H-J eine Ausschnittsvergrößerung des Hals-, Thorax- und Lendenwirbelbereiches der Wirbelsäule am Embryonaltag 14,5 dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; H), die *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/+}-Embryonen (B; F; I) und die *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/Y}-Embryonen (G; J). Die Pfeile markieren die ektopischen proximalen Rippen.

Um die Ursache der Skelettfehlbildungen beschreiben zu können, wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob die Differenzierung der Somiten stattgefunden hatte.

Die Expression von *Pax3* (Abb.5.1.7.3 A-C), als auch die von *Myogenin* (Abb.5.1.7.3 D-F) war in den *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/+}-Embryonen und in den *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/Y}-Embryonen nachweisbar. Eine Veränderung der Expressionsdomänen dieser Gene war nicht sichtbar (Abb.5.1.7.3 A-F). Jedoch konnte eine Ausweitung der in der kaudalen Hälfte der Somiten höheren Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in die kraniale Hälfte der *Tbx18*^{cre/+};*Hprt*^{Tbx18VP16/Y}-Embryonen detektiert werden (Abb.5.1.7.3 I; L; O). In den

weiblichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen war die Expression von $Pax1$, $Pax9$ und $Mox1$ unverändert (Abb.5.1.7.3 H; K; N).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression des dominant negativen Proteins von $Tbx18$ in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4, keinen Einfluss auf die Differenzierung, sondern ausschließlich auf die A/P-Polarisierung der Somiten hatte.

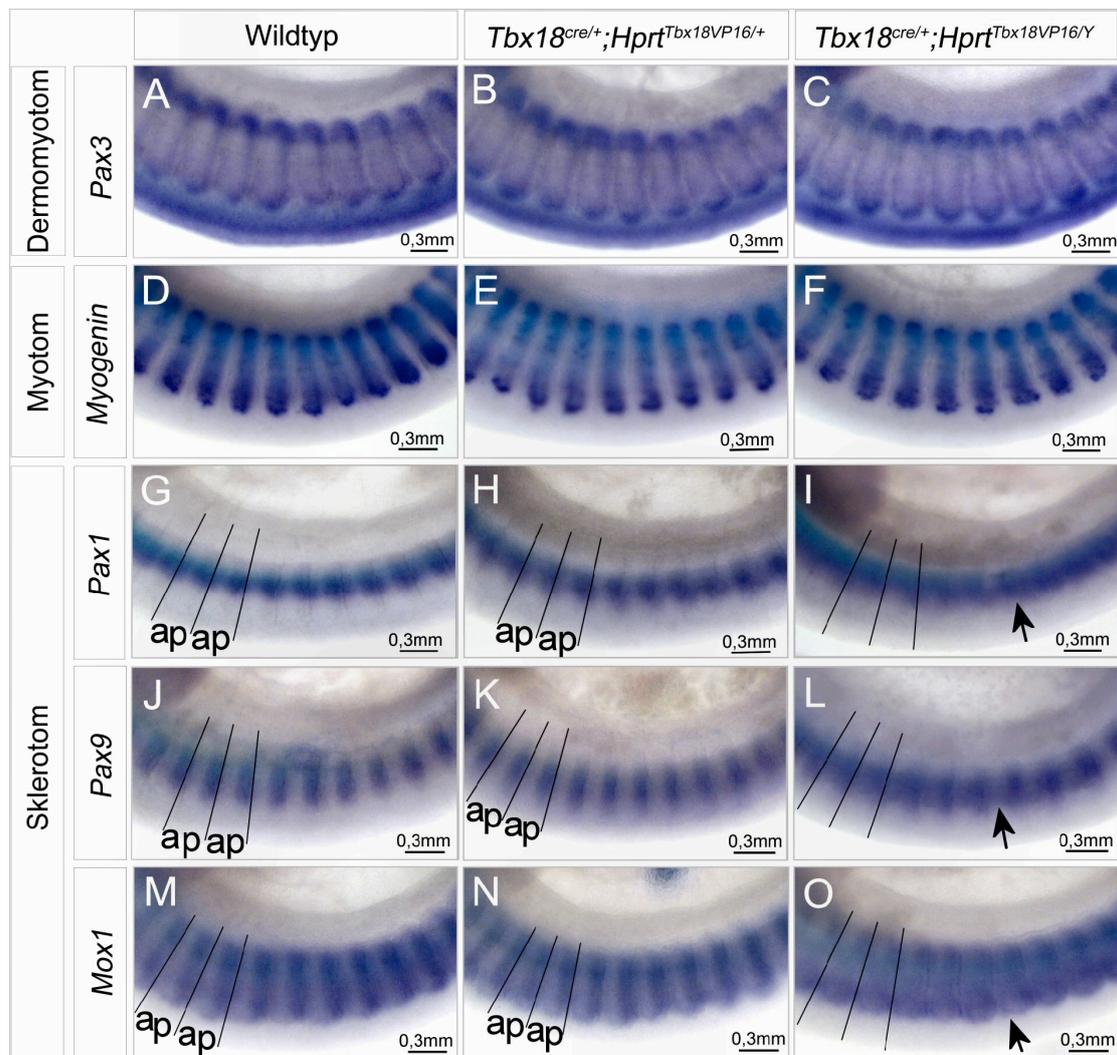


Abb.5.1.7.3: Die Differenzierung der Somiten der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.7.3 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.7.3 A-C stellt die $Pax3$ -Expression, Abb.5.1.7.3 D-F die $Myogenin$ -Expression, Abb.5.1.7.3 G-I die $Pax1$ -Expression, Abb.5.1.7.3 J-L die $Pax9$ -Expression und Abb.5.1.7.3 M-O die $Mox1$ -Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (B; E; H; K; N) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (C; F; I; L; O). Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtyp- und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen sowie die Somitengrenzen der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen sind eingezeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von $Pax1$, $Pax9$ und $Mox1$ in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen.

Die Analyse der veränderten A/P-Polarisierung der Somiten wurde mittels der Expression von *Tbx22* und von *Uncx4.1* beschrieben. Die Expression des Tbx18VP16-Proteins wurde mittels des Nachweises der GFP-Aktivität des EGFP-Proteins sichtbar gemacht.

Die Expression des Transgens war ausschließlich in der kranialen Hälfte der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen bzw. der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen, beginnend in dem Somiten S4, zu beobachten (Abb.5.1.7.4 A-C; G-I). Jedoch konnte in den am weitesten kranial gelegenen Somiten der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen nur eine schwache Transgenexpression nachgewiesen werden (Abb.5.1.7.4 C). Weiterhin war die *Uncx4.1*-Expression in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen in das kraniale Kompartiment der differenzierten Somiten ausgeweitet (Abb.5.1.7.4 F). Die Expression des Homöobox-Gens in den Somiten der Schwanzregion war, aufgrund der fehlenden Rekombination in den Somiten S1 bis S4, weiterhin auf die kaudale Hälfte begrenzt (Abb.5.1.7.4 L). Die mosaikartige Expression des Tbx18VP16-Proteins in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen hatte keinen Einfluss auf die Expression von *Uncx4.1* in den epithelialen Somiten bzw. im Sklerotom (Abb.5.1.7.4 E; K). Die Expression von *Tbx22* war in beiden transgenen Embryonen unverändert (Abb.5.1.7.4 M-O).

Folglich resultierte die Expression eines dominant negativen Proteins von *Tbx18* in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4, in einer Posteriorisierung des Sklerotoms.

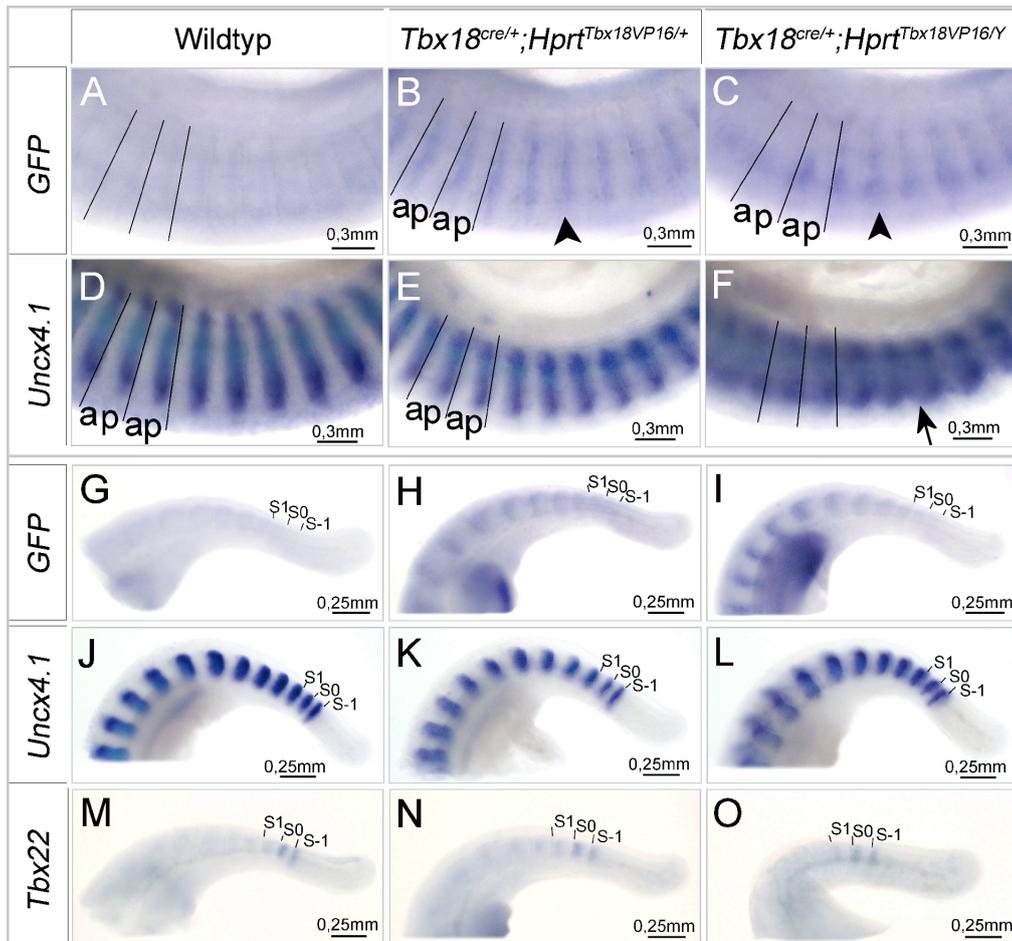


Abb.5.1.7.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen und den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.7.4 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (D-F) mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtyp- und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen bzw. die Somitengrenzen der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen ist eingezeichnet. Die Abb.5.1.7.4 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (B; E; H; K; N) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Uncx4.1*, die Pfeilköpfe die Expression des dominant negativen Allels.

In einem nächsten Schritt wurde der Beginn der Posteriorisierung der Somiten analysiert.

Die Expression von *Pax9* und von *Mox1* wiesen in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen und den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen weiterhin in der kaudalen Hälfte der Somiten der Schwanzregion eine höhere Intensität als in deren kranialem Kompartiment auf (Abb.5.1.7.5 A-F). In gleicher Weise war auch die *EphrinB2*-Expression in der kaudalen Hälfte der Somiten in beiden transgenen Embryonen detektierbar (Abb.5.1.7.5 G-I). Des Weiteren war die Expression von *Mesp2* (Abb.5.1.7.5 P-R) wie auch die *EphA4*-Expression (Abb.5.1.7.5 J-L) und die Expression von *Cer1* in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen

5. Ergebnisse

und den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen auf die kraniale Hälfte der Somitomere und der Somiten begrenzt (Abb.5.1.7.5 M-O).

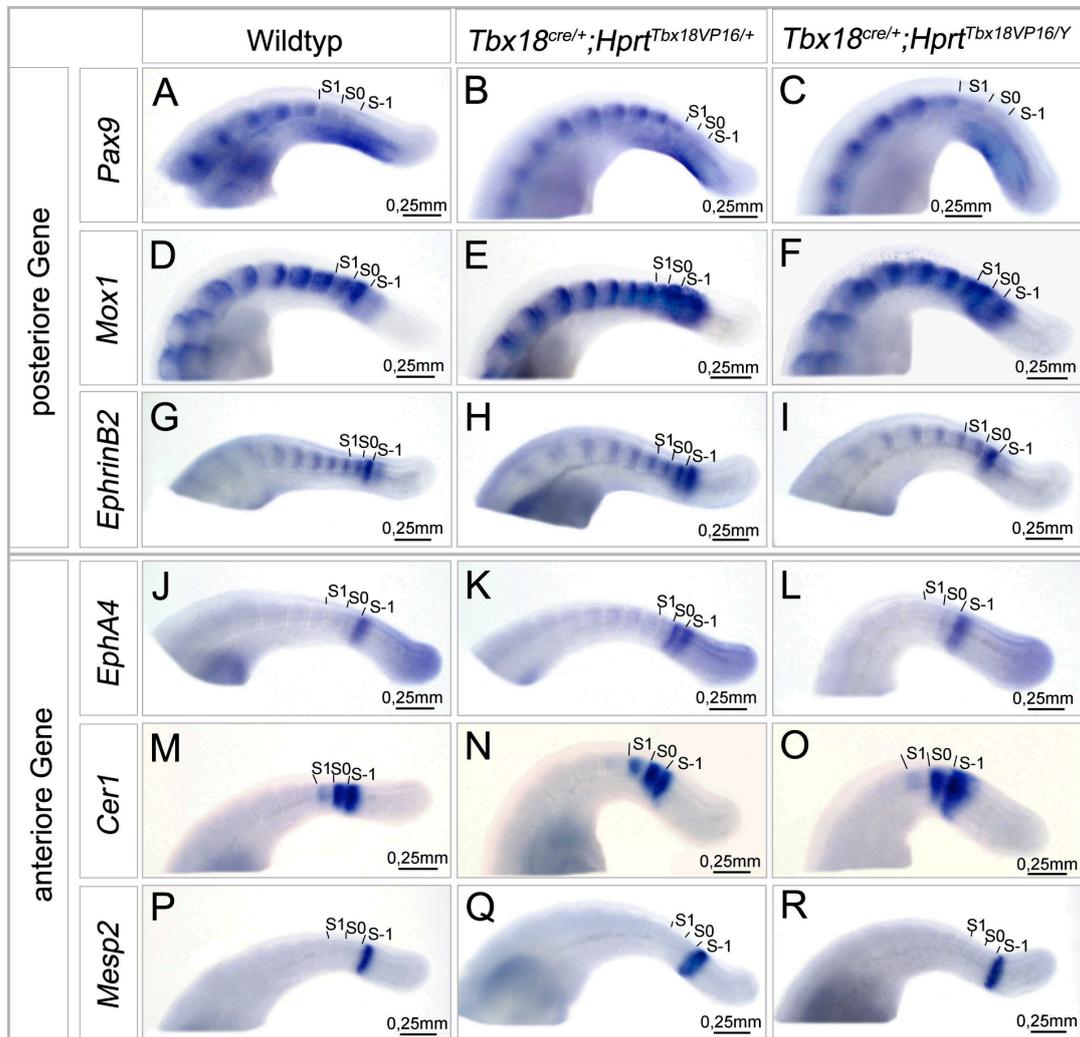


Abb.5.1.7.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen und den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.7.5 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert werden. Abb.5.1.7.5 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.1.7.5 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.1.7.5 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.1.7.5 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.1.7.5 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.1.7.5 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M; P), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (B; E; H; K; N; Q) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (C; F; I; L; O; R).

Folglich war auch die Expression von *Dll1* und *Hey1* in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen bzw. den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen weiterhin in der kaudalen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten S1-S4 nachweisbar (Abb.5.1.7.6 A-F).

Somit wurde die A/P-Polarität in Embryonen, die sich durch die Expression eines dominant negativen Tbx18-Proteins in der kranialen Hälfte des Sklerotoms auszeichneten, regulär etabliert, im Sklerotom jedoch nicht aufrechterhalten.

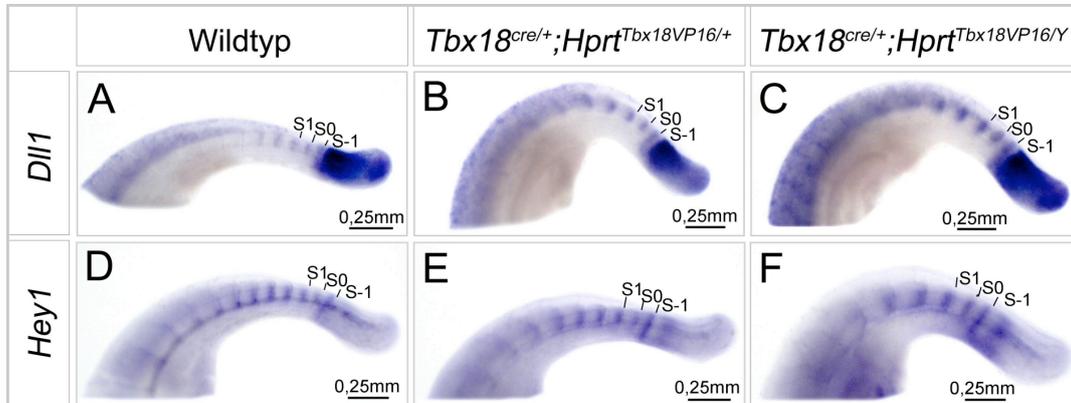


Abb.5.1.7.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen bzw. der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.1.7.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.1.7.6 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.1.7.6 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen (B; E) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen (C; F).

Um festzustellen, ob die Posteriorisierung der Somiten das Resultat des Verlustes der kranialen Zellen aufgrund von Apoptose war oder, ob die Zellen des kranialen Kompartiments eine kaudale Identität durch die Expression von kaudal-spezifischen Genen annahmen, wurde mit Hilfe des Lysotracker am Embryonaltag 10,5 die Apoptose in den Zellen des Sklerotoms in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen bzw. den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen analysiert.

Der rot-fluoreszierende Farbstoff des Lysotracker lagert sich in Organellen mit einem niedrigen pH-Wert ein, wie z.B. in Lysosomen, deren Enzyme an der Apoptose beteiligt sind, und kennzeichnet so apoptotische Zellen. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen, die im ventralen Bereich des Sklerotoms apoptotische Zellen aufwiesen, war in den Zellen der kranialen Hälfte des Sklerotoms in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen Apoptose zu erkennen (Abb.5.1.7.7 A-C).

Folglich wurde die Posteriorisierung der Somiten durch das Einwandern kaudaler Zellen in die kraniale Hälfte nach dem Verlust der kranialen Zellen infolge von Apoptose verursacht.

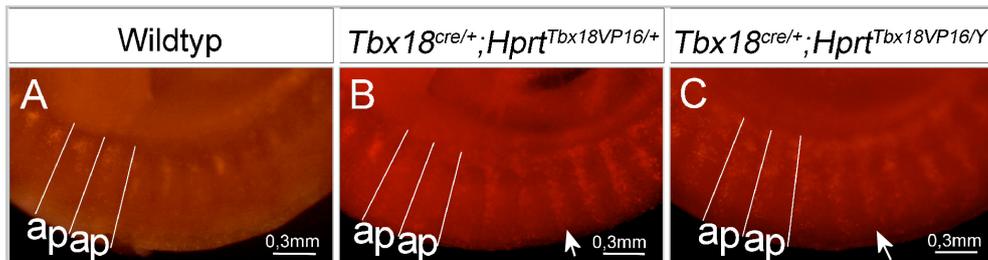


Abb.5.1.7.7: Die Analyse der Apoptose im Sklerotom der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen bzw. der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.1.7.7 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der LysoTrackerfärbung in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtyp- und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen bzw. der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen ist eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/+}$ -Embryonen (B) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}$ -Embryonen (C). Die Pfeile markieren die erhöhte Apoptose in der kranialen Hälfte des Sklerotoms.

5.2 Die Funktion des Notch-Signalweges in den Somiten

5.2.1 Der Notch-Signalweg ist im Sklerotom nicht funktionell aktiv

Die bisherige Analyse von *Dll1* im Zuge der Somitogenese weist darauf hin, dass dieser Signalweg, aufgrund der Begrenzung der *Dll1*-Expression auf das PSM und auf die Somiten S0 bis S4 und infolge des Fehlens eines weiteren aktivierenden Liganden in den differenzierten Somiten, nur im PSM und in den epithelialen Somiten eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu, wird die Expression von *Tbx18* im Verlauf der Differenzierung der Somiten in der kranialen Hälfte des Sklerotoms aufrechterhalten, was die Vermutung zulässt, dass dieser T-Box-Transkriptionsfaktor, neben der Funktion als Repressor von *Dll1* in den epithelialen Somiten, eine weitere Funktion im Sklerotom besitzt bzw. weiterhin für die Repression der bisher nicht nachgewiesenen Expression des Notch-Liganden in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten verantwortlich ist. Um zu analysieren, ob eine Aktivität des Notch-Signalweges im Sklerotom die Entwicklung der Wirbelsäule beeinflussen kann und somit einen Hinweis auf eine mögliche Funktion dieses Signalweges in den differenzierten Somiten zu erhalten, wurde die Expression der intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors (NICD), welcher mit *Dll1* in dem PSM und in den Somiten S0 bis S4 koexprimiert ist, mit Hilfe der *Tbx18^{cre}*-Mauslinie in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4, induziert. Das für die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* verwendete *Rosa26^{NICD}*-Allel enthielt eine mit *LoxP*-Sequenzen flankierte Phosphoglyceratkinase-Neomycin-Stop-Kassette fusioniert mit der cDNA der intrazellulären Domäne von *Notch1*, an deren 3'-Ende eine IRES-GFP-Kassette kloniert wurde (Kopan et al. 1994; Mizutani et al. 2001). Nach Cre-Rekombinase-abhängiger Entfernung der Phosphoglyceratkinase-Neomycin-Stop-Kassette an

den *LoxP*-Schnittstellen wird die intrazelluläre Domäne von *Notch1* gewebespezifisch transkribiert und induziert in dem rekombinierten Gewebe die Expression von Zielgenen dieses Signalweges, wie z.B. *Hey1*. Um zu überprüfen, ob durch die Verpaarung von *Tbx18^{cre/+}*-Männchen mit *Rosa26^{NICD/NICD}*-Weibchen eine Aktivierung des Notch-Signalweges in der kranialen Hälfte der Somiten stattfand, wurde die Expression des Zielgens *Hey1* mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 analysiert. *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen wiesen eine in den Wildtypembryonen nicht detektierbare *Hey1*-Expression in der kranialen Hälfte des Sklerotoms auf (Abb.5.2.1.1 A; B). Aufgrund der fehlenden Rekombination der *Tbx18^{cre}*-Mauslinie in den epithelialen Somiten S1 bis S4 war in diesen Strukturen ausschließlich die endogene Expression von *Hey1* in der kaudalen Hälfte sichtbar (Abb.5.2.1.1 E; F). Ebenso war die *Dll1*-Expression unverändert (Abb.5.2.1.1 C; D). Eine Induktion der Expression von *Dll1* in der kranialen Hälfte des Sklerotoms, infolge der dort stattfindenden Missexpression der aktiven Form von *Notch1*, war nicht nachzuweisen, da die Regulation dieses Liganden nicht von der Aktivität des Notch-Signalweges abhängt.

Die Missexpression des Notch-Signalweges erfolgte in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen somit ausschließlich in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4.

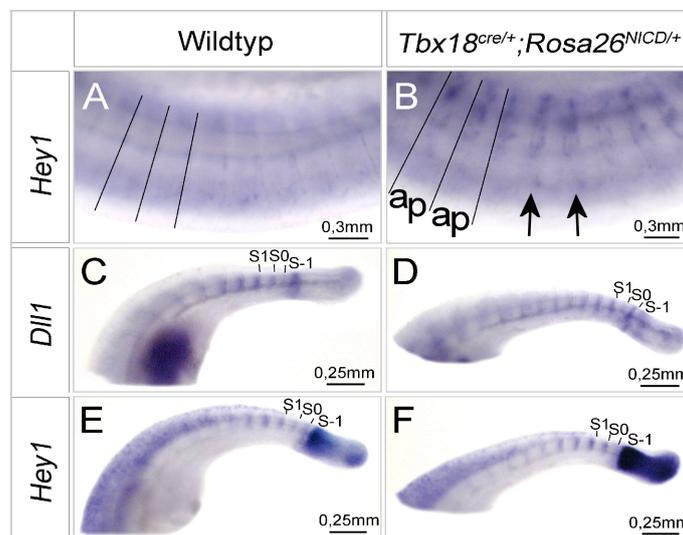
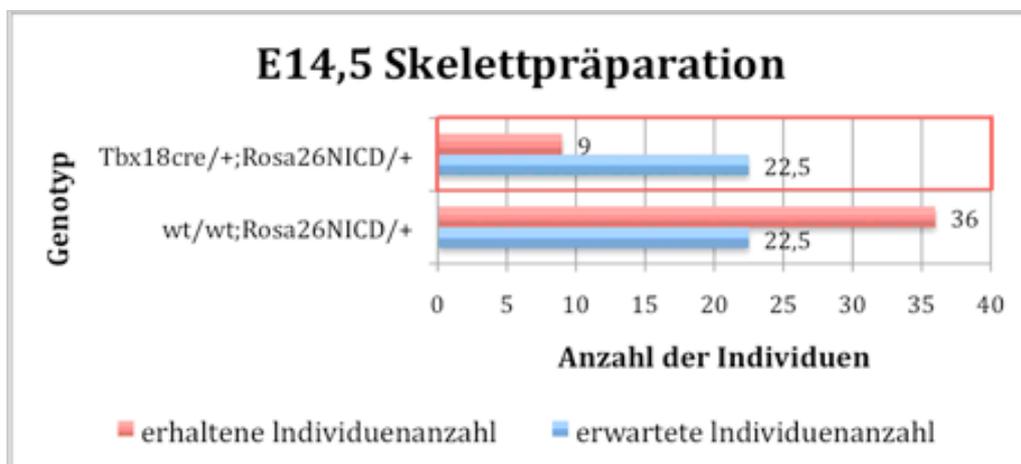


Abb.5.2.1.1: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.1.1 A; B zeigen die *Hey1*-Expression in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule; die Abb.5.2.1.1 C-F die Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.2.1.1 C; D stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.2.1.1 E; F die *Hey1*-Expression dar. Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtypembryonen wie auch die Position der Somitomere S-1 und S0 und die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E) und die *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F). Die Pfeile markieren die *Hey1*-Expression in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten.

5. Ergebnisse

Die niedrigere als nach Mendel erwartete Anzahl an $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen am Embryonaltag 14,5 zeigte, dass die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* in der kranialen Hälfte der Somiten in diesem Entwicklungsstadium embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.2.1.1).

Diagramm 5.2.1.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Rosa26^{NICD/NICD}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 45 Embryonen des Embryonalstadiums 14,5 aufgenommen. Die geringere als erwartete Individuenanzahl der $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen ist rot umrandet.



Um festzustellen, ob die Aktivität des Notch-Signalweges in dem Sklerotom einen Einfluss auf die Entwicklung der Wirbelsäule hatte, wurden die Skelette der $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen untersucht. Aufgrund der embryonalen Letalität dieser transgenen Embryonen wurde die Analyse dieser Stützstruktur am Embryonaltag 14,5 durchgeführt. Die Skelettpräparation zeigte, dass $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen regulär gebildete proximale Rippen und Pedikel besaßen (Abb.5.2.1.2 B; E; F). Eine Expansion dieser Skelettstrukturen war lediglich vereinzelt im Thoraxbereich der Wirbelsäule einiger $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen zu erkennen und umfasste selten mehr als zwei Wirbel (Abb.5.2.1.2 B; E; F).

Insofern scheint eine Aktivität des Notch-Signalweges in dem Sklerotom die Entwicklung der Wirbelsäule nicht fundamental zu beeinflussen.

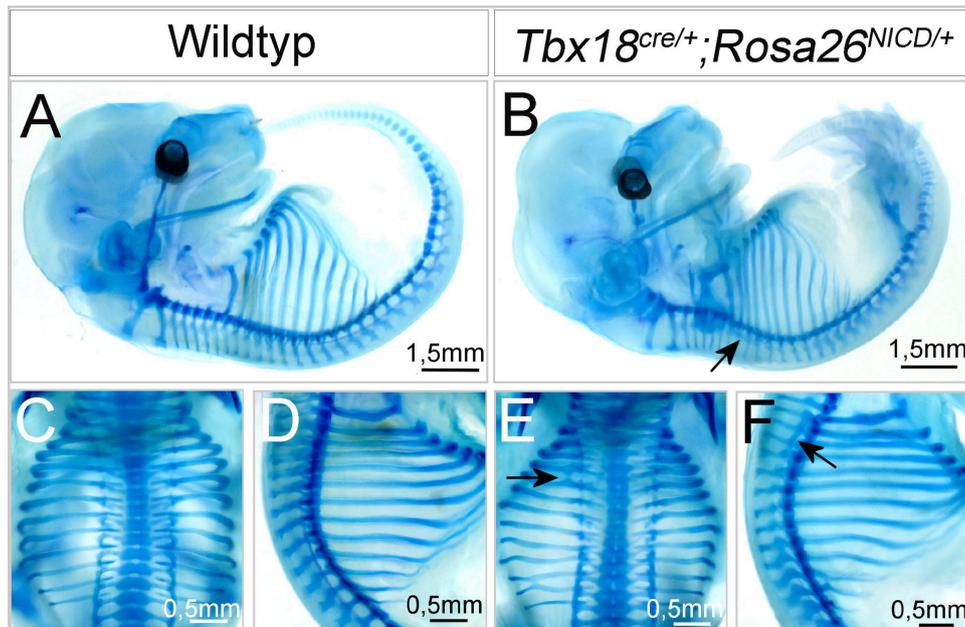


Abb.5.2.1.2: Skelette der $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen am Embryonaltag 14,5. Die Abb.5.2.1.2 A; B stellen die Skelette kompletter Embryonen am Embryonaltag 14,5, die Abb.5.2.1.2 C-F eine Ausschnittsvergrößerung des Thoraxbereiches der Wirbelsäule dieser Embryonen dar. Die Abb.5.2.1.2 C; E zeigen eine dorsale Sicht auf den Thoraxbereich, die Abb.5.2.1.2 D; F eine laterale Ansicht dieses Bereiches. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; D) und die $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen (B; E; F). Die Pfeile markieren die ektopischen proximalen Rippen bzw. Pedikel der $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen.

Um zu ergründen, ob die vereinzelt auftretenden ektopischen Skelettelemente in den $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen eine Ursache der Missexpression der intrazellulären Domäne von *Notch1* in der kranialen Hälfte der Somiten waren bzw. zufällig auftretende Veränderungen der Wirbel darstellten, die auch vereinzelt in Wildtypembryonen zu beobachten sind, wurde die Expression Sklerotom-spezifischer Gene am Embryonaltag 10,5 analysiert.

Die nachweisbare Expression von *Pax3* (Abb.5.2.1.3 A-B), *Myogenin* (Abb.5.2.1.3 C-D) sowie von *Pax1* (Abb.5.2.1.3 E-F), *Pax9* (Abb.5.2.1.3 G-H) und *Mox1* (Abb.5.2.1.3 I-J) zeigte, dass die Differenzierung der Somiten in den $Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}$ -Embryonen regulär stattgefunden hatte. Die genauere Betrachtung der Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* ließ jedoch eine geringe Expansion des in der kaudalen Hälfte der Somiten stärkeren Expressionslevels dieser Gene in das kraniale Kompartiment des Sklerotoms erkennen (Abb.5.2.1.3 E-J).

Folglich hatte die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* in der kranialen Hälfte der Somiten keinen Einfluss auf deren Differenzierung. Jedoch war die A/P-Polarität der Somiten geringfügig verändert.

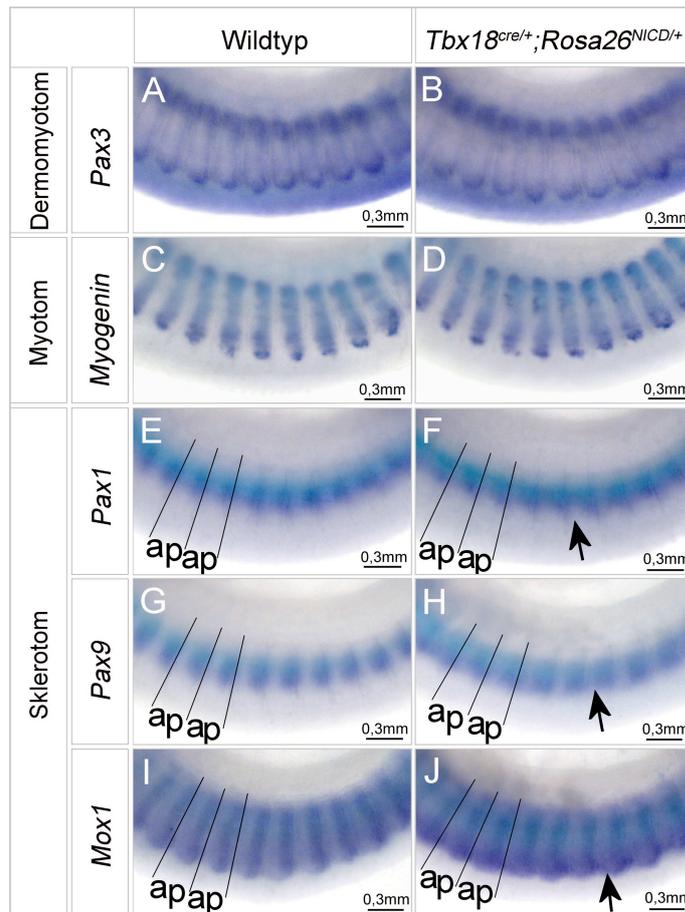


Abb.5.2.1.3: Die Analyse der Differenzierung der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.1.3 A-J zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.2.1.3 A-B stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.2.1.3 C-D die *Myogenin*-Expression, Abb.5.2.1.3 E-F die *Pax1*-Expression, Abb.5.2.1.3 G-H die *Pax9*-Expression und Abb.5.2.1.3 I-J die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G; I) und die *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H; J). Die A/P-Polarität der Somiten ist bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet. Die Pfeile verweisen auf die geringe Expansion dieser Gene in die kraniale Hälfte der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

Um eine Veränderung der A/P-Polarität nachweisen zu können, wurde die Expression von *Tbx18* und *Uncx4.1* untersucht.

Übereinstimmend mit der geringen Ausweitung der Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in die kraniale Hälfte der Somiten, konnte auch eine Expansion der *Uncx4.1*-Expression in das kraniale Kompartiment in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen beobachtet werden (Abb.5.2.1.4 A-B). Die Ausweitung der *Uncx4.1*-Expression war jedoch nur im Sklerotom erkennbar. Die am weitesten kaudal gelegenen Somiten der Schwanzregion der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen wiesen die charakteristische Expression dieses Homöobox-Transkriptionsfaktors in der kaudalen Hälfte auf (Abb.5.2.1.4 E-F). Die

geringfügige Expansion der kaudal exprimierten Gene in die kraniale Hälfte der differenzierten Somiten war nicht ausreichend, um eine Veränderung der Expression von *Tbx18* im Sklerotom zu erreichen. Sowohl in den Somitomeren S-1 und S0 als auch in den epithelialen Somiten und dem Sklerotom war die Expression dieses T-Box-Transkriptionsfaktors in der kranialen Hälfte nachzuweisen (Abb.5.2.1.4 C-D; G-H). Somit war nur eine geringfügige Veränderung der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen nachweisbar.

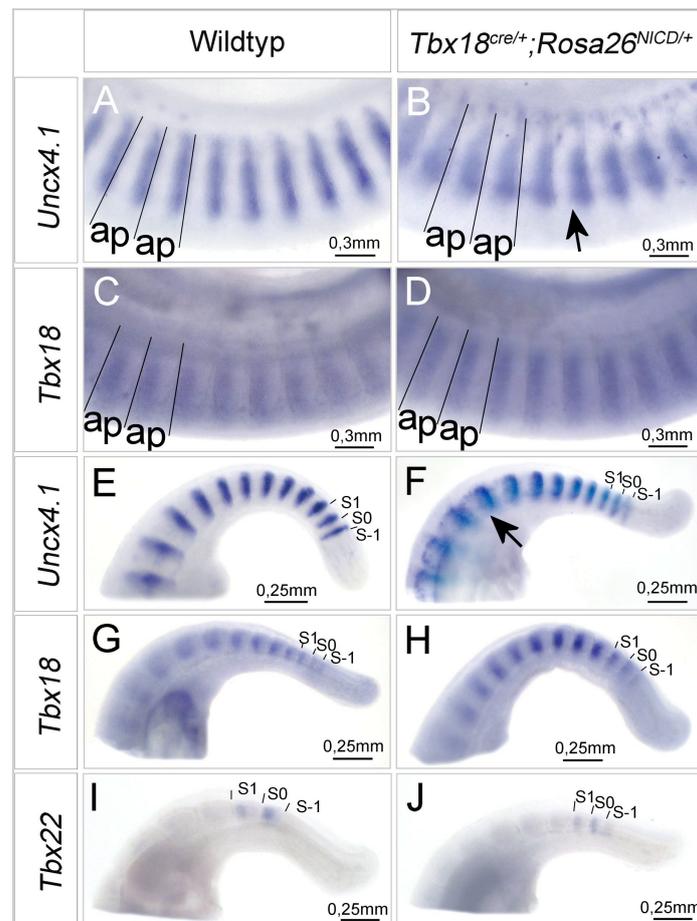


Abb.5.2.1.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.1.4 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expression von *Uncx4.1* (A-B) und von *Tbx18* (C-D) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten ist eingezeichnet. Die Abb.5.2.1.4 E-H stellen die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (E-F) und *Tbx18* (G-H) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G), die *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Uncx4.1* in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

Um sicherzustellen, dass keine Beeinflussung der endogenen Aktivität des Notch-Signalweges, welche für die Etablierung der A/P-Polarität der Somiten notwendig ist, in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen vorlag, wurde die Expression spezifischer in den

5. Ergebnisse

Somitomeren S-1 und S0 sowie in den epithelialen Somiten S1 und S2 exprimierter Gene mittels RNS-*in situ* Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 analysiert.

Die Expression der paired-Box-Transkriptionsfaktoren *Pax1* und *Pax9* wies weiterhin in der kaudalen Hälfte der Somiten der Schwanzregion der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen eine höhere Intensität als in deren kranialer Hälfte auf (Abb.5.2.1.5 A-D). In gleicher Weise war auch die Expression von *EphrinB2* in der kaudalen Hälfte der Somiten detektierbar (Abb.5.2.1.5 E-F). Weiterhin war die Expression von *Mesp2* und *EphA4* in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 (Abb.5.2.1.5 G-J) unverändert.

Die Etablierung der A/P-Polarität der Somiten wurde folglich durch die Missexpression der intrazellulären Domäne von *Notch1* in der kranialen Hälfte dieser Strukturen nicht beeinflusst.

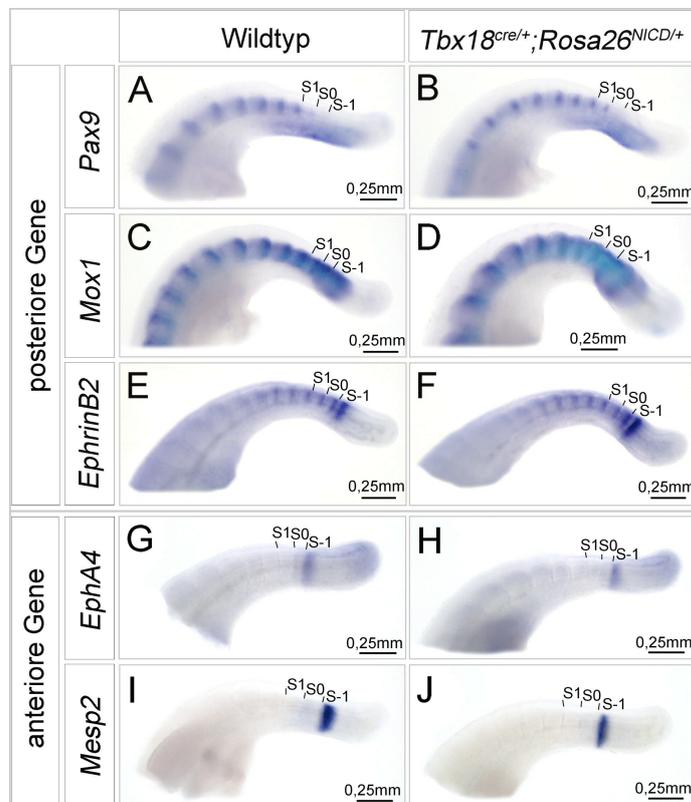


Abb.5.2.1.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.1.5 A-L zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.2.1.5 A-B stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.2.1.5 C-D die *Mox1*-Expression, Abb.5.2.1.5 E-F die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.2.1.5 G-H die *EphA4*-Expression und Abb.5.2.1.5 I-J die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G; I), die *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H; J).

Die Analyse der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen wies darauf hin, dass die Aktivität des Notch-Signalweges im Sklerotom für die Entwicklung der Wirbelsäule nicht notwendig ist.

5.2.2 Die Posteriorisierung des Sklerotom der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante kann durch die Inaktivierung des Notch-Signalweges nicht reduziert werden

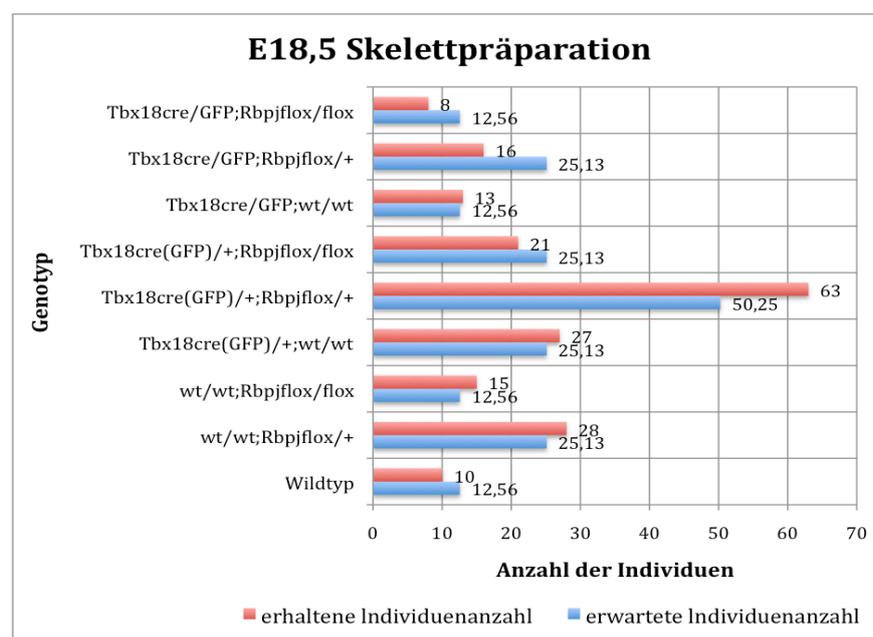
Um in einem weiteren Experiment überprüfen zu können, ob der Notch-Signalweg im Sklerotom funktionell aktiv ist, sollte eine Inaktivierung dieses Signalweges in der kranialen Hälfte der Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Embryonen herbeigeführt werden (im Folgenden als *Tbx18*^{cre/GFP};*Rbpj*^{fllox/fllox}-Embryonen bezeichnet). Wie bereits im Zuge der Analyse der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Nullmutante gezeigt wurde, resultierte die Abwesenheit dieses T-Box-Transkriptionsfaktors in einer Posteriorisierung der differenzierten Somiten. Die posteriore Identität der einen Somitenhälfte wird durch die Expression des Notch-Liganden *Dll1* in der kaudalen Hälfte des Somitomers S-1 festgelegt und in diesem Kompartiment in dem Somitomer S0 und den Somiten S1 bis S4 aufrechterhalten. Aufgrund der Begrenzung der *Dll1*-Expression auf die kaudale Hälfte der epithelialen Somiten und infolge des Fehlens eines weiteren aktivierenden Liganden in dem kranialen Kompartiment der epithelialen Somiten, ist die Aktivität des Notch-Signalweges ebenfalls auf diese Hälfte der Somiten der Schwanzregion eines Embryos beschränkt. Da *Tbx18* als Repressor der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten fungiert, könnte für den Fall, dass die Aktivität des Signalweges in der kaudalen Hälfte des Sklerotoms aufrechterhalten wird, die Posteriorisierung der differenzierten Somiten der *Tbx18*^{GFP/GFP}-Nullmutante durch die Ausweitung der *Dll1*-Expression und somit der Aktivität des Notch-Signalweges in die kraniale Hälfte des Sklerotoms hervorgerufen werden. In diesem Fall sollte die Ausdehnung der Aktivität des Notch-Signalweges in die kraniale Hälfte des Sklerotoms im *Tbx18*^{GFP/GFP}-Nullmutantenhintergrund durch die spezifische Expression einer inaktiven Form des die intrazelluläre Domäne der Notch-Rezeptoren bindenden Transkriptionsfaktors *Rbpj* (recombination signal-binding protein κ) in dem kranialen Kompartiment des Sklerotoms unterbunden werden (Oka et al. 1995). Die Bindung der intrazellulären Domäne von Notch-Rezeptoren an den Transkriptionsfaktor *Rbpj* resultiert in der Abspaltung des Korepressor-Komplexes, welcher in der Abwesenheit der intrazellulären Domäne eines Notch-Rezeptors die Inaktivierung der Zielgene dieses Signalweges garantiert, und in der Bildung eines Koaktivator-Komplexes bestehend aus Histon-Acetyl-Transferasen und Chromatin-modulierenden Faktoren, der für die Induktion der Transkription der Zielgene verantwortlich ist (Bray et al. 2006). Das hier verwendete *Rbpj*-Allel war durch den Besitz von *LoxP*-Sequenzen, welche das 6. Exon dieses Transkriptionsfaktors, das für die DNA-Bindedomäne kodiert, und das 7. Exon flankieren, charakterisiert (Oka et al. 1995). Durch die Verpaarung der *Tbx18*^{cre}-Mauslinie mit dem *Rbpj*^{fllox/fllox}-Mausstamm wurde in der kranialen Hälfte des

5. Ergebnisse

Sklerotoms somit ein *Rbpj*-Protein exprimiert, welches, aufgrund des Fehlens der DNA-Bindedomäne, nicht an die Promotorregionen der Zielgene des Signalweges binden konnte. Infolgedessen wurde eine Aktivierung der Zielgene des Notch-Signalweges nach Bindung der intrazellulären Domäne der Notch-Rezeptoren an das *Rbpj*-Protein in dieser Hälfte der Somiten unterbunden. Somit sollte in den *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flox/flox}*-Embryonen die Posteriorisierung der differenzierten Somiten, im Fall, dass diese durch die Ausweitung der Aktivität des Notch-Signalweges in die kranialen Hälfte dieser Somiten verursacht wurde, reduziert sein. Dieses sollte in einer Abschwächung des Skelettphänotypes der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flox/flox}*-Embryonen im Vergleich zu den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten resultieren.

Für die Herstellung der Embryonen, die durch die Expression einer inaktiven Form des Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutantenhintergrund charakterisiert waren, wurden *Tbx18^{cre/+};Rbpj^{flox/+}*-Männchen mit *Tbx18^{GFP/+};Rbpj^{flox/+}*-Weibchen verpaart. Die erhaltene Anzahl an Nachkommen pro Genotyp am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4 an, im Wildtyphintergrund bzw. im *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutantenhintergrund keine embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.2.2.1). Insofern konnte die Analyse der Skelette am Embryonaltag 18,5 durchgeführt werden.

Diagramm 5.2.2.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von *Tbx18^{cre/+};Rbpj^{flox/+}*-Männchen mit *Tbx18^{GFP/+};Rbpj^{flox/+}*-Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 201 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



Um festzustellen, ob durch die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutantenhintergrund eine Verminderung der Posteriorisierung der Somiten stattfand, wurden die Skelette der *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutanten, die sich durch eine Expansion der proximalen Rippen und Pedikel individueller Wirbel im Hals- und Thoraxbereich der Wirbelsäule sowie einer veränderten Morphologie der Pedikel und ektopischen, die Pedikel untereinander verbindenden Knorpelstrukturen im Lenden- und Schwanzwirbelbereich auszeichneten, mit denen der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen verglichen (Abb.5.2.2.1 C; G; K). Die Analyse der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass die Skelette dieser transgenen Embryonen ebenfalls durch die Expansion der proximalen Rippen und der Pedikel individueller Wirbel des Hals- und Thoraxbereiches der Wirbelsäule charakterisiert waren. Die veränderte Morphologie der Pedikel der Lenden- und Schwanzwirbelregion der *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutanten war in den *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen ebenfalls zu erkennen (Abb.5.2.2.1 L). Ferner waren ektopische Knorpelstrukturen, welche die Pedikel untereinander verbinden, in diesen transgenen Embryonen nachweisbar (Abb.5.2.2.1 L). Die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im Wildtyphintergrund verursachte keine Skelettdefekte. Sowohl die proximalen Rippen wie auch die Pedikel wurden in diesen Embryonen regulär gebildet (Abb.5.2.2.1 B; F; J).

Aufgrund des vergleichbaren Schweregrades der Skelettdefekte der *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutanten und der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen waren diese nicht das Resultat der Ausweitung der Aktivität des Notch-Signalweges in die kranialen Hälfte der Somiten.

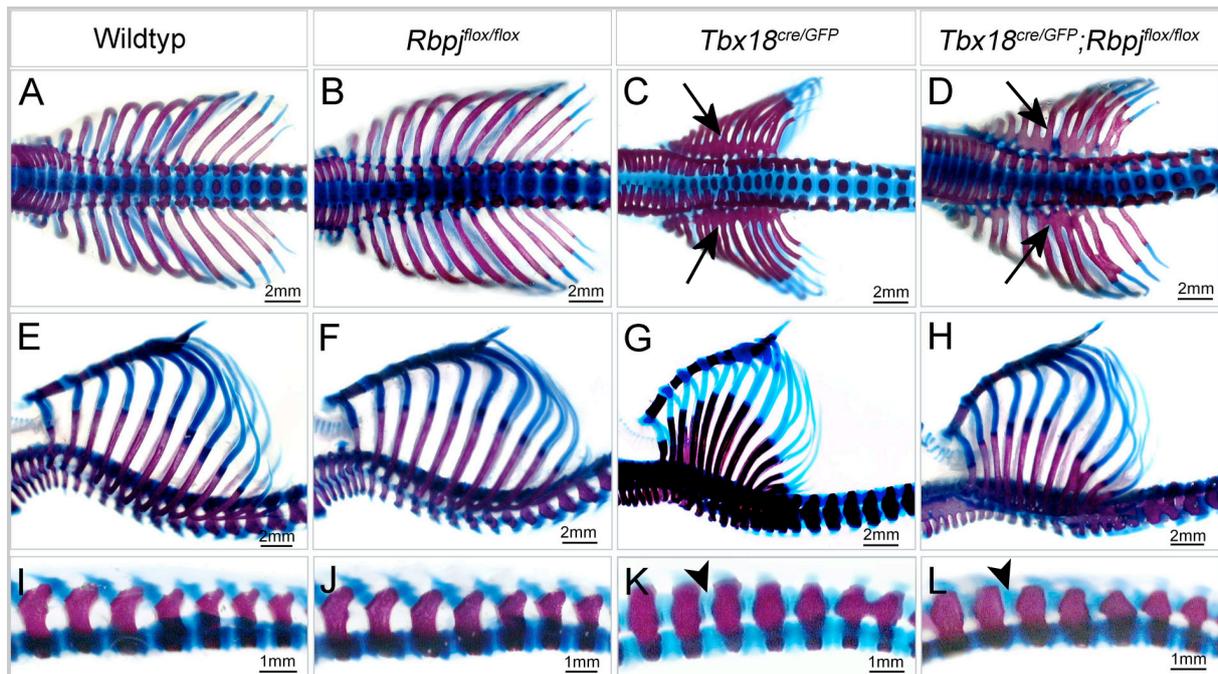


Abb.5.2.2.1: Skelettdéfekte der *Tbx18*^{cre/GFP};*Rbpj*^{flox/flox}-Embryonen am Embryonaltag 18,5.

Die Abb.5.2.2.1 A-D zeigen die dorsale Ansicht einer Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Halswirbel- und Thoraxbereiches, die Abb.5.2.2.1 E-H die laterale Ansicht einer Ausschnittsvergrößerung des Halswirbel- und Thoraxbereiches, die Abb.5.2.2.1 I-L die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I), die *Rbpj*^{flox/flox}-Mutante (B; F; J), die *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutante (C; G; K) und die *Tbx18*^{cre/GFP};*Rbpj*^{flox/flox}-Mutante (D; H; L). Die Pfeile markieren die ektopischen Knochelemente, die Pfeilköpfe die ektopischen Knorpel-elemente der *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutante und der *Tbx18*^{cre/GFP};*Rbpj*^{flox/flox}-Mutante.

Um zu überprüfen, ob durch die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutantenhintergrund eine Verminderung der Posteriorisierung der Somiten stattfand, wurde die Expression von *Tbx18* und die von *Uncx4.1* untersucht. Die Expression von *Tbx18* wurde in der *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutante und den *Tbx18*^{cre/GFP};*Rbpj*^{flox/flox}-Embryonen durch den Nachweis der GFP-Aktivität des *Tbx18*^{GFP}-Allels sichtbar gemacht.

Tbx18^{cre/GFP}-Mutanten waren durch eine Ausweitung der *Uncx4.1*-Expression und durch den Verlust der Expression des mutanten *Tbx18*-Gens in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten gekennzeichnet (Abb.5.2.2.2 C; G). Im Gegensatz dazu, war die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in den Somiten der Schwanzregion der *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutanten weiterhin in der jeweiligen Hälfte nachweisbar (Abb.5.2.2.2 K; O). Die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutantenhintergrund führte zu keiner Reduktion der *Uncx4.1*-Expression in dieser Hälfte der differenzierten Somiten (Abb.5.2.2.2 D; H). Eine für die *Tbx18*^{cre/GFP}-Mutante charakteristische Ausweitung von *Uncx4.1* in die kranialen Hälfte des Sklerotoms sowie der

Verlust der *Tbx18*-Expression war auch in den *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen sichtbar (Abb.5.2.2.2 D). Weiterhin war in den epithelialen Somiten der Schwanzregion dieser transgenen Embryonen die Expression des mutanten *Tbx18*-Allels in dem kranialen Kompartiment und die Expression von *Uncx4.1* in der kaudalen Hälfte der Vorläuferstrukturen der Wirbel detektierbar (Abb.5.2.2.2 L; P). Die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4 an, im Wildtyphintergrund resultierte in keiner Veränderung der Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren (Abb.5.2.2.2 B; F; J; N).

Somit führte die Expression des inaktiven Rbpj-Proteins in der kranialen Hälfte der Somiten im *Tbx18^{cre/GFP}*-Mutantenhintergrund zu keiner Verminderung der Posteriorisierung der Somiten. Die Posteriorisierung der differenzierten Somiten scheint somit nicht das Resultat einer Aktivität des Notch-Signalweges in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten zu sein. Insofern wurde auch durch die Analyse der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen gezeigt, dass der Notch-Signalweg in dem Sklerotom wahrscheinlich keine Funktion ausübt.

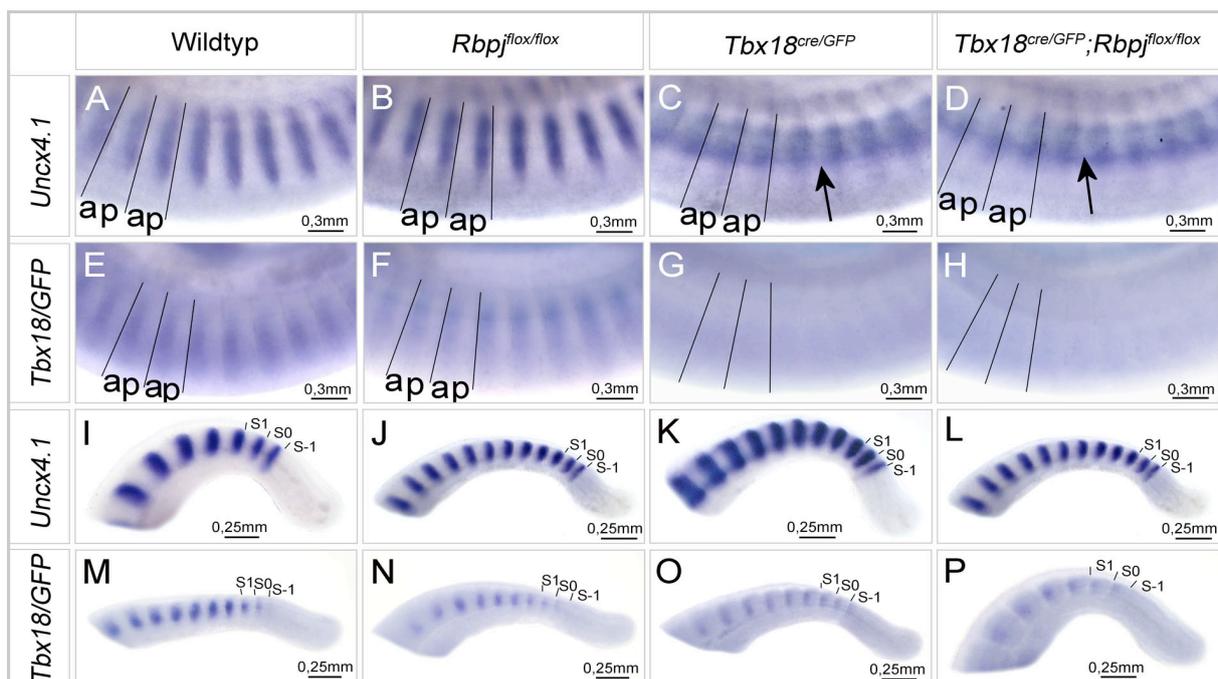


Abb.5.2.2.2: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen. Die Abb.5.2.2.2 A-H zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (A-D) und *Tbx18* (E-H) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten ist eingezeichnet. Die Abb.5.2.2.2 I-P stellt die Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M), die *Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen (B; F; J; N), die *Tbx18^{cre/GFP}*-Embryonen (C; G; K; O) und die *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen (D; H; L; P). Die Pfeile verweisen auf die Ausweitung der *Uncx4.1*-Expression in den *Tbx18^{cre/GFP}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flx/flx}*-Embryonen.

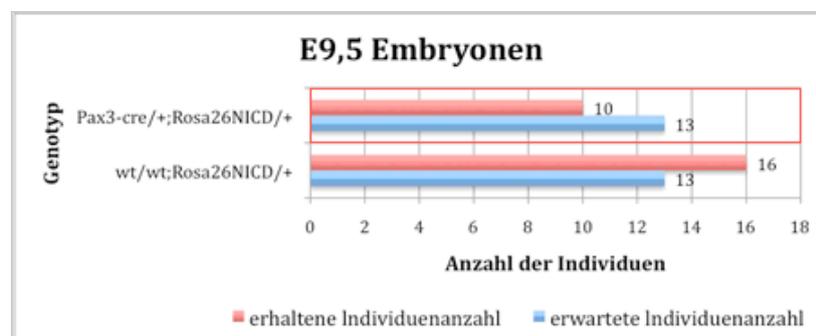
5.2.3 Der Notch-Signalweg ist an der Spezifizierung der kaudalen Hälfte der epithelialen Somiten beteiligt

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob der Notch-Signalweg in den epithelialen Somiten aktiv ist. Die bisher nachgewiesene Beteiligung des Notch-Signalweges bei der Etablierung der A/P-Polarität macht die Anwesenheit der Aktivität dieses Signalweges in dem kaudalen Kompartiment des Somitomers S-1 erforderlich. Dieses erklärt jedoch nicht die Expression von Notch-Signalweg-Komponenten in den epithelialen Somiten.

Um die Funktion des Notch-Signalweg in den epithelialen Somiten zu analysieren, wurde die intrazelluläre Domäne von *Notch1* unter Verwendung des *Rosa26^{NICD}*-Allels mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos fehlexprimiert.

Die Verteilung der Individuenanzahl der Genotypen der Verpaarung *Pax3-cre/+*-Männchen mit *Rosa26^{NICD/NICD}*-Weibchen folgte dem Mendelschen Verteilungsgesetz zweier unabhängig voneinander vererbter Allele (Diagramm 5.2.3.1). Die niedrigere als nach Mendel erwartete Anzahl der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen am Embryonaltag 9,5 zeigte, dass die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* im PSM und in den epithelialen und differenzieren Somiten in diesem Entwicklungsstadium embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.2.3.1). Insofern konnte die folgende Analyse ausschließlich am Embryonaltag 9,5 durchgeführt werden.

Diagramm 5.2.3.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von *Pax3-cre/+*-Männchen mit *Rosa26^{NICD/NICD}*-Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 26 Embryonen des Embryonalstadiums 9,5 aufgenommen. Die geringere als erwartete Individuenanzahl der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen ist rot umrandet.



Mit Hilfe des Nachweises der Expression des Zielgens *Hey1* mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5 konnte die Induktion des Notch-Signalweges im PSM und in den 9 am weitesten kaudal gelegenen Somiten der Schwanzregion der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen gezeigt werden (Abb.5.2.3.1 E; F). Die Begrenzung der im

PSM zyklischen Expression von *Hey1* auf die kaudale Hälfte des Somitomers S-1 und die Aufrechterhaltung der Expression in diesem Kompartiment in den Somiten S1 bis S4 in den Wildtypembryonen war in diesen transgenen Embryonen nicht zu erkennen. *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen waren durch eine uniforme *Hey1*-Expression im PSM und in den 9 am weitesten kaudal gelegenen Somiten gekennzeichnet (Abb.5.2.3.1 E; F). Die weiter kranial gelegenen Somiten wiesen, aufgrund der fehlenden Rekombination der *Pax3-cre*-Mauslinie in diesen Strukturen, die kaudal begrenzte Expression von *Hey1* in den Somiten auf (Abb.5.2.3.1 A; B). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war auch die Expression von *Dll1* auf das kraniale Kompartiment der Somiten der Schwanzregion der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen ausgeweitet (Abb.5.2.3.1 G; H).

Die Missexpression der aktiven Form des *Notch1*-Rezeptors erfolgte somit im PSM, den epithelialen Somiten und den differenzieren Somiten bis zur zukünftigen mittleren Thoraxregion der Wirbelsäule.

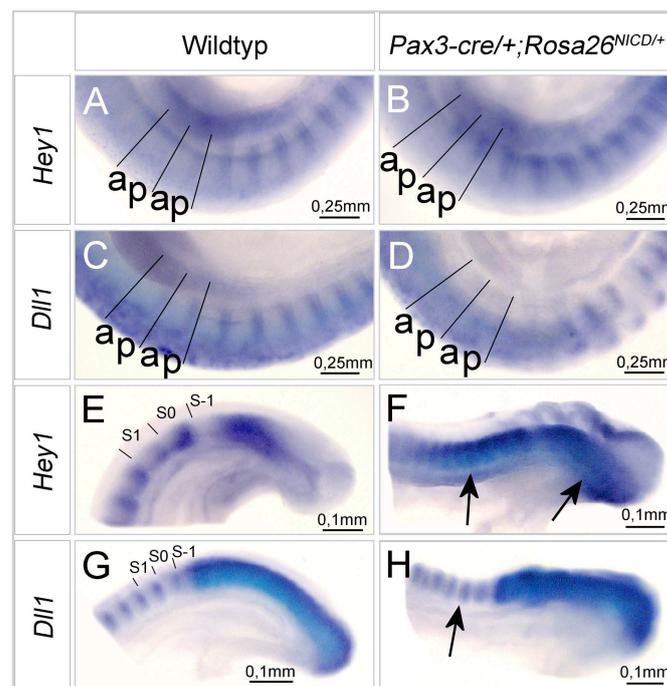


Abb.5.2.3.1: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.3.1 A-D zeigen die *Hey1*- und die *Dll1*-Expression in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule; die Abb.5.2.3.1 E-H die Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Abb.5.2.3.1 A; B; E; F stellen die *Hey1*-Expression und die Abb.5.2.3.1 C; D; G; H die *Dll1*-Expression dar. Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtypembryonen bzw. der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen als auch die Position der Somitomere S-1 und S0 und die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G), die *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H). Die Pfeile kennzeichnen die in die kraniale Hälfte der Somiten ausgeweitete *Dll1*- und *Hey1*-Expression bzw. die uniforme *Hey1*-Expression im PSM der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

5. Ergebnisse

Aufgrund der Missexpression der aktiven Form von *Notch1* mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie im Dermomyotom und im Myotom könnte der Differenzierungsprozess der Somiten in diesen Embryonen beeinträchtigt sein.

Entsprechend war die *Pax3*-Expression des Dermomyotoms in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen reduziert (Abb.5.2.3.2 A; B). Weiterhin erfolgte die Induktion der Expression von *Myogenin* in den Somiten der transgenen Embryonen verspätet, erkennbar an der Position der Vordergliedmaßenknospe (Abb.5.2.3.2 C; D). Zusätzlich war eine Ausweitung der kaudal höheren Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in die kraniale Hälfte der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen zu erkennen (Abb.5.2.3.2 E-J).

Zusammenfassend war die Differenzierung der Somiten in Embryonen, die durch die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* in der unteren Körperregion charakterisiert waren, beeinträchtigt. Zudem war die A/P-Polarität des Sklerotoms verändert.

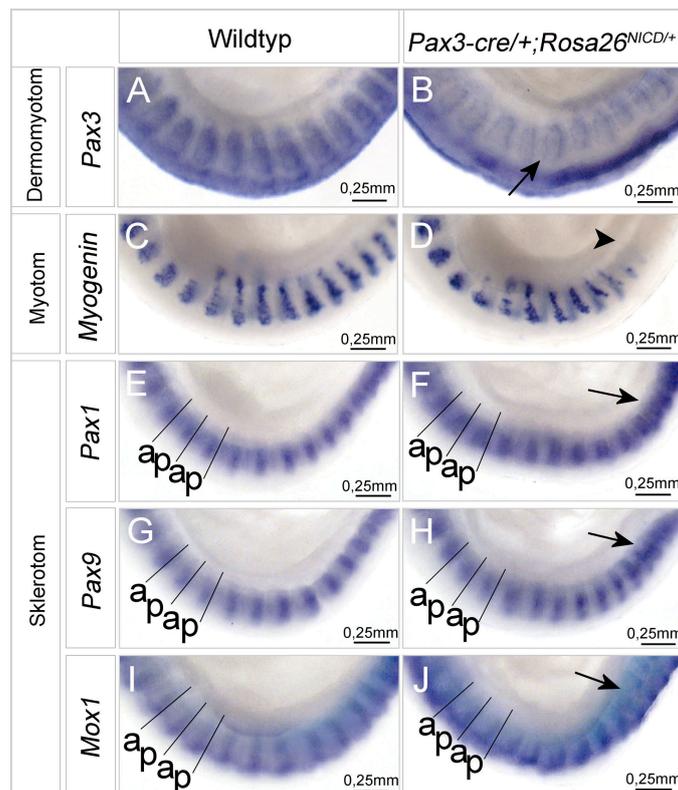


Abb.5.2.3.2: Die Analyse der Differenzierung der Somiten der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.3.2 A-J zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Abb.5.2.3.2 A-B stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.2.3.2 C-D die *Myogenin*-Expression, Abb.5.2.3.2 E-F die *Pax1*-Expression, Abb.5.2.3.2 G-H die *Pax9*-Expression und Abb.5.2.3.2 I-J die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G; I), die *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H; J). Die A/P-Polarität der Somiten ist bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet. Der Pfeilkopf markiert die spätere Differenzierung des Dermomyotoms in das Myotom und Dermatome, die Pfeile die reduzierte Expression von *Pax3* bzw. die ausgeweitete Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

Da die Expression von *Hey1* und *Dll1* in die kraniale Hälfte der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen ausgeweitet war, lag die Vermutung nahe, dass eine Posteriorisierung der Vorläuferstrukturen der Wirbel stattgefunden hatte. Um dieses nachzuweisen, wurde die Expression von *Tbx18*, *Tbx22* und *Uncx4.1* analysiert.

Übereinstimmend mit den bisher erhaltenen Ergebnissen der Analyse der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen konnte auch eine Ausweitung der *Uncx4.1*-Expression in das kraniale Kompartiment der das Transgen exprimierenden Somiten detektiert werden (Abb. 5.2.3.3 E-F). Gleichzeitig zeichneten sich diese Somiten durch den Verlust der *Tbx18*- und *Tbx22*-Expression, ab dem Somitomer S0, aus. In der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 blieb die Expression beider T-Box-Transkriptionsfaktoren jedoch erhalten (Abb.5.2.3.3 G-J). Somit resultierte die Missexpression der aktiven Form von *Notch1* im PSM, in den epithelialen und differenzierten Somiten in einer Posteriorisierung dieser Strukturen.

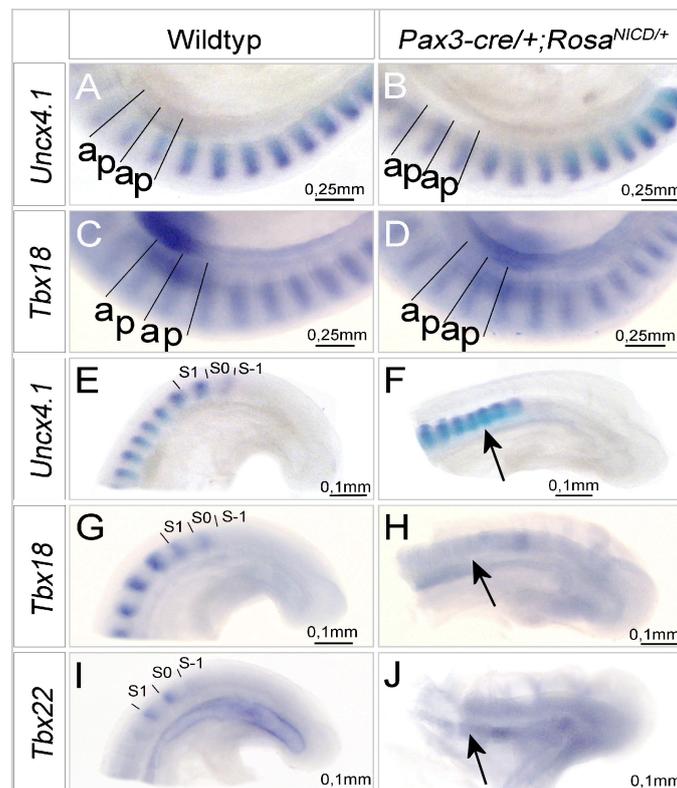


Abb.5.2.3.3: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.3.3 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expression von *Uncx4.1* (A-B) und von *Tbx18* (C-D) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5. Die A/P-Polarität der Somiten ist eingezeichnet. Die Abb.5.2.3.3 E-J stellen die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* (E-F), *Tbx18* (G-H) und *Tbx22* (I-J) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G; I), die *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H; J). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Uncx4.1* bzw. die reduzierte Expression von *Tbx18* und *Tbx22* in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

5. Ergebnisse

Anschließend wurde der Beginn der Posteriorisierung der Somiten der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen untersucht.

Die Analyse der Expression von *Mox1* in den Somiten der Schwanzregion der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen zeigte eine Ausweitung des für die kaudale Somitenhälfte charakteristischen hohen Expressionslevels in die kraniale Hälfte der Somiten, ab dem Somitomer S0 (Abb.5.2.3.4 C-D). In ähnlicher Weise zeichneten sich die das Transgen exprimierenden Somiten dieser Embryonen durch eine einheitlich hohe Genexpression von *Pax9*, beginnend in dem Somiten S2, aus (Abb.5.2.3.4 A-B). Die Expression von *EphA4* und *Mesp2* in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 war in den transgenen Embryonen unverändert nachweisbar (Abb.5.2.3.4 E-H).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression der aktiven Form von *Notch1* in der kaudalen Körperregion die Etablierung der A/P-Polarität in dem Somitomer S-1 nicht beeinflusst. Diese Polarisierung der Somiten wurde jedoch ab dem Somitomer S0 nicht aufrechterhalten.

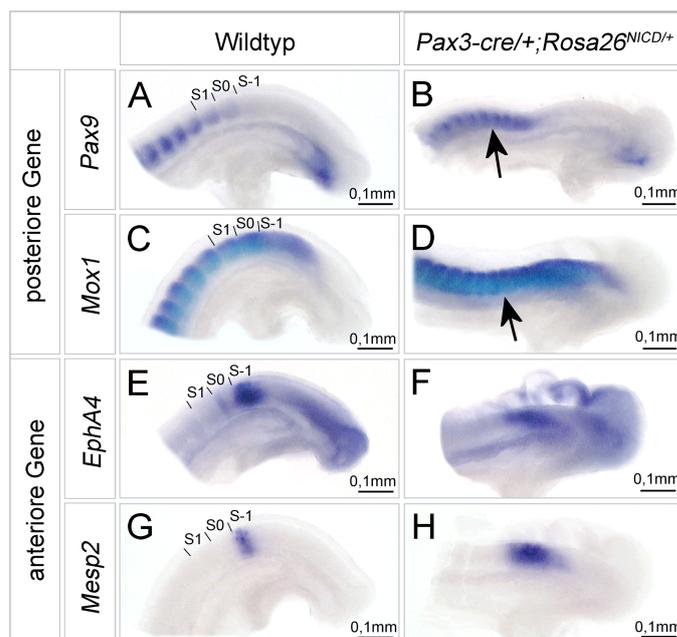


Abb.5.2.3.4: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Die Abb.5.2.3.4 A-H zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 9,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.2.3.4 A-B stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.2.3.4 C-D die *Mox1*-Expression, Abb.5.2.3.4 E-F die *EphA4*-Expression und Abb.5.2.3.4 G-H die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; C; E; G), die *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen (B; D; F; H). Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Pax9* und *Mox1* in den *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen.

Die Analyse der *Pax3-cre/+;Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen zeigte, dass die Aktivierung des Notch-Signalweges mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie im PSM, wie auch in den epithelialen und differenzierten Somiten die A/P-Polarität beeinflusste. Infolgedessen konnte geschlossen werden, dass der Notch-Signalweg in den epithelialen Somiten weiterhin für die Spezifizierung der kaudalen Hälfte notwendig war.

5.3 *Uncx4.1* ist an der Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten beteiligt

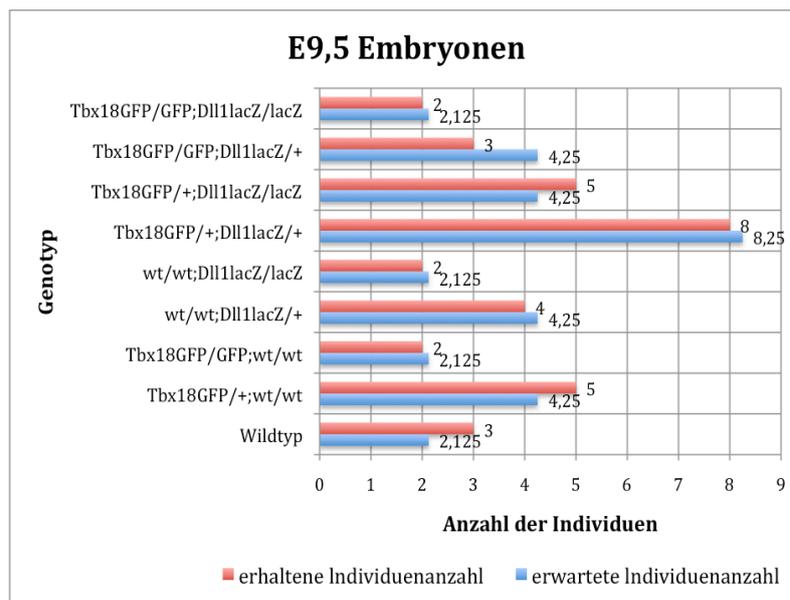
5.3.1 *Uncx4.1* ist kein Zielgen des Notch-Signalweges

Die Analyse der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen wie auch die der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{fllox/fllox}*-Embryonen erbrachte neue Erkenntnisse, welche die Regulation von *Uncx4.1*, betrafen. Aufgrund des Verlustes der *Uncx4.1*-Expression in *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen wurde dieser Transkriptionsfaktor als ein Zielgen des Notch-Signalweges diskutiert. Im diesem Fall hätte dessen Inaktivierung in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{fllox/fllox}*-Embryonen eine Reduktion der ausgeweiteten *Uncx4.1*-Expression nach sich ziehen müssen. *Uncx4.1* war jedoch weiterhin, wie in *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten, in der kranialen Hälfte der Vorläuferstrukturen der Wirbel dieser transgenen Embryonen exprimiert. Ein weiterer Hinweis, dass *Uncx4.1* kein Zielgen des Notch-Signalweges ist, erbrachte die Analyse der *Tbx18^{cre/+};Rosa26^{NICD/+}*-Embryonen. Der Nachweis der Expression des Zielgens *Hey1* in der kompletten kranialen Hälfte des Sklerotoms ließ die Schlussfolgerung zu, dass eine Aktivität des Notch-Signalweges in dem gesamten Kompartiment dieser Strukturen vorlag. Somit müsste auch die Expression von *Uncx4.1* in der gesamten kranialen Hälfte der differenzierten Somiten nachzuweisen sein. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors war jedoch nur in die kraniale Hälfte des Sklerotoms ausgeweitet und somit ausschließlich in dem am weitesten kaudal gelegenen Bereich des kranialen Kompartiments nachweisbar. Die Abwesenheit der *Uncx4.1*-Expression in *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen könnte somit das Resultat der Anteriorisierung und so des Verlustes der posterioren Zellen der Somiten in diesen Embryonen sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *Tbx18^{GFP/GFP};Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen hergestellt. *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten waren durch eine Posteriorisierung der Somiten charakterisiert und besaßen so den entgegengesetzten Phänotyp der *Dll1*-Nullmutanten. Durch die Herstellung von *Tbx18^{GFP/GFP};Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen sollte die Anteriorisierung der Somiten der *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Nullmutanten reduziert bzw. aufgehoben werden. Für die Züchtung der

5. Ergebnisse

Tbx18^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen wurden *Tbx18*^{GFP/+};*Dll1*^{lacZ/+}-Weibchen mit *Tbx18*^{GFP/+};*Dll1*^{lacZ/+}-Männchen verpaart. Das mutante *Dll1*-Allel konnte, wie das Nullallel für *Tbx18*, nur im heterozygoten Zustand gezüchtet werden, da *Dll1*^{lacZ/lacZ}-Mutanten um den Embryonaltag 12 letal sind (Harbe de Angelis et al. 1997). Die Anzahl der Nachkommen pro Genotyp aus dieser Verpaarung erbrachte die nach dem Mendelschen Verteilungsgesetz zu erwartende Anzahl an Individuen (Diagramm 5.3.1.1). Somit war die Doppelmutation des *Tbx18*- und des *Dll1*-Gens vor dem Embryonaltag 9,5 nicht letal. Da die *Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen und die *Tbx18*^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen um den Embryonaltag 10 hämorrhagisch werden, wurde die Analyse dieser Embryonen am Embryonaltag 9,5 durchgeführt.

Diagramm 5.3.1.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von *Tbx18*^{GFP/+};*Dll1*^{lacZ/+}-Männchen mit *Tbx18*^{GFP/+};*Dll1*^{lacZ/+}-Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 34 Embryonen des Embryonalstadiums 9,5 aufgenommen.



Um zu überprüfen, ob *Uncx4.1* ein Zielgen des Notch-Signalweges ist, wurde die Expression dieses Transkriptionsfaktors in *Tbx18*^{GFP/GFP}-Embryonen, *Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen und *Tbx18*^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen mittels RNS-*in situ* Hybridisierung analysiert.

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten war in den *Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen die Expression von *Uncx4.1* stark reduziert (Abb.5.3.1.1 C). Im Gegensatz dazu, war die Expression dieses Transkriptionsfaktors in den *Tbx18*^{GFP/GFP}-Nullmutanten in die kraniale Hälfte der Somiten ausgeweitet (Abb.5.3.1.1 B). Eine vergleichbare Situation unterlag den

Tbx18^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Embryonen. Diese transgenen Embryonen waren ebenfalls durch eine gleichmäßige Expression von *Uncx4.1* in den Somiten gekennzeichnet (Abb.5.3.1.1 D). Infolgedessen ist *Uncx4.1* kein Zielgen des Notch-Signalweges und vermittelt nicht, wie bisher angenommen, die Funktion des Notch-Signalweges in der kaudalen Hälfte der Somiten.

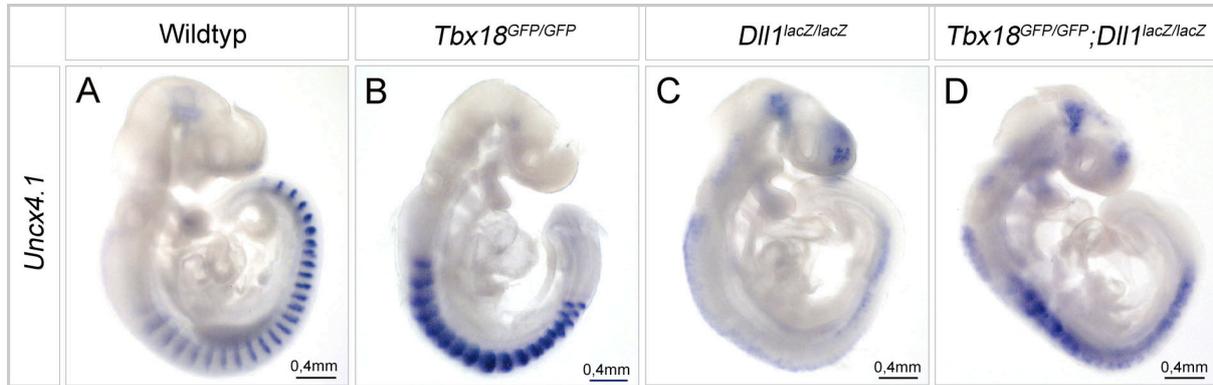


Abb.5.3.1.1: Die Expression von *Uncx4.1* in *Tbx18*^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Mutanten. Die Analyse der Expression von *Uncx4.1* erfolgte mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung in kompletten 9,5 (A-D) Embryonen. Von links nach rechts sind dargestellt: Wildtyp (A); *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutante (B), *Dll1*^{lacZ/lacZ}-Mutante (C) und *Tbx18*^{GFP/GFP};*Dll1*^{lacZ/lacZ}-Mutanten (D).

5.3.2 Die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Somitenhälfte war hinreichend, um eine Posteriorisierung zu verursachen

Um die Funktion von *Uncx4.1* in der Somitogenese analysieren zu können, sollte dieser Homöobox-Transkriptionsfaktor im paraxialen Mesoderm fehlexprimiert werden. In diesem Zusammenhang wurde, analog zu dem *Hprt*^{*Tbx18*}-Konstrukt, eine beidseitig durch *LoxP*-Sequenzen begrenzte bicistronische Transgen-Kassette bestehend aus dem Proteinkodierenden Bereich des *Uncx4.1*-Gens (*Uncx4.1*-ORF) und dem 3'-gelegenen *IRE5-EGFP* hergestellt. Dieses Konstrukt wurde in den *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (*Hprt*)-Lokus integriert (wurde im Folgenden als *Hprt*^{*Uncx4.1*}-Allel bezeichnet). Durch die gewebespezifische Expression einer Cre-Rekombinase wurden zwei Rekombinationsereignisse hervorgerufen: Die Entfernung einer Neomycin-3xStopp-Kassette und die Umkehrung der Orientierung des transgenen Konstruktes, wodurch die gewebespezifische Fehlexpression von *Uncx4.1* induziert wurde. Aufgrund der Induktion der Expression von *Uncx4.1* in dem Somitomer S0, wurde für die Missexpression des *Hprt*^{*Uncx4.1*}-Allels die *Tbx18*^{cre}-Mauslinie verwendet, da mit Hilfe des *Pax3-cre*-Mausstammes bereits eine Rekombination im PSM hervorgerufen wird, was zu einer frühzeitigen Induktion der Expression dieses Homöobox-Gens im paraxialen Mesoderm führen würde.

5. Ergebnisse

Die Expression des transgenen *Uncx4.1*-Proteins wurde über die EGFP-Epifluoreszenz des EGFP-Proteins sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise konnte die Genaktivität des Transgens in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4 (Abb.5.3.2.1 P; R), in den weiblichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und in den männlichen *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5 nachgewiesen werden (Abb.5.3.2.1 D; F; J; L).

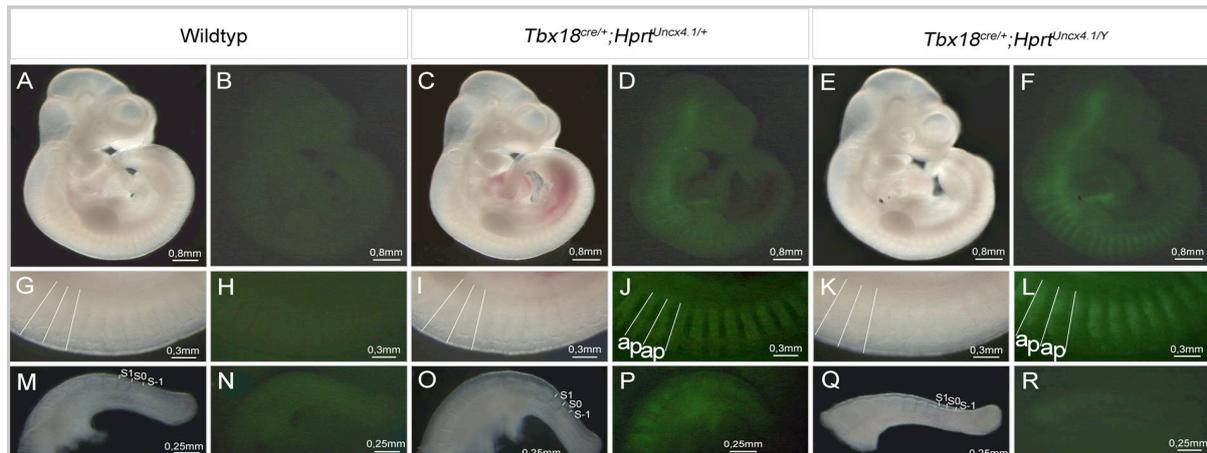
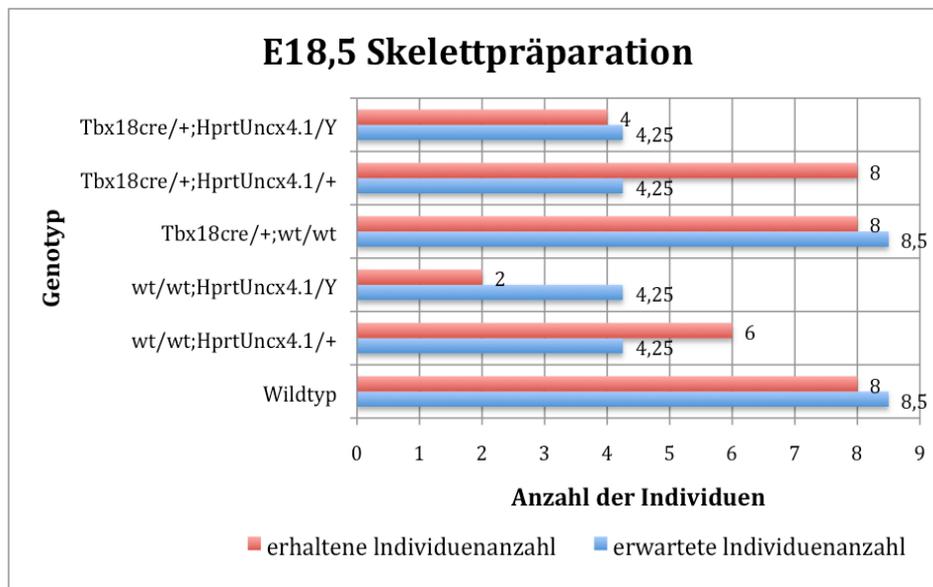


Abb.5.3.2.1: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.3.2.1 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (C; D) und *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (E; F). Die Abb.5.3.2.1 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule von Wildtypembryonen (G; H), *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (I; J) und *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (K; L) und die Abb.5.3.2.1 M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion von Wildtypembryonen (M; N), *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (O; P) und *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sowie die Somitengrenzen sind eingezeichnet.

Aus der erhaltenen Individuenanzahl pro Genotyp der Verpaarung *Tbx18^{cre/+}*-Männchen mit *Hprt^{Uncx4.1/+}*-Weibchen konnte geschlussfolgert werden, dass die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4 an, keine embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.3.2.1).

Diagramm 5.3.2.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung von $Tbx18^{cre/+}$ -Männchen mit $Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 34 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



Die Analyse der Skelette am Embryonaltag 18,5 zeigte, dass die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten in den männlichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen zu ektopischen Skelettelemente führte. Individuelle Wirbel des Hals- und Thoraxbereiches der Wirbelsäule wiesen expandierte proximale Rippen und die Bildung ektopischer Pedikel auf (Abb.5.3.2.2 C). Weiterhin konnten im Lenden- und Schwanzwirbelbereich ektopische Knorpel- bzw. Knochenstrukturen nachgewiesen werden, welche die Pedikel untereinander verbinden (Abb.5.3.2.2 F). In den weiblichen $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen konnten keine Skelettdefekte beobachtet werden. Die proximalen Rippen und die Pedikel wurden in diesen Embryonen regulär gebildet (Abb.5.3.2.2 B; E).

Folglich führte die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S4, zu ektopischen Skelettelementen, ähnlich denen, die in $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutanten beobachtet wurden.

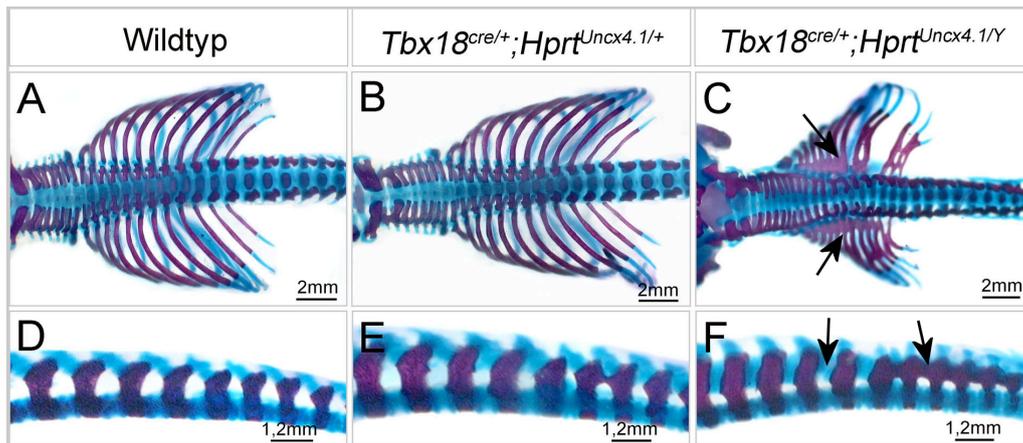


Abb.5.3.2.2: Skelette der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.3.2.2 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.3.2.2 D-F die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (B; F) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (C; F). Die Pfeile markieren die ektopischen Skelettelemente der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen.

In einem ersten Schritt sollte nachgewiesen werden, dass die Differenzierung der Somiten, infolge der Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Somitenhälfte, ab dem Somiten S4, nicht beeinflusst wurde.

Die Expressionsdomänen von *Pax3* (Abb.5.3.2.3 A-C) wie auch die von *Myogenin* (Abb.5.3.2.3 D-F) waren in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen unverändert nachweisbar. Im Gegensatz dazu, war die stärkere Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1*, charakteristisch für die kaudale Hälfte der Somiten, in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen auf die kraniale Hälfte des Sklerotoms ausgeweitet (Abb.5.3.2.3 I; L; O). Die mosaikartige Transgenexpression in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene (Abb.5.3.2.3 H; K; N).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten die Differenzierung nicht beeinflusste, jedoch zu einem Verlust der A/P- Polarität führte.

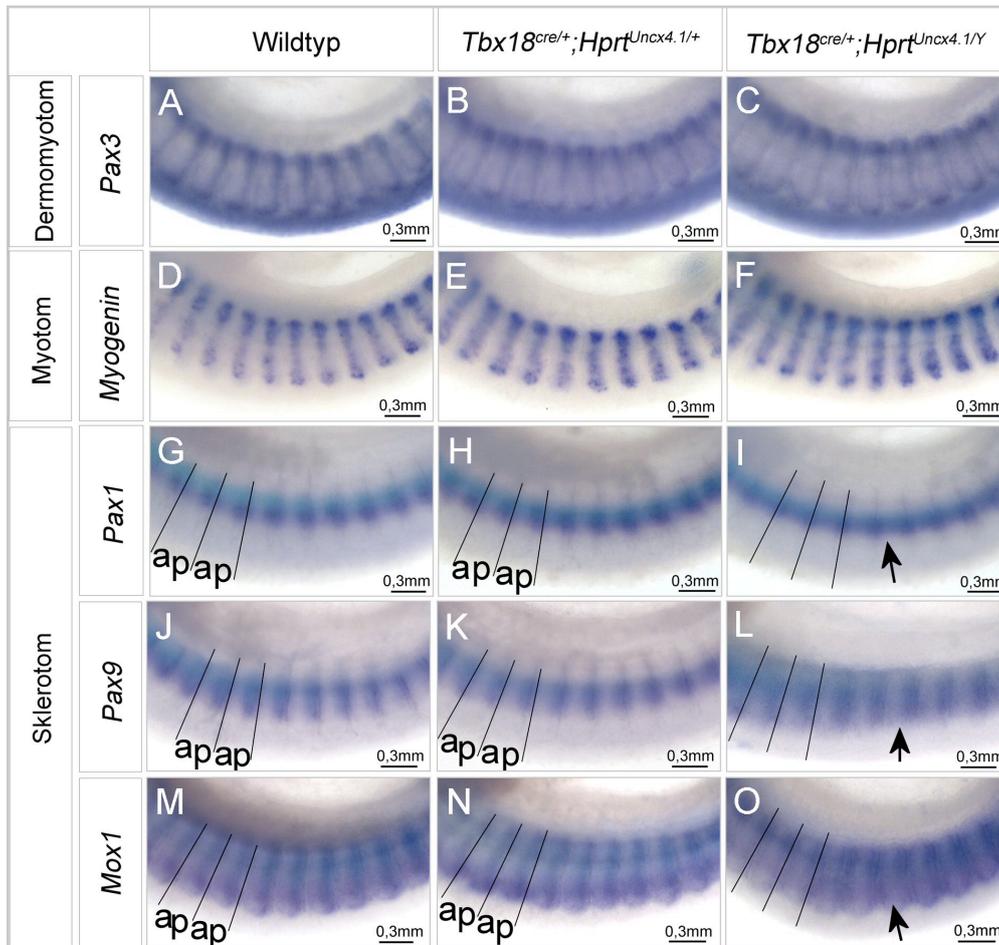


Abb.5.3.2.3: Die Differenzierung der Somiten der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.3.2.3 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.2.3 A-C stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.3.2.3 D-F die *Myogenin*-Expression, Abb.5.3.2.3 G-I die *Pax1*-Expression, Abb.5.3.2.3 J-L die *Pax9*-Expression und Abb.5.3.2.3 M-O die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (B; E; H; K; N) und die $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (C; F; I; L; O). Die A/P-Polarität der Somiten ist bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet. Die Pfeile markieren die ausgeweitete Expression der sklerotomalen Gene der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen.

Um die Veränderung der A/P-Polarisierung der Somiten der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen analysieren zu können, wurde die Expression von *Tbx22* und *Tbx18* untersucht. Die Expression des $Hprt^{Uncx4.1}$ -Allels wurde durch den Nachweis der GFP-Aktivität des EGFP-Proteins sichtbar gemacht.

Die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte des Sklerotoms der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (Abb.5.3.2.4 C) resultierte in einem Verlust der *Tbx18*-Expression in den differenzierten Somiten (Abb.5.3.2.4 F). Im Gegensatz dazu, war die Expression dieses T-Box-Transkriptionsfaktors im Sklerotom der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -

5. Ergebnisse

Embryonen unverändert (Abb.5.3.2.4 E). Aufgrund der fehlenden Rekombination in den am weitesten kaudal gelegenen Somiten (Abb.5.3.2.4 H; I), war die Expression von *Tbx18* in den Somitomeren S-1 und S0 und in den Somiten S1 bis S4 sowie die Expression von *Tbx22* in diesem Bereich des paraxialen Mesoderms in den beiden transgenen Embryonen weiterhin in der kranialen Hälfte der Vorläuferzellen der Wirbel detektierbar (Abb.5.3.2.4 J-O).

Folglich resultierte die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten in einer Posteriorisierung des Sklerotoms.

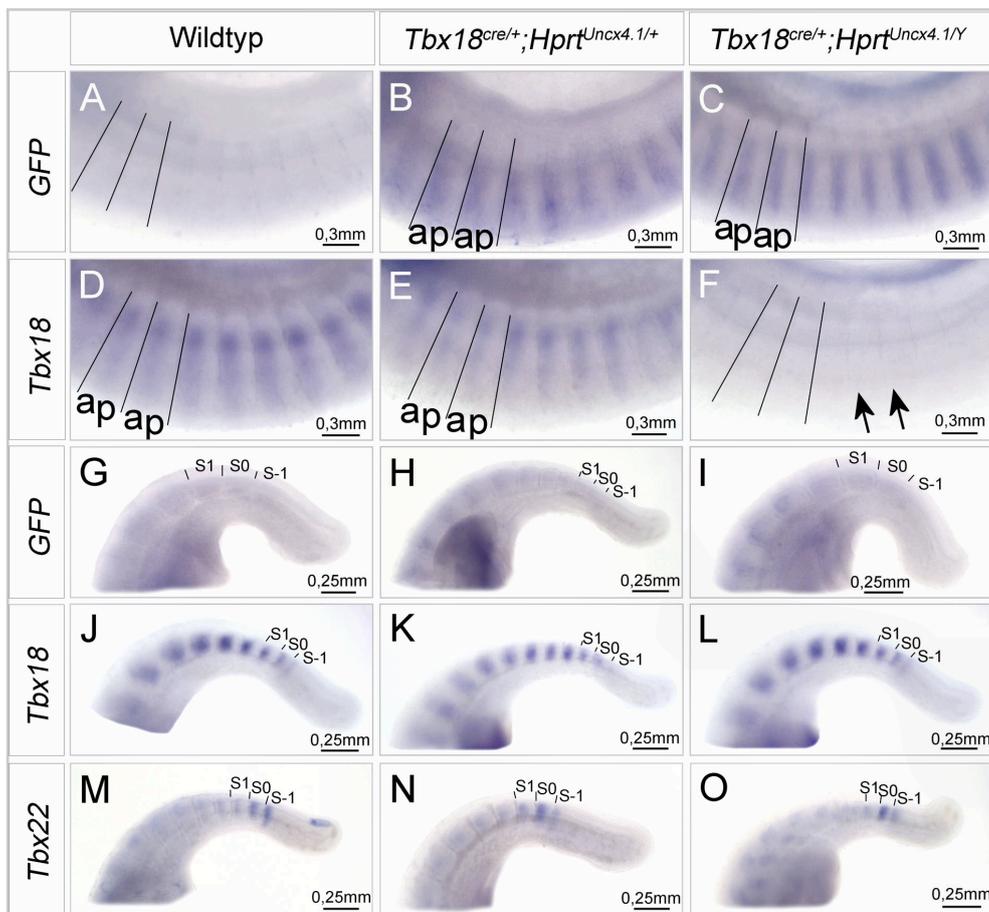


Abb.5.3.2.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.3.2.4 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Tbx18* (D-F) mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten bzw. die Somitengrenzen sind eingezeichnet. Die Abb.5.3.2.4 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (G-I) und der Expressionsanalyse von *Tbx18* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile markieren den Verlust der *Tbx18*-Expression in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen.

Übereinstimmend mit der unveränderten Expression von *Tbx18* und *Tbx22* in den Somitomeren S-1 und S0 und den epithelialen Somiten wiesen auch *Pax1* und *Pax9* das für sie typische höhere Expressionslevel in der kaudalen Hälfte der Somiten der Schwanzregion der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen auf (Abb.5.3.2.5 A-F). Ebenso war die *EphrinB2*-Expression in der kaudalen Hälfte der Somiten in diesen transgenen Embryonen detektierbar (Abb.5.3.2.5 G-I). Weiterhin war die Expression von *Mesp2* in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen bzw. den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen regulär in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 nachweisbar (Abb.5.3.2.5 P-R). Die Expression von *EphA4* (Abb.52J-L) und *Cer1* war in diesen transgenen Embryonen ebenfalls unverändert (Abb.5.3.2.5 M-O).

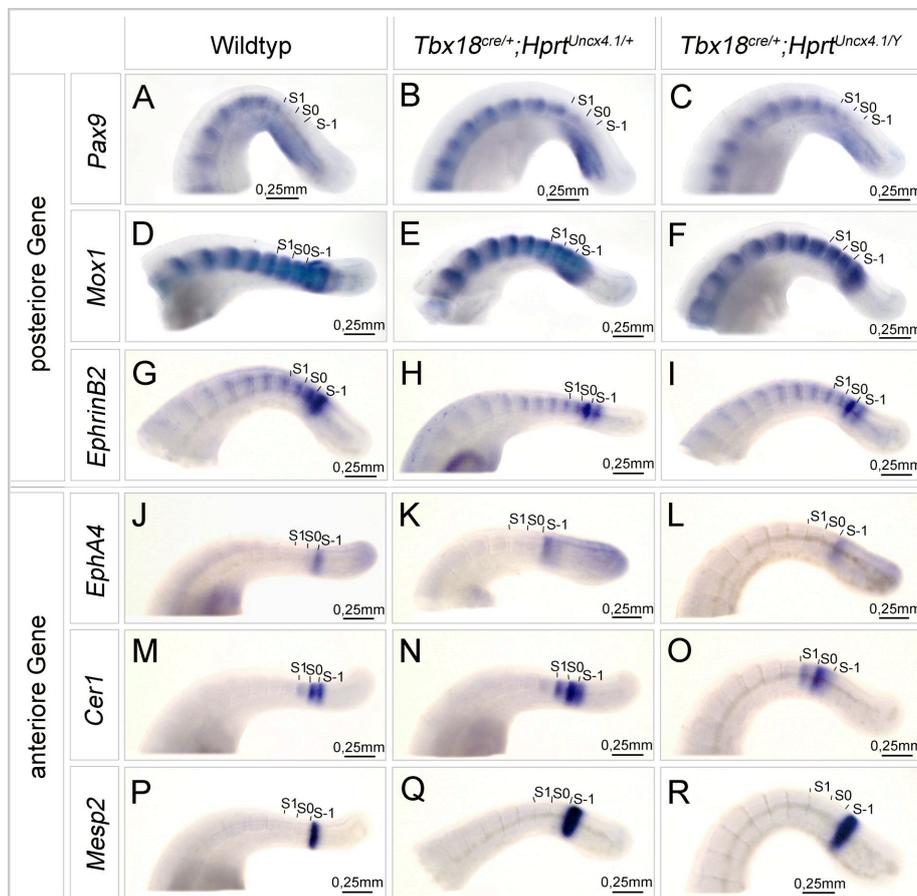


Abb.5.3.2.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.3.2.5 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.3.2.5 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.3.2.5 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.3.2.5 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.3.2.5 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.3.2.5 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.3.2.5 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M; P), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N; Q) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O; R).

5. Ergebnisse

Folglich war auch die Expression von *Dll1* und *Hey1* in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen in der kaudalen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten S1-S4 sichtbar (Abb.5.3.2.6 A-F).

Somit wurde die Etablierung der A/P-Polarität in dem Somitomer S-1 durch die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten mittels der *Tbx18^{cre}*-Mauslinie nicht beeinflusst.

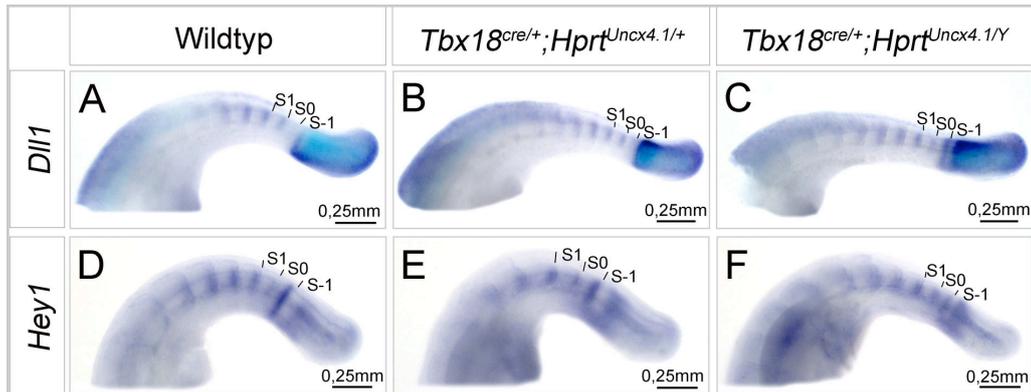


Abb.5.3.2.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten von Embryonen, die *Uncx4.1* in der kranialen Sklerotomhälfte fehlexprimieren. Die Abb.5.3.2.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.2.6 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.3.2.6 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E) und die *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F).

Eine Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten, ab dem Somiten S4, war somit hinreichend, um eine Posteriorisierung des Sklerotoms zu erzielen.

5.3.3 Die Expression von *Uncx4.1* im PSM beeinflusste nicht die Etablierung der A/P-Polarität

Um den Grund für die Induktion der Expression von *Uncx4.1* in dem Somitomer S0 zu untersuchen, wurde mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie *Uncx4.1* unter anderem im PSM fehlexprimiert.

Die EGFP-Epifluoreszenz des EGFP-Proteins zeigte, dass eine Missexpression des Transgens im PSM (Abb.5.3.3.1 P; R), in den epithelialen Somiten (Abb.5.3.3.1 P; R) sowie im Myotom, im Dermatome und im Sklerotom der zukünftigen Lenden- und Schwanzwirbelregion bis einschließlich des zukünftigen unteren Thoraxbereiches der Wirbelsäule (Abb.5.3.3.1 D; F; J; L) in den weiblichen *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und den männlichen *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen am Embryonaltag 10,5 stattfand.

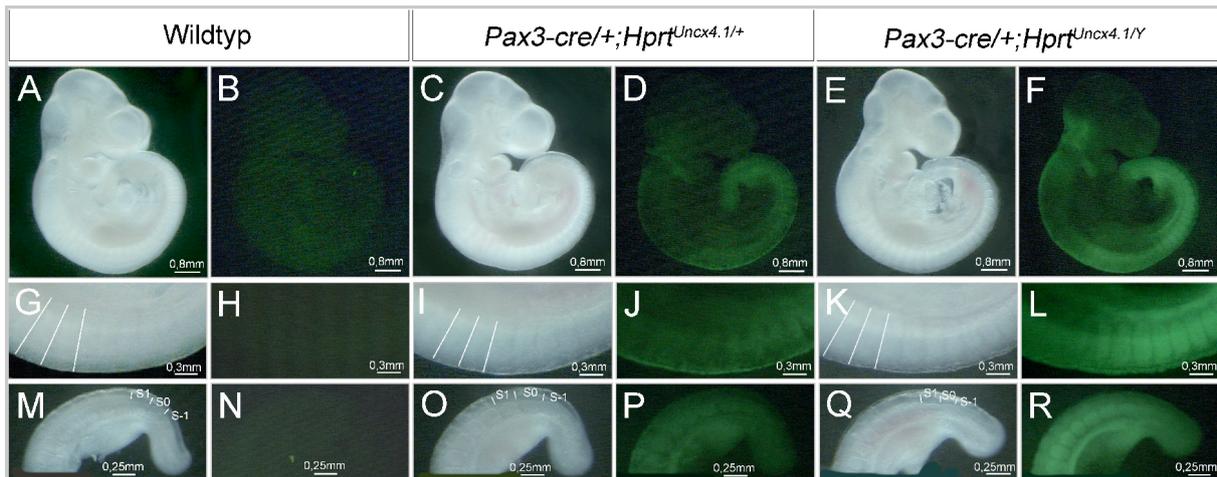
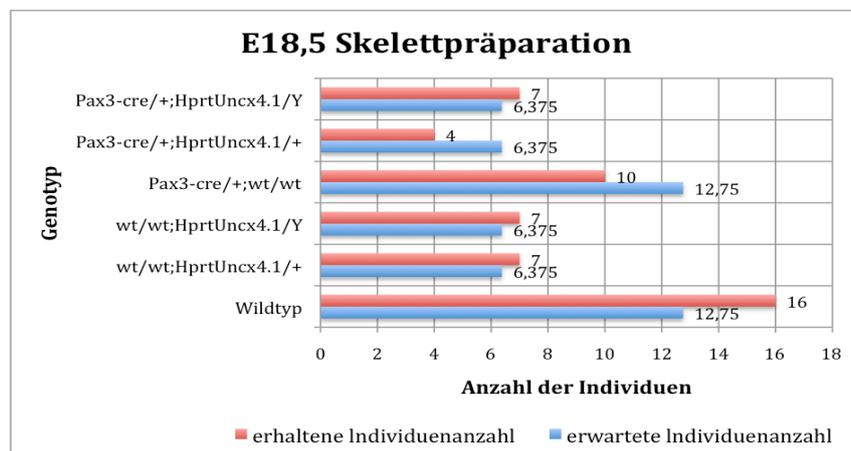


Abb.5.3.3.1: Dunkelfeld- und Epifluoreszenzbilder von Wildtyp, $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 10,5. Die Abb.5.3.3.1 A-F zeigen komplette Wildtypembryonen (A; B), $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (C; D) und $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (E; F). Die Abb.5.3.3.1 G-L stellen eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule der Wildtypembryonen (G; H), $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (I; J) und $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (K; L) und die Abb.5.3.3.1 M-R eine Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion der Wildtypembryonen (M; N), $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (O; P) und $Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (Q; R) dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet.

Die erhaltene Anzahl an Nachkommen pro Genotyp aus der Verpaarung $Pax3cre/+$ -Männchen mit $Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Weibchen ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Missexpression von *Uncx4.1* im PSM, wie auch in den epithelialen Somiten und in den differenzierten Somiten vor dem Embryonaltag 18,5 keine embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.3.3.1).

Diagramm 5.3.3.1: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung $Pax3cre/+$ -Männchen mit $Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 51 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



5. Ergebnisse

Die Analyse der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5 zeigte stärker ausgeprägte Skelettdefekte als durch die Missexpression von $Uncx4.1$ in der kranialen Hälfte des Sklerotoms in den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen verursacht wurde. So war im Vergleich zu den $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen jeder Wirbel des unteren Thoraxbereiches der Wirbelsäule der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen durch die Expansion der proximalen Rippen und die Bildung ectopischer Pedikel gekennzeichnet (Abb.5.3.3.2 C). Weiterhin waren die Pedikel der Lenden- und der oberen Schwanzwirbel dieser transgenen Embryonen zu einem zusammenhängenden Knochenband expandiert (Abb.5.3.3.2 F). Die Skelette der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen wiesen keine Expansion der proximalen Rippen auf (Abb.5.3.3.2 B). Jedoch waren die Pedikel der Lenden- und der oberen Schwanzwirbelregion zum Teil ebenfalls durch ectopische, sie verbindende Knochenstrukturen charakterisiert (Abb.5.3.3.2 E).

Somit erzeugte die Missexpression von $Uncx4.1$ in der unteren Körperregion einen stärkeren Phänotyp wie die Missexpression dieses Homöobox-Gens in der kranialen Hälfte des Sklerotoms bzw. der Verlust von $Tbx18$ verursachte.

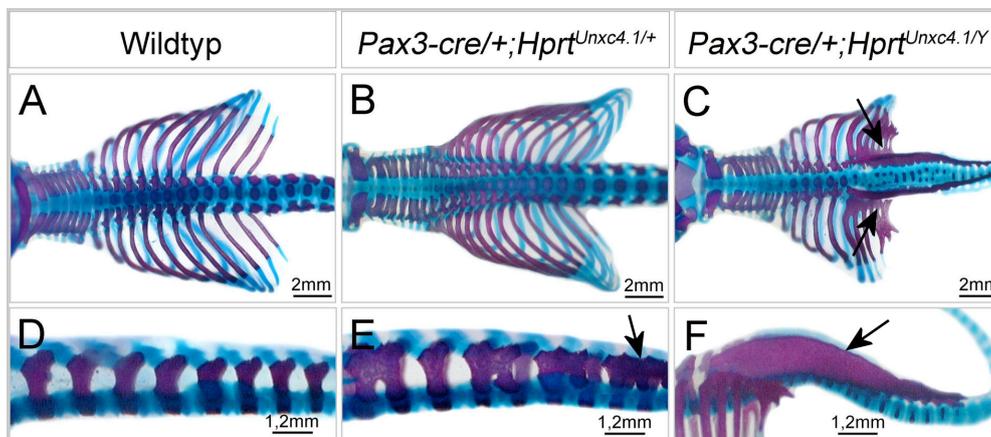


Abb.5.3.3.2: Skelette der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.3.3.2 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.3.3.2 D-F die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (B; F) und die $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (C; F). Die Pfeile markieren die ectopischen Skelettelemente der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen.

Weiterhin wurde analysiert, ob eine Missexpression von $Uncx4.1$ mittels der $Pax3^{cre}$ -Mauslinie einen Effekt im Dermomyotom bzw. im Myotom hat.

Die Expressionsdomänen von $Pax3$ sowie von $Myogenin$ in den $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und in den $Pax3^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen waren nicht verändert (Abb.5.3.3.3 A-F). Dagegen wurde die Expression von $Pax1$, $Pax9$ und $Mox1$ in den

Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}-Embryonen beeinflusst. Die in der kaudalen Hälfte der Somiten höhere Expression dieser Gene war in das kraniale Kompartiment ausgeweitet (Abb.5.3.3.3 I; L; O). Im Gegensatz dazu, war eine Expression dieser beiden paired-Box-Transkriptionsfaktoren und die des Homöobox-Gens in den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen weiterhin mit einer stärkeren Intensität in der kaudalen Hälfte der Somiten im Vergleich zu dem kranialen Kompartiment nachweisbar (Abb.5.3.3.3 H; K; N).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Missexpression von *Uncx4.1* in der unteren Körperregion keinen Einfluss auf die Differenzierung der Somiten, sondern ausschließlich auf die A/P-Polarisierung hatte.

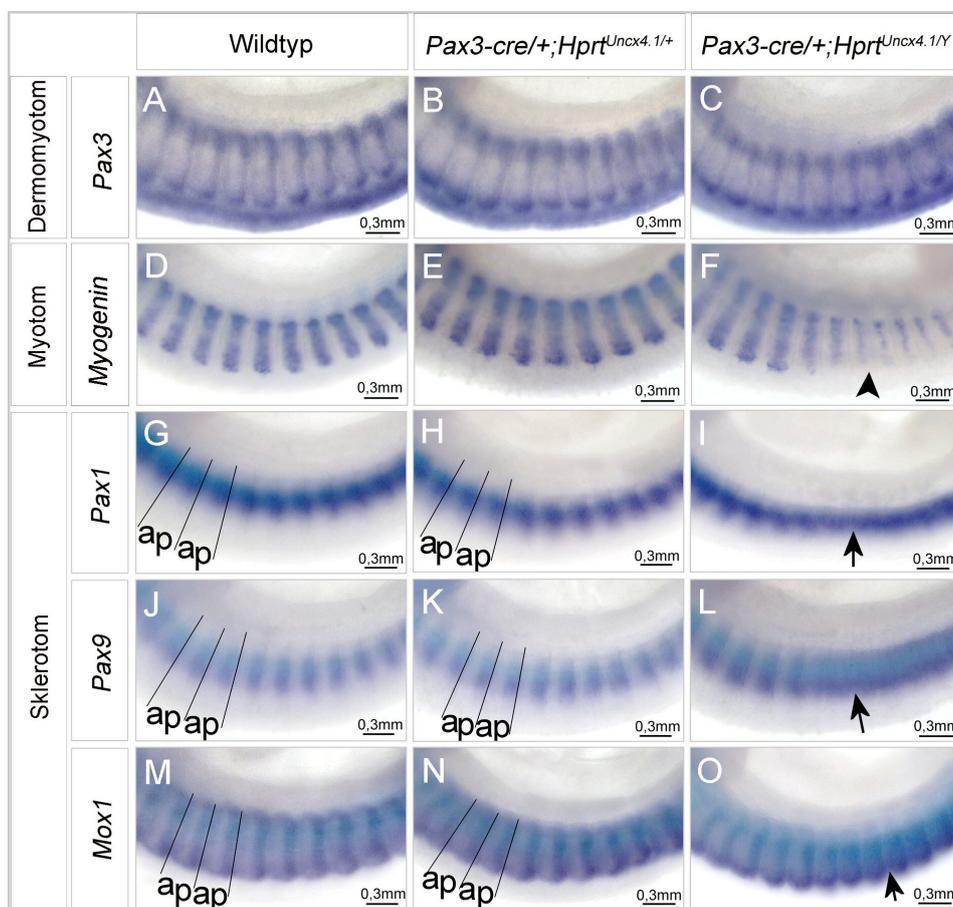


Abb.5.3.3.3: Die Differenzierung der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.3.3.3 A-O zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.3.3 A-C stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.3.3.3 D-F die *Myogenin*-Expression, Abb.5.3.3.3 G-I die *Pax1*-Expression, Abb.5.3.3.3 J-L die *Pax9*-Expression und Abb.5.3.3.3 M-O die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die A/P-Polarität der Somiten der Wildtyp- und *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen ist eingezeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die ausgeweitete Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen, der Pfeilkopf die reduzierte *Myogenin*-Expression.

In einem weiteren Schritt wurde die veränderte A/P-Polarisierung der Somiten untersucht. Interessanterweise resultierte die mosaikartige Missexpression von *Uncx4.1* in den epithelialen und differenzierten Somiten der *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen in einer Ansammlung der das Transgen-exprimierenden Zellen in der kaudalen Hälfte dieser Strukturen, detektiert über die *GFP*-Expression (Abb.5.3.3.4 B; H). Als Resultat war *Tbx18* in diesen Embryonen regulär in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0, sowie der epithelialen Somiten und des Sklerotoms nachweisbar (Abb.5.3.3.4 E; K). In den männlichen *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen dagegen war die Genaktivität des T-Box-Transkriptionsfaktors sowohl in den epithelialen Somiten als auch im rekombinierten Bereich des Sklerotoms stark reduziert (Abb.5.3.3.4 F; L). In den Somitomeren S-1 und S0 blieb die *Tbx18*-Expression in der kranialen Hälfte erhalten. Weiterhin war die Expression von *Tbx22* in den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten S1 und S2 ebenfalls kaum detektierbar (Abb.5.3.3.4 O). Im PSM der *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen und in den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen war die Expression von *Tbx22* unverändert (Abb.5.3.3.4 N).

Somit resultierte die ektopische Expression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten in einer Posteriorisierung dieser mesodermalen Strukturen.

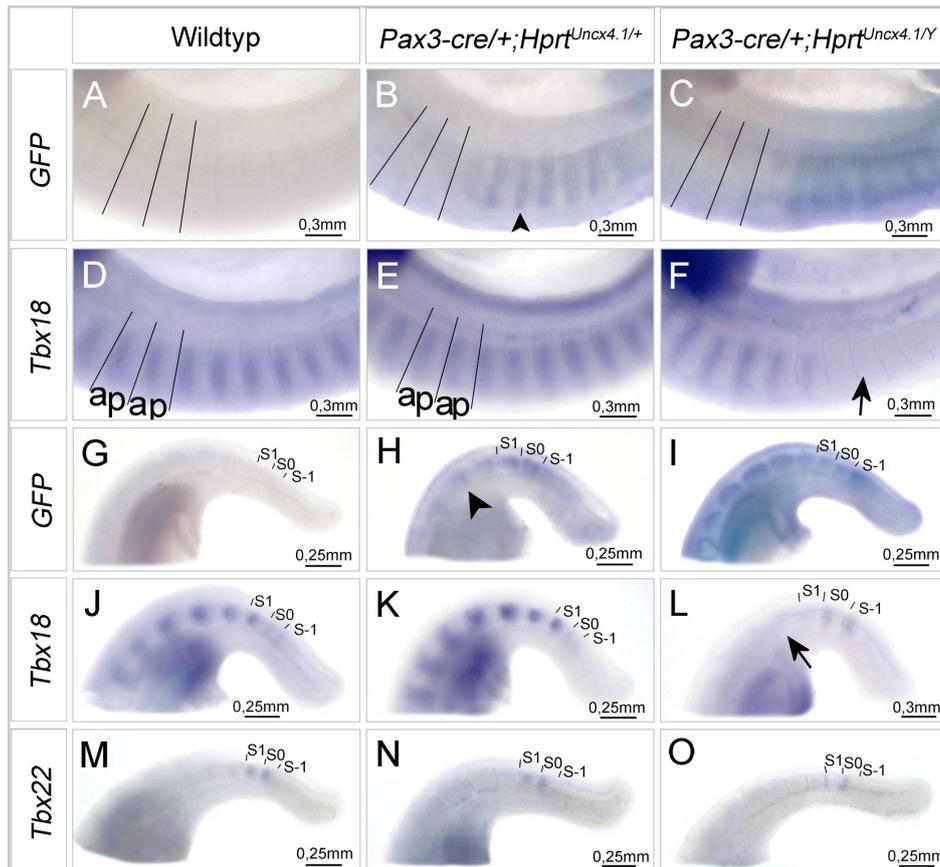


Abb.5.3.3.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.3.3.4 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (A-C) und die Expressionsanalyse von *Tbx18* (D-F) in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten bzw. die Somitengrenzen sind eingezeichnet. Die Abb.5.3.3.4 G-O stellt die Ausschnittsvergrößerung der Missexpression des Transgens mittels der *GFP*-Expression (G-I) und die Expressionsanalyse von *Tbx18* (J-L) und *Tbx22* (M-O) in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeilköpfe markieren die Ansammlung der das Transgen-exprimierenden Zellen in der kaudalen Hälfte der Somiten bzw. des Sklerotoms in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen, die Pfeile den Verlust der *Tbx18*-Expression in *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen.

Der Beginn der Posteriorisierung der Somiten wurde mit Hilfe der Expression von Genen mit einer kranialen bzw. kaudalen Genaktivität in den Somitomeren S-1 und S0 sowie in den epithelialen Somiten S1 und S2 analysiert.

In Übereinstimmung mit der Ausweitung der Expression von *Pax9* und *Mox1* im Sklerotom der *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen, war auch eine Expansion der Genaktivität dieser beiden paired-Box-Transkriptionsfaktoren in die kraniale Hälfte der Somiten der Schwanzregion dieser transgenen Embryonen nachweisbar. Die Ausweitung der *Mox1*-Expression begann in dem Somiten S1, die der *Pax9*-Expression in dem Somiten S2

(Abb.5.3.3.5 C; F). In ähnlicher Weise war die Expression von *EphrinB2* in diesen transgenen Embryonen in die kraniale Hälfte der Somiten, ab den Somiten S1, ausgeweitet (Abb.5.3.3.5 I). In den Somitomeren S-1 und S0 war die Expression dieses Liganden des Ephrin-Signalweges lediglich im kaudalen Kompartiment sichtbar (Abb.5.3.3.5 I). Ferner war die *Mox1*-Expression in diesem Bereich des PSM in den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen unverändert (Abb.5.3.3.5 F). Aufgrund der Ansammlung der das Transgen-exprimierenden Zellen in der kaudalen Hälfte der epithelialen Somiten und des Sklerotoms in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen war die Expression von *Mox1*, *Pax9* und *EphrinB2* in diesen Embryonen nicht verändert (Abb.5.3.3.5 B; E; H). Die Analyse der *EphA4*- (Abb.5.3.3.5 J-L), *Cer1*- (Abb.5.3.3.5 M-O) und *Mesp2*-Expression (Abb.5.3.3.5 P-R) zeigte, dass diese Gene in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und den in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen regulär exprimiert waren.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Posteriorisierung der Somiten in diesen transgenen Embryonen erst in dem Somiten S1 auftrat. Die Etablierung der A/P-Polarität der Somiten war nicht beeinträchtigt.

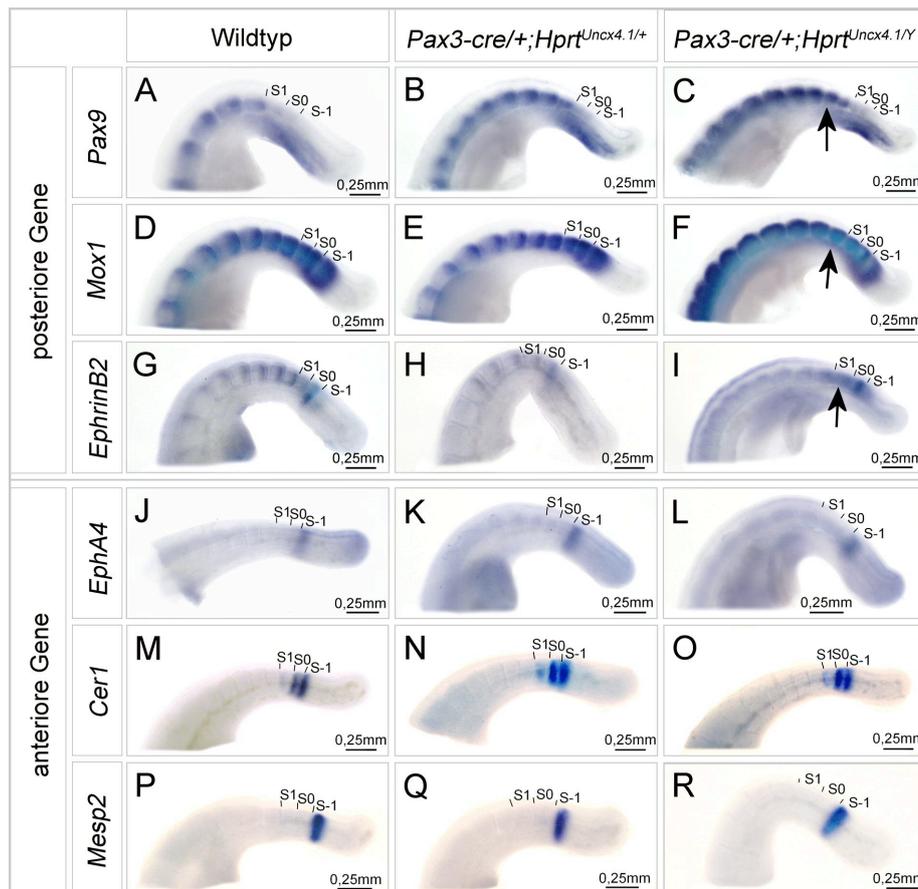


Abb.5.3.3.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität in den Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen und der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Die Abb.5.3.3.5 A-R zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.3.3.5 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.3.3.5 D-F die *Mox1*-Expression, Abb.5.3.3.5 G-I die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.3.3.5 J-L die *EphA4*-Expression, Abb.5.3.3.5 M-O die *Cer1*-Expression und die Abb.5.3.3.5 P-R die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G; J; M), die *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen (B; E; H; K; N) und die *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen (C; F; I; L; O). Die Pfeile markieren die Ausweitung der kaudal exprimierten Gene in den Somiten der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen.

Folglich war auch eine Ausweitung der *Dll1*- bzw. der *Hey1*-Expression in die kraniale Hälfte der Somiten der Schwanzregion, ab dem Somiten S1, in den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen nachweisbar (Abb.5.3.3.6 C; F). In den Somitomeren S-1 und S0 war die Expression dieser beiden Gene weiterhin auf das kaudale Kompartiment begrenzt (Abb.5.3.3.6 C; F). In den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen war die Expression der Komponenten des Notch-Signalweges unverändert (Abb.5.3.3.6 B; E).

Somit war die ektopische Expression von *Uncx4.1* im PSM, in den epithelialen Somiten und in den differenzierten Somiten hinreichend, um eine Posteriorisierung der Somiten, jedoch nicht der Somitomere zu verursachen.

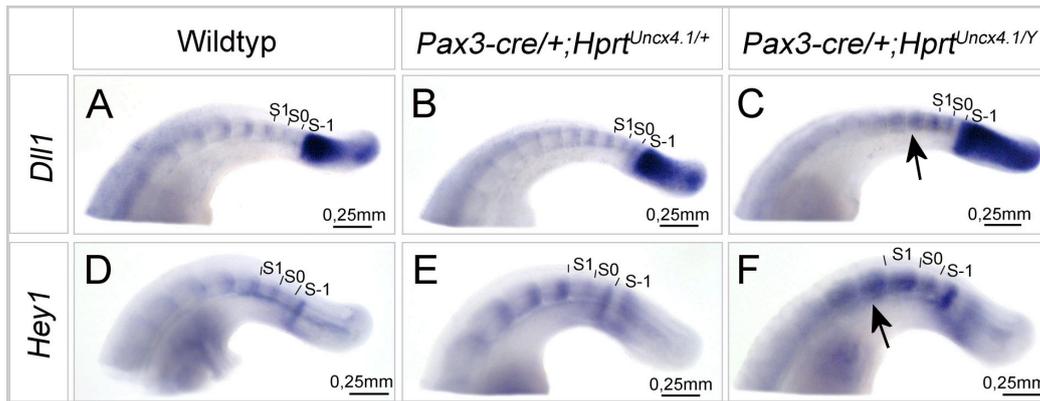


Abb.5.3.3.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der $Pax3\text{-}cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen und der $Pax3\text{-}cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen. Die Abb.5.3.3.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.3.6 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.3.3.6 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die $Pax3\text{-}cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}$ -Embryonen (B; E) und die $Pax3\text{-}cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen (C; F). Die Pfeile markieren die Ausweitung von *Dll1* und *Hey1* in den Somiten der $Pax3\text{-}cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen.

Eine Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten war hinreichend, um einen Verlust der *Tbx18*-Expression herbeizuführen. Die Posteriorisierung der Somiten der $Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}$ -Embryonen könnte somit das Resultat der Repression der *Tbx18*-Expression durch *Uncx4.1* in diesem Kompartiment sein.

5.3.4 *Uncx4.1* fungiert als Repressor

Eine repressive Funktion des Homöobox-Gens ist bisher nur für das *Uncx4.1*-homologe Protein in *Caenorhabditis elegans*, *Unc-4*, nachgewiesen worden (Von Stetina et al. 2007).

Um zu analysieren, ob auch das murine *Uncx4.1*-Protein als Repressor fungieren kann, wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der Gal4-Bindedomäne und dem Protein-kodierenden Bereich des *Uncx4.1*-Gens (*Uncx4.1-ORF*), welches im Folgenden als Gal4-*Uncx4.1* bezeichnet wurde, hergestellt. Als Kontrolle diente ein analoges Fusionsprotein von *Tbx18*. Das Reporterplasmid bestand aus fünf Gal4-Bindestellen am 5'-Ende des E1b-Minimalpromotors, der an das 5'-Ende des Luziferase-Gens kloniert wurde (Abb.5.3.4.1 A). Nach Kotransfektion von HeLa-Zellen mit dem Gal4-*Uncx4.1*- bzw. dem Gal4-*Tbx18*-Protein und dem Reporterplasmid konnte sowohl die bereits beschriebene dosisabhängige Repression der Reporteraktivität durch *Tbx18* als auch eine solche durch *Uncx4.1* detektiert werden. Nach Transfektion der höchsten eingesetzten Konzentration (250ng) konnte sowohl durch *Tbx18* als auch durch *Uncx4.1* eine Reduktion der Basalaktivität des Reporters, welche

auf 1 gesetzt wurde, um die Hälfte erreicht werden. Die Gal4-Bindedomäne alleine hatte keinen Effekt auf die Basalaktivität des Reporters (Abb.5.3.4.1 B).

Somit ist mittels dieses Transaktivierungsexperimentes gezeigt worden, dass das murine *Uncx4.1* als Repressor fungiert.

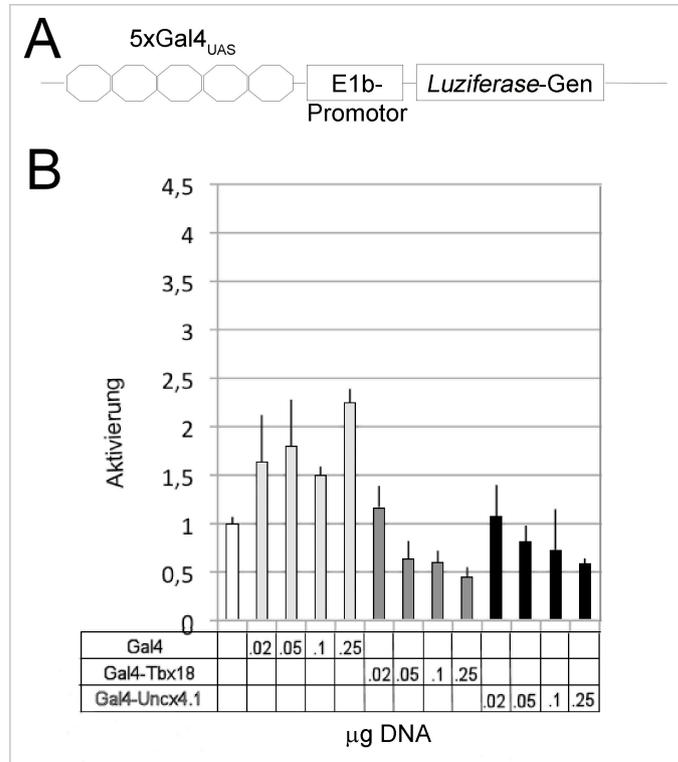


Abb.5.3.4.1: *Uncx4.1* fungiert als Repressor. Abb.5.3.4.1 A zeigt ein Schema des 5xGal4_{UAS}-E1b-Luziferase-Reporterplasmid, welches aus dem *Luziferase*-Gen fusioniert mit dem E1b-Minimalpromotor, an dessen 5'-Ende fünf Gal4-Bindestellen kloniert wurden, besteht. Abb.5.3.4.1 B stellt die Effekte von *Tbx18* oder *Uncx4.1* auf die Basalaktivität des Reporters dar.

5.3.5 Der gleichzeitige Verlust von *Uncx4.1* und *Tbx18* resultierte in der Abwesenheit der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten

Um nachzuweisen, ob *Uncx4.1* eine Funktion als Repressor der *Tbx18*-Transkription in der kaudalen Hälfte der Somiten hat, wurde ein Mausstamm hergestellt, der sich durch den gemeinsamen Verlust beider Transkriptionsfaktoren auszeichnet. Für die Züchtung der *Uncx4.1*^{lacZ/lacZ}; *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten wurden *Tbx18*^{GFP/+}; *Uncx4.1*^{lacZ/+}-Männchen mit *Tbx18*^{GFP/+}; *Uncx4.1*^{lacZ/+}-Weibchen verpaart. Das mutante *Uncx4.1*-Allel konnte, wie das *Tbx18*-Nullallel, nur im heterozygoten Zustand gezüchtet werden, da *Uncx4.1*^{lacZ/lacZ}-Mutanten kurz nach der Geburt aufgrund von respiratorischer Insuffizienz starben (Mansouri et al. 2000; Leitges et al. 2000). Falls *Uncx4.1* als Repressor der *Tbx18*-Transkription in dem kaudalen Kompartiment der Somiten fungiert, sollten die *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten und die *Uncx4.1*^{lacZ/lacZ}; *Tbx18*^{GFP/GFP}-Mutanten einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Bei einer

gleichzeitigen Abwesenheit der Expression von *Tbx18* sollte der Verlust des Repressors dieses T-Box-Transkriptionsfaktors keine weitere Auswirkung auf den Phänotyp der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten haben.

Wie bereits beschrieben waren *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten durch eine Expansion der proximalen Rippen und Pedikel individueller Wirbel im Hals- und Thoraxbereiches der Wirbelsäule sowie einer veränderten Morphologie der Pedikel und ektopischen, die Pedikel untereinander verbindenden Knorpelstrukturen im Lenden- und Schwanzwirbelbereich charakterisiert (Abb.5.3.5.1 C; G). Im Gegensatz dazu, waren diese Skelettstrukturen bei *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten abwesend. Sowohl die proximalen Rippen als auch die Pedikel wurden in diesen Mutanten entlang der gesamten Körperachse nicht gebildet (Abb.5.3.5.1 B; F). Interessanterweise resultierte der gemeinsame Verlust von *Tbx18* und *Uncx4.1* in einem intermediären Skelettphänotyp. So fehlten diesen *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten, vergleichbar mit den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, die proximalen Rippen. Analog zu den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten waren diese Embryonen ferner durch die Bildung ektopischer, die Pedikel der Lenden- und Schwanzwirbel untereinander verbindenden Knorpelstrukturen gekennzeichnet (Abb.5.3.5.1 D; H).

Folglich resultierte der gemeinsame Verlust von *Uncx4.1* und *Tbx18* sowohl in der Abwesenheit bestimmter Knochenstrukturen als auch in der Bildung ektopischer Knorpelstrukturen. (Die Analyse der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Skelettdefekte wurde von Manvendra Singh durchgeführt.)

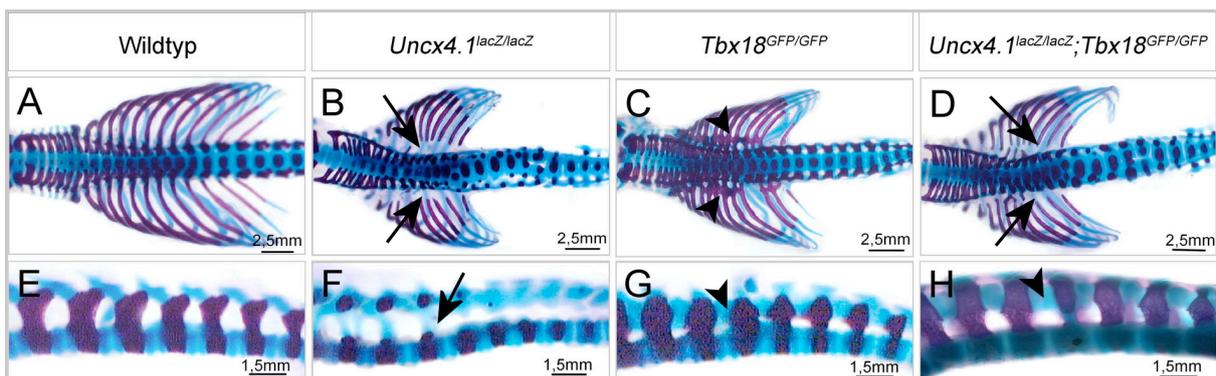


Abb.5.3.5.1: Skelettdefekte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.3.5.1 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.3.5.1 E-H die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante (B; F), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C; G) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (D; H). Die Pfeile markieren die fehlenden Knochenelemente, die Pfeilköpfe die ektopischen Knorpel- und Knochenelemente der Mutanten. (Die Analyse der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Skelettdefekte wurde von Manvendra Singh durchgeführt.)

Da beide Transkriptionsfaktoren bereits im Somiteomer S-1 bzw. S0 exprimiert sind, könnte der gemeinsame Verlust von *Tbx18* und *Uncx4.1* die Differenzierung der Somiten beeinträchtigen.

Die *Pax3*-Expression (Abb.5.3.5.2 A-D) und die Expression von *Myogenin* (Abb.5.3.5.2 E-H) waren in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten und den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten nicht verändert. Jedoch zeigte die Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in den drei Mutanten Abweichungen zu der Expression dieser Gene in den Wildtypembryonen. Das in der kaudalen Hälfte der Somiten höhere Expressionslevel von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* war in *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten reduziert. Diese Mutanten waren durch eine uniforme, für das kraniale Kompartiment charakteristisch niedrige Expression dieser drei Gene in den differenzierten Somiten gekennzeichnet (Abb.5.3.5.2 J; N; R). *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten dagegen waren durch die Ausweitung des in der kaudalen Hälfte der Somiten stärkeren Expressionslevels dieser beiden paired-Box-Transkriptionsfaktoren und des Homöobox-Gens in das kraniale Kompartiment charakterisiert (Abb.5.3.5.2 K; O; S). In Embryonen, die sich durch den gemeinsamen Verlust von *Uncx4.1* und *Tbx18* auszeichneten, war ebenfalls eine uniforme Expression von *Pax1*, *Pax9* und *Mox1* in beiden Hälften der Somiten zu erkennen. Das Expressionslevel dieser Gene war in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten jedoch niedriger als in *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten und höher als in *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten (Abb.5.3.5.2 L; P; T).

Folglich wurde die Differenzierung der Somiten durch den Verlust von *Uncx4.1* bzw. *Tbx18* und durch den gleichzeitigen Verlust beider Transkriptionsfaktoren nicht beeinflusst, jedoch ging die A/P-Polarität der Somiten in allen drei Mutanten verloren.

5. Ergebnisse

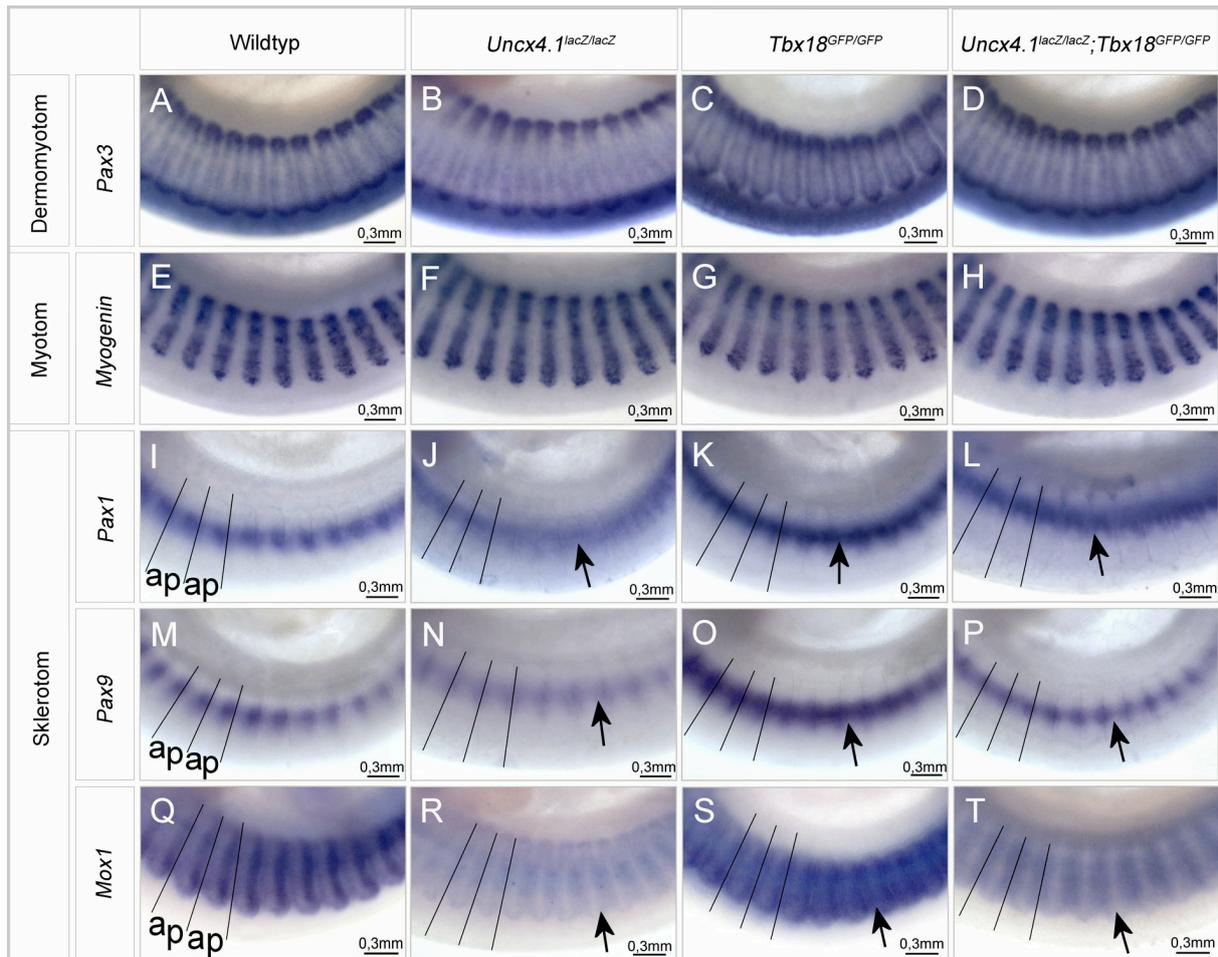


Abb.5.3.5.2: Die Differenzierung der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.2 A-T zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung von spezifischen Genen des Dermomyotoms, des Myotoms und des Sklerotoms in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.5.2 A-D stellt die *Pax3*-Expression, Abb.5.3.5.2 E-H die *Myogenin*-Expression, Abb.5.3.5.2 I-L die *Pax1*-Expression, Abb.5.3.5.2 M-P die *Pax9*-Expression und Abb.5.3.5.2 Q-T die *Mox1*-Expression dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M; Q), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante (B; F; J; N; R), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C; G; K; O; S) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (D; H; L; P; T). Die Pfeile markieren die reduzierte bzw. ausgeweitete Expression der Gene in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante, der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und die Somitengrenzen der Mutanten sind bei den sklerotomalen Genen eingezeichnet.

Für die Analyse der veränderten A/P-Polarität der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten wurde neben einer histologischen Untersuchung der Somiten mittels RNS-*in situ* Hybridisierung die Expression von *Uncx4.1* und *Tbx18* analysiert. Die Expression von *Tbx18* wurde in der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten durch den Nachweis der GFP-Aktivität des *Tbx18^{GFP}*-Allels sichtbar gemacht, die von *Uncx4.1* in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*- bzw. in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten durch die Expression des *LacZ*-Gens.

Die histologische Analyse der differenzierten Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten ergab, dass sich die Vorläuferstrukturen der Wirbel durch eine gleichmäßig niedrige Zelldichte, charakteristisch für die kraniale Hälfte des Sklerotoms, auszeichneten (Abb.5.3.5.3 B). Dagegen besaßen die Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten eine für das kaudale Kompartiment spezifische einheitlich hohe Zelldichte in beiden Kompartimenten dieser mesodermalen Strukturen (Abb.5.3.5.3 C). Wie bereits durch die Genexpression der sklerotomalen Gene ersichtlich wurde, waren auch die Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten durch eine uniforme Zelldichte gekennzeichnet, die höher als in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante und niedriger als in der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante war (Abb.5.3.5.3 D). Weiterhin durchzogen die Spinalnerven in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten und in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten nicht wie in Wildtypembryonen ausschließlich die kraniale Hälfte der Somiten, sondern durchliefen die Mitte (Abb.5.3.5.3 B; D). Die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten waren durch weniger stark ausgeprägte Spinalnerven, die in unregelmäßigem Abstand das Sklerotom durchzogen, charakterisiert (Abb.5.3.5.3 C).

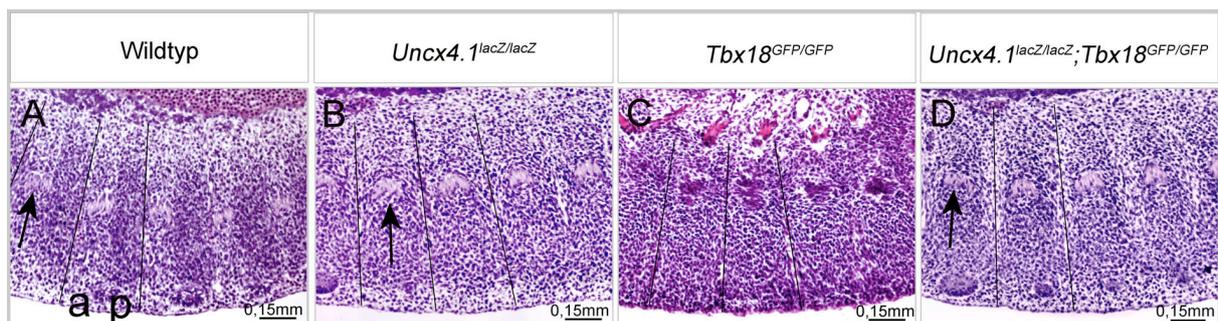


Abb.5.3.5.3: Die histologische Analyse der A/P-Polarität der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.3 A-D zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der histologischen Färbung der differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und die Somitengrenzen der Mutanten sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante (B), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (D). Die Pfeile markieren die Nervenstränge.

Die Analyse der Expression von *Tbx18* bzw. *Uncx4.1* zeigte, dass der Verlust von *Uncx4.1* in der Expansion der *Tbx18*-Expression in die kaudale Hälfte der differenzierten Somiten (Abb.5.3.5.4 B; F) und der Verlust des T-Box-Transkriptionsfaktors in der Ausdehnung der Expression des Homöobox-Gens in die kraniale Hälfte des Sklerotoms resultierte (Abb.5.3.5.4 C; G). Interessanterweise war in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten, trotz der Ausweitung der Expression des mutanten *Tbx18*-Allels in die kaudale Hälfte der differenzierten Somiten, ebenfalls eine Expression des *Uncx4.1*-Nullallels in diesem Kompartiment des Sklerotoms nachzuweisen (Abb.5.3.5.4 D; H). In den epithelialen Somiten

5. Ergebnisse

fürte der Verlust von *Tbx18* zu keiner Veränderung der Genexpression von *Uncx4.1*. Neben der *GFP*-Expression des mutanten *Tbx18*-Allels in der kranialen Hälfte der Somiten war die Genaktivität von *Uncx4.1* in dem kaudalen Kompartiment in diesen transgenen Embryonen sichtbar (Abb.5.3.5.4 K; O). Dagegen war in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten und in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten eine Ausweitung der *Tbx18*-Genaktivität bzw. der des *Tbx18*-Nullallels in die kaudale Hälfte der epithelialen Somiten zu erkennen (Abb.5.3.5.4 N; P). Weiterhin waren diese Embryonen durch eine Expression des mutanten *Uncx4.1*-Allels in dem kaudalen Kompartiment der Vorläuferstrukturen der Wirbel gekennzeichnet (Abb.5.3.5.4 J; L).

Folglich führte der Verlust von *Tbx18* zu einer Posteriorisierung der differenzierten Somiten, der von *Uncx4.1* resultierte in einer Anteriorisierung der Somiten. Der gleichzeitige Verlust von *Tbx18* und *Uncx4.1* verursachte weder eine Posteriorisierung noch eine Anteriorisierung der Somiten, sondern einen intermediären Phänotyp.

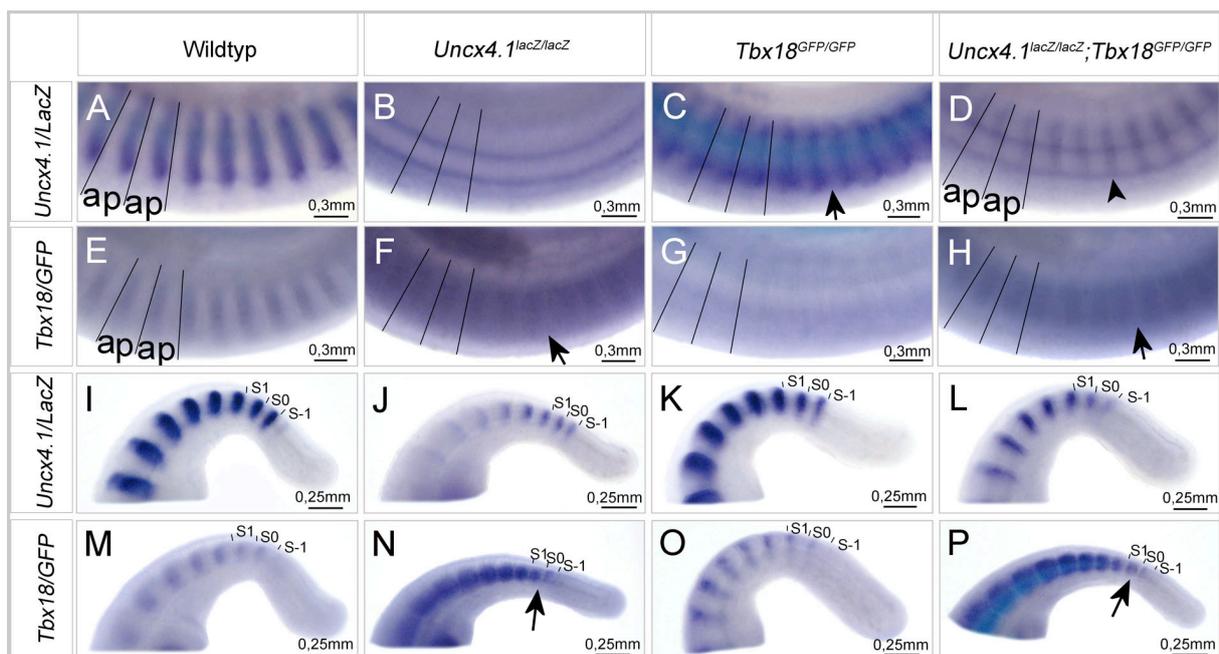


Abb.5.3.5.4: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.4 A-H zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Uncx4.1* mittels *LacZ* (A-D) und *Tbx18* (E-H) mittels *GFP* in den differenzierten Somiten der zukünftigen Thoraxregion der Wirbelsäule mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps sowie die Somitengrenzen der Mutanten sind eingezeichnet. Die Abb.5.3.5.4 I-P stellt die Ausschnittsvergrößerung der Somiten der Schwanzregion dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante (B; F; J; N), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C; G; K; O) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (D; H; L; P). Die Pfeile verweisen auf die Ausweitung der *Tbx18*-Expression in die kaudale Sklerotomhälfte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante bzw. die der *Uncx4.1*-Expression in die kraniale Hälfte der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante. Der Pfeilkopf kennzeichnet die *LacZ*-Expression in der kaudalen Hälfte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante.

Weiterhin wurde die Auswirkung des Verlustes von *Tbx18* und *Uncx4.1* auf die Etablierung der A/P-Polarität untersucht.

Übereinstimmend mit der reduzierten Expression von *Mox1* und *Pax9* in der kaudalen Hälfte der differenzierten Somiten in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten war auch die Expression dieser Gene in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos bei einem Verlust von *Uncx4.1* in diesem Kompartiment ab dem Somiten S1 reduziert (Abb.5.3.5.5 B; F). Dagegen war in den epithelialen Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten das unterschiedlich hohe Expressionslevel von *Mox1* und *Pax9* in den beiden Kompartimenten sichtbar (Abb.5.3.5.5 C; G). Der gemeinsame Verlust von *Uncx4.1* und *Tbx18* verursachte ebenfalls eine Reduktion der kaudal stärkeren Expression dieser Gene in den Somiten der Schwanzregion eines Embryos, beginnend in dem Somiten S1 (Abb.5.3.5.5 D; H). In gleicher Weise war auch die auf die kaudale Hälfte der Somiten begrenzte Expression von *EphrinB2* in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante und in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante, ab dem Somiten S1, herunterreguliert (Abb.5.3.5.5 J; L). Aufgrund der Aufrechterhaltung der A/P-Polarität in den epithelialen Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante war die Expression dieses Liganden des Ephrin-Signalweges in diesen Embryonen unverändert (Abb.5.3.5.5 K). Weiterhin war die Expression von *EphA4* sowie die von *Mesp2* und von *Cer1* in allen drei transgenen Embryonen regulär nachzuweisen (Abb.5.3.5.5 M-X).

Somit wurde die A/P-Polarität in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, sowie in den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten und in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten in dem Somitomer S-1 regulär etabliert, jedoch bei einem Verlust von *Uncx4.1* ab dem Somiten S1 bzw. bei einem alleinigen Verlust von *Tbx18* im Sklerotom nicht aufrechterhalten.

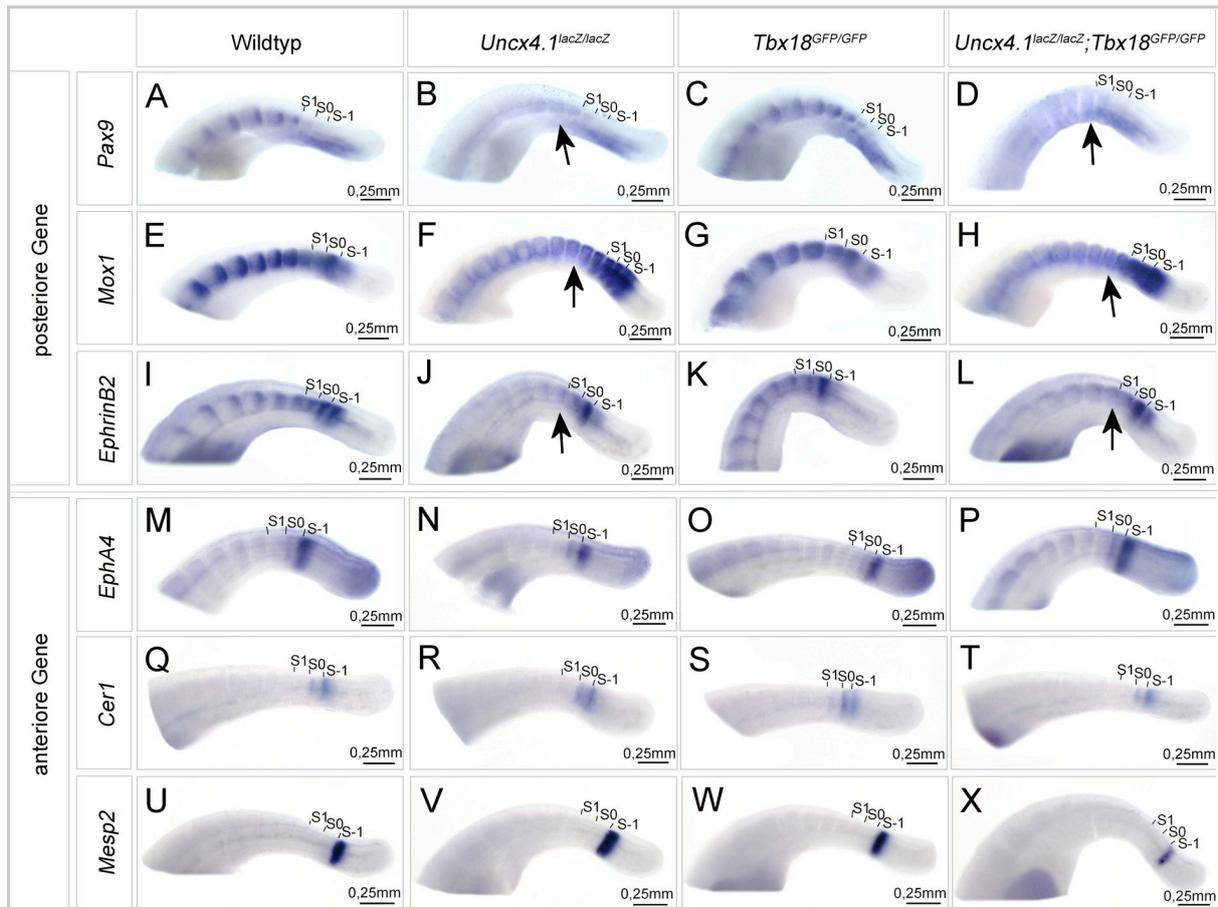


Abb.5.3.5.5: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität der Somiten in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.5 A-X zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.3.5.5 A-D stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.3.5.5 E-H die *Mox1*-Expression, Abb.5.3.5.5 I-L die *EphrinB2*-Expression, Abb.5.3.5.5 M-P die *EphA4*-Expression, Abb.5.3.5.5 Q-T die *Cer1*-Expression und die Abb.5.3.5.5 U-X die *Mesp2*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E; I; M), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante (B; F; J; N), die *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (C; G; K; O) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (D; H; L; P). Die Pfeile kennzeichnen den Verlust der Expression kaudal exprimierter Gene.

Folglich waren die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante bzw. die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante durch eine Reduktion der *Dll1*- bzw. der *Hey1*-Expression in den Somiten der Schwanzregion, beginnend in dem Somiten S1, gekennzeichnet (Abb.5.3.5.6 B; D; F; H). Aufgrund der Aufrechterhaltung der A/P-Polarität in den epithelialen Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten war die Expression der Komponenten des Notch-Signalweges in diesen Embryonen nicht verändert (Abb.5.3.5.6 C; G).

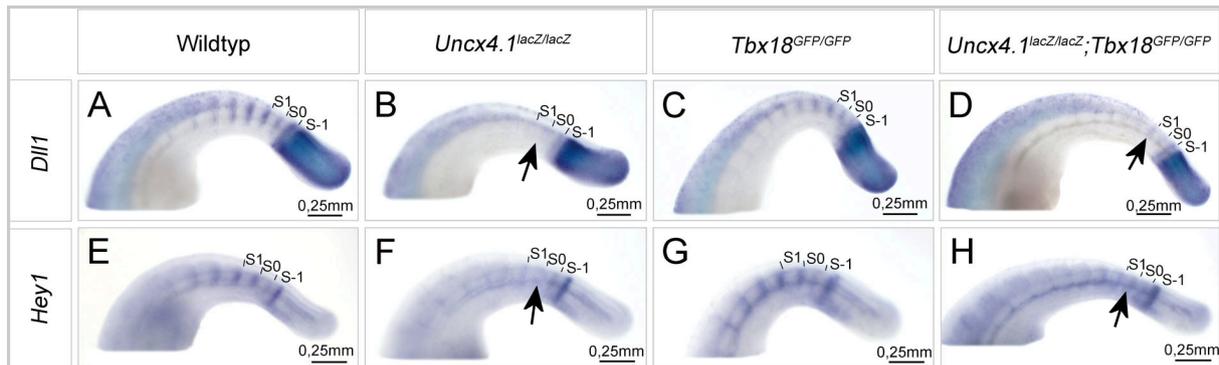
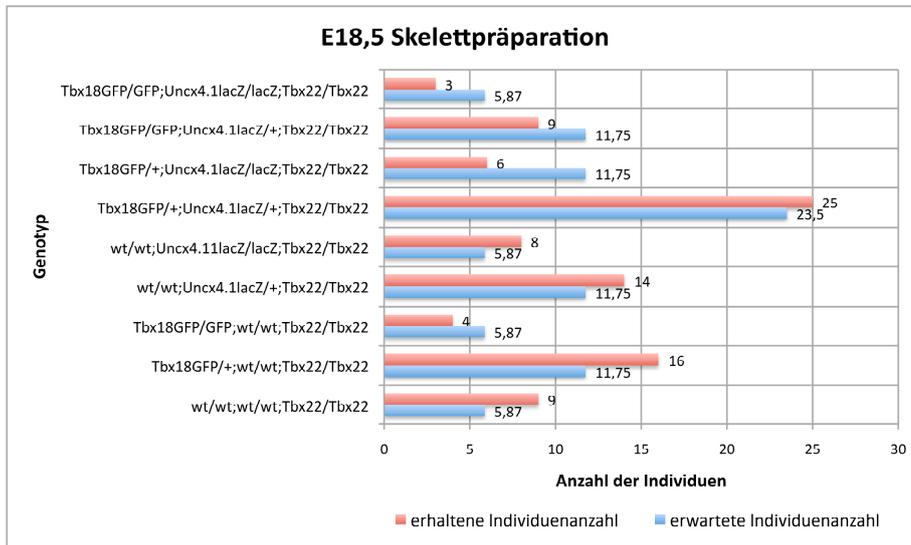


Abb.5.3.5.6: Die Expressionsanalyse der Komponenten des Notch-Signalweges in den Somiten der $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutanten. Die Abb.5.3.5.6 A-F zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Dll1* und *Hey1* im Schwanzbereich eines Embryos mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5. Abb.5.3.5.6 A-C stellt die *Dll1*-Expression und die Abb.5.3.5.6 D-F die *Hey1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; E), die $Uncx4.1^{lacZ/lacZ}$ -Mutante (B; F), die $Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante (C; G) und die $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante (D; H). Die Pfeile kennzeichnen den Verlust der Expression von *Dll1* und *Hey1* in der $Uncx4.1^{lacZ/lacZ}$ -Mutante und der $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutante.

Zusammenfassend waren $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}$ -Embryonen durch den Verlust der Kompartimentierung der Somiten beginnend in dem Somiten S1 gekennzeichnet, der jedoch nicht in einer Anteriorisierung bzw. Posteriorisierung der Somiten resultierte, sondern einen Verlust der kranialen und der kaudalen Identität der Somiten verursachte. Durch die zusätzliche Mutation des *Tbx22*-Gens in dem $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}$ -Mutantenhintergrund sollte es möglich sein, Embryonen zu erzeugen, die sich unmittelbar nach der Etablierung der A/P-Polarität durch Somiten auszeichnen, denen sowohl die kraniale als auch die kaudale Identität fehlt.

Da *Tbx22/Tbx22*-Mutanten keinen letalen Phänotyp entwickelten, konnten diese Tiere im homozygoten Zustand gehalten werden (Pauws et al. 2009). Folglich wurden für die Generierung der $Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22$ -Tripelmutanten $Uncx4.1^{lacZ/+};Tbx18^{GFP/+};Tbx22/Y$ -Männchen mit $Uncx4.1^{lacZ/+};Tbx18^{GFP/+};Tbx22/Tbx22$ Weibchen verpaart. Die Auswertung der erhaltenen Nachkommen pro Genotyp aus dieser Verpaarung zeigte, dass die Tripelmutation keine embryonale Letalität verursachte (Diagramm 5.3.5.2).

Diagramm 5.3.5.2: Die Verteilung der Genotypen der Kreuzung *Uncx4.1^{lacZ/+};Tbx18^{GFP/+};Tbx22/Tbx22*-Männchen mit *Uncx4.1^{lacZ/+};Tbx18^{GFP/+};Tbx22/Tbx22*-Weibchen. Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen der einzelnen Genotypen und die der tatsächlich erhaltenen Individuenanzahl eines Genotyps. In diese Statistik wurden 94 Embryonen des Embryonalstadiums 18,5 aufgenommen.



Um den Einfluss des zusätzlichen Verlustes von *Tbx22* im *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutantenhintergrund zu untersuchen, wurden die Skelette der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten am Embryonaltag 18,5 mit denen der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten verglichen. *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten waren wie *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten durch den Verlust der proximalen Rippen im Thoraxbereich der Wirbelsäule und der Bildung ektoischer Knorpelstrukturen im Lenden- und Schwanzwirbelbereich gekennzeichnet (Abb.5.3.5.7 B; C; E; F). Weiterhin war ebenfalls die in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten zu erkennende Veränderung der Morphologie der Pedikel in diesen transgenen Embryonen nachzuweisen (Abb.5.3.5.7 E; F).

Folglich besaßen die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten einen ähnlichen Phänotyp wie die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten.

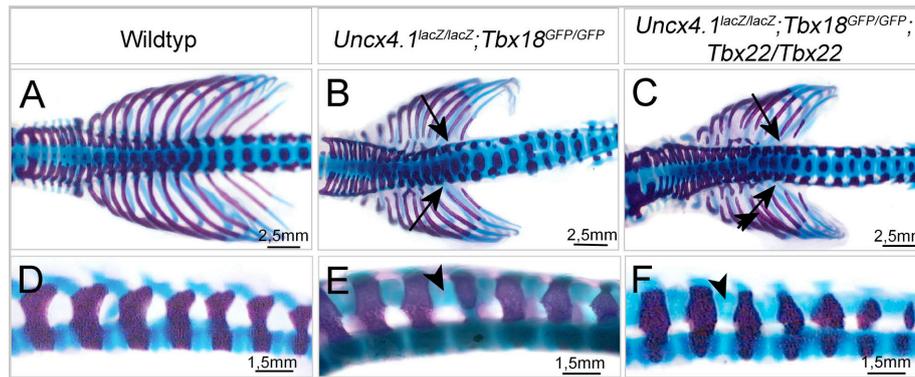


Abb.5.3.5.7: Skelettdefekte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutanten am Embryonaltag 18,5. Die Abb.5.3.5.7 A-C zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Skelettpräparation des Hals- und Thoraxbereiches, die Abb.5.3.5.7 D-F die des Lenden- und oberen Schwanzwirbelbereiches der Wirbelsäule. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (B; E) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante (C; F). Die Pfeile markieren die fehlenden Knochenelemente, die Pfeilköpfe die ektopischen Knorpel Elemente der Mutanten.

Die A/P-Polarität dieser Mutanten wurde mittels der Expression von *Pax9* und *Tbx18* am Embryonaltag 10,5 untersucht. Die Expression von *Tbx18* wurde in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante durch den Nachweis der GFP-Aktivität des *Tbx18^{GFP}*-Allels sichtbar gemacht.

Die Expression des mutanten *Tbx18*-Gens war in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante in das kaudale Kompartiment des Sklerotoms ausgeweitet (Abb.5.3.5.8 E; F). Weiterhin war *Pax9* durch eine einheitliche Expression im Sklerotom der beiden Mutanten gekennzeichnet, die eine geringere Intensität als für die kaudale Hälfte charakteristisch und eine höhere als für das kraniale Kompartiment typisch besaß (Abb.5.3.5.8 B; C).

Folglich waren auch die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Embryonen in gleicher Weise wie die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Embryonen durch einen Verlust der A/P-Polarität der Somiten gekennzeichnet, der jedoch nicht zu einer typischen Anteriorisierung bzw. Posteriorisierung der Somiten führte.

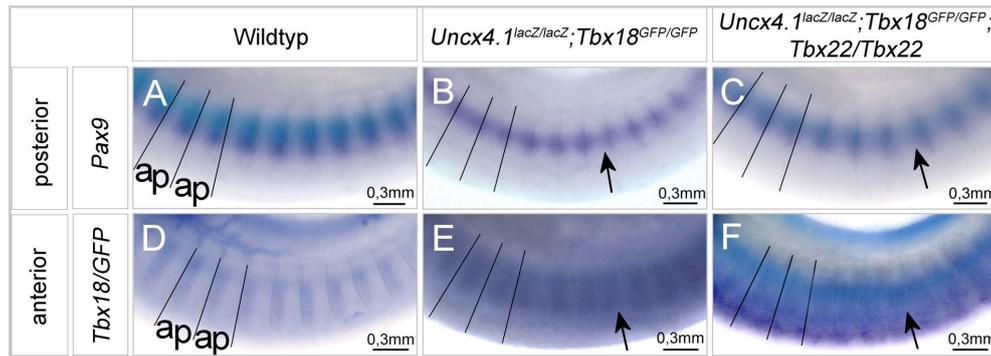


Abb.5.3.5.8: Die Analyse der A/P-Polarität der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.8 A-F zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von *Tbx18* mittels *GFP* und von *Pax9*. Abb.5.3.5.8 A-C stellt die *Pax9*-Expression und Abb.5.3.5.8 D-F die *GFP*-Expression für *Tbx18* dar. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D), die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (B; E) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante (C; F). Die Pfeile markieren die reduzierte bzw. ausgeweitete Expression der Gene in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante bzw. der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante. Die A/P-Polarität der Somiten des Wildtyps und die Somitengrenzen der Mutanten sind eingezeichnet.

Weiterhin wurde analysiert, ab welchem Somiten der Verlust der A/P-Polarisierung in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutanten stattfand.

Das für die kaudale Hälfte der epithelialen Somiten charakteristische hohe Expressionslevel von *Pax9* war in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten und den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten, ab dem Somiten S2, reduziert (Abb.5.3.5.9 B; C). Außerdem war die Expression von *Tbx18* in die kaudale Hälfte der epithelialen Somiten ausgeweitet (Abb.5.3.5.9 E; F). Die Ausweitung der Expression des mutanten *Tbx18*-Allels war ab dem Somiten S1 zu erkennen (Abb.5.3.5.9 E; F). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis war auch die Expression von *Dll1* in der kaudalen Hälfte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten, beginnend in dem Somiten S1, reduziert (Abb.5.3.5.9 H; I). Somit resultierte die gleichzeitige Mutation des *Uncx4.1*-, *Tbx18*- und *Tbx22*-Gens in einem Verlust der A/P-Polarisierung der Somiten, beginnend in dem Somiten S1.

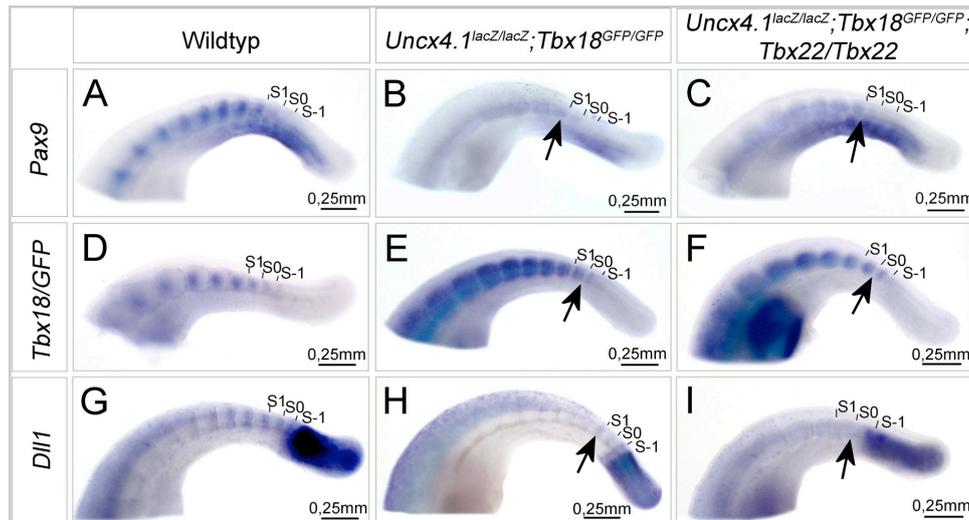


Abb.5.3.5.9: Die Analyse der Etablierung der A/P-Polarität der Somiten in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutanten. Die Abb.5.3.5.9 A-I zeigen mittels RNS-*in situ*-Hybridisierung am Embryonaltag 10,5 eine Ausschnittsvergrößerung der Expressionsanalyse von Genen, die spezifisch in der anterioren bzw. posterioren Hälfte der Somitomere S-1 und S0 und in den Somiten des Schwanzbereiches exprimiert sind. Abb.5.3.5.9 A-C stellt die *Pax9*-Expression, Abb.5.3.5.9 D-F die *Tbx18*-Expression mittels *GFP* und die Abb.5.3.5.9 G-I die *Dll1*-Expression dar. Die Position der Somitomere S-1 und S0 als auch die des Somiten S1 sind eingezeichnet. Von links nach rechts gesehen sind dargestellt: Wildtyp (A; D; G) die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante (B; E; H) und die *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutante (C; F; I). Die Pfeile kennzeichnen den Verlust der Expression kaudaler Gene bzw. die Ausweitung kranialer Gene.

5.3.6 *Uncx4.1* aktiviert in Anwesenheit des Wnt-Signalweges den *Dll1*-Promotor *in vitro*

Interessanterweise verursachte der Verlust von *Uncx4.1* in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten und den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Mutanten eine Reduktion der *Dll1*-Expression. Da diese transgenen Embryonen ebenfalls durch den Verlust des Repressors bzw. der Repressoren der *Dll1*-Transkription, *Tbx18* und *Tbx22*, charakterisiert waren, wurde eine Expansion der auf die kaudale Hälfte der epithelialen Somiten begrenzten *Dll1*-Expression in das kraniale Kompartiment erwartet. Der Verlust der Expression des Liganden des Notch-Signalweges lässt jedoch vermuten, dass *Uncx4.1* an der Aufrechterhaltung der Expression von *Dll1* beteiligt ist. Um dieses zu überprüfen, wurde ein Transaktivierungsexperiment in HeLa-Zellen mit dem oben beschriebenen Reportergenkonstrukt bestehend aus dem Luziferase-Gen, welches an das 3'-Ende des *Dll1*-Minimalpromotors kloniert wurde, der unter der Kontrolle des *Dll1*-Enhancers steht, durchgeführt.

Wie bereits gezeigt wurde, hatte *Tbx18* keinen Effekt auf die Basalaktivität des Reporterkonstruktes, welche auf 1 gesetzt wurde. Jedoch war bereits durch die alleinige Transfektion von *Uncx4.1* eine schwache Aktivierung des Reporters um das Doppelte der Basalaktivität zu erkennen. Durch die Kotransfektion von *Tbx18* und *Uncx4.1* scheint eine

6. Diskussion

Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Somitogenese zeigten, dass für die Entwicklung der Wirbelsäule neben der korrekten Etablierung einer A/P-Polarität in dem Somitomer S-1 auch deren Aufrechterhaltung in den epithelialen Somiten bzw. im Sklerotom eine entscheidende Rolle spielt. Embryonen, bei denen diese Polarisierung der Vorläuferstrukturen der Wirbel nicht erhalten blieb, besaßen schwere Skelettdefekte, die häufig zu embryonaler Letalität führten (Bussen et al. 2004, Mansouri et al. 2000; Leitges et al. 2000). In dem Zusammenhang konnte diese Arbeit zur Erforschung der regulatorischen Prozesse beitragen, die an der Aufrechterhaltung der Kompartimentierung der Somiten beteiligt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* an der Aufrechterhaltung der Expression des die kaudale Hälfte der Somiten spezifizierenden Notch-Ligand *Dll1* in den epithelialen Somiten beteiligt ist. Die Begrenzung von *Dll1* auf das kaudale Kompartiment ist wahrscheinlich das Resultat der Repression seiner Transkription durch die T-Box-Transkriptionsfaktor *Tbx18* und *Tbx22* in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten. Insofern wird die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität in den epithelialen Somiten wie deren Etablierung durch das Zusammenwirken transkriptioneller Regulatoren gewährleistet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg im Sklerotom nicht aktiv ist. Insofern wird die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität in den differenzierten Somiten anders reguliert. Für die Aufrechterhaltung der A/P-Polarität des Sklerotoms ist die antiapoptotische Funktion von *Tbx18* in den Zellen des kranialen Kompartiments erforderlich sowie die Anwesenheit repulsiver Signale in beiden Kompartimenten, die eine Vermischung der kranialen und kaudalen Zellen verhindern.

6.1 Die A/P-Polarität wird im PSM von Mausembryonen nicht irreversibel festgelegt

Bereits zu Anfang der Erforschung der Somitogenese konnte mit Hilfe von Transplantationsexperimenten in Hühnchenembryonen nachgewiesen werden, dass die A/P-Polarität der Somiten im PSM festgelegt wird. Christ et al. (1974) konnten zeigen, dass die Inversion eines Teils des PSM in A/P-Richtung zu Somiten führte, die durch eine entgegengesetzte Polarisierung, also durch eine posteriore Identität der kranialen Hälfte und einer Anterioren des kaudalen Kompartiments, charakterisiert sind. Daraus wurde geschlossen, dass die A/P-Polarität der Somiten schon im kranialen PSM irreversibel festgelegt wird (Christ et al. 1974). Die Analyse der Nullmutanten für *Uncx4.1* zeigte jedoch,

dass in Mausembryonen ein Verlust der A/P-Polarität der epithelialen Somiten nach deren Etablierung im PSM auftreten kann (Mansouri et al. 2000; Leitges et al. 2000). In den Somitomeren S-1 und S0 der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen konnte die A/P-Polarität regulär nachgewiesen werden, wurde jedoch ab dem Somiten S1 nicht aufrechterhalten. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in Embryonen, die mittels der *Pax3cre*-Mauslinie *Uncx4.1* bzw. *Tbx18* im PSM, in den epithelialen Somiten sowie in den differenzierten Somiten fehlexprimierten, ebenfalls ein Verlust der A/P-Polarität der Somiten, beginnend in dem Somiten S1, verursacht wurde, obwohl deren Etablierung im PSM regulär stattgefunden hatte. Weiterhin konnte mittels der Analyse der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten festgestellt werden, dass auch nach der Differenzierung der Somiten ein Verlust der Polarisierung des Sklerotoms möglich war (Bussen et al. 2004). In diesen transgenen Embryonen wurde die A/P-Polarität der Somiten, nach deren Etablierung im Somitomer S-1, im Somitomer S0 sowie in den epithelialen Somiten aufrechterhalten. Die Abwesenheit der Kompartimentierung der Vorläuferstrukturen der Wirbel war ausschließlich auf das Sklerotom begrenzt. Ähnlich war die Missexpression von *Uncx4.1* bzw. *Tbx18* in der kranialen bzw. kaudalen Hälfte des Sklerotoms mittels der *Tbx18cre*-Mauslinie hinreichend, um einen Verlust der Polarisierung dieser mesodermalen Struktur herbeizuführen. Die Etablierung der A/P-Polarität im Somitomer S-1 und deren Aufrechterhaltung in den epithelialen Somiten war in diesen transgenen Embryonen ebenfalls nicht beeinträchtigt. Folglich wird in Mausembryonen die A/P-Polarität der Somiten im PSM nicht irreversibel festgelegt, sondern durch einen aktiven Mechanismus nach der Etablierung aufrechterhalten.

6.2 Tbx22 und Tbx18 besitzen eine redundante Funktion in der Somitogenese

Auffällig bei der Analyse der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen und der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten war, dass, im Vergleich zu den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, die A/P-Polarität der epithelialen Somiten in den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Embryonen unverändert war. Dieses spricht für die Anwesenheit eines redundanten Faktors, welcher in Abwesenheit von *Tbx18* die A/P-Polarität der Somiten der Schwanzregion eines Mausembryos aufrechterhält. Eine redundante Funktion zwischen *Tbx18* und einem weiteren T-Box-Transkriptionsfaktor, *Tbx15*, konnte bereits bei der Entwicklung der Gliedmaßen nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation mit Herrn Dr. Henner Farin). In ähnlicher Weise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch bei der Entwicklung der Wirbelsäule *Tbx18* mit einem weiteren T-Box-Gen, *Tbx22*, funktionell kooperiert. Insofern konnte die Aufrechterhaltung der A/P-

Polarität der epithelialen Somiten bei einem Verlust von *Tbx18* mit der Anwesenheit von *Tbx22* in diesen Strukturen erklärt werden. Da *Tbx18* und *Tbx22* jedoch nur in den Somitomeren S-1 und S0 sowie in den Somiten S1 und S2 koexprimiert sind, kann *Tbx22* nicht die Abwesenheit von *Tbx18* im Sklerotom kompensieren, wodurch dessen A/P-Polarisierung verloren geht. Aufgrund dieser spät einsetzenden Posteriorisierung durchlaufen die Zellen, welche den Verlust der Kompartimentierung des Sklerotoms in den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten verursachen, die Chondrogenese verzögert. Infolgedessen wurden am Embryonaltag 18,5 im Lenden- und Schwanzwirbelbereich der Wirbelsäule der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten ektopische, die Pedikel untereinander verbindende Knorpelanlagen beobachtet, die noch nicht in Knochengewebe umgewandelt waren. Im Vergleich dazu, begann die Posteriorisierung der Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen im epithelialen Somiten S1, wodurch sich diese Zellen früher zu Chondroblasten differenzieren, die dadurch am Embryonaltag 18,5 bereits sukzessiv mittels endochondraler Ossifikation in Knochengewebe umgewandelt waren. Aus diesem Grund waren die Pedikel der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen durch ektopische Knochenstrukturen miteinander verbunden. Da die Expressionsdomäne von *Tbx22* im PSM und in den Somiten mit der von *Tbx18* korreliert, wurde der Verlust von *Tbx22* vollständig durch *Tbx18* kompensiert. Als Konsequenz bildeten die *Tbx22^{-/-}*-Mutanten keine Skelettdefekte aus.

6.3 *Tbx18* und *Tbx22* beeinflussen nicht die Etablierung der A/P-Polarität

Obwohl beide T-Box-Gene in der kranialen Hälfte des Somitomers S-1 und S0 exprimiert sind, wurde die A/P-Polarität in den *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen regulär etabliert. In ähnlicher Weise beeinflusst die Missexpression von *Tbx18* im PSM mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie ebenfalls nicht die Etablierung der A/P-Polarisierung der zukünftigen Somiten. Der Verlust der Kompartimentierung dieser Strukturen war in beiden transgenen Mausstämmen erst ab dem Somiten S1 zu beobachten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *Tbx18* und *Tbx22* keinen Einfluss auf die Etablierung der A/P-Polarität haben. Die Etablierung der A/P-Polarität der Somiten ist das Resultat der genetischen Interaktion des Transkriptionsfaktors *Mesp2* mit dem Notch-Signalweg. *Mesp2* wird von dem Notch-Signalweg zusammen mit *Tbx6* im kranialen PSM aktiviert (Yasuhiko et al. 2006) und im Zuge der Kompartimentierung der Somiten auf die kraniale Hälfte des Somitomers S-1 begrenzt (Morimoto et al. 2005; Takahashi et al. 2000). In dieser Hälfte des zukünftigen Somiten destabilisiert *Mesp2* mastermind-like1 (*Maml1*), einen Koaktivator der Notch-Rezeptoren, der an der Komplexbildung zwischen NICD/Rbpj/*Maml1* beteiligt ist

(Sasaki et al. 2011), und stabilisiert die Expression von *Lfng*, was beides zu einer Inhibierung des Notch-Signalweges in diesem Kompartiment führt (Morimoto et al. 2005). In der kaudalen Hälfte des Somitomers S-1 hingegen bleibt die Aktivität des Notch-Signalweges erhalten (Morimoto et al. 2005). Im Gegensatz zur Expression der Notch-Signalweg-Komponenten konnte im Somitomer S0 und in den epithelialen Somiten keine *Mesp2*-Transkription nachgewiesen werden. Diese Begrenzung der *Mesp2*-Expression auf den Somitomeren S-1 erfolgt über einen Rückkopplungsmechanismus, bei welchem *Mesp2* die Expression seiner eigenen Repressoren, *Ripply1* und *Ripply2*, induziert. Diese Transkriptionsrepressoren verursachen über die ubiquitin-abhängige Degradation von Tbx6 die Herunterregulierung der *Mesp2*-Expression (Oginuma et al. 2008). Bei diesem Prozess kann auch die in anderen Modellorganismen nachgewiesene Rekrutierung des Groucho/HDAC-Korepressorkomplexes durch *Ripply1* und *Ripply2* eine Rolle spielen (Kondow et al. 2007; Kawamura et al. 2008). Somit wird zeitlich verzögert ebenfalls die *Mesp2*-Proteinkonzentration reduziert, welche im Somitomer S0, aber kaum noch im Somiten S1 detektierbar ist (Saga; 2007). Aufgrund der normalen *Mesp2*-Transkription in den *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen und den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen wurde die Aktivität des Notch-Signalweges in diesen transgenen Embryonen weiterhin auf die kaudale Hälfte der Somitomere S-1 und S0 begrenzt und die A/P-Polarität somit in diesem Bereich des PSM aufrechterhalten. Infolgedessen findet der Verlust der Kompartimentierung erst in Abwesenheit des *Mesp2*-Proteins im Somiten S1 statt. Somit ist *Mesp2* hinreichend, um die Aktivität des Notch-Signalweges auf die kaudale Hälfte der Somitomere S-1 und S0 zu begrenzen.

6.4 Tbx18 und Tbx22 könnten als Repressoren der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten fungieren

Eine Erklärung für die Posteriorisierung der Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen lieferte die Ausweitung der Expression des die kaudale Hälfte der Somiten spezifizierenden Notch-Liganden in das kraniale Kompartiment der Vorläuferstrukturen der Wirbel. Die Expression von *Dll1* in der kranialen Hälfte der Somiten könnte mit dem Erwerb einer kaudalen Identität der Zellen dieses Kompartiments einhergehen. Die Ausweitung der *Dll1*-Expression nach Herunterregulierung der *Mesp2*-Proteinexpression in dem Somiten S1 der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen lässt vermuten, dass die T-Box-Gene möglicherweise die Funktion von *Mesp2* in den epithelialen Somiten übernehmen und als Repressoren der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten fungieren. Diese Hypothese

wurde durch die Analyse der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen gestützt. Eine Missexpression von *Tbx18* in der kaudalen Hälfte der Somiten ist hinreichend, um einen Verlust der *Dll1*-Transkription ab dem Somiten S1 zu erreichen. Im Somitomer S-1 und S0 war die *Dll1*-Expression in diesen transgenen Embryonen unverändert nachweisbar, was die Vermutung zulässt, dass die Aktivierung der *Dll1*-Expression in diesen Strukturen stärker als die Repression durch *Tbx18* war. Dieses könnte auf eine schwache Rekombination der *Pax3-cre*-Mauslinie in diesem Bereich zurückzuführen sein.

Eine Funktion für *Tbx18* und *Tbx22* als Transkriptionsrepressoren wurde bereits beschrieben (Andreou et al. 2007; Farin et al. 2007). Für *Tbx18* konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor im N-terminalen Bereich eine eh1-Domäne besitzt, die für die Bindung an groucho-Korepressoren verantwortlich ist (Farin et al. 2007). Weiterhin wurde bei Farin et al. (2007) nachgewiesen, dass *Tbx18 in vitro* die *Tbx6*- und *Tcf1e/β-Catenin*-vermittelte Aktivierung des *Dll1*-Promotors konzentrationsabhängig reprimieren kann (Farin et al. 2007). Für *Tbx22* wurde gezeigt, dass dieser T-Box-Transkriptionsfaktor ein Zielgen des small ubiquitin-like modifier 1-Proteins, SUMO-1, ist, dessen post-translationelle Modifikation des *Tbx22*-Proteins für die repressive Aktivität des T-Box-Transkriptionsfaktors notwendig ist (Andreou et al. 2007). In dieser Arbeit konnte mittels weiterer Promotorstudien nachgewiesen werden, dass beide T-Box-Gene synergistisch bei der Repression des aktivierten *Dll1*-Promotors *in vitro* agieren können. In diesem Zusammenhang wurde das bei Hofmann et al. (2004) und Farin et al. (2007) eingesetzte Reporterkonstrukt verwendet, welches den *Dll1*-Minimalpromotor enthält, der unter der Kontrolle des *msd*-Fragmentes stand (in der Literatur wird dieses Konstrukt als *Dll1^{tg'msd'}* bezeichnet; Beckers et al. 2000). Das *msd*-Fragment ist hinreichend, um eine Expression von *Dll1* im PSM, den epithelialen und differenzierten Somiten zu induzieren. Hofmann et al. (2004) konnten zeigen, dass dieser Enhancer sechs T-Box-Bindestellen und vier Tcf/Lef-Bindestellen enthält. Des Weiteren wurden im *Dll1*-Minimalpromotor in der Nähe des ATGs zwei T-Box-Bindestellen und eine Tcf/Lef-Bindestelle nachgewiesen (Hofmann et al. 2004). Eine weitere T-Box-Bindestelle wurde 5' des *msd*-Fragmentes gelegen detektiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Letztere für die *Dll1*-Expression in der Schwanzknospe verantwortlich ist und keinen Einfluss auf deren Expression im PSM bzw. in den epithelialen Somiten hatte (Hofmann et al. 2004). Insofern enthielt das hier verwendete Reporterkonstrukt alle bisher identifizierten T-Box-Bindestellen, die für eine Bindung von *Tbx18* bzw. *Tbx22* infrage kommen würden. Die in dieser Arbeit erhaltene 4- bis 6-fache Aktivierung dieses Reporterkonstrukt durch *Tbx6*- und *Tcf1e/β-Catenin* war geringer als die der bereits veröffentlichten Studien (Hofmann et al. 2004).

Hofmann et al. (2004) konnten eine 8- bis 9-fache Aktivierung des Reporters nachweisen. Jedoch wurde für diese Experimente ein *Tbx6VP16*-Konstrukt eingesetzt (Hofmann et al. 2004), während in dieser Arbeit ausschließlich ein *Tbx6*-Konstrukt verwendet wurde. Da *Tbx6* keinen Effekt auf die Reporteraktivität hatte, war die in dieser Arbeit erhaltene niedrigere Aktivierung des *Dll1*-Promotorkonstruktes erklärbar. Wie bei Farin et al. (2007) für *Tbx18* beobachtet wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch *Tbx22* *in vitro* an die T-Box-Bindestellen des *Dll1*-Minimalpromotors bzw. des *msd*-Fragmentes binden kann. Jedoch muss erwähnt werden, dass Beckers et al. (2000) mittels Studien in transgenen Mäusen nachgewiesen haben, dass das *msd*-Fragment die *Dll1*-Expression im gesamten Somiten induziert, nicht nur in deren kaudaler Hälfte (Farin et al. 2007). Aus diesem Grund ist es möglich, dass das inhibitorische Element, welches die endogene *Dll1*-Expression auf die kaudale Hälfte der Somiten begrenzt, nicht in diesem Konstrukt liegt. Jedoch ist in dieser Studie ferner festgestellt worden, dass zwischen dem *Dll1*-Minimalpromotor und dem *msd*-Fragment ein zweites *msd*-Fragment (*msd II*) liegt, welches hinreichend ist, um die *Dll1*-Expression ausschließlich im PSM und in den epithelialen Somiten, jedoch nicht in den differenzierten Somiten zu induzieren (Beckers et al. 2000). Das *msd II*-Promotorelement repräsentiert somit die endogene Aktivität des *Dll1*-Gens eher als das *msd*-Fragment. Die Funktion dieses *msd II*-Fragmentes konnte durch negative regulierende Elemente in dem 3'-Bereich des *msd*-Fragmentes reprimiert werden (Beckers et al. 2000; Vergleich *Dll1^{tg1.6/lacZ}* mit *Dll1^{tg2.5/lacZ}*). Damit ist nachgewiesen worden, dass in dem *msd*-Fragment negative regulierende Elemente vorhanden sind, welche die *Dll1*-Aktivität im PSM und in den epithelialen Somiten reprimieren können. Das Element, welches die *Dll1*-Expression auf die kaudale Hälfte der Somiten begrenzt, ist noch nicht bekannt. Um dieses zu identifizieren muss eine genauere Promotoranalyse der *msd*-Fragmente und eventuell weiterer Genomregionen durchgeführt werden.

Neben der Analyse der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen wurde die Hypothese, dass *Tbx18* als Repressor der *Dll1*-Transkription in der kranialen Hälfte der Somiten fungieren könnte, auch durch die Untersuchung von Embryonen, die ein dominant negatives Protein von *Tbx18* im PSM, den epithelialen und den differenzierten Somiten exprimierten, gestützt. Die in der Promotorstudie nachgewiesene Aktivierung des *Dll1*-Promotorelementes durch das *Tbx18VP16*-Protein konnte auch in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen beobachtet werden. Diese Embryonen waren durch eine *Dll1*-Expression in der kranialen Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somiten S-1, charakterisiert. Folglich ist nachgewiesen worden, dass *Tbx18* hinreichend ist, um die Expression von *Dll1* in den Somiten zu regulieren. Da

bisher keine direkte Bindung von Tbx18 oder Tbx22 an Promotorelemente des *Dll1*-Gens gezeigt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die T-Box-Gene einen Aktivator von *Dll1* in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten reprimieren. So könnte unter anderem ein Konkurrieren um die T-Box-Bindestellen zwischen Tbx6 als Aktivator und Tbx18/Tbx22 als Repressoren für die Herunterregulierung der *Dll1*-Expression in der kranialen Hälfte der Somitomere verantwortlich sein. Wehn et al. (2010) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass ektopisches in den Somiten fehlexprimiertes Tbx6-Protein einen Phänotyp verursachte, der dem der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten ähnelt. Die Autoren schlussfolgerten, dass dieser Phänotyp aufgrund des Konkurrierens von Tbx6 und Tbx18 um die T-Box-Bindestellen der *Tbx18*-Zielgene entstand. Weiterhin konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass Tbx18 die Tbx6-vermittelte Aktivierung eines *Dll1-msd-Luziferase*-Konstruktes *in vitro* reprimierte (Wehn et al. 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tbx18 und Tbx6 an dieselben T-Box-Bindestellen binden können. Jedoch konnte im Zuge der Promotoranalyse des *Mesp2*-Gens beobachtet werden, dass Tbx6 an Promotorelemente des *Mesp2*-Gens bindet, Tbx18 jedoch nicht. Somit besitzen Tbx6 und Tbx18, zumindest im *Mesp2*-Promotor, nicht dieselben Bindestellen (Yasuhiko et al. 2006). Deshalb ist ein Konkurrieren um T-Box-Bindestellen zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren fraglich. Doppelfärbungen mittels Antikörper gegen Tbx6 und *Mesp2* zeigten, dass Tbx6 nur im Somitomeren S-1, jedoch nicht mehr im Somitomer S0 nachweisbar war (Oginuma et al. 2008). Folglich könnte ein Konkurrieren zwischen Tbx6 und Tbx18/Tbx22 um die T-Box-Bindestellen im *Dll1*-Promotor nur im Somitomeren S-1 stattfinden. Dieses sollte in einer graduellen Reduktion der *Dll1*-Expression in den Somitomeren resultieren sollte. Jedoch war bereits im Somitomer S-1 keine Expression von *Dll1* in der kranialen Hälfte der Somiten mehr detektierbar, da *Mesp2*, wie oben diskutiert, hinreichend ist die *Dll1*-Expression auf die kaudale Hälfte des zukünftigen Somiten zu begrenzen. Dieses schließt nicht aus, dass *Mesp2*, Tbx18 und Tbx22 eine redundante Funktion bei der Begrenzung der *Dll1*-Expression auf die kaudale Hälfte des Somitomers S-1 haben könnten. Allerdings konnten Tbx18 und Tbx22 in Nullmutanten für *Mesp2* bzw. in Embryonen, die ein dominant negatives Protein von *Mesp2* in der kranialen Hälfte der Somiten exprimierten, die Aktivität des Notch-Signalweges nicht auf die kaudale Hälfte der Somitomere begrenzen (Takahashi et al. 2007; Sasak et al. 2011). Insofern sind Tbx18 und Tbx22 im Somitomer S-1 nicht hinreichend, um *Dll1* in dessen kranialer Hälfte zu reprimieren. Aus diesem Grund kann geschlussfolgert werden, dass *Mesp2* für die initiale Repression des Notch-Signalweges im Somitomer S-1 notwendig ist. Die Aufrechterhaltung der Repression von *Dll1* in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten

erfolgt wahrscheinlich durch Tbx18 und Tbx22.

6.5 Tbx18 fungiert im Sklerotom als antiapoptotischer Faktor

Da bisher keine direkte Bindung von Tbx18 bzw. Tbx22 an den Promotor von *Dll1* nachgewiesen wurde, muss in Betracht gezogen werden, dass die Posteriorisierung der Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen das Resultat der Migration von Zellen des kaudalen Kompartiments in die kraniale Hälfte nach dem Verlust der kranialen Zellen aufgrund von Apoptose sein könnte. In diesem Zusammenhang müsste ebenfalls eine graduelle Posteriorisierung der epithelialen Somiten zu beobachten sein. Bei genauerer Betrachtung der *Dll1*-Expression in den *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen war bereits im Somitomer S0 eine schwache Expression des Notch-Liganden in dessen kranialer Hälfte zu erkennen. Insofern könnte Tbx18 eine antiapoptotische Funktion besitzen, die gewährleistet, dass nicht alle Zellen des kranialen Kompartiments apoptotisch werden. Die Induktion von Apoptose in der kranialen Hälfte der Somiten ist für die Ausbildung der Zelldichteunterschiede der beiden Kompartimenten notwendig. In Hühnchenembryonen konnte gezeigt werden, dass in den Somiten S1 bis S18 apoptotische Zellen in der kranialen Hälfte nachzuweisen waren (Sanders et al. 1997). Gegen eine antiapoptotische Funktion von Tbx18 in den epithelialen Somiten spricht, dass in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen die das Transgen exprimierenden Zellen nachweisbar waren und nicht, wie für diesen Fall erwartet, apoptotisch wurden. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass Tbx18 in den epithelialen Somiten nicht als antiapoptotischer Faktor fungiert.

Jedoch wurde eine solche Funktion von Tbx18 in Bussen et al. (2004) für das Sklerotom diskutiert. Die Posteriorisierung des Sklerotoms der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten konnte mit einer erhöhten Apoptoserate in dessen kranialer Hälfte in Zusammenhang gebracht werden. Die Autoren vermuteten, dass die Einwanderung kaudaler Zellen in die kraniale Hälfte der differenzierten Somiten, nach dem Verlust der apoptotischen kranialen Zellen, der Grund der Posteriorisierung des Sklerotoms war (Bussen et al. 2004). Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Uncx4.1* in den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten, trotz der Ausweitung in die kraniale Hälfte des Sklerotoms, in der kaudalen Hälfte der differenzierten Somiten stärker war. Das lässt schließen, dass kaudale Zellen sukzessiv in die kraniale Hälfte des Sklerotoms einwandern. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression eines dominant negativen Proteins von Tbx18 in der kranialen Hälfte des Sklerotoms hinreichend ist, um in diesem Kompartiment Apoptose zu induzieren. Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass in den am weitesten kranial gelegenen

differenzierten Somiten nur wenige das Transgen exprimierende Zellen nachweisbar waren. Als Resultat der erhöhten Apoptose kranialer Zellen konnte eine Ausweitung der Expression kaudal spezifischer Gene in die kraniale Hälfte des Sklerotoms gezeigt werden. Vergleichbar zu der Situation in der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutante, waren diese Embryonen weiterhin durch ein höheres Expressionslevel dieser Gene in der kaudalen Hälfte der Somiten charakterisiert, was auf eine graduelle Posteriorisierung der kranialen Hälfte schließen ließ. Insofern kann geschlussfolgert werden, dass Tbx18 im Sklerotom eine antiapoptotische Funktion ausübt.

6.6 Tbx18 ist für die Aufrechterhaltung der Spezifizierung der kranialen Somitenhälfte verantwortlich

Die Analyse der *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen ließ ferner vermuten, dass Tbx18 für die Aufrechterhaltung der Spezifizierung der kranialen Somitenhälfte verantwortlich ist. In den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen wurde infolge der X-Chromosominaktivierung Tbx18 mosaikartig in der Hälfte der Zellen in den gesamten Somiten exprimiert. Trotz der Missexpression von Tbx18 in Zellen des kaudalen Kompartiments, konnte keine Expression des Transgens in dieser Hälfte nachgewiesen werden. Weiterhin waren diese Embryonen durch eine reguläre A/P-Polarität der Somiten charakterisiert. Insofern hatten sich die kranialen und kaudalen Zellen in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen voneinander separiert und ihrem Schicksal gemäß in dem jeweiligen Kompartiment angeordnet. Stern et al. (1987) konnten in Transplantationsexperimenten in Hühnchenembryonen zeigen, dass sich die Zellen einer kranialen und einer kaudalen Somitenhälfte nicht mischen. Im Gegensatz dazu, konnte jedoch eine Vermischung von Zellen zweier kranialer bzw. zweier kaudaler Kompartimente beobachtet werden (Stern et al. 1987). Insofern ist in Hühnchenembryonen nachgewiesen worden, dass Zellen der kranialen und der kaudalen Hälfte repulsiv aufeinander wirken. Das Separieren der das Transgen exprimierenden Zellen von den kaudalen Zellen in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Expression von *Tbx18* hinreichend war, um eine kraniale Identität der Zellen hervorzurufen. Als Konsequenz sonderten sich diese Zellen von denen der kaudalen Somitenhälfte ab und sammelten sich in der kranialen Hälfte der Somiten an. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass infolge des Verlustes durch Apoptose kein Nachweis der das Transgen exprimierenden Zellen in der kaudalen Hälfte möglich war. Allerdings sollte dieses dann auch auf die transgenen Zellen der kranialen Hälfte zutreffen, die jedoch nachweisbar waren. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass dieser Prozess spezifisch in der kaudalen Hälfte stattfand.

Zusammenfassend ist in dieser Arbeit gezeigt worden, dass Tbx18 für die Aufrechterhaltung der kranialen Identität der Zellen der einen Somitenhälfte verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang reprimiert Tbx18 in der kranialen Hälfte der epithelialen Somiten zusammen mit Tbx22 die Expression des die kaudale Somitenhälfte spezifizierenden Notch-Liganden *Dll1*. Damit übernimmt Tbx18 die Funktion von *Mesp2*, welches für die initiale Repression von *Dll1* im Somitomer S-1 notwendig ist. Nach der Differenzierung der Somiten erfolgt die Aufrechterhaltung der Kompartimentierung über die antiapoptotische Funktion von Tbx18 (Abb. 6.6.1).

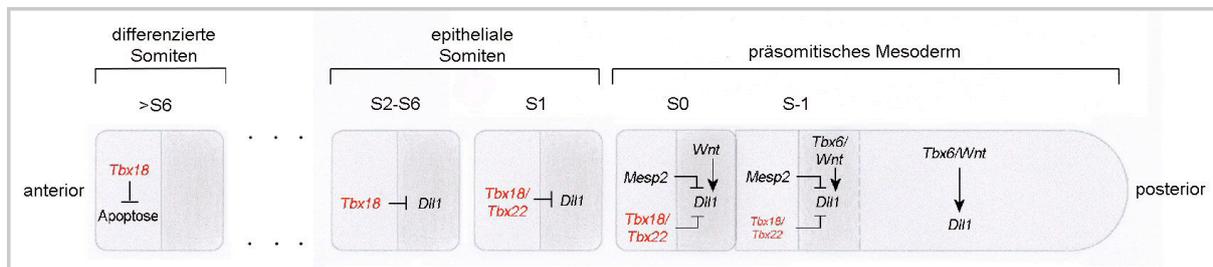


Abb.6.6.1: Schematische Darstellung der Funktion von Tbx18 und Tbx22 im paraxialen Mesoderm

6.7 Der Notch-Signalweg ist in den differenzierten Somiten nicht aktiv

Die Identifizierung von Tbx18 als Repressor der *Dll1*-Expression in der kranialen Hälfte der Somiten führte zu der Frage, ob eine Aktivität des Notch-Signalweges in der kaudalen Hälfte der differenzierten Somiten vorhanden ist und Tbx18 weiterhin für die Repression der bisher nicht nachgewiesenen *Dll1*-Expression in der kranialen Hälfte des Sklerotoms verantwortlich ist. Die Analyse von *Tbx18^{cre/+}; Rosa^{NICD/+}*-Embryonen zeigte, dass die Expression der intrazellulären Domäne des Notch1-Rezeptors in der kranialen Hälfte des Sklerotoms die A/P-Polarität der Somiten nicht beeinflusste und zu keinen schwerwiegenden Skelettdefekten führte. Weiterhin konnte in dieser Arbeit mittels der *Tbx18^{cre/GFP}; Rbpj^{lox/lox}*-Embryonen nachgewiesen werden, dass die Posteriorisierung der Somiten der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutante nicht das Resultat einer Ausweitung der Aktivität des Notch-Signalweges in die kraniale Hälfte der Somiten war. Somit wurde geschlussfolgert, dass der Notch-Signalweg in den differenzierten Somiten nicht aktiv ist.

Frühere Studien konnten ebenfalls nachweisen, dass die Überexpression von *Dll1* keinen Einfluss auf die A/P-Polarität der Somiten hatte. Teppner et al. (2007) konnte zeigen, dass die Überexpression von *Dll1* mittels des *msd*-Promotors in den beiden Kompartimenten der epithelialen und der differenzierten Somiten keinen Einfluss auf die Expression kranialer bzw. kaudaler Gene hatte. Infolgedessen wiesen lediglich 25% der Neugeborenen dieser transgenen Embryonen morphologisch sichtbare Skelettveränderungen auf. Diese umfassten reduzierte

proximale Rippen, Zwischenwirbelscheiben und Dornfortsätzen der Wirbel. Neugeborene ohne äußerlich sichtbaren Phänotyp waren zum Teil durch vereinzelt auftretende fusionierte Wirbel bzw. reduzierte Dornfortsätze charakterisiert (Teppner et al. 2007). In ähnlicher Weise war in Embryonen, die ein dominant negatives *Dll1*-Allel, welches ebenfalls unter der Kontrolle des *msd*-Fragmentes stand, im paraxialen Mesoderm exprimierten, die A/P-Polarität nur unwesentlich verändert. Als Resultat traten auch in diesen transgenen Embryonen nur vereinzelt Skelettdefekte, welche fusionierte dorsale Wirbelbögen und reduzierte Pedikel umfassten, auf (Cordes et al. 2004). Jedoch führte die Missexpression eines dominant negativen Proteins von *Dll1* im paraxialen Mesoderm zu homeotischen Transformationen (Cordes et al. 2004). Insofern kann geschlussfolgert werden, dass der Notch-Signalweg im Sklerotom wahrscheinlich nicht aktiv ist.

Im Gegensatz dazu resultierte die ektopische *Dll1*-Expression im PSM und in den epithelialen Somiten in einer Posteriorisierung der Somiten. *Pax3-cre/+;Rosa^{NICD/+}*-Embryonen waren durch die Ausweitung kaudal exprimierter Gene in die kraniale Hälfte der Somiten, beginnend in dem Somitomer S0, charakterisiert. Vergleichbar wurde für *T(s)-cre/+;Rosa^{NICD/+}*-Embryonen, welche ebenfalls die aktive Form der intrazellulären Domäne von Notch1 im PSM und in den Somiten exprimierten, eine Posteriorisierung der Somiten beobachtet. Feller et al. (2008) konnten zeigen, dass die Expression von *Uncx4.1* in die kraniale Hälfte der Somiten ausgeweitet war, während keine *Tbx18*-Expression in diesen Vorläuferstrukturen der Wirbel detektierbar war (Feller et al. 2008). Insofern kann geschlussfolgert werden, dass *Dll1* in den epithelialen Somiten weiterhin für die Aufrechterhaltung der kaudalen Hälfte verantwortlich ist.

Die Analyse der *Pax3-cre/+;Rosa^{NICD/+}*-Embryonen und der *T(s)-cre/+;Rosa^{NICD/+}*-Embryonen ergab zudem, dass die Expression der aktiven Form des Notch1-Rezeptors im PSM die Expression von *Mesp2* nicht beeinflusst (Feller et al. 2008). Infolgedessen wird die A/P-Polarität in diesen Embryonen regulär im Somitomer S-1 etabliert. Somit konnten Feller et al. (2008) nachweisen, dass keine zyklische Aktivität des Notch-Signalweges im PSM für die Etablierung der A/P-Polarisierung der Somiten vorhanden sein muss.

6.8 Der Notch-Signalweg hat einen Einfluss auf die Differenzierung der Myoblasten

Eine ektopische Expression der intrazellulären Domäne von Notch1 mittels der *Pax3-cre*-Mauslinie in dem Dermomyotom führte zu einer reduzierten Expression von *Pax3* in diesem Kompartiment. Bereits in früheren Studien ist nachgewiesen worden, dass in *Dll1*-

Nullmutanten bzw. in Embryonen, die durch ein hypomorphes *Dll1*-Allel gekennzeichnet waren, eine Reduktion der Skelettmuskeln auftrat. Die von dem Dermomyotom abstammenden Myoblasten wurden in diesen Embryonen regulär determiniert. Jedoch erfolgte deren Differenzierung beschleunigt, sodass ein vorübergehender Überschuss an Muskelfasern und eine reduzierte Anzahl an Vorläuferzellen, erkennbar an der schwächeren *Pax3/Pax7*-Expression im Dermomyotom, vorlag. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese frühzeitig erhöhte Differenzierung der Myoblasten zu einer vorzeitigen Abnahme der Vorläuferzellen und somit zu einem Verlust des weiteren Muskelwachstums führt (Schuster-Gossler et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnte die in den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen nachgewiesene Reduktion der *Pax3*-Expression und eine verzögert auftretende Differenzierung des Dermomyotom in das Dermatom und das Myotom erklärt werden, da diese transgenen Embryonen ebenfalls durch einen Verlust der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten gekennzeichnet waren. Allerdings scheint ein genau definiertes Expressionslevel von Notch-Zielgenen für die reguläre Differenzierung der Myoblasten notwendig zu sein, weil die Ausweitung der *Dll1*-Expression in die kraniale Hälfte der Somiten der *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen und der *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen sowie die Überexpression des Notch-Signalweges in den epithelialen und differenzierten Somiten der *Pax3cre/+;Rosa^{NICD/+}*-Embryonen ebenfalls eine Reduktion der *Pax3*-Expression und eine verzögert auftretende Differenzierung des Dermomyotom verursachte.

6.9 *Uncx4.1* ist kein Zielgen des Notch-Signalweges

Aufgrund des Verlustes der *Uncx4.1*-Expression in den *Dll1*-Nullembryonen und in den *Rbpj*-Mutanten, wurde dieser Transkriptionsfaktor als ein Zielgen des Notch-Signalweges angesehen (Barrantes et al. 1999). Die Analyse der *Tbx18^{cre/+};Rosa^{NICD/+}*-Embryonen wie auch die der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flox/flox}*-Embryonen erbrachte jedoch neue Erkenntnisse hinsichtlich der Regulation von *Uncx4.1*. Als Zielgen des Notch-Signalweges hätte *Uncx4.1* in den *Tbx18^{cre/+};Rosa^{NICD/+}*-Embryonen, wie für *Hey1* gezeigt wurde, in der gesamten kranialen Hälfte der Somiten exprimiert werden müssen. Allerdings ist dessen Expression nur in die kraniale Hälfte des Sklerotoms ausgeweitet gewesen und war somit ausschließlich in dem kaudalen Bereich des kranialen Kompartiments des Sklerotoms nachweisbar. Weiterhin hätte die Inaktivierung des Notch-Signalweges in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten der *Tbx18^{cre/GFP};Rbpj^{flox/flox}*-Embryonen eine Reduktion der ausgeweiteten *Uncx4.1*-Expression in diesem Kompartiment des Sklerotoms nach sich ziehen müssen. Jedoch war

Uncx4.1 weiterhin, wie in *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten, in der kranialen Hälfte der Vorläuferstrukturen der Wirbel dieser transgenen Embryonen exprimiert. Mittels der *Dll1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass *Uncx4.1* kein Zielgen des Notch-Signalweges ist, da eine Expression dieses Transkriptionsfaktors in diesen Mutanten detektierbar war. Vergleichbar konnte auch in den *Mesp2^{lacZ/lacZ};Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen eine Expression von *Uncx4.1* in den Somiten nachgewiesen werden (Takahashi et al. 2003). Die Abwesenheit der *Uncx4.1*-Expression in *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen ist folglich das Resultat der Anteriorisierung und somit des Verlustes der posterioren Zellen der Somiten in diesen Embryonen.

6.10 *Uncx4.1* ist an der Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten beteiligt

Das *Uncx4.1*-homologe Protein in *Caenorhabditis elegans*, UNC-4, fungiert als Repressor bei der Spezifizierung von Motoneuronen in diesem Modellorganismus (Winnier et al. 1999). Winnier et al. (1999) konnten zeigen, dass UNC-4 eine eh1-Domäne besitzt, die hoch konserviert ist und auch in Mausembryonen nachgewiesen wurde. Mutationen dieser eh1-Domäne zerstören die physikalische Interaktion mit UNC37, einem groucho-Korepressor, der die repressive Funktion von UNC-4 vermittelt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit mittels eines Gal4-*Uncx4.1*-Fusionsproteins gezeigt werden, dass auch das murine *Uncx4.1* als Repressor fungiert.

Erste Hinweise auf die Funktion von *Uncx4.1* bei der Somitogenese erbrachte die Analyse der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Doppelmutanten sowie die der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22/Tbx22*-Tripelmutanten. Mit Hilfe dieser transgenen Embryonen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Uncx4.1* eine Reduzierung der *Dll1*-Expression, ab dem Somiten S1, nach sich zog. Da diese Mutanten ebenfalls durch den Verlust des Repressors bzw. der Repressoren des Notch-Liganden charakterisiert waren, war eine Ausweitung der *Dll1*-Expression erwartet worden. Die Abwesenheit der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten lässt schlussfolgern, dass *Uncx4.1* an der Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten beteiligt ist. Da in dem PSM die Induktion der *Dll1*-Expression durch den Wnt-Signalweg und *Tbx6* vermittelt wird, war der Verlust der *Dll1*-Expression in Abwesenheit von *Uncx4.1* erst zeitlich verzögert, ab dem Somiten S1, nachweisbar. Die Analyse der *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen bzw. der *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen wies weiterhin nach, dass *Uncx4.1* nicht hinreichend ist, die *Dll1*-Expression zu induzieren, da keine Genaktivität des Notch-Liganden in der kranialen Hälfte des Sklerotoms

in den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen bzw. den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen detektiert wurde. Es konnte lediglich eine Ausweitung der Expression des Notch-Liganden in die kraniale Hälfte der epithelialen Somiten in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen, ab den Somiten S1, beobachtet werden. Da die *Mesp2*-Expression in diesen transgenen Embryonen nicht beeinflusst wurde, war die Repression von *Dll1* in der kranialen Hälfte der Somitomere S-1 und S0 gewährleistet und eine Ausweitung der *Dll1*-Expression erst in Abwesenheit des *Mesp2*-Proteins im Somiten S1 nachzuweisen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist mittels eines Transaktivierungsexperimentes für den *Dll1*-Promotor gezeigt worden, dass *Uncx4.1* allein nur einen schwach aktivierenden Effekt auf die Reporteraktivität hatte. Im Gegensatz dazu, wurde die Wnt-vermittelte Aktivierung des Reporters durch eine Kotransfektion mit *Uncx4.1* um das 8-fache verstärkt. Diese Resultate lassen vermuten, dass *Uncx4.1* zusammen mit dem Wnt-Signalweg an der Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten beteiligt ist. Da *Uncx4.1* als Repressor fungiert, muss dieser Transkriptionsfaktor einen Repressor des Wnt-Signalweges reprimieren, um eine Aktivierung des *Dll1*-Promotors hervorrufen zu können. Somit könnte die *Tbx6*/Wnt-vermittelte Aktivierung von *Dll1* im PSM in den epithelialen Somiten durch die Aufrechterhaltung der Aktivität des Wnt-Signalweges in der kaudalen Hälfte erhalten bleiben. Für die Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten ist eine alleinige Aktivität des Wnt-Signalweges wahrscheinlich hinreichend. Eine Aktivität des Wnt-Signalweges in den epithelialen Somiten ist bereits nachgewiesen worden. Experimente im Modellorganismus Hühnchen zeigten, dass Wnt-Signale der Dachplatte des Neuralrohrs bzw. des Oberflächenektoderms die Bildung des Dermomyotoms förderten, während SHH und Noggin, welche in der Bodenplatte des Neuralrohrs bzw. des Notochord exprimiert sind, die Sklerotomentwicklung induzierten (Wagner et al. 2000). Linker et al. (2005) konnten zeigen, dass Wnt6, welches von dem Ektoderm sekretiert wird, an den Frizzled7-Rezeptor, der in den epithelialen Somiten exprimiert wird, bindet. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges kontrolliert die Expression von Paraxis in dem dorsalen Bereich der epithelialen Somiten. Durch die Expression dieses bHLH-Proteins wird der epitheliale Charakter des dorsalen Bereiches der Somiten beibehalten (Linker et al. 2005). Um zu gewährleisten, dass in der ventralen Hälfte der epithelialen Somiten eine Epithel-Mesenchym-Transformation stattfinden kann, wird durch die SHH-vermittelte Erhöhung der Expression des Wnt-Antagonisten *Sfrp2* in diesem Bereich der Somiten der Einfluss des Wnt-Signalweges herabgesetzt. *Sfrp2* ist hinreichend, um die Dermomyotom-induzierende Funktion von Wnt1 und Wnt4 zu inhibieren, jedoch nicht die von Wnt3a (Lee et al. 2000). Somit bleibt

wahrscheinlich eine Wnt3a-vermittelte Aktivität des Signalweges im Sklerotom erhalten. Da *Sfrp2* als einziger bisher beschriebener Wnt-Antagonist im Sklerotom identifiziert wurde, ist dieses Gen ein geeigneter Kandidat, um durch *Uncx4.1* reprimiert zu werden. Eine Repression der *Sfrp2*-Transkription sollte in einer erhöhten Aktivität des Wnt-Signalweges resultieren, was zu einer Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten führen könnte.

Studien im Zuge der Nierenentwicklung in Mausembryonen zeigten, dass *Uncx4.1* in diesem Organsystem ein Zielgen des Wnt9b/ β -Catenin-Signalweges sein kann (Karner et al. 2011). Somit wäre es möglich, dass *Uncx4.1* als ein Zielgen des Wnt-Signalweges den eigenen Signalweg inhibiert. Ein solcher Mechanismus ist bereits für andere Zielgene des Wnt-Signalweges im PSM nachgewiesen worden. Dequeant et al. (2006) konnten zeigen, dass *Axin2*, *dapper homologue 1 (Dact1)* und *dickkopf homologue 1 (Dkk1)* in diesem Bereich des paraxialen Mesoderms die Aktivität des eigenen Signalweges inhibierten. Jedoch konnte in *T-Cre; Ctnnb1^{flLOF/+}*-Embryonen eine Expression von *Uncx4.1* detektiert werden (Dunty et al. 2008). Somit ist *Uncx4.1* in den Vorläuferstrukturen der Wirbel kein Zielgen des Wnt-Signalweges.

6.11 Die Regulation von *Tbx18*, *Tbx22* und *Uncx4.1*

Die Ausweitung der *Tbx18*-Expression in die kaudale Hälfte der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutante, der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}; Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutante sowie in der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}; Tbx18^{GFP/GFP}; Tbx22/Tbx22*-Nullmutante lässt die Vermutung zu, dass ein Repressor der *Tbx18*-Transkription in diese Hälfte der Somiten existiert, der entweder *Uncx4.1* selbst ist oder von diesem Transkriptionsfaktor reguliert wird. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war die Missexpression von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte der Somiten der *Tbx18^{cre/+}; Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen bzw. der *Pax3-cre/+; Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen hinreichend, einen Verlust der *Tbx18*-Expression herbeizuführen. Im Zuge der Analyse der *Tbx18*-Expression in *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten wurde geschlussfolgert, dass dieser T-Box-Transkriptionsfaktor durch den Notch-Signalweg reguliert wird. Der Verlust von *Dll1* verursachte eine Expansion der Expression von *Tbx18* in die kaudale Hälfte der Somiten (Bussen et al. 2004). Jedoch konnte mittels der *Tbx18^{cre/+}; Rosa^{NICD/+}*-Embryonen nachgewiesen werden, dass, trotz der Aktivierung der Notch-Zielgene in der kranialen Hälfte der differenzierten Somiten, die *Tbx18*-Expression in diesem Kompartiment erhalten blieb. Insofern muss geschlussfolgert werden, dass der Repressor von *Tbx18* kein Zielgen des Notch-Signalweges ist. Die Ausweitung der *Tbx18*-Expression in die kaudale Hälfte der Somiten der *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten ist das Resultat des

Verlustes der *Uncx4.1*-Expression in diesen Embryonen. Weiterhin ist *Tbx18* kein Zielgen des Wnt-Signalweges, da eine Expression dieses T-Box-Transkriptionsfaktors in den *T-Cre;Ctnnb1^{flLOF/+}*-Embryonen nachweisbar war (Dunty et al. 2008). In ähnlicher Weise war eine Ausweitung der *Tbx22*-Expression in die kaudale Hälfte der Somiten in den *Dll1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten nachzuweisen. Aufgrund der Aufrechterhaltung der A/P-Polarität in dem Somitomer S0 und in dem Somiten S1 in den *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten bzw. in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen war eine Veränderung der *Tbx22*-Expression in diesen Embryonen nicht sichtbar. Insofern könnten beide T-Box-Gene auf die gleiche Weise reguliert werden. Der Nachweis der *Uncx4.1*-Expression in der kaudalen Hälfte der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ};Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten zeigte, dass dieser Transkriptionsfaktor nicht durch *Tbx18* oder eines *Tbx18*-abhängigen Faktors in der kranialen Hälfte reprimiert wird. Jedoch ist dadurch nicht ausgeschlossen worden, dass kein Repressor von *Uncx4.1* in der kranialen Hälfte existiert. Weiterhin muss keine direkte Repression von *Uncx4.1* vorliegen, es könnte auch der Aktivator von *Uncx4.1* in der kranialen Somitenhälfte reprimiert werden.

6.12 *Uncx4.1* ist für die Aufrechterhaltung der Spezifizierung der kaudalen Somitenhälfte verantwortlich

Analog zu der Expression des transgenen *Tbx18*-Allels in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Tbx18/+}*-Embryonen, konnte auch in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen, trotz der mosaikartigen Expression des transgenen *Uncx4.1*-Allels infolge der X-Chromosominaktivierung in den weiblichen Embryonen, keine Transgenexpression in der kranialen Hälfte der Somiten nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen diese Embryonen eine reguläre A/P-Polarität der Somiten auf. Insofern schienen sich auch in den *Pax3-cre/+;Hprt^{Uncx4.1/+}*-Embryonen die kranialen und kaudalen Zellen voneinander separiert und ihrem Schicksal gemäß in dem jeweiligen Kompartiment angeordnet zu haben. Folglich kann geschlussfolgert werden, dass die Zellen durch die Expression des Transgens eine kaudale Identität erhalten haben, wodurch sie sich von den kranialen Zellen abgesondert und in der kaudalen Somitenhälfte angesammelt haben. Da in der kaudalen Hälfte GFP-positive Zellen nachzuweisen waren, ist ein Verlust dieser Zellen aufgrund von Apoptose unwahrscheinlich, jedoch nicht ausgeschlossen, da dieser Prozess spezifisch in der kranialen Hälfte stattfinden könnte.

Zusammenfassend ist somit gezeigt worden, dass *Uncx4.1* für die Aufrechterhaltung der *Dll1*-Expression in den epithelialen Somiten notwendig ist. *In vitro*-Analysen weisen darauf hin, dass *Uncx4.1* in diesem Zusammenhang einen Repressor des Wnt-Signalweges reprimieren könnte. Weiterhin ist die Begrenzung der *Tbx18*-Expression auf die kraniale Hälfte der

Somiten von *Uncx4.1* abhängig. Im Sklerotom ist die Expression von *Uncx4.1* für die Aufrechterhaltung der kaudalen Identität der Zellen des einen Kompartimentes verantwortlich. Die Aufrechterhaltung der Kompartimentierung des Sklerotoms ist wahrscheinlich das Resultat repulsiver Signale in den beiden Somitenhälften (Abb.6.12.1).

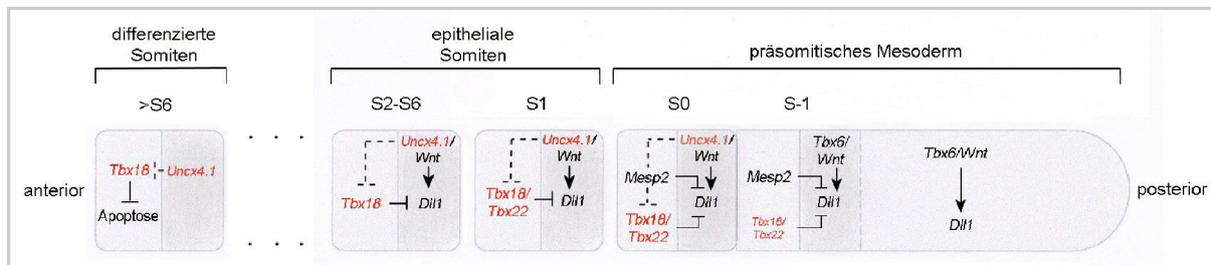


Abb.6.12.1: Schematische Darstellung der Funktion von *Tbx18*, *Tbx22* und *Uncx4.1* im paraxialen Mesoderm; die gestrichelten Linien stehen für eine mögliche direkte oder indirekte Regulation

6.13 Die Regulierung der Zelldichte der Kompartimente der Somiten ist für die Entwicklung der Wirbel von entscheidender Bedeutung

Mittels des Ergebnisses, dass eine *Uncx4.1*-Expression in den Zellen hinreichend ist, damit diese eine kaudale Identität bzw. im Fall von *Tbx18* eine kraniale Identität erhalten, konnten die Skelettphänotypen sämtlicher in dieser Arbeit untersuchten Mausstämme erklärt werden. Da sich die Zellen in dem kaudalen Kompartiment durch eine erhöhte Proliferationsrate auszeichnen, ist diese bei einer Posteriorisierung der Somiten ebenfalls in der kranialen Hälfte der Somiten nachzuweisen. Diese erhöhte Zellzahl in der kranialen Hälfte erklärt die Bildung ektopischer Skelettelemente in den *Tbx18^{GFP/GFP}*-Nullmutanten (Abb.6.13.1), den *Tbx18^{GFP/GFP};Tbx22^{-/-}*-Embryonen, den *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen, den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Tbx18VP16/Y}*-Embryonen, den *Tbx18^{cre/+};Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen und den *Pax3cre/+;Hprt^{Uncx4.1/Y}*-Embryonen. Im Gegensatz dazu, wird in der kranialen Hälfte Apoptose induziert. Insofern ist bei einer Anteriorisierung der Somiten das kaudale Kompartiment durch eine zu niedrige Zellzahl im Vergleich zu der Wildtypsituation charakterisiert. Diese erklärt, warum *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Embryonen (Abb.6.13.1) und *Pax3cre/+;Hprt^{Tbx18/Y}*-Embryonen durch fehlende Skelettstrukturen gekennzeichnet sind. Die gleichzeitige Abwesenheit von *Uncx4.1* und *Tbx18* resultiert in einer einheitlichen Zelldichte, die höher als charakteristisch für die kraniale Hälfte der Somiten und niedriger als spezifisch für das kaudale Kompartiment ist. Somit besitzen diese Embryonen eine zu niedrige Zelldichte in der kaudalen Hälfte und eine zu hohe in dem kranialen Kompartiment im Vergleich zu den Wildtypembryonen. Dieses führt zu der Bildung ektopischer, die Pedikel untereinander verbindenden Knorpelstrukturen

6. Diskussion

und dem Verlust der proximalen Rippen (Abb.6.13.1). Sowohl die Pedikel als auch die proximalen Rippen werden von der kaudalen Somitenhälfte gebildet (Huang et al. 1994; Huang et al. 1996; Aoyama et al. 2000). Infolge der zu geringen Zelldichte der kaudalen Hälfte in diesen Embryonen differenzieren sich zu wenige Zellen zu Chondroblasten, was zum Verlust der proximalen Rippen führt. Im Gegensatz dazu, ist eine geringe Zellzahl in der kranialen Hälfte offensichtlich für die Separierung der Pedikel notwendig. Bei einer Erhöhung der Zellzahl der kranialen Hälfte bilden die überschüssigen Chondroblasten ektopische Skelettstrukturen aus. Der Verlust der Induktion der Proliferation im kaudalen Kompartiment und der Apoptose in der kranialen Hälfte der Somiten der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ},Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten lässt vermuten, dass *Uncx4.1* und *Tbx18* an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind. Wie dieses auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist bisher nicht bekannt und bedarf der weiteren Erforschung.

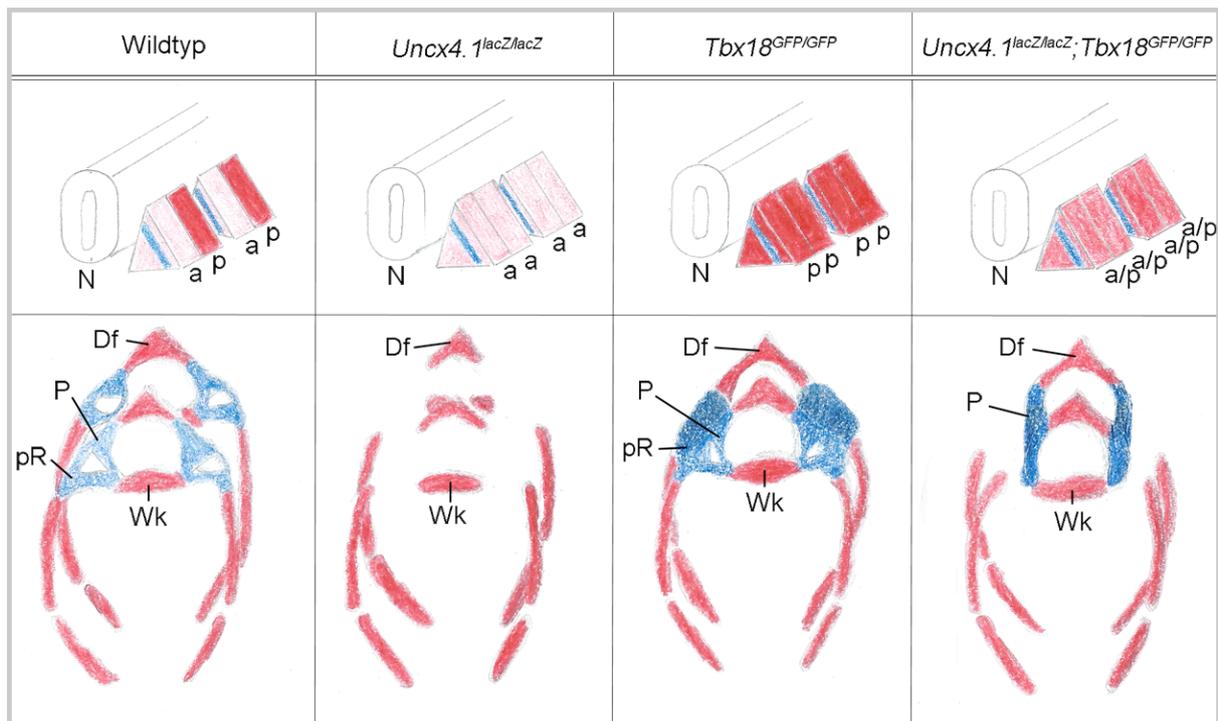


Abb.6.13.1: Schematische Darstellung der Polarisierung der Somiten sowie der Skelettphänotypen der Wildtypen, der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ}*-Mutanten, der *Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten und der *Uncx4.1^{lacZ/lacZ},Tbx18^{GFP/GFP}*-Mutanten. a = anterior (kranial); Df = Dornfortsatz; N = Neuralrohr; p = posterior (kaudal); P = Pedikel; pR = proximale Rippen; Wk = Wirbelkörper; In Blau ist der Bereich der Somiten dargestellt, der die Pedikel und proximalen Rippen bildet.

7. Literaturverzeichnis

- Abu-Abed, S.** 2001. The retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity and development of posterior structures. *Genes Dev.* 15: 226-240
- Airik, R., Bussen, M., Singh, M. K., Petry, M. und Kispert, A.** 2006. Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme. *J. Clin. Invest.* 116(3): 663-674
- Airik, R., Trowe, M. O., Foik, A., Farin, H. F., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Schweizer, M., Scherer, G., Kist, R. und Kispert, A.** 2010. Hydroureteronephrosis due to loss of Sox9 regulated smooth muscle cell differentiation of the ureteric mesenchyme. *Hum. Mol. Genet.* 129(1): 79-90
- Andreou, A. M., Pauws, E., Jones, M. C., Singh, M. K., Bussen, M., Doudney, K., Moore, G. E., Kispert, A., Brosens, J. J. und Stanier, P.** 2007. TBX22 missense mutations found in patients with X-linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation and transcriptional repression. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 700-712
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B. und Herrmann, B. G.** 2003. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4(3): 395-406
- Aulehla, A., Wiegraebe, W., Baubet, V., Wahl, M. B., Deng, C., Taketo, M., Lewandoski, M. und Pourquie, O.** 2008. A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nature Cell Biol.* 10(2): 186-193
- Ayoama, H. und Asamoto, K.** 2000. The developmental fate of the rostral/caudal half of a somite for vertebra and rib formation: experimental confirmation of the resegmentation theory using chick-quail chimeras. *Mech. Dev.* 99: 71-82
- Beckers, J., Caron, A., Harbe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J. und Gossler, A.** 2000. Distinct regulatory elements direct Delta 1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech. Dev.* 95: 23-34
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S. und Kageyama, R.** 2001b. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev.* 15(20): 2642-2647

- Bettenhausen, B. und Gossler, A.** 1995. Efficient isolation of novel mouse genes differentially expressed in early postimplantation embryos. *Genomics* 28: 436-441
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L. und Gossler, A.** 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121: 2407-2418
- Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C. C., Nash, A. und Hilton, D.** 1998. Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev. Biol.* 194: 135-51
- Bray, S. J.** 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(9): 678- 689
- Brent, A. E., Schweitzer, R. und Tabin, C. J.** 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113: 235-248
- Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A. und Olson, E. N.** 1996. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* 384(6609): 570- 573
- Burnside, B.** 1973. Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation. *Am. Zool.* 13: 989-1006
- Bush, J. O., Lan, Y., Maltby, K. M. und Jiang, R.** 2002. Isolation and developmental expression analysis of Tbx22, the mouse homolog of the human X-linked cleft palate gene. *Dev. Dyn.* 225: 322-326
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A. und Kispert, A.** 2004. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* 18(10): 1209-1221
- Candia, A. F., Hu, J., Crosby, J., Lalley, P. A., Noden, D., Nadeau, J. H. und Wright, C. V.** 1992. Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. *Development* 116: 1123-1136
- Chapman, D. L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L. M. und Papaioannou, V. E.** 1996. Tbx6, a mouse T-box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev. Biol.* 180: 534-542

- Chapman, D. L. und Papaioannou, V. E.** 1998. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* 391: 695-697
- Christ, B., Jacob, H. J. und Jacob, M.** 1974. [Somitogenesis in the chick embryo. Determination of the segmentation direction]. *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft* 68: 573- 579
- Christ, B.** 1975. Die Entwicklung der Körperwandmetamerie, experimentelle Untersuchung an Hühnerembryonen, Habilitationsschrift, Ruhr-Universität Bochum
- Christ, B. und Wilting, J.** 1992. From Somites to vertebral column. *Ann. Anat.* 174: 23-32
- Christ, B. und Ordahl, C. P.** 1995. Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.* 191(5): 381- 396
- Christ, B., Huang, R. und Wilting, J.** 2000. The development of the avian vertebral column. *Anat. Embryol.* 202(3): 179-194
- Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trowe, M. O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F. und Kispert, A.** 2006. Formation of the venous pole of the heart from an *Nkx2-5*-negative precursor population requires *Tbx18*. *Circ Res.* 23; 98(12):1555-1563
- Cordes, R., Schuster-Gossler, K., Serth, K. und Gossler, A.** 2004. Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development* 131(6):1221-2133
- Crooke, J. und Zeeman, E. C.** 1976. A clock and wavefront model for the control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 58: 455-476
- Dale, J. K.** 2006. Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis. *Dev. Cell* 10: 355-366
- Debrulle, J. und Pourquie, O.** 2004. *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427(6973): 419- 422
- Del Barco Barrantes, I., Elia, A. J., Wunsch, K., Hrabe De Angelis, M., Mak, T., Rossant, J., Conlon, R., Gossler, A., und de la Pompa, J.** 1999. Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* 9: 470 – 480

- Delfini, M. C., Dubrulle, J., Malapert, P., Chal, J. und Pourquie, O.** 2005. Control of the segmentation process by graded MAPK/ERK activation in the chick embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(32): 11343- 11348
- Dequeant, M. L., Glynn, E., Gaudenz, K., Wahl, M., Chen, J., Mushegian, A. und Pourquie, O.** 2006. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science* (New York) 314(5805): 1595-1598
- Deutsch, U., Dressler, G. R. und Gruss, P.** 1988. Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53: 617-25
- Diez del Corral, R.** 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40: 65-79
- Donwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M. und Beddington, R.** 1997. Mouse Dll3: A novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* (Cambridge, UK) 124: 3065-3076
- Duband, J. L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M. und Thiery, J. P.** 1987. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J.Cell Biol.* 104: 1361-1374
- Duband, J. L., Volberg, T., Sabanay, I., Thiery, J. P. und Geiger, B.** 1988. Spatial and temporal distribution of the adherens-junction-associated adhesion molecule A-NCAM during avian embryogenesis. *Development* 103: 325-344
- Dubrulle, J., McGrew, M. J. und Pourquie, O.** 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 106(2): 219-232
- Dunty, W. C., Biris, K. K., Chalamalasetty, R. B., Taketo, M. M., Lewandoski, M. und Yamaguchi, T. P.** 2008. Wnt3a/-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. *Development* 135: 85-94
- Ebensperger, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B., Mizutani, Y., Christ, B., Balling, R. und Koseki, H.** 1995. Pax1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. *Anat Embryol.* 191: 297-310

- Edmondson, D. G. und Olson, E. N.** 1989. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3: 628-40
- Ewan, K. B. R. und Everett A. W.** 1992. Evidence for resegmentation in the formation of the vertebral column using the novel approach of retroviral-mediated gene transfer. *Exp. Cell Res.* 198: 315-320
- Fan, C. M. und Tessier-Lavigne, M.** 1994. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79: 1175-1186
- Fan, C. M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D. T., Beachy, P. A. und Tessier-Lavigne, M.** 1995. Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* 81: 457-465
- Farin, H. F., Bussen, M., Schmidt, M. K., Singh, M. K., Schuster-Gossler, K. und Kispert, A.** 2007. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *JBC* 282(35): 25748-25759
- Feller, J., Schneider, A., Schuster-Gossler, K. und Gossler, A.** 2008. Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation, *Genes Dev.* 22: 2166-2171
- Ferjentsik, Z.** 2009. Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites. *PLoS Genet.* 5: e1000662
- Forsberg, H., Crozet, F. und Brown, N. A.** 1998. Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr. Biol.* 8(18): 1027-1030
- Furumoto, T., Miura, N., Akasaka, T., Mizutani-Koseki, Y., Sudo, H., Fukuda, K., Maekawa, M., Yuasa, S., Fu, Y., Moriya, H., Taniguchi, M., Imai, K., Dahl, E., Balling, R., Pavlova, M., Gossler, A. und Koseki, H.** 1999. Notochord-dependent expression of Mfh1 and Pax1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. *Dev. Biol.* 210: 15-29

7. Literaturverzeichnis

Galceran, J. 2004. Lef1-mediated regulation of delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis. *Genes Dev.* 18: 2718-2723

Gammill, L. S. und Bronner-Fraser, M. 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 795-805

Georges-Labouesse, E. N., George, E. L., Rayburn, H. und Hynes, R. O. 1996. Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev. Dyn.* 207: 145-156

Gilbert, S. F. 2006. *Developmental Biology*. 8th edition, Sinauer Associates Inc.12

Gossler, A. 2002. Somitogenesis: Segmentation of the Paraxial Mesoderm and the delineation of Tissue Compartments in Mouse Development

Goulding, M., Lumsden, A. und Paquette, A. J. 1994. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120: 957-971

Griffith, C. M., Wiley, M. J. und Sanders, E. J. 1992. The vertebrate tail bud: Three germ layers from one tissue. *Anat. Embryol.* 185: 101-113

Hansen; J. T. Netter's clinical anatomy 2nd edition

Harbe de Angelis, M., McIntyre II, J. und Gossler, A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386: 717-721

Hatta, K., Takagi, S., Hajime, F. und Takeichi, M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of n-cadherin cell adhesion molecule correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev. Biol.* 120: 215-227

Herrmann, B. G. 1991. Expression pattern of the brachyury gene in whole mount T^{wis}/T^{wis} mutant embryos. *Development* 116: 1203-1220

Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K. und Kageyama, R. 2002. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* (New York) 298(5594): 840-843

- Hofmann, M.** 2004. Wnt signaling, in synergy with T/Tbx6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev.* 18: 2712-2717
- Horikawa, K. R. G.** 1999. Adhesive subdivisions intrinsic to epithelial somites. *Dev. Biol.* 215: 182-189
- Huang, R., Zhi, Q., Wilting, J. und Christ, B.** 1994. The fate of somitocoel cells in avian embryos. *Anat. Embryol.* 190(3): 243-250
- Huang, R., Zhi, Q., Neubuser, A., Muller, T. S., Brand-Saberi, B., Christ, B. und Wilting, J.** 1996. Function of somite and somitocoel cells in the formation of the vertebral motion segment in avian embryos. *Acta anat.* 155(4): 231-241
- Huang, R., Zhi, Q., Brand-Saberi, B. und Christ, B.** 2000a. New experimental evidence for somite resegmentation, *Anat. Embryol.* 202: 195-200
- Jacob, M., Jacob H. J. und Christ, B.** 1975b. Die frühe Differenzierung des chordanahen Bindegewebes. Raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an Hühnerembryonen. *Experientia* 31: 1083-1086
- Jacob, M., Christ, B. und Jacob, H. L.** 1979. The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. An ultrastructural study. *Anat. Embryol* 157: 291-309
- Jacob, M., Christ, B. und Grim, M.** 1982. Problems of muscle pattern formation and of neuromuscular relations in avian limb development. In: Kelley RO, Goetinck PF, MacCabe JA, editors. Proceeding of the IIIrd International Conference on Limb Morphogenesis and Regeneration Storrs CT. New York: Alan R. Liss. Inc., Part B p 333-341
- Johnson, R. L., Laufer, E., Riddle, R. D. und Tabin, C.** 1994. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79: 1165-1173
- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D. und Pourquie, O.** 2000. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* (Cambridge, England) 127(7): 1421-1429
- Karfunkel, P.** 1971. The role of microtubules and microfilaments in neurulation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 25: 30-56

- Karner, C. M., Das, A., Ma, Z., Self, M., Chen, C., Lum, L., Oliver, G. und Carroll, T. J.** 2011. Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. *Development* 138: 1247-1257
- Katoh, M. und Katoh, M.** 2007. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International journal of oncology* 31(2): 461- 466
- Kawamura, A., Koshida, S. und Takada, S.** 2008. Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators. *Mol. Cell Biol.* 28: 3236–3244
- Keynes, R. J. und Stern, C. D.** 1984. Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* 310: 786-789
- Kispert, A. und Herrmann, B. G.** 1993. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* 12: 3211-3220
- Kispert, A.** 1995. The Brachyury protein: a T-domain transcription factor. *Sem. Dev. Biol.* 6: 395-403
- Kondow, A., Hitachi, K., Okabayashi, K., Hayashi, N. und Asashima, M.** 2007. Bowline mediates association of the transcriptional corepressor XGrg-4 with Tbx6 during somitogenesis in *Xenopus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359: 959–964
- Kopan, R., Nye, J. S. und Weintraub, H.** 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix- loop- helix region of MyoD. *Development* (Cambridge, England) 120(9): 2385-2396
- Kragtorp, K. und Miller, J. R.** 2007. Integrin α 5 is required for somite rotation and boundary formation in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 236: 2713-2720
- Kraus, F., Haenig, B. und Kispert, A.** 2001. Cloning and expression analysis of the mouse T- box gene Tbx18. *Mech. Dev.* 100(1): 83- 86
- Kuan, C-Y. K., Tannahill, D., Cook, G. M. W. und Keynes, R. J.** 2004. Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mech. Dev.* 121: 1055–1068

- Lawson, K. A., Meneses, J. J. und Pedersen, R. A.** 1991. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113: 891-911
- Lawson, K. A. und Pedersen, R. A.** 1992. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. *Ciba Found Symp.* 165: 3-21
- Lee, C., Buttitta, L., May, N., Kispert, A. und Fan, C.** 2000. SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with Wnt4 in the somite mesoderm. *Development* 127: 109-118
- Leimeister, C., Dale, K., Fischer, A., Klamt, B., Hrabe de Angelis, M., Radtke, F., McGrew, M. J., Pourquie, O. und Gessler, M.** 2000. Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. *Dev. Biol.* 227(1): 91-103
- Leitges, M., Neidhardt, L., Haenig, B., Herrmann, B. G. und Kispert, A.** 2000. The paired homeobox gene *Uncx4.1* specifies pedicles, transverse processes and proximal ribs of the vertebral column. *Development* (Cambridge, England) 127(11): 2259- 2267
- Li, J., Chen, F. und Epstein, J. A.** 2000. Neural crest expression of Cre recombinase directed by the proximal *Pax3* promoter in transgenic mice. *Genesis* 26: 162-4
- Linask, K. K.** 1998. N-cadherin/catenin-mediated morphoregulation of somite formation. *Dev. Biol.* 202: 85-102
- Linker, C., Lesbros, C., Gros, J., Burrus, L. W., Rawls, A. und Marcelle, C.** 2005. Beta-catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Development* 132: 3895–3905
- Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C. und Fehling, H. J.** 2007. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur. J. Immunol.* 37: 43-53
- Mallo, M. und Brändlin, I.** 1997. Segmental identity can change independently in the hindbrain and rhombencephalic neural crest. *Dev. Dyn.* 210: 146–156

- Mansouri, A., Yokota, Y., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Gruss, P.** 1997. Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney and nervous system. *Dev. Dyn.* 210(1): 53- 65
- Mansouri, A., Voss, A. K., Thomas, T., Yokota, Y. und Gruss, P.** 2000. *Uncx4.1* is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of *Pax9*. *Development* (Cambridge, England) 127(11): 2251- 2258
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland R. M. und McMahon, A. P.** 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 12: 1438-1452
- Miller, D. M., Shen, M. M., Shamu, C. E., Bürglin, T. R., Ruvkun, G., Dubois, M. L., Ghee, M., Wilson, L.** 1992. *C. elegans unc-4* gene encodes a homeodomain protein that determines the pattern of synaptic input to specific motor neurons. *Nature* 355: 841 – 845
- Milton, H. und Goslow, G. E.** 2003. Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere. Verlag: Springer, Berlin; Auflage: 1. A.
- Mizutani, T., Taniguchi, Y., Aoki, T., Hashimoto, N. und Honjo, T.** 2001. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16): 9026- 9031
- Monsoro-Burq, A. H., Bontoux, M., Teillet, M. A. und Le Douarin, N.** 1994. Heterogeneity in the development of the vertebra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10435-10439
- Monsoro-Burq, A. H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P. und Le Douarin, N.** 1996. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* 122: 3607-3616
- Monsoro-Burq, A. H. und Le Douarin, N.** 2000. Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. In: Ordahl CP(ed) *Somitogenesis part 2* Academic Press, London, pp 43-75
- Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M. und Saga, Y.** 2005. The *Mesp2* transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435(7040): 354-359

- Moorman, A. F., Houweling, A. C., de Boer, P. A. und Christoffels, V. M.** 2001. Sensitive Nonradioactive Detection of Mrna in Tissue Sections: Novel Application of the Whole-Mount in Situ Hybridization Protocol. *J. Histochem. Cytochem.* 49(1): 1-8
- Müller, T.S., Ebensperger, C., Neubüser, A., Koseki, H., Balling, R., Christ, B. und Wilting, J.** 1996. Expression of avian Pax1 and Pax9 in the sclerotomes is controlled by axial and lateral tissues, but intrinsically regulated in pharyngeal endoderm. *Dev. Biol.* 178: 403-417
- Müller, Hassel** 2003. Entwicklungsbiologie, 3. Auflage, Springer-Verlag
- Murtaugh, L. C., Zeng, I., Chyung, J. H. und Lassar, A. B.** 2001. The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Dev. Cell* 1: 411-422
- Nagele, R. G. und Lee, H.** 1987. Studies on the mechanisms of neurulation in the chick: Morphometric analysis of the relationship between regional variations in cell shape and sites of motive force generation. *J. Exp.* 2001241:197- 205
- Nakajima, Y., Morimoto, M., Takahashi, Y., Koseki, H. und Saga, Y.** 2006. Identification of Epha4 enhancer required for segmental expression and the regulation by Mesp2. *Development* 133: 2517-2525
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K. und Takahashi, Y.** 2004. Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of cdc42 and rac1. *Dev. Cell* 7: 425-438
- Neidhardt, L., Kispert, A. und Hermann, B.G.** 1997. A mouse gene of the paired- related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. *Dev. Genes Evol.* 207: 330- 339
- Neubüser, A., Koseki, H. und Balling, R.** 1995. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev. Biol.* 170: 701-716
- Nieto, M. A., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. und Wilkinson, D. G.** (1992). A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development* 116: 1137-1150

- Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C. X. und Kageyama, R.** 2007. The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. *Dev. Cell* 13(2): 298-304
- Oginuma, M., Niwa, Y., Chapman, D. L. und Saga, Y.** 2008. Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. *Development* 135: 2555-2562
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. und Honjo, T.** 1995. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* 121:3291-3301
- Olivera-Martinez, I., Coltey, M., Dhouailly, D. und Pourquie, O.** 2000. Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development* 127: 4611-4617
- Pauws, E., Hoshino, A., Bentley, L., Prajapati, S., Keller, C., Hammond, P., Martinez-Barbera, J. P., Moore, G. E. und Stanier, P.** 2009. Tbx22null mice have a submucous cleft palate due to reduced palatal bone formation and also display ankyloglossia and choanal atresia phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 18: 4171-4179
- Peters, H., Wilm, B., Sakai, N., Imai, K., Maas, R. und Balling, R.** 1999. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development* 126: 5399-5407
- Poelmann, R. E.** 1981. The formation of the embryonic mesoderm in the early post-implantation mouse embryo. *Anat. Embryol.* 162: 29-40
- Pourquie, O., Coltey, M., Breant, C. und Le Douarin, N. M.** 1995. Control of somite patterning by signals from the lateral plate. *Proc. Natl. Sci. USA* 92: 3219-3233
- Pourquie, O., Fan, C. M., Coltey, M., Hirsinger, E., Waranabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M. und Le Douarin, N. M.** 1996. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: A role of BMP4. *Cell* 84: 461-471
- Pourquie, O. und Tam, P. P.** 2001. A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Dev. Cell* 1(5): 619-620

- Probstmeier, R., Bilz, A. und Schneider Schaulies, J.** 1994. Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid during early mouse embryogenesis. *J. Neurosci. Res.* 37: 324-335
- Réaume, A. G., Colon, R. A., Zirnbibl, R., Yamaguchi, T. P. und Roussant, J.** 1992. Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 154: 377-387
- Rickmann, M., Fawcett, L. W. und Keynes, R. J.** 1985. The migration of neural crest cells and growth of motor axons through the rostral half of chick somite. *J. Embryol. Exp. Morph.* 90: 437-455
- Rodrigo, I., Hill, R. E., Balling, R., Münsterberg, A. und Imai, K.** 2003. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development* 130: 473-482
- Rodrigo, I., Bovolenta, P., Mankoo, B. S. und Imai, K.** 2004. Meox homeodomain proteins are required for Bapx1 expression in the sclerotome and activate its transcription by direct binding to its promotor. *Mol. Cell Biol.* 24: 2757-2766
- Rovescalli, A. C., Asoh, S. und Nirenberg, M.** (1996). Cloning and characterization of four murine homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 10691 – 10696
- Saga, Y., Hata, N., Koseki, H. und Taketo, M. M.** 1997. Mesp2: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 11(14): 1827- 1839
- Saga, Y.** 2007. Segmental Border Is Defined by the Key Transcription Factor Mesp2, by Means of the Suppression of Notch Activity. *Dev. Dyn.* 236: 1450–1455
- Sanders, E. J.** 1997. Cell death in the avian sclerotome. *Dev. Biol.* 192: 551-563
- Sasaki, N., Kiso, M., Kitagawa, M. und Saga, Y.** 2011. The repression of Notch signaling occurs via the destabilization of mastermind-like 1 by Mesp2 and is essential for somitogenesis. *Development* 138: 55-64
- Sawada, A.** 2001. Fgf/MAPK signaling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 128: 4873-4880
- Schoenwolf, G. C.** 1984. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am. J. Anat.* 169: 361-376

Schuster-Gossler, K., Cordes, R. und Gossler, A. 2007. Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *PNAS* 104: 537-542

Smith, J. L. und Schoenwolf, G. C. 1989. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J. Exp. Zool.* 250(1): 49-62

Smith, J. L. und Schoenwolf, G. C. 1997. Neurulation: Coming to closure. *Trends Neurosci.* 20: 510-517

Solursh, M., Fisher, M., Meier, S. und Singley, C. T. 1979. The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 54: 75-98

Stern, C. D. und Keynes, R. J. 1987. Interactions between somite cells: the formation and maintenance of segment boundaries in the chick embryo. *Development* (Cambridge, England) 99(2): 261- 272

Straaten, H. W. M., Hekking, J. W. M., Wiertz-Hoessels, E. J. L. M., Thors, F. und Drukker, J. 1988. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat. Embryol.* 177: 317-324

Swiatek, P. und Gridley, T. 1993. Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev.* 7: 2071–2084

Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A. und McMahon, A. P. 1994. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8(2): 174-189

Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H. und Saga, Y. 2000. Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nature genetics* 25(4): 390- 396

Takahashi, Y., Inoue, T., Gossler, A. und Saga, Y. 2003. Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* (Cambridge, England) 130(18): 4259- 4268

Takahashi, Y., Yasuhiko, Y., Kitajima, S., Kanno, J. und Saga, Y. (2007). Appropriate suppression of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Dev. Biol.* 304: 593-603

- Tam, P. P. und Beddington, R. S.** 1986. A study of the pattern of prospective somites in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Journal of embryology and experimental morphology* 92: 269- 285
- Tam, P. P. und Beddington, R. S.** 1987. The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* (Cambridge, England) 99(1): 109- 126
- Tam, P. P. und Tam, S. S.** 1992. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and the tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. *Development* 115: 703-715
- Tam, P. P. L. und Trainor, P. A.** 1994. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat. Embryol.* 189: 275-305
- Tam, P. P., Goldman, D., Camus, A. und Schoenwolf, G. C.** 2000. Early events of somitogenesis in higher vertebrates: allocation of precursor cells during gastrulation and the organization of a meristic pattern in the paraxial mesoderm. *Curr. Dev. Biol.* 47: 1- 32
- Teppner, I., Becker, S., de Angelis, M. H., Gossler, A. und Beckers, J.** 2007. Compartmentalised expression of Delta- like 1 in epithelial somites is required for the formation of intervertebral joints. *BMC Dev. Biol.* 7: 68
- Trowe, M. O., Maier, H., Schweizer, M. und Kispert, A.** 2008. Deafness in mice lacking the T-box transcription factor Tbx18 in otic fibrocytes. *Development* 135(9): 1725-1734
- Vermot, J. und Pourquie, O.** 2005. Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* 435: 215-220
- Von Stetina, S. E., Fox, R. M. und Watkins, K. L.** 2007. Unc-4 represses CEH-12/HB9 to specify synaptic inputs to VA motor neurons in *C.elegans*. *Genes Dev.* 21: 332-346
- Wagner, J., Schmidt, C., Nikovits, W. und Christ, B.** 2000. Compartmentalization of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by Wnt-expression. *Dev. Biol.* 228: 86-94
- Wahl, M. B., Deng, C., Lewandoski, M. und Pourquie, O.** 2007. FGF signaling acts upstream of the Notch and Wnt signaling pathways to control segmentation clock oscillations in mouse somitogenesis. *Development* (Cambridge, England) 134(22): 4033- 4041

- Wang, H. U. und Anderson, D. J.** (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18: 383-96
- Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R. und Takahashi, Y.** 2009. Ephrin B2 coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 7467-7472
- Wehn, A. K. und Chapman, D. L.** 2010. Tbx18 and Tbx15 null-like phenotypes in mouse embryos expressing Tbx6 in somitic and lateral plate mesoderm. *Dev. Biol.* 347: 404-413
- Williams, R., Lendahl, U. und Lardelli, M.** 1995. Complementary and combinatorial pattern of Notch gene family expression during early mouse development. *Mech. Dev.* 53: 357-368
- Wilson, V. und Beddington, R. S. P.** 1996. Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech. Dev.* 55: 79-89
- Wilting, J., Kurz, H., Brand-Saberi, B., Steding, G., Yang, Y. X., Hasselhorn, M. M., Epperlein, H. H. und Christ, B.** 1994. Kinetics and differentiation of somite cells forming the vertebral column: studies on human and chick embryos. *Anat. Embryol.* 190: 573-581
- Winnier, A. R., Meir, J. Y.-J., Ross, J. M., Tavernarakis, N., Driscoll, M., Ishihara, T., Katsura, I. und Miller, D. M.** 1999. UNC-4 / UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13: 2774–2786
- Wolpert, Tickle** 2011. Principles of Development, 4th edition, Oxford University press
- Yamaguchi, T. P., Colon, R. A. und Roossant, J.** 1992. Expression of the fibroblast growth factor receptor FGFR-1/flg during gastrulation and segmentation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 152: 75-88
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemayer, M. und Roossant, J.** 1992. Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* 8: 3032-3044
- Yamaguchi, T. P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N. und McMahon, A. P.** 1999. T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev.* 13: 3185-3190

Yasuhiko, Y., Haraguchi, S., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kanno, J. und Saga, Y. 2006. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10): 3651- 3656

Yoshikawa, Y., Fujimori, T., McMahon, A. P. und Takada, S. 1997. Evidence that the absence of Wnt3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev. Biol.* 183: 234-242

Zeng, L., Kempf, H., Murtaugh, L. C., Sato, M. E. und Lassar, A. B. 2002. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev.* 16: 1990-2005

8. Danksagung

Ich möchte mich bei all denen ganz herzlich bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit auf verschiedene Art und Weise unterstützt haben.

Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei...

Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert für die Möglichkeit, dieses Projekt zu bearbeiten und für die wertvolle Hilfestellung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen für den Prüfungsvorsitz.

Dr. Henner Farin, Tanja Matkovic, Dr. Manvendra Singh und Dr. Karin Schuster-Gossler für ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Marianne Petry, für die hervorragende Organisation des Labors und für die große Unterstützung während der gesamten Zeit der Dissertation.

Birte Eckstein für die gute Zusammenarbeit bei dem in silico-Screen.

all denen, die durch die Bereitstellung von transgenen Mauslinien und Materialien diese Arbeit möglich gemacht haben.

meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Kispert und dem Institut für Molekularbiologie für die gute Zusammenarbeit.

bei meinen Eltern, deren ständige Unterstützung mir die Kraft gegeben hat, auch schwierige Situationen zu meistern und ohne die es diese Arbeit wahrscheinlich nicht geben würde.

9. 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)

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martina Schmidt
Wohnort	Freienwalder Str.12, 30629 Hannover
Geburtsdatum, -ort	31.07.1980, Berlin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schule

1987-1993	Grundschule, Berlin
1993-2000	Stauffenberg-Gymnasium, Berlin
23.06.2000	Abitur am Stauffenberg-Gymnasium, Berlin

Studium

10/2000 – 04/2006	Biologie-Studium an der Freien Universität, Berlin
10/2000 – 09/2002	Grundstudium
10/2002 – 07/2005	Hauptstudium: Schwerpunkte: Genetik, Zellbiologie, Ökologie Nebenfach: Pharmazie
08/2005 – 04/2006	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Freien Universität, Berlin Thema der Diplomarbeit: „Die Beteiligung des Delta/Notch-Signalwegs bei der Bildung der Parapodienanlagen von <i>Platynereis dumerilii</i> “

Berufliche Daten

- 05/2006 – 08/2006 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der Freien
Universität, Berlin
- 09/2006 – heute Promotion am Institut für Molekularbiologie der MHH in der
Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert
Thema: „Untersuchung zur Funktion der Transkriptionsfaktoren
Tbx18 und Uncx4.1 in der Somitogenese der Maus“

Publikation

Farin, H. F., Bussen, M., **Schmidt, M. K.**, Singh, M. K., Schuster- Gossler, K. und Kispert, A. 2007. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *The Journal of biological chemistry* 282(35): 25748- 25759