Die Analyse der *Dkk1*-Regulation während der Embryonalentwicklung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver Lieven

aus Brüggen

November 2008

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Rüther
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Wagner
Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Grundlagen 1

1.2 Wnt-Proteine und deren Signalwege 3

1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg im Zytoplasma 4

1.2.2 Der kanonische Wnt-Signalweg innerhalb des Nukleus 5

1.3 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Embryonalentwicklung 6

1.3.1 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Augenentwicklung 7

1.3.2 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Gliedmaßenentwicklung 9

1.3.3 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Nierenentwicklung 10

1.4 Wnt-Zielgene 11

1.5 Modulation des Wnt-Signalweges und dessen entwicklungsbiologische Relevanz 12

1.6 Mechanismen der Dkk1-vermittelten Wnt-Inhibition 14

1.7 Funktionen von *Dkk1* während der Embryonalentwicklung 15

1.7.1 Funktion von *Dkk1* während der Kopfinduktion 15

1.7.2 Funktion von *Dkk1* während der Gliedmaßenentwicklung 16

1.7.3 Funktion von *Dkk1* während der Segmentierung und Osteoblastenentwicklung 16

1.8 Veränderte *Dkk1*-Regulation und deren Assoziation mit unterschiedlichen Krankheitsformen 17

1.9 Regulation der *Dkk1*-Expression 18

1.10 Mechanismen der Gen-Regulation in cis: Promotoren und Enhancer 19

1.10.1 Phylogenetisch konservierte, nicht-kodierende Sequenzen (CNEs) 21

1.11 Ziel der Arbeit 22

2 MATERIAL & METHODEN **23**

2.1 Chemikalien, Standardlösungen und Nährmedien 23

2.2 Erzeugung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen 26

2.3 Dephosphorylierung von DNA 26

2.4 Gelelektrische Auftrennung von DNA-Fragmenten 26

2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 27

2.6 Ligation von DNA-Fragmenten 27

2.7 Transformation eines Ligationsansatzes in kompetente E.*coli*-Zellen 28

2.8 Präparation von DNA aus *E.coli*-Plasmiden 28
2.8.1 Präparative Isolierung von Plasmiden mit der Minipräparation 29
2.8.2 Präparative Isolierung von Plasmiden mit der Maxipräparation 29
2.9 Gewinnung von DNA aus Maus-Gewebebiopsien 30
2.10 RNA-Isolierung aus Mausembryonen 30
2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA 31
2.12 Amplifikation von DNA mittels PCR 31
2.12.1 Verwendete Oligonukleotide 33
2.12.2 Reverse Transkription 34
2.12.3 Mutagenese 35
2.13 DNA-Sequenzierung 35
2.14 Generierung transgener Mäuse 35
2.14.1 Isolierung von DNA-Fragmenten für die Mikroinjektion 36
2.14.2 Vasektomieren männlicher Mäuse 36
2.14.3 Superovulation und Isolation fertilisierter Oozyten 36
2.14.4 Pronukleare DNA-Mikroinjektion in Mauszygoten 37
2.14.5 Embryotransfer in das Ovidukt von Rezipienten-Mäusen 38
2.15 Nachweis der Reportergen-Aktivität 38
2.16 Hybridisierungstechniken: *in situ* Hybridisierung 39
2.16.1 Synthese der komplementären RNA-Sonden 39
2.16.2 Ganzkörper- oder „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung 40
2.16.2.1 Isolierung und Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung 40
2.16.2.2 Entfernung unspezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation 41
2.16.2.3 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper 41
2.16.3 *In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten 41
2.17 Histologie 42
2.17.1 Anfertigung von Paraffindünnschnitten 42
2.17.2 Hämalaun/Eosin-Färbung 43
2.18 Proteinbiochemische Methoden 44
2.18.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen 44
2.18.2 Gelretardationsanalyse 45
2.18.3 Gelektrophoretische Trennverfahren 46

2.18.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 46
2.18.3.2 Native Polyacrylamidelekrophorese 47
2.18.4 Proteinnachweis durch Immunodetektion 47
2.18.5 Detektion von radioaktiv-markierten Proteinen mit dem Phosphoimager 49
2.19 Tierhaltung und Mausstämme 49
2.20 Isolierung definierter Embryonalstadien 50
2.21 Dokumentation 50
2.22 Identifizierung von CNEs 50
2.23 *lacZ*-Reporterkonstrukte 51

3 ERGEBNISSE 52
3.1 Analyse des regulatorischen Potentials eines 1,8kb *Dkk1*-Promotorfragmentes in transient transgenen Embryonen 52
3.2 Identifizierung unterschiedlicher CNEs im Bereich des *Dkk1*-Lokus 53
3.3 Analyse des regulatorischen Potentials identifizierter CNEs 54
3.4 Analyse des regulatorischen Potentials der CNEs 25, 114, 190 und 195 durch die Generierung einer transgenen Mauslinie 55
3.5 Charakterisierung der Reporteraktivität in neuroektodermalen Derivaten 56
3.6 Von der *Dkk1*-Expression abweichende Reporteraktivität 58
3.6.1 Reportergen-Aktivität während der Gliedmaßenentwicklung 58
3.6.1.1 Analyse des Einflusses einer zusätzlichen anterioren *Shh*-Expression auf die Reporteraktivität in den Gliedmaßen 59
3.6.2 Reporteraktivität innerhalb des vomeronasalen Organs 60
3.7 Charakterisierung des regulatorischen Potentials der CNEs 25, 114, 190 und 195 61
3.8 Analyse der *Dkk1*-Regulation während der Augenentwicklung 62
3.8.1 Analyse der Lef1 vermittelten *Dkk1*-Aktivierung 63
3.8.2 Analyse der $Dkk1^{+/-}$-Haploinsuffizienz während der Augenentwicklung 65
3.8.3 Analyse des Einflusses der reduzierten Dkk1-Aktivität auf das Reportermuster in den Augenanlagen 66
3.8.4 Analyse des Einflusses der *Dkk1*-Haploinsuffizienz auf den kanonischen Wnt-Signalweg 67

3.9 Identifikation zusätzlicher *Dkk1*-Expressionsdomänen 68
3.9.1 *Dkk1*-Expression im otischen Vesikel 68
3.9.2 *Dkk1*-Expression während der Organogenese des posterioren Embryos, sowie im Metanephros und den externen Genitalanlagen 69
3.9.3 *Dkk1*-Expression im Genital-Tuberkel 71
3.10 Funktion von *Dkk1* während der Urogenitalentwicklung 72
3.10.1 Analyse der *Bmp4* und *Fgf8*-Expression im Genitaltuberkel von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen 72
3.10.2 Analyse der Induktion externer Genitalien in *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen 73
3.10.3 Analyse der *Dkk1*-Funktion während der Nierenentwicklung 74
3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse 75

4 DISKUSSION 77
4.1 Die Relevanz des *Dkk1*-Promotors für die gewebespezifische *Dkk1*-Regulation 77
4.2 Identifizierung unterschiedlicher CNEs 78
4.3 Regulatorische Redundanz der CNEs 78
4.4 *Dkk1*-Regulation *doubleridge* assoziierter CNEs 79
4.5 Die *Dkk1*-Regulation während der Gliedmaßenentwicklung 79
4.6 Kraniofasziale *Dkk1*-Regulation 81
4.7 Die direkte *Dkk1*-Regulation während der Augenentwicklung 82
4.8 *Dkk1* und die Wechselwirkung mit dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Augenentwicklung 82
4.9 Ausblick I: Die Funktion von *Dkk1* während der Augenentwicklung 85
4.9.1 Die Einordnung der *Dkk1*-Haploinsuffizienz in bekannte Augenfehlbildungen 86
4.9.2 Einfluss der *Dkk1*-Haploinsuffizienz auf humane Augen-Pathogenesen 87
4.10 Neu identifizierte *Dkk1*-Expressionsdomänen- und Funktionen 89
4.10.1 Funktion von *Dkk1* während der Urogenitalentwicklung 89
4.10.2 Ausblick II: Unbekannte Funktionen von *Dkk1* 90
4.10.3 Ausblick III: Potential der generierten *Dkk1*-Reportermauslinie 92

5 ZUSAMMENFASSUNG/ ABSTRACT 93

6 ANHANG **95**

6.1 Konsensus-Sequenzen identifizierter CNEs im Bereich des *Dkk1*-Lokus 95

6.2 In dieser Arbeit verwendete Reporterkonstrukte 99

7 ABKÜRZUNGEN **100**

8 LITERATUR **103**

9 DANKSAGUNG **120**

10 ERKLÄRUNG **121**

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen

Während der Entwicklung eines Individuums von der Befruchtung einer Eizelle bis hin zum Tode, der Ontogenese, spiegeln sich zum Großteil die im Laufe seiner Entwicklungsgeschichte konservierten biologischen Mechanismen wieder. Die Charakteristika einer Spezies liegen demnach in ihrer Phylogenie verankert. Die enorme Vielfalt der heutigen Organismen legt jedoch nahe, dass die Evolution keinen stringenten Vorgang darstellt. Bei der Weitergabe genetischer Information an die nächste Generation können spontane genomische Änderungen, sog. genetische Variationen auftreten. Wenn aus diesen Ereignissen an gegebene Umweltbedingungen besser angepasste Individuen hervorgehen, die ihre Eigenschaften untereinander an Nachkommen weitergeben und neue Spezies bilden, kommt es zur Evolution der Organismen.

Während der Embryogenese, die bei höher entwickelten Spezies häufig einen kurzen Zeitraum der Ontogenese einnimmt, wird der konservierte genetische Bauplan eines Organismus räumlich und zeitlich exakt koordiniert realisiert. Frühe Entwicklungsereignisse bilateralsymmetrischer Tiere bis zur Entstehung der Blastula sind vornehmlich von rapiden mitotischen Zellteilungen ohne Gestaltwandel gekennzeichnet. Während der sich anschließenden Gastrulation erfolgt ein innerer Gestaltwandel, der zur Errichtung der drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, führt. Im Verlauf der sich anschließenden Organogenese werden aus den drei Keimblättern unterschiedliche Gewebe und Organe angelegt. Aus dem Ektoderm geht beispielsweise die Epidermis der Haut, sowie das Epithel von Mund, Nasen- und Nasennebenhöhlen aber auch das zentrale Nervensystem, Neurone und Gliazellen des peripheren Nervensystems während der Neurulation hervor. Aus dem Mesoderm entsteht der gesamte Bewegungsapparat mit Knochen und Muskeln, die glatte Muskulatur der Eingeweide, sowie Bindegewebe, Herz mit Blutgefäßen und Blutkörpern, Milz, Lymphknoten, Nieren und die Keimdrüsen. Das Endoderm differenziert sich zu dem Epithel des Verdauungstraktes, inklusive des Mundes, Pharynx und des terminalen Teils des Rektums, Tracheen und Bronchien, Alveolen der Lungen und der Harnblase.

Entwicklungsereignisse sind auch mit einer Determination der Körperachsen verbunden. Diese führt zu der Etablierung einer Kopf-Schwanz-, oder auch anterio-posterioren, einer Rücken-Bauch- (dorso-ventralen) und einer links-rechts-Achse. Die Achsendetermination an sich stellt einen hoch konservierten Mechanismus dar, dessen erkennbarer Zeitpunkt variiert jedoch stark. Bei *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) beispielsweise ist die

anterio-posteriore Achse bereits während der ersten Zellteilung durch die Verteilung der P-Granula bestimmt (Strome und Wood, 1982), wohingegen bei Mausembryonen die anterio-posteriore Achse erst während der Gastrulation mit der Bildung und Wanderung des anterioren viszeralen Endoderms sichtbar wird (Beddington und Robertson, 1998).

Bei den Ereignissen der Gastrulation gelangen Zellen in eine genaue räumliche Anordnung zueinander, wodurch ein differenziertes Gewebe aus ursprünglich pluripotenten Vorläuferzellen entsteht. Diese Prozesse, die auch als Musterbildung bezeichnet werden, hängen häufig von Zellgruppen, sog. Signalzentren, ab, die für die Errichtung eines Gewebes und der Induktion ihrer Zellen essentiell sind. Bestimmte Gruppen von Zellen sind hierbei dazu befähigt, das Entwicklungsschicksal angrenzender Zellgruppen festlegen zu können. Diese Eigenschaft wurde erstmals 1924 von Hans Spemann und Hilde Mangold beschrieben. Sie zeigten, dass ein Explantat der dorsalen Urmundlippe eines Molchembryos während der Gastrulation nach Transplantation in einen zweiten Embryo dort eine zweite Körperachse induzieren kann. Für diese zweite Achse wurde maßgeblich Gewebe des Empfängerembryos rekrutiert, dessen Entwicklungsschicksal vom verpflanzten „Organisator" umbestimmt wurde (Spemann and Mangold 1924). Bei dem hier beschriebenen Phänomen der Induktion steuert eine Gruppe von Zellen das Entwicklungsschicksal einer angrenzenden Gruppe von Zellen mithilfe diffundierender Signalmoleküle (Gurdon 1992). Dabei können manche dieser Signalmoleküle, sog. Morphogene oder parakrine Faktoren, in Abhängigkeit ihrer lokalen Konzentration eine Differenzierung der Zielzellen zu unterschiedlichen Zelltypen bewirken (Wolpert et al., 1999). Die Fähigkeit der umgebenden Zellen oder Zellgruppen, diese Signale zu erkennen und darauf reagieren zu können, wird als Kompetenz bezeichnet.

Parakrine Faktoren binden an Rezeptoren benachbarter Zellen, wodurch deren intrazelluläre Signaltransduktions-Maschinerie moduliert wird. Nach der Weiterleitung in den Zellkern wird durch die direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an Zielsequenzen ihrer Zielgene oder Gengruppen deren Expression an oder abgeschaltet. Auf diese Weise regulieren induktive Signale über die Aktivität von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren die Expression von untergeordneten Genen in der Embryonalentwicklung. Die molekularen Mechanismen, über die bestimmte Signale in eine veränderte Genaktivität münden, sind zum größten Teil phylogenetisch hoch konserviert.

Aufgrund dieser Konservierung können durch Untersuchungen und Manipulationen an unterschiedlichen Modellorganismen grundsätzliche entwicklungsbiologische Erkenntnisse

gewonnen werden. Beispielsweise ermöglicht die extrauterinäre Entwicklung von Hühnerembryonen im Hühnerei einen relativ einfachen Eingriff für Manipulationsuntersuchungen. Studien an höher entwickelten Vertebraten, z.B. den Säugetieren, sind immer mit komplizierten Eingriffsmethoden verbunden, da diese sich uterinär entwickeln. Erkenntnisse, die durch Analysen an Säugetieren gewonnen werden, sind auch von humanbiologischem Interesse, da sie grundlegende Erkenntnisse über unterschiedliche Krankheitsformen liefern können und häufig der Entwicklung von Medikamenten dienen. In den letzten Jahren nimmt die Zahl an bedeutsamen Studien zu, bei denen mit sog. knockout- oder transgenen Mäusen gearbeitet worden ist. Die zugrunde liegende Technik der embryonalen Stammzellforschung und der DNA-Rekombination bei Säugetieren wurde von Mario Capecchi, Oliver Smithies und Martin Evans entwickelt, die im Jahre 2007 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

1.2 Wnt-Proteine und deren Signalwege

Durch die Genomsequenzierung einiger Säugetier-und Invertebraten-Organismen konnten neunzehn *Wnt*-Gene im Menschen und in Mäusen, sieben in *Drosophila* und fünf in C.*elegans* identifiziert werden. Durch den Vergleich des Genomes von *Drosophila* mit unterschiedlichen Säugetieren konnte festgestellt werden, dass einige *Wnt*-Gene gemeinsame Vorläufergene besitzen. Wnt-Proteine aktivieren drei unterschiedliche Signalwege. Diese sind:

i) der kanonische oder Wnt/β-Catenin Signalweg (Dale 1998; Huelsken und Behrens, 2002; Nusse, 2005). Dieser Signalweg spielt bei zahlreichen Prozessen eine entscheidende Rolle, ist am besten charakterisiert und wird in 1.2.1 und 1.2.2 eingehend behandelt.

ii) der planare Zell-Polarität-Signalweg (Tada et al., 2002). Dieser Signalweg führt zu einer asymmetrischen Zellorganisation und zu der Polarisierung von Zellen durch die Induktion von Modifikationen am Aktin-Zytoskelett.

iii) die Wnt/Ca^{2+}-Kaskade. Diese führt zur Freilassung von intrazellulärem Kalzium und ist wichtig für die Zelladhäsion und Zellbewegungen während der Gastrulation. Dieser Signalweg wird zurzeit kontrovers diskutiert und überlappt zum Teil mit dem planaren Zellporität-Signalweg (Habas und Dawid, 2005; Kohn und Moon, 2005).

1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg im Zytoplasma

Wnt-Proteine sind Zystein-reiche Glykoproteine, die als Morphogene fungieren. Sie interagieren mit Zielzellen durch Bindung an Vertretern der Sieben-Transmembran-Rezeptoren, die Frizzled (Fz) genannt werden (Abb. 1B; Cadigan et al., 1998; Strigini und Cohen, 2000; Zecca et al., 1996), und an Vertreter der Low density Lipoprotein-Related-Rezeptoren (LDLR) Superfamilie, Lrp6, die weitere Transmembran-Proteine darstellen. Diese Rezeptoren transduzieren ein Signal an ein intrazelluläres Dishevelled-Protein (Dsh), wodurch dieses phosphoryliert wird (Yanagawa et al., 1995). Durch diese Modifikation wird das Signal an einen Proteinkomplex aus Glykogen-Synthase Kinase-3β (GSK3β), Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC) und den transkriptionellen Regulator β-Catenin weitergeleitet. Hierdurch wird die Phosphorylierung von β-Catenin verhindert, worauf dieses in den Zellkern gelangt und mit nukleären Proteinen interagiert. Ohne Wnt-Signale kontrolliert der GSK3β/Axin/APC-Komplex die von Proteasomen bewerkstelligte Degradation von β-Catenin, wodurch dessen intrazelluläre Konzentration gering gehalten wird (Abb. 1A). Hierbei wird β-Catenin durch bestimmte Kinasen phosphoryliert. Axin und APC fungieren bei diesem Prozess als sterische Proteine, die eine Interaktion zwischen den Kinasen und β-Catenin erleichtern (Hart et al., 1998; Kishida et al., 1998).

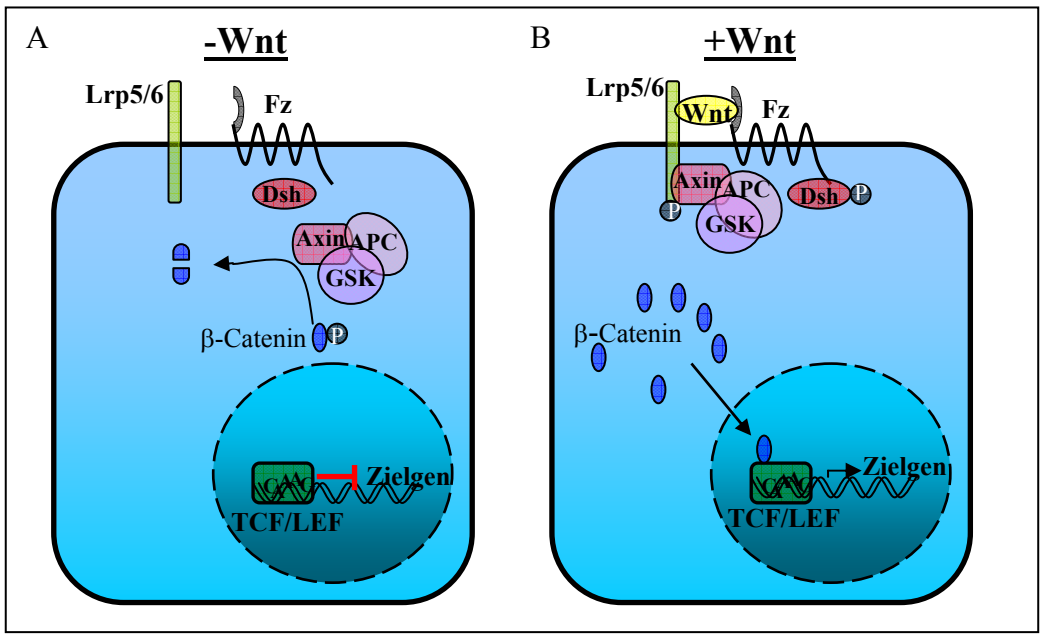


Abb. 1: Der kanonische Wnt-Signalweg. A) Abwesenheit des Wnt-Signales: β-Catenin bildet einen Komplex mit Axin, APC und GSK3β. GSK3β phospshoryliert β-Catenin, wodurch dieses durch das Proteasom degradiert wird. **B)** Durch die Bindung von Wnt-Proteinen an Lrp5/6 und Fz wird Dsh phosphoryliert, woraufhin eine Rekrutierung von Axin an Lrp-Proteine resultiert. Dadurch wird die β-Catenin-Degradation inhibiert, was eine zytoplasmatische Akkumulation zur Folge hat. β-Catenin gelangt dadurch in den Zellkern, und modifiziert die Expression von Wnt-Zielgenen durch eine Wechselwirkung mit TCF/LEF-Proteinen, die bestimmte Zielsequenzen auf der DNA erkennen.

1.2.2 Der kanonische Wnt-Signalweg innerhalb des Nukleus

Innerhalb des Kernes interagiert β-Catenin mit TCF/LEF-(Transkriptionsfaktor/Lymphoid enhancer-bindenden) Proteinen, wodurch die Gen-Expression von Wnt-Zielgenen moduliert wird (Abb. 2B; Behrens et al., 1996; Cadigan und Nusse 1997). TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren stellen demnach als direkte Mediatoren der durch Wnt-vermittelten Zielgenexpression Schlüsselproteine des Wnt-Signalweges dar. Das humane und das Maus-Genom beinhalten jeweils vier *TCF/LEF*-Gene (*TCF1, LEF1=TCF2, TCF3* und *TCF4*). TCF/LEF-Proteine bestehen aus homologen β-Catenin-Interaktionsdomänen und DNA-Bindedomänen. Das DNA-Bindemotif von ca. 80 Aminosäuren Länge (HMG-Box) befähigt die TCF/LEF-Proteine, spezifische TCF/LEF-Bindestellen innerhalb der kleinen Furche der DNA zu erkennen. Durch die Interaktion von TCF/LEF-Faktoren mit ihren Zielsequenzen werden starke Krümmungen der DNA induziert, wodurch eine Änderung der sterischen DNA-Eigenschaften und die Modifikation der Zielgenexpression resultiert (Love et al., 1995).

Die Wnt-Signalvermittlung durch die Interaktion zwischen β-Catenin und TCF/LEF innerhalb des Zellkernes wird durch eine Vielzahl von weiteren Interaktionspartnern modifiziert. In der Abwesenheit von Wnt-Signalen wird durch die Interaktion von TCF/LEF-Proteinen mit dem Groucho-Protein die Zielgenexpression inhibiert. (Abb. 2A; Brannon et al., 1997; Cavallo et al., 1998). Durch das Wnt-Signal konvertiert nukleäres β-Catenin den TCF/LEF-Repressor-Komplex in einen Aktivator-Komplex. Dies wird vermutlich durch die Ablösung von Groucho von dem TCF/LEF-Komplex und der Rekrutierung der Histon-Acetylase CBP/p300 verursacht. CBP fungiert hierbei als Koaktivator zusammen mit dem β-Catenin/TCF-Komplex (Hecht et al., 2000; Takemaru und Moon 2000). Brg1, ein weiterer Aktivator, stellt eine Komponente des SWI/SNF-Chromatin-Komplexes dar, der, zusammen mit CBP eine Chromatin-Modifikation induziert, wodurch die Zielgen-Transkription induziert wird (Barker et al., 2001).

Zurzeit wird angenommen, dass die Interaktionen zwischen dem TCF-β-Catenin-Komplex und dem Chromatin durch Legless (Bcl9; Lgs) und Pygopos (Pygo) ermöglicht werden (Kramps et al., 2002; Parker et al., 2002; Thompson et al., 2002). Weiterhin stellt Chibby einen nukleären Antagonisten dar, der den C-Terminus von β-Catenin bindet (Takemaru et al., 2003). Die Dissoziation des Komplexes zwischen β-Catenin, TCF/LEF und CBP/p300 wird durch ein weiteres β-Catenin-bindendes Protein, ICAT, verursacht (Daniels und Weis 2002; Graham et al., 2002; Tago et al., 2000). Die TCF-Aktivität wird ebenfalls durch die

Phosphorylierung durch die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase NLK/Nemo beeinflusst (Ishitani et al., 1999). Die Phosphorylierung von TCF/LEF durch aktiviertes Nemo schwächt die DNA-Bindeaffinität des β-Catenin/TCF/LEF-Komplexes ab, wodurch ebenfalls die transkriptionelle Aktivierung von Wnt-Zielgenen reduziert wird (Ishitani et al., 1999; 2003). β-Catenin kann mit weiteren Bindepartnern innerhalb des Kernes interagieren, z.B. Pitx2. Hierbei wird Pitx2 von einem transkriptionellen Repressor in einen Aktivator umgewandelt (Kioussi et al., 2002).

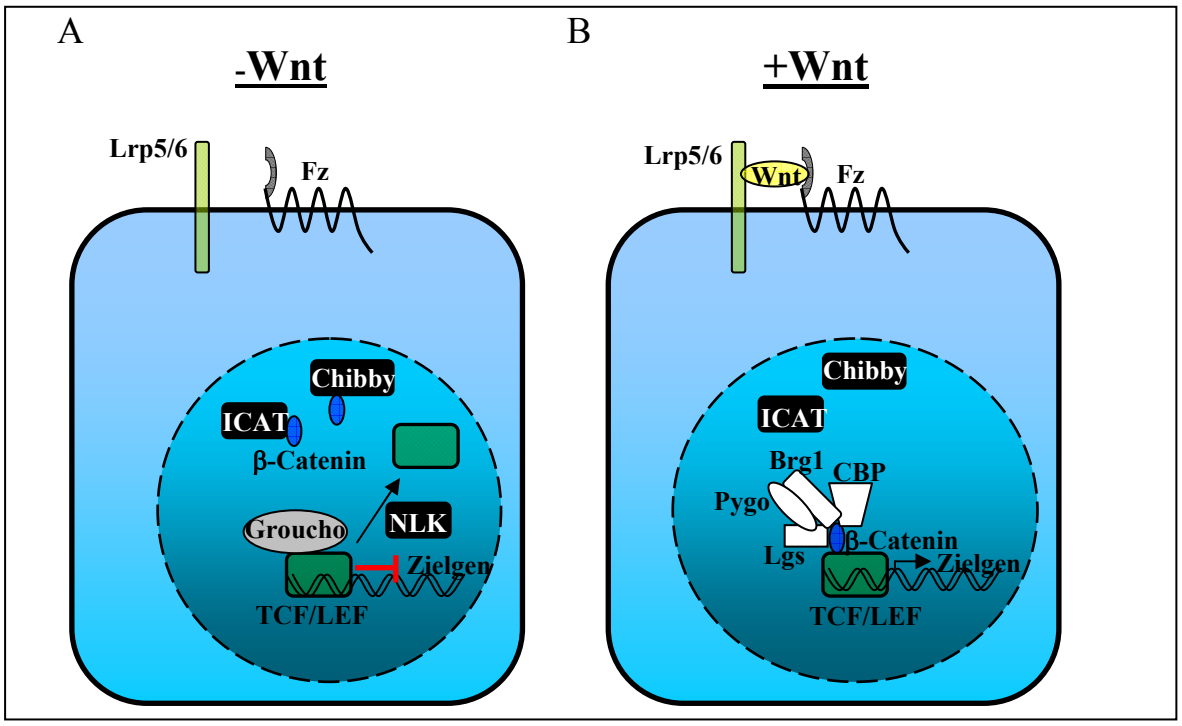


Abb. 2: Der Kanonische Wnt-Siganlweg innerhalb des Nukleus. A) In der Abwesenheit des Wnt-Signalweges wird durch die Interaktion zwischen Groucho und TCF/LEF die Transkription von Zielgenen inhibiert. β-Catenin wird zusätzlich durch Chibby und ICAT inhibiert. Die TCF/LEF-Aktivität wird durch NLK moduliert. **B)** β-Catenin wechselwirkt mit der Interaktion zwischen TCF/LEF und Groucho und aktiviert die Gen-Expression. β-Catenin bindet ebenfalls an Legless (Lgs), Pygopus (Pygo), CREB-bindendes-Protein (CBP) und Brg1.

1.3 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Embryonal-entwicklung

Wnt-Signale regulieren im Allgemeinen die Zell-Proliferation, sodass viele Wnt-Genverlustmutanten eine Reduktion oder einen Verlust der Zellteilung aufweisen. Dies kann in den entsprechenden Mutanten zu einem Verlust bestimmter Zellen bzw. Gewebe führen, da die Expansion von Vorläuferzellen ausbleibt (Logan und Nusse, 2004). Beispielsweise stellen *myc* und *cyclinD1* direkte Wnt-Zielgene in Darm-Karzinom-Zellen dar, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen Wnts und der Regulation des Zellzyklus angenommen wird (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu und McCormick 1999).

Der Einfluss von Wnt-Signalen auf die Zellproliferation ist eng mit Musterbildungsereignissen verknüpft, sodass Ursachen der Phänotypen von Wnt-Verlustmutanten häufig in der Fehlorganisation der Zellschicksal-Spezifikation begründet liegen. Da sich Wnt-Proteine strukturell teilweise sehr ähnlich sind und überlappende Expressionsdomänen besitzen, weisen unterschiedliche *Wnt*-Gene häufig eine funktionelle Redundanz auf. So existieren mehrere Beispiele, in denen mutante Phänotypen erst bei gemeinsamer Mutation mehrerer *Wnt*-Gene erhalten worden sind. Beispielsweise demonstriert der Phänotyp von *Wnt1/Wnt3a*-Doppelmutanten eine Notwendigkeit des Wnt-Signalweges in einer breiteren Region des zentralen Nervensystems, als *Wnt1*- oder *Wnt3a*-Einzelmutanten (Ikeya et al., 1997).

Gegenteilig legen Studien nahe, dass einzelne Wnts an distinkten Entwicklungsereignissen beteiligt sind. *Wnt3* zum Beispiel wird im Primitivstreifen exprimiert und *Wnt3*-Mutanten führen zu Gastrulations-Defekten (Liu et al., 1999). Für diese Arbeit sind hauptsächlich Wnt-Signale während der Organogenese von Relevanz, deren Rolle im Folgenden an den Beispielen der Augenentwicklung, der Gliedmaßenentwicklung und der Nierenentwicklung näher dargelegt wird.

1.3.1 Funkionen von *Wnt*-Genen während der Augenentwicklung

Das optische Vesikel (Abb. 3) geht aus dem ventralen Dienzephalon (rot) hervor und differenziert zum optischen Nerv (gelb), der neuronalen Retina (blau), sowie dem retinalen Pigment-Epithel (grün) aus. Hierbei sind die entsprechenden Vorläuferstrukturen entlang der dorso-ventralen und der posterio-anterioren Achsen organisiert. Eine Vielzahl unterschiedlicher Morphogene vermittelt während der Augenentwicklung die Etablierung distinkter retinaler Regionen mit unterschiedlichen Neuronenzelltypen. Durch gegenseitige Wechelwirkungen mit dem Oberflächenektoderm differenziert sich die Linse (lila), ein nicht-neuroektodermaler Teil des Auges aus. Aus dem anterioren Anteil des Auges, dem Übergang von der neuronalen Retina zum Pigmentepithel geht im weiteren Verlauf die Iris hervor. Diese Domäne, die ziläre marginale Zone, spielt auch in adulten Augen bei der retinalen Stammzellgenerierung und deren Differenzierung eine entscheidende Rolle.

Die Dynamik der Expression unterschiedlicher *Wnt*-Gene und deren Signalwegkomponenten während der Augenentwicklung ist hoch komplex (Fuhrmann et al., 2003; Jin et al., 2002; Liu et al., 2003), und ist nicht auf den neuroektodermalen Anteil des Auges beschränkt, sondern beinhaltet auch die Linsenanlage und das Augenlied.

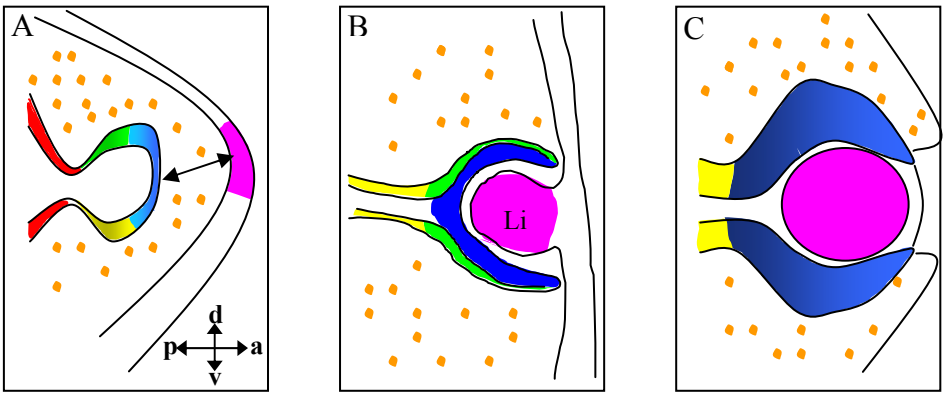


Abb. 3: Entwicklung des optischen Vesikels. A) Das ventrale Dienzephalon (rot) erweitert sich zu den lateralen Seiten. Dorsale Vorläuferzellen bilden das retinale Pigmentepithel (grün), ventrale Vorläuferzellen den optischen Nerven (gelb) und neuronale Retinavorläuferzellen (blau) entwickeln sich aus dem anterioren Teil. Pfeil: Retinale Vorläuferzellen interagieren mit ektodermalen Zellen (lila), wodurch die Linse (Li) induziert wird (**B)**). (**C)**) Durch eine Vielzahl komplexer Mechanismen entsteht das Auge. Mesenchymale Zellen sind orange dargestellt.

Der Wnt/β-Catenin Signalweg spielt bei verschiedenen Prozessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Augenentwicklung während der frühen Musterbildung (Esteve und Bovolenta, 2006) und der retinalen Entwicklung eine Rolle (Van Raay und Vetter, 2004). *Wnt2b* beispielsweise wird in der ziliären, marginalen Zone exprimiert und scheint die Proliferation von retinalen Vorläuferzellen in dieser Domäne aufrecht zu erhalten (Jasoni et al., 1999; Kubo et al., 2003). Verlustmutanten bestimmter Gene des Wnt/β-Catenin-Signalweges zeigen drastische Augenphänotypen. So weisen *Lrp5*$^{-/-}$-Mäuse aufgrund eines Versagens des durch Makrophagen induzierten Zelltodes Augen-Vaskularisierungen auf. *Lrp6*$^{-/-}$-Mutanten weisen retinale Kolobome, verkleinerte Augenanlagen (Mikrophthalmie) und eine defekte Linsenentwicklung auf (Stump et al., 2003, Pinson et al., 2000). Mäuse, in denen β-Catenin konstitutiv aktiviert ist, weisen ebenfalls retinale Abberationen auf (Miller et al., 2006).

Häufig hängen menschliche Krankheiten mit Mutationen von *Wnt*-Genen bzw. Signalkomponenten zusammen. *Fz4* beispielsweise hängt mit der Errichtung eines Augendefektes zusammen, der in einem Verlust der peripheren retinalen Vaskularisation begründet ist. Diese, als exsudative Vitreoretinopathie bezeichnete Krankheit führt zu einem Ausbleiben der retinalen Angiogenese und ist durch retinale Abtrennungen und Mikrophthalmie charakterisiert, die zur Blindheit führt (Robitaille et al., 2002). Weiterhin wird vermutet, dass eine Heraufregulation von Fz-Proteinen mit der retinalen Degeneration bei Retinitis pigmentosa- Patienten zusammenhängt (Jones et al., 2000). Diese Studien legen nahe, dass Wnt-Signale auch während der Aufrechterhaltung der adulten Retina eine wichtige Rolle spielen.

1.3.2 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Gliedmaßenentwicklung

Zu einem frühen Stadium der Gliedmaßenentwicklung besteht die Extremitätenknospe aus unterschiedlichen Signalzenzentren, die sowohl eine Musterbildung verursachen, als auch das Auswachsen entlang der proximo-distalen Achse vermitteln (Abb.4 A). Auf der posterioren Seite wird durch die Etablierung der „Zone polarisierender Aktivität“ (ZPA) und der damit verbundenen *Sonic hedgehog* (*Shh*)-Expression hauptsächlich die a-p-Achse determiniert. Ein weiteres, distal gelegenes Signalzentrum, die apikale ektodermale Leiste (AER) vermittelt das Auswachsen entlang der proximo-distalen Achse über die Expression des *Fibrobasten-Wachstumsfaktor* 8 (*Fgf8*). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird durch verschiedene Faktoren interdigitaler Zelltod verursacht, der schließlich zu der Separierung einzelner Zehen führt (Abb. 4B und C).

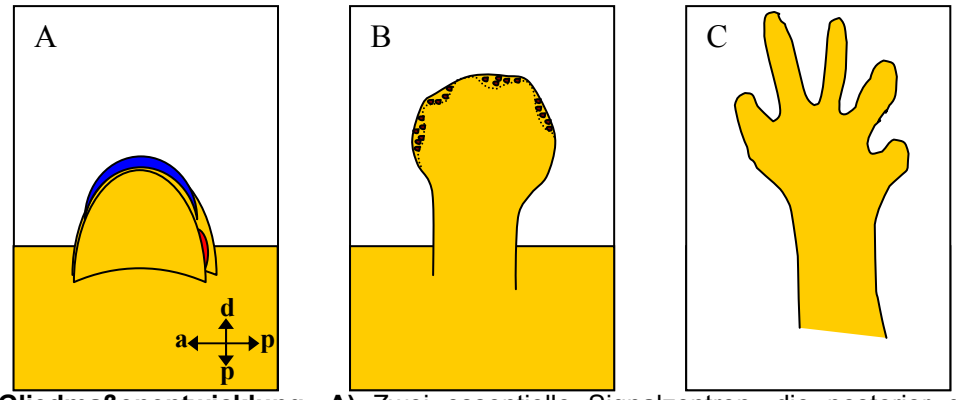


Abb.4: Gliedmaßenentwicklung. **A)** Zwei essentielle Signalzentren, die posterior gelegene, mesenchymale ZPA (rot) und die AER (blau) vermitteln sowohl die anterio-posteriore Musterbildung als auch die Entwicklung entlang der proximo-distalen Achse. **B+C)** Durch interdigitalen Zelltod werden einzelne Zehen separiert.

Bei den Musterbildungsvorgängen sind auch verschiedene *Wnt*-Gene involviert (Church und Francis-West, 2002). Der durch Wnt3 vermittelte Wnt/β-Catenin-Signalweg wird beispielsweise für die Etablierung der AER benötigt. Ein Verlust der *Wnt3*-Funktion führt zu einer drastischen Reduktion der AER, was zum Verlust kompletter Gliedmaßen führen kann (Barrow et al., 2003; Soshnikova et al., 2003). Entgegengesetzt verursacht eine Überaktivierung des Wnt-Signalweges durch überschüssiges β-Catenin eine Erweiterung der AER (Soshnikova et al. 2003). Neben der Funktion, die *Wnt3* während der Gliedmaßenentwicklung einnimmt, spielt *Wnt5a* eine Rolle. Auch ein Verlust des *Wnt5a*-Genes führt zu einem Verlust des Auswachsens der Gliedmaßen (Yamaguchi et al., 1999).

1.3.3 Funktionen von *Wnt*-Genen während der Nierenentwicklung

Das Nephron als funktionelle Einheit der Niere stellt ein hoch spezialisiertes Gewebe dar, das aus 12 verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Spezifikation besteht. Jeder dieser Zelltypen ist an einem bestimmten Ort entlang der Länge des Nephrons mit einer bestimmten Beziehung zueinander lokalisiert. Die permanente Niere, der Metanephros, entwickelt sich bei Säugetieren aus zwei transienten Vorläuferstrukturen, die als Pro- und Mesonephros bezeichnet werden (Abb. 5). Alle drei Strukturen sind Derivate des intermediären Mesoderms und entwickeln sich in anterio-posteriorer Orientierung. Während sich posterior der Mesonephros bildet, degeneriert der anteriore Pronephros (Abb. 5A+B). Im weiteren Verlauf tritt der nephrische Dukt in Kontakt mit der Harnblase (Abb. 5B). Während der Metanephros-Entwicklung wächst der posteriore nephrische Dukt in das metanephrogene Mesenchym ein und bildet zahlreiche Verästelungen. Bei der Metanephros-Entwicklung werden auch die renalen Tubuli und die Glomeruli gebildet, den Orten, an denen später das Blut der Arteriolen gefiltert wird. Wenn das Mesenchym zu einem Epithel kondensiert, teilt es die Basallamina der Urether-Knospen-Zellen, die es induziert haben, und verbindet es zum Urether-Knospen-Epithel. Ein Teil des aggregierten Mesenchyms wird zum Nephron, während die Urether-Knospe zum kollektiven Dukt des Urins wird (Sariola, 2002).

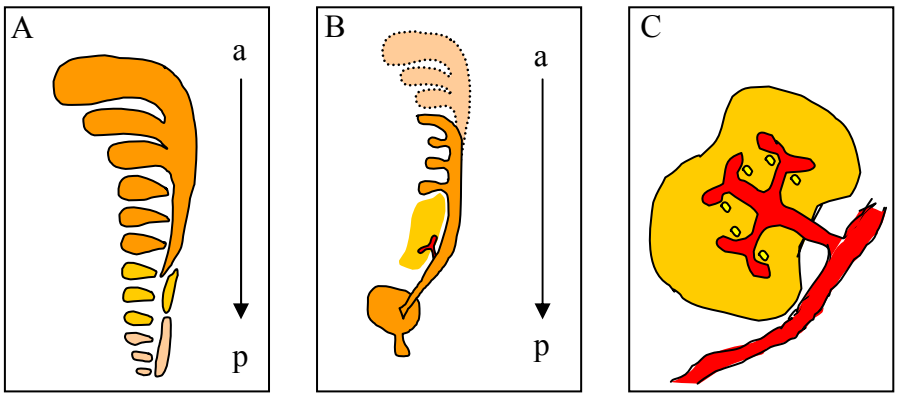


Abb.5: Metanephrosentwicklung aus zwei transienten Vorläuferstrukturen. A) Der Pronephros entwickelt sich von anterior nach posterior, wobei posterior der Mesonephros entsteht. **B)** Mit der Etablierung des Mesonephros degeneriert der Pronephros. Der nephrische Dukt tritt in Kontakt mit der Harnlase. Posterior der Metanephros induziert. **C)** Der Metanephros wächst in das metanephrogene Mesenchym ein, die Enden, die Urether-Knospen interagieren mit dem umgebenden Mesenchym und spalten sich auf. Hierbei entstehen die renalen Tubuli und die Glomeruli (gelb).

Während der Nierenentwicklung werden die *Wnt*-Gene *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7b* und *Wnt11* in distinkten nephrischen Arealen zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert (Kispert et al., 1996). Durch genetische Ablation von *Wnt4*, welches endogen in dem aggregierenden

metanephrischen Mesenchym exprimiert wird, kommt es zum Ausbleiben der Aggregation in prätubulare Kluster und der Tubulogenese (Stark et al., 1994).

Durch eine β-Catenin-abhängige TCF/βGal transgene Reportermaus konnte gezeigt werden, dass das renale TCF-Signal initial im nephrischen Dukt und dem Urether vorhanden ist und sich im weiteren Verlauf in zwei Expressionsdomänen aufspaltet, den sich teilenden Urether-Spitzen und den distalen Enden der S-förmigen Körperchen. In der perinatalen Periode, wenn die Nephrogenese beendet ist, werden TCF-Signale herunterreguliert (Iglesias et al., 2007).

1.4 Wnt-Zielgene

Engrailed ist das erste durch Korrelation des überlappenden Expressionsmusters in *Drosophila* mit dem *Drosophila Wnt*-Homolog *wingless* identifizierte Wnt-Zielgen (DiNardo et al., 1988; Ingham et al., 1988; Siegfried et al., 1992).

Der Wnt-Signalweg steuert häufig die Regulation von Wnt-Signalweg-Komponenten, sodass ein Schlüsseleffekt des Wnt-Signalweges eine Kontrolle der Rückkopplungsregulation darstellt. Eine Klasse von Zielgenen des Wnt-Signalweges stellen z.B. *Fz*-Gene dar (Cadigan et al., 1998; Muller et al., 1999; Sato et al., 1999, Willert et al., 2002). Das Maß der *Lrp*-Expression wird ebenfalls durch den Wnt-Signalweg kontrolliert, wodurch eine Feinmodulation der Wnt-Aktivität an der Zelloberfläche sichergestellt wird (Baeg et al., 2001; Wehrli et al., 2000). Zudem stellt die intrazelluläre Komponente des Wnt-Signalweges *Axin2* ein direktes Wnt-Zielgen dar (Aulehla et al., 2003, Jho et al., 2002). Die Transkription von *TCF* und *LEF* wird ebenfalls durch Wnts reguliert. Weiterhin regulieren APC-Mutationen eine splice-Variante von *TCF1* herauf, die eine N-terminale β-Catein-Bindestelle mangeln (Roose et al., 1999). Es wird vermutet, dass dieses dominant negative TCF1 Wnt-Signale hemmt und das Ausmaß der Störung reduziert, die durch einen Verlust von β-Catenin oder APC resultieren. Eng mit der durch Wnts verursachten Regulation sind auch Phänotypen entsprechender Genverlustmutanten von Wnt-Signalwegkomponenten verknüpft, die häufig mit den Phänotypen der übergeordneten *Wnt*-Gene korrelieren. Der Verlust von *TCF3* beispielsweise in *TCF3*-Verlustmutanten führt zu einer Erweiterung und häufig zu duplizierten Mesoderm-Strukturen, inklusive des Knotens und der Chorda dosalis (Merrill et al., 2004).

1.5 Modulation des Wnt-Signalweges und dessen entwicklungsbiologische Relevanz

Die durch unterschiedliche Wnt-Proteine vermittelte Aktivierung des Wnt-Signalweges wird extrazellulär durch eine Vielzahl von Modulatoren beeinflusst (Abb.6). Eine sekretierte Form des Fz-Proteins (Sfrp) beispielsweise enthält die Ligand-bindende Domäne des Fz-Wnt-Rezeptors (Hoang et a., 1996, Rattner et al., 1997). Alternativ binden Wnts an WIF-Proteine, die sekretierte Moleküle der Derailed/RYK-Klasse der Transmembran-Wnt-Rezeptoren darstellen (Hsieh et al., 1999a). Das Cerberus-Protein stellt ebenfalls einen extrazellulären Wnt-Modulator dar. Sowohl Sfrps, als auch WIFs und Cerberus fungieren durch eine direkte Interaktion mit Wnt-Proteinen als extrazelluläre Wnt-Inhibitoren (Bafico et al., 1999; Dennis et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Leyns et al., 1997; Uren et al., 2000; Wang et al., 1997). Neben diesen Wnt-Modulatoren, existieren vier Zystein-reiche Proteine der Dickkopf-Familie (Dkk1-4), die durch eine Konkurrenz-Reaktion durch Wechselwirkung mit dem Wnt-Rezeptor Lrp6 fungieren (Glinka et al., 1998; Mao et al., 2001). Dkk-Proteine wirken als Wnt-Inhibitoren, wobei Dkk2 sowohl als Inhibitor, als auch Wnt-Aktivator fungieren kann.

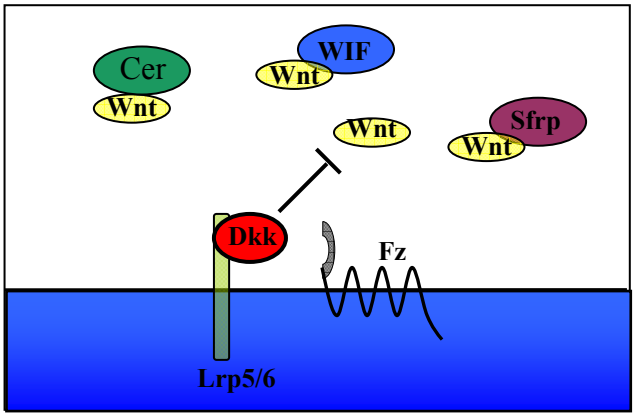


Abb.6: Modifikation des Wnt-Signalweges durch extrazelluläre Wnt-Modulatoren. WIF, Sfrp und Cer fungieren als Wnt-Inhibitoren durch direkte Wnt-Protein-Interaktion. Dkk-Proteine modulieren den Wnt-Signalweg durch Bindung an Lrp5/6-Rezeptoren.

Entwicklungsbiologisch ist die Wnt-Inhibition während der Vermittlung unterschiedlicher embryonaler Musterbildungsereignisse essentiell. Der einleitend bereits erwähnte Organisator ist essentiell für die Etablierung von drei unterschiedlichen Derivaten, die während der Neurula von anterior nach posterior unterscheidbar sind: das anteriore viszerale Endoderm, aus welchem die Leber hervorgeht; das prächordale Mesendoderm, welches zu dem Kopfmesenchym, Kopf und Augenmuskel und dem Vorderdarm differenziert, und das Chordamesoderm, welches die Chorda dorsalis hervorbringen wird. Für *Xenopus* und Zebrafisch-Embryonen konnte gezeigt werden, dass Wnt/β-Catenin-Signale sowohl hinreichend als auch nötig für die Induktion des Organisators und somit

indirekt für die Kopfinduktion zu frühen Zeitpunkten der Embryogenese sind (Schier, 2001; Solnica-Krezel und Driever, 2001). Die Kompetenz von *Xenopus* und Zebrafisch-Embryonen, auf Wnt-Signale reagieren zu können, ändert sich jedoch nach der Midblastula-Transition, wenn die zygotische Expression beginnt. Ab diesem Zeitpunkt ist die Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges für die Etablierung anteriorer Strukturen innerhalb des Organizers unerläßlich. Sowohl dem Spemann's Organisator von *Xenopus*-Embryonen, als auch dem Schild im Zebrafisch und dem anterioren Mesendoderm in Mäusen ist gemein, dass in diesen Signalzentren Wnt-Signale durch die Wnt-Inhibitoren Cerberus, Sfrp und Dkk1 blockiert werden (Abb.7). Gleichzeitig werden Bmps durch die Antagonisten Chordin, Noggin und Follistatin inhibiert (Sasai et al., 1994; Piccolo et al., 1996; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Fainsod et al., 1997; Okabayashi et al., 1999; Smith und Harland, 1992; Zimmermann et al., 1996). Wnts, zusammen mit Fgfs und Retinoinsäure bilden im weiteren Entwicklungsverlauf nach posterior zunehmende Gradienten und induzieren *Hox*-Gene, die wiederum zu einer Spezifizierung des Neuralrohres führen. Umgekehrt wirken Wnt-Signale zusammen mit Bmps und Nodals inhibierend auf die anteriore Entwicklung (De Robertis und Kuroda, 2004; Niehrs, 2004b). Da bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Ereignissen die alleinige durch Dkk1 vermittelte Wnt-Inhibition verantwortlich ist, wird im Folgenden näher auf die zugrunde liegenden Ereignisse eingegangen.

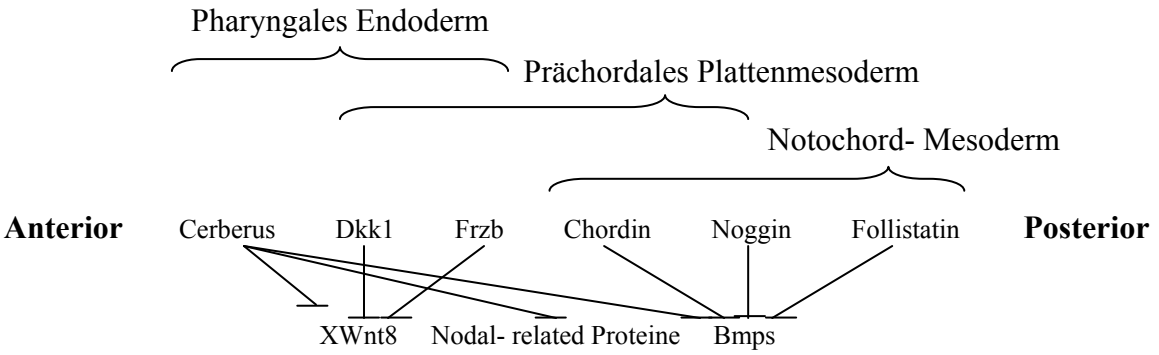


Abb.7: Parakrine Faktoren des Organisators inhibieren andere parakrine Faktoren. Das pharyngale Endoderm sekretiert Cerberus und Dkk1. Dkk1 blockiert Wnt-Proteine; Cerberus blockiert Wnts, Nodal-related Proteine und Bmps. Die prächordale Platte sekretiert die Wnt-Inhibitoren Dkk1 und Frzb, sowie die Bmps-Inhibitoren Chordin und Noggin. In der Chorda dorsalis werden die Bmp-Inhibitoren Chordin, Noggin und Follistatin exprimiert; modifiziert nach Gilbert, 2004.

1.6 Mechanismus der Dkk1-vermittelten Wnt-Inhibition

Dkk1 ist ein Vertreter einer evolutionär konservierten Genfamilie. *Dkk*-Gene kodieren für sekretierte Proteine, die eine Signalsequenz, sowie zwei konservierte, Zystein-reiche Domänen einen charakteristischen Abstand zueinander einnehmen. Dkk-Proteine konnten bereits in Invertebraten, wie *Dictyostelium*, *Cnidaria*, *Urochordata* und *Ascidians* nachgewiesen werden (Hino et al. 2003; Fedders et al., 2004; Guder et al., 2006). Jedoch konnten deren Proteine bei *Drosophila* und *C. elegans* nicht nachgewiesen werden, was daraufhin deutet, dass diese Gene während der Evolution bei Protostomia sekundär verloren gegangen sind. Dkk1-und Dkk2 binden mit einer sehr hohen Affinität an Lrp5/6, während die Affinität von Wnt-Proteinen für diese Rezeptoren geringer ist (Bafico et al., 2001; Semenov et al., 2001; Mao et al., 2001a). Durch die Bindung von Dkk1 an Lrp6 wird die Affinität dieses Rezeptors zwischen Wnt und Frizzled vermindert, wodurch eine Blockierung der Wnt-Signaltransduktion resultiert (Abb. 8; Semenov et al., 2001). Weitere Dkk1-Rezeptoren stellen Kremen1 und Kremen2 dar (Mao et al., 2002). Diese potenzieren die Fähigkeit von Dkk1, Wnt-Signale zu inhibieren. Kremen2 bildet einen ternären Komplex mit Dkk1 und Lrp6 und induziert ein Ablösen von Lrp6 von der Plasmamembran, wodurch der Komplex internalisiert. R-Spondin (RSpo)-Familienmitglieder 1-4 stellen ebenfalls sekretierte, Zystein-reiche Proteine dar. Indem sie die durch Dkk1 vermittelte Internalisation des Dkk1-Lrp5/6-Komplexes inhibieren, fördern sie den Wnt-Signalweg (Binnerts et al., 2007). Wie genau diese Prozesse ablaufen, ist z.Z. nicht bekannt.

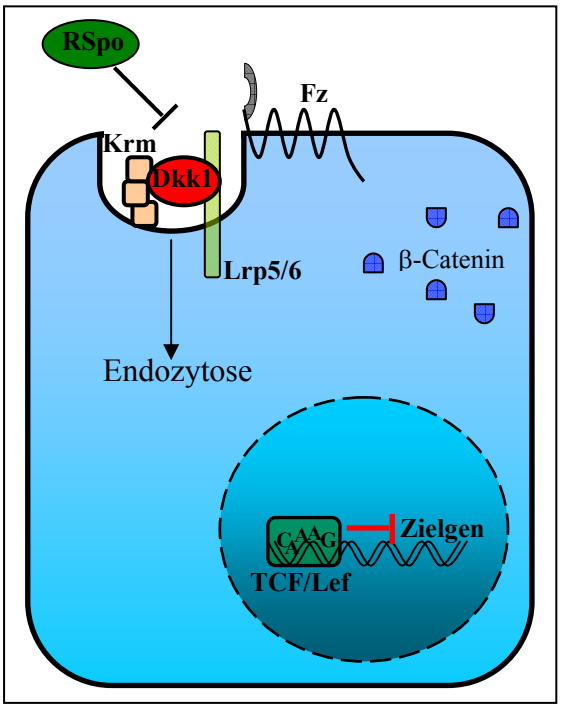


Abb.8: Dkk1 vermittelte Inhibition des Wnt-Signalweges. Durch die Bindung von Dkk1 an Lrp5/6 wird die Bindung von Wnts an den Fz-Rezeptor blockiert. Durch den ternären Komplex zwischen Dkk1 mit Lrp5/6 und Krm resultiert eine Endozytose des Komplexes. Die Modulation durch Dkk-Proteine wird durch RSpo inhibiert, wodurch der Wnt-Signalweg bevorzugt wird.

1.7 Funktionen von *Dkk1* während der Embryonalentwicklung

Da Wnt-Proteine entscheidende Rollen während der Embryonalentwicklung spielen, ist offensichtlich, dass durch die differentielle *Dkk1*-Expression und der damit verbundenen Wnt-Signalweginhibition Zellschicksalsprozesse festgelegt werden. Es ist daher nahe liegend, die gewebespezifische *Dkk1*-Transkription sehr distinkt gesteuert werden muß. Dies ist z.Z. jedoch nicht erforscht.

Die Funktion von *Dkk1* ist an unterschiedlichen Organismen und Entwicklungsereignissen durch Überexpressionsuntersuchungen, sowie *Dkk1*-Genverlustmutanten untersucht worden. Im Folgenden wird auf die am besten untersuchten Organe eingegangen.

1.7.1 Funktion von *Dkk1* während der Kopfinduktion

Ursprünglich wurde *Dkk1* durch die Expression in *Xenopus*-Embryonen innerhalb der Spemann's Kopf-Organisatorregion und der damit verbundenen Wnt–Inhibition in frühen Entwicklungsstadien charakterisiert (Glinka et al., 1998). Hierbei führte die Injektion von *Dkk1* mRNA sowohl in Zebrafisch, als auch *Xenopus*-Embryonen, zusammen mit Bmp-Inhibitoren zu einer Induktion kompletter Kopfstrukturen, die Inhibition von *Dkk1* durch eine Injektion von anti-Dkk1-Antikörper hingegen führte zur Mikrozephalie (Glinka et al., 1998). Aus diesem Grund wird eine wichtige Rolle für Dkk1 während der Kopfinduktion angenommen.

In Mausembryonen wird *Dkk1* von der Gastrula bis zur Neurula im anterioren viszeralen Endoderm, dem anterioren Mesendoderm und dem Vorderdarm-Endoderm exprimiert, in Geweben also, die mit der anterioren Spezifikation assoziiert sind. Entsprechend der Anteriorisierung von Froschembryonen bei einer Überexpression von *Dkk1*, sind *Dkk1* defiziente Mausmutanten durch eine Abwesenheit anteriorer Kopfstrukturen charakterisiert. Eine Abwesenheit des früh exprimierten Markergenes *Hesx1* zeigt, dass die frühe Induktion dieser Kopfstrukturen verloren gegangen ist. Diese Daten beweisen, dass Dkk1 für die Entwicklung anteriorer Kopfstrukturen essentiell ist (Mukhopadhyay et al., 2001).

Wenn die Kopfanlage zu unterschiedlichen Derivaten differenziert, wird *Dkk1* in verschiedenen Geweben des Kopfes exprimiert, wie dem Mesenchym des ersten Kiemenbogens, aus dem bestimmte Knochen und Knorpelanteile ausdifferenzieren (Monaghan et al., 1999). Neuroektodermal wird *Dkk1* in Kopf-Ganglien, sowie in bestimmten Arealen des Gehirnes und den Augenanlagen exprimiert (Monaghan et al., 1999). Während der Augenentwicklung weist *Dkk1* ein distinktes und räumlich-zeitlich

dynamisches Expressionsmuster im neuroektodermalen Anteil der Retina, sowie in dem pigmentierten Teil und in den Augenliedern auf (Monaghan et al., 1999). Die Augen stellen die einzigen Organe dar, in denen eine gewebespezifische *Dkk1*-Expression in adulten Mäusen gezeigt werden konnte (Ang et al., 2004). Da *Dkk1* essentiell für die frühe Kopfinduktion ist, ist die Funktion von *Dkk1* bei der Etablierung diverser Kopf-Derivate bislang nicht untersucht worden. Injektionen von *Dkk1* mRNA zusammen mit mRNA von *Bmp*-Antagonisten in frühe Blastomere von *Xenopus*-Embryonen führen zu der Entwicklung von zwei kompletten zusätzlichen Augen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Dkk1 die Bildung der prächordalen Platte induzieren kann, einem Gewebe, dass für die Aufspaltung des primären Augenfeldes essentiell ist (Kazanskaya et al., 2000).

1.7.2 Funktion von *Dkk1* während der Gliedmaßenentwicklung

Während der Gliedmaßenentwicklung der Maus wird *Dkk1* zu frühen Entwicklungsstadien in der AER, sowie in der posterioren nekrotischen Zone (PNZ) exprimiert. Zu späteren Stadien ändert sich dieses Muster, und *Dkk1* ist in den interdigitalen Regionen exprimiert, in Domänen, in denen programmierter Zelltod zu einer Separierung der einzelnen Zehen führt (Grotwold et al., 1999).

Dkk1$^{-/-}$-Embryonen sind durch eine vermehrte Anzahl von Zehen an den Vorder-und Hintergliedmaßen, einer sog. Polydaktylie, charakterisiert. Diese beruht auf einer Interaktion mit *Wnt7a*, welches die Zehenanzahl reguliert (Adamska et al., 2004). Zudem sind die Zehen miteinander verwachsen, so dass eine sog. Syndaktylie vorliegt. Hierdurch wurde eine Rolle von Dkk1 bei der Etablierung des interdigitalen Zelltodes vermutet. Dementsprechend verursacht die Überexpression von *Dkk1* in Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen eine ektopische Induktion von programmiertem Zelltod und somit Gliedmaßenverkürzungen (Grotewold und Rüther, 2002). Der durch Dkk1 hervorgerufene Zelltod ist zudem maßgeblich an den Gliedmaßenverkürzungen bei Thalidomid induzierten Embryopathien beteiligt (Knobloch et al., 2007).

1.7.3 Funktion von *Dkk1* während der Segmentierung und der Osteoblastenentwicklung

Die Vertebrae ist durch eine Segmentierung entlang der anterio-posterioren Achse gekennzeichnet. Während der Entwicklung geht diese aus transienten Vorläuferstrukturen des paraxialen Mesoderms, den Somiten hervor. Somitenpaare bilden sich während der

Entwicklung in einem periodischen Prozess, der unter der Kontrolle der Segmentierungs-Uhr steht. Diese steuert die oszillierende mRNA-Expression einer Vielzahl zyklisch exprimierter Gene innerhalb des unsegmentierten präsomitischen Mesoderms. Diese Oszillation wird durch eine Interaktion zwischen Notch und Wnt/β-Catenin-Signalwegen bewirkt (Aulehla und Herrmann, 2004). Die Expression von *Dkk1* überlappt der *Wnt3a*-Expressionsdomäne im präsomitischen Mesoderm (Glinka et al., 1998). *Dkk1*$^{-/-}$-Mäuse weisen in bestimmten Bereichen eine fusionierte Vertebrae vor, was vermutlich mit Knochenbildungsdefekten im Bereich des Schwanzes zusammenhängt (MacDonald et al., 2004).

Wnt/β-Catenin-Signale verursachen weiterhin eine Zunahme des Knochenwachstums durch mehrere Mechanismen, wie der Stammzellerneuerung, Osteoblasten-Proliferation die Induktion der Osteoblasten-Genese und der Inhibition der Osteoblasten und Osteozyten-Apoptose (Krishnan et al., 2006). Der Wnt-Rezeptor Lrp5 ist ebenfalls ein Schlüsselregulator der Knochenmasse. Im Menschen führt der Verlust von Lrp5 zum Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom, was zu einer Verminderung der Knochendichte führt (Gong et al., 2001). Umgekehrt bewirkt die erhöhte *Lrp5*-Expression eine erhöhte Kochenmasse (Boyden et al., 2002). Durch eine reduzierte Proliferation von Vorläuferzellen sind *Lrp5*$^{-/-}$-Mäuse ebenfalls durch eine verringerte Knochenmasse gekennzeichnet (Kato et al., 2002). *Dkk1*$^{+/-}$-Mäuse weisen ebenfalls eine erhöhte Knochenmasse auf (Morvan el al., 2006). Umgekehrt entwickeln transgene Mäuse, die *Dkk1* überexprimieren, Osteopenia (Li et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der Wnt-Signalweg unter einer negativen Kontrolle durch Dkk1 steht, um das physiologische Maß der Knochenmasse zu regulieren.

1.8 Veränderte *Dkk1*-Regulation und deren Assoziation mit unterschiedlichen Krankheitsformen

Häufig wird die Expression entwicklungsbiologisch relevanter Gene während der Tumorentwicklung de- bzw. reorganisiert. So konnte dargelegt werden, dass der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Etablierung unterschiedlicher Krebsformen spielt (Polakis, 2000; Moon et al., 2004). Patienten, die beispielsweise am multiplen Myelom leiden, zeigen eine erhöhte *Dkk1*-Konzentration innerhalb des Blutserums (Tian et al., 2003). Seren von Patienten mit einer erhöhten *Dkk1*-Expression führten in Zellkultur-Experimenten zu einer Inhibierung von Osteoblasten-Vorläufern. Eine Behandlung von Myeloma-Patienten mit autologen Stammzelltransplantation führt zu einer Abnahme des

Dkk1-Niveau, was mit einer Zunahme an Knochenbildungsmarkern korreliert (Politou et al., 2006).

Eine Vielzahl von Tumorzelllinien oder -Geweben weisen Veränderungen in der *Dkk1*-Expression auf. In Darm-Krebszellen, sowie in menschlichen Gebährmutterkrebs stellt das *Dkk1*-Gen ein Zielgen von β-Catenin dar (Gonzalez-Sancho et al., 2005; Chamorro et al., 20005). Grund für den Ausfall der *Dkk1*-Expression ist eine Hypermethylierung des *Dkk1*-Promotors. Die Überexpression von *Dkk1* in Kolon- Zellen (Aguilera et al., 2006) und in HeLa-Zellen (Mikheev et al., 2004) reduziert die Kolonien-Bildung und das Tumor-Wachstum, wodurch eine Tumor-Suppressor-Funktion für *Dkk1* angenommen wird.

1.9 Regulation der *Dkk1*-Expression

Während der Kopfinduktion führt der Verlust der *Dkk1*-Expression zu einer ektopischen Wnt/β-Catenin-Signalweg-Aktivierung im anterioren Keimbahngewebe und vermindert Zellbewegungen im Endoderm während der Maus Gastrulation. Interessanterweise führt eine Reduktion der *Wnt3*-Genexpression in *Dkk1*$^{-/-}$-Mäusen zu einer Reduktion des Kopfphänotyps. Aufgrund dieser Tatsache wird ein direkter negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen *Dkk1* und *Wnt3* angenommen (Lewis et al., 2008).

Wie bereits erläutert, führt die Überexpression von *Dkk1* in Hühnergliedmaßen zu verstärkter Apoptose, was mit einer drastischen Reduktion von Gliedmaßen einhergeht. Durch weiterführende Untersuchungen an Hühnergliedmaßenknospen ist der Einfluss transplantierter Kügelchen, die proteingetränkt waren, auf die *Dkk1*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung untersucht worden (Grotewold und Rüther, 2002). Für Bmp4 wird sowohl eine knocheninduzierende, als auch eine Zelltod induzierende Funktion angenommen. Durch Transplantationsexperimente konnte gezeigt werden, dass Bmp4 die Expression ausschließlich im Kontext der Apoptose-Induktion in der Gliedmaße induziert. Auch der durch Thalidomid induzierte oxidative Stress verstärkt den Bmp-Signalweg. Hierbei wird *Dkk1* heraufreguliert, wodurch der Wnt-Signalweg ektopisch inhibiert und dadurch Zelltod induziert wird (Knobloch et al., 2007). Dieser Effekt kann durch eine Blockade von Dkk1 oder GSK3β herabgesetzt werden. Fgf8 führt ebenfalls zu einer Aktivierung der *Dkk1*-Expression in Gliedmaßen von Hühnerembryonen (Grotewold und Rüther, 2002). Weiterhin wird die *Dkk1*-Expression durch UV-Irridation und weiteren exogenen Stimuli induziert. Die Induktion der *Dkk1*-Expression kann auch durch p53 hervorgerufen werden, welches ein wesentlicher Stimulus bei der Etablierung des programmierten Zelltods darstellt.

Um die direkte *Dkk1*-Regulation zu untersuchen, ist in weiteren Studien die Relevanz regulatorischer DNA-Sequenzen innerhalb des *Dkk1*-Promotors untersucht worden.
Hierbei konnte gezeigt werden, dass das humane *Dkk1* durch den Wnt-Signalweg direkt über TCF/LEF-Bindestellen erfolgen kann (Chamorro et al., 2005; Gonzalez-Sancho et al., 2005; Niida et al., 2004). Zudem bindet p53 an die entsprechende Zielsequenz innerhalb des *Dkk1*-Promotors (Wang et al., 2000).
Die Relevanz Gen-regulatorischer Sequenzen im Bereich des Maus–*Dkk1* Lokus wurde durch eine Mausmutante analysiert, die als *doubleridge* bezeichnet wird (Adamska et al., 2003; MacDonald et al., 2004). Diese Mausmutanten weisen eine Deletion von 60kb genomischer DNA 140kb 3' des *Dkk1* Startcodons auf. Der Verlust dieser Sequenz führt zu einer Reduktion des endogenen *Dkk1*-Levels auf 10% in sich entwickelnden Kopfanlagen. Die Kopfentwicklung ist dennoch in diesen Mutanten unbeeinflusst, die Restaktivität scheint demnach hinreichend für die Induktion zu sein. Eine weitere Reduktion des *Dkk1*-Maßes durch die Kombination des *doubleridge*-Allels mit einem $Dkk1^{+/-}$-Allel führt jedoch zu einer Vielzahl von Kopfdefekten. Diese reichen von Hydrozephalie und Anophthalmie bis zu einem Verlust anteriorer Kopfstrukturen (MacDonald et al., 2004).
Die *doubleridge*-Mäuse weisen, wie $Dkk1^{-/-}$-Embryonen Polydaktylie auf, welche auf einer erweiterten AER beruhen (Mac Donald et al., 2004; Adamska et al., 2004). Weiterhin resultiert durch die verminderte Wnt-Inhibition ein Überschuß an Wnt-Signalaktivierung über den Rezeptor Lrp6. Durch eine Kombination der *doubleridge* Mutanten mit $Lrp6^{+/-}$-Mäusen konnte dementsprechend die Zehenzahl auf ein normales Maß gehoben werden (MacDonald et al., 2004). Wie die distinkte *Dkk1*-Expression während der Entwicklung im Einzelnen gesteuert wird, ist zurzeit nicht bekannt.

1.10 Mechanismen der Gen-Regulation *in cis:* Promotoren und Enhancer

Die räumlich zeitliche Realisierung erblicher Information führt zu einem funktionellen Lebewesen und stellt ein fundamentales Charakteristikum einer Spezies dar. Heute ist die Beschreibung Protein-kodierender Gene auf der Basis von Genom-Projekten weit fortgeschritten. Die Genome von Säugetieren kodieren für einen bemerkenswert konsistenten Satz von Genen (Gibbs et al., 2004; Mural et al., 2002; Waterston et al., 2002), mit Orthologen für eine Mehrheit dieser Gene innerhalb der Familie der Säugetiere. Unterschiede finden sich hauptsächlich in paralogen Duplikationen bestimmter Gen-

Familien. Da ein ähnlicher Satz an Genen in unterschiedlichen Spezies vorhanden ist, wird vermutet, dass regulatorische Unterschiede eine wichtige Rolle bei der Evolution zwischen den Spezies spielen.

Da in der vorliegenden Arbeit die über genregulatorisch fungierende DNA-Sequenzen vermittelte direkte Regulation der *Dkk1*-Expression untersucht wurde, sind im Folgenden bekannte genregulatorische Fakten erläutert.

Genregulatorische Mechanismen werden heute in drei unterschiedliche Kategorien unterteilt:

i) Regulation der Transkription in *cis*, die durch DNA-Sequenzen in Promotoren, Enhancern und Silencern bewerkstelligt wird;

ii) Regulation in *trans*, vermittelt durch Transkriptionsfaktoren, die an *cis*-Stellen binden, sowie RNA-Interferenz und MikroRNAs (miRNAs);

iii) Regulation auf der Basis des Verpackungsgrads und Modifikationsstatus der DNA (z.B. CpG-Methylierung) und wie die DNA verpackt wird (z.B. Histon-Azetylierung und Methylierung).

Neben den Protein-kodierenden Regionen existieren regulatorische Sequenzen innerhalb eines Genomes, die an beiden Seiten, wie auch innerhalb eines Genes (v.a. in Introns) lokalisiert sein können. Diese Sequenzen, Promotoren, Enhancer oder Silencer kontrollieren das räumlich zeitliche Expressionsmuster eines Genes.

Promotoren stellen Bindestellen für basale Transkriptionsfaktoren dar, welche die Initiation der Transkription von Protein-kodierenden Genen ermöglichen. Hauptmerkmal ist die Bindestelle für die RNA-Polymerase, die TATA-Box, welche ca. 30 bp vor dem Transkriptionsstart gelegen ist. Während der Bindung der RNA-Polymerase wird bei Eukaryoten ein Transkriptionsintinitiationskomplex gebildet (Berg et al., 2006), der in dieser Arbeit nicht weiter erläutert wird.

Enhancer stellen wichtige Regulatoren der räumlich zeitlichen Dynamik der Expression eines Genes dar. Sehr häufig liegen diese weit von dem Gen entfernt, dessen Expression sie kontrollieren. Weiterhin können mehrere Enhancer die Transkription eines Genes kontrollieren, wobei ein Enhancer von mehreren Trankriptionsfaktoren gebunden werden kann, die wiederum häufig in Kombination eine gewebespezifische Expression verursachen. Trankriptionsfaktoren, gebunden an einem Enhancer, interagieren mit dem Promotor-Komplex des regulierten Genes. Des weiteren ist beschrieben worden, dass Transkriptionsfaktoren nicht nur als transkriptionelle Aktivatoren fungieren, sondern auch als Inhibitoren, die Silencer genannt werden.

1.10.1 Phylogenetisch konservierte, nicht-kodierende Sequenzen (CNEs)

Die Initiation der Transkription an Promotoren, die durch angrenzende cis-Regulatoren beeinflusst wird, ist bis heute gut an niederen Eukaryoten charakterisiert (Levine und Tijan, 2003). Wie jedoch das räumlich-zeitliche Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene höherer Eukaryoten reguliert wird, ist weitgehend unbekannt. Eines der fundamentalsten Ziele in der Genom-Ära ist sicherlich, die Mechanismen der Gen-Regulation zu entschlüsseln und darzulegen, wie die Evolution des Musters der Gen-Regulation zu morphologischen und phänotypischen Unterschieden unter den Organismen geführt hat. Wie wichtig die Genregulation ist, wird dadurch verdeutlicht, dass 2/3 der Sequenz-Konservierung in Säugetieren nicht Protein-kodierend ist (Evtushenko et al., 1989). Diese konservierten Sequenzen werden auch als „konservierte nicht-kodierende Sequenz-Elemente“ (CNEs) bezeichnet und fungieren häufig als Enhancer oder Silencer. CNEs sind weitgehend einzigartig innerhalb eines Genomes. Zudem sind bis heute keine charakteristischen Erkennungsmerkmale beschrieben worden. Ultrakonservierte CNEs, die erstmals von Bejarano et al. beschrieben worden sind, zeigen eine Identität in mehr als 200bp innerhalb der Genome zwischen Mensch, Maus und Ratte. Diese Elemente sind auch in Nicht-Säugetieren existent, mit Ausnahme der Invertebraten. Mehr als 1400 dieser Sequenzen sind zwischen dem Kugelfisch und dem Menschen hoch konserviert, wobei die Mehrheit mit entwicklungsbiologischen Genen assoziiert ist (Woolfe et al., 2005). Dies wird beispielsweise durch CNEs deutlich, welche die Entwicklungsgene *Sox21*, *Pax6*, *Hlxb9* und *Shh* umgeben, da von 25 getesteten CNEs 23 eine Enhancer-Funktion in einem oder in mehreren Geweben besitzen. Diese Tatsache legt nahe, dass deren Konservierung zu einer Spezifikation des entwicklungsbiologischen Programms in höheren Organismen geführt haben muß (Dermitzakis et al., 2002). Wie für viele Protein-kodierende Gene, konnte für Mausmutanten, in denen CNE-reiche Regionen deletiert worden sind, gezeigt werden, dass diese Sequenzen nicht zwangsläufig essentiell für die gewebespezifische Expression eines Genes sind, da die entsprechenden Mutanten keinerlei Phänotypen aufwiesen. Dieser Befund wird durch eine weitere Studie gestützt, in der mehr als 1000 CNEs, die in Gen-Wüsten lagen, deletiert wurden, jedoch keine schwerwiegenden Phänotypen auftraten (Nogreba et al., 2004). Dass CNEs gegenteilig essentiell für die Expression des zu regulierenden Genes sein können, wurde durch Analysen eines ein *Shh*-regulierendes CNEs gezeigt. Dieses verursacht eine charakteristische *Shh*-Expression in

den Gliedmaßen, und ist ca. 1 Mb vom *Shh*-Gen entfernt, innerhalb des Introns des benachbarten Genes *Lmbr1,* lokalisiert. Zudem korreliert der zufällige Austausch einzelner Basen beim Menschen mit Phänotypen, die man bereits von *Shh*-Mausmutanten kannte (Lettice et al., 2003). Sowohl Phänotypen der Mausmutante *Hx*, als auch unabhängige Mutationen einzelner Menschen sind auf Punktmutationen innerhalb dieses CNEs zurückzuführen. Punkt-Mutationen, die in sehr weit entfernt gelegenen CNEs, die als Enhancer fungieren auftreten, können also auch zu kongenitalen Abnormalitäten führen.

1.11 Ziel der Arbeit

Dkk1 ist ein differentiell exprimiertes Gen und spielt durch die Inhibition des Wnt-Signalweges während der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. Diese Modulation ist essentiell für die Musterbildung unterschiedlicher Gewebe. In vorherigen Arbeiten ist gezeigt worden, dass die *Dkk1*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung genetisch durch verschiedene Faktoren reguliert wird. Weiterhin können geringfügige Veränderungen des endogenen, räumlich-zeitlich exakt koordinierten *Dkk1*-Expressionsniveaus drastische Phänotypen zur Folge haben, woraus sich vermuten lässt, dass die dynamische *Dkk1*-Regulation distinkt verlaufen muss. Die biologische Bedeutung der *Dkk1*-Regulation wird auch dadurch verdeutlicht, dass eine veränderte *Dkk1*-Expression häufig mit der Etablierung unterschiedlicher Krankheiten in Verbindung gebracht wird. Wie die *Dkk1*-Genexpression und damit die durch Dkk1 vermittelte Wnt-Inhibition während der Embryonalentwicklung direkt gesteuert wird, ist zur Zeit unbekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

Hierfür wurden im Bereich des *Dkk1*-Lokus durch *in silico*-Analysen CNEs identifiziert, die von Relevanz für die *Dkk1*-Regulation sein könnten. Ihre regulatorischen Eigenschaften wurden durch die Generierung unterschiedlicher Reporterkonstrukte in transient exprimierenden Reportermäusen in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Um die räumlich-zeitliche Relevanz dieser CNEs zu untersuchen, ist eine transgene Mauslinie generiert worden.

Die Entschlüsselung der direkten *Dkk1*-Regulation liefert einen wesentlichen Beitrag für das Verständnis von Musterbildungsprozessen während der Entwicklung. Zudem stellen Erkenntnisse über die Regulation des *Dkk1*-Genes während der Entwicklung eine grundlegende Bedeutung für die Erforschung unterschiedlicher Krankheitsformen dar.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Chemikalien, Standardlösungen und Nährmedien

Die während dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden, soweit nicht speziell erwähnt, von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, New England Biolabs (NEB), Merck, Riedel de Haen, Roche Molecular Biochemicals, Roth und Sigma bezogen. Die jeweils benötigten Materialien werden bei den einzelnen Methoden genauer aufgeführt. Zum Ansetzen von Lösungen wurde Wasser aus einer Millipore-MilliQAnlage verwendet. Soweit erforderlich, wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 min. oder durch trockene Hitze bei 180°C für 30 min. sterilisiert. Alle eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien, soweit bei den einzelnen Versuchen nicht explizit erwähnt, entsprechen den in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendeten.

TAE	40 mM Tris/Acetat 2 mM EDTA pH 8.2 (mit Acetat eingestellt)
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8.0 (mit HCl eingestellt)
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton (Applichem #A1553) 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Applichem #A1552) in H_2O autoklaviert
Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin (Applichem #A0839) in LB-Medium
Ethidiumbromid	10 mg/ml (Applichem #A1152)
Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G (Merck #14277) in TAE
Puffer P1	50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0
Puffer P2	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacatat pH 4,8 mit Eisessig
Phenol/Chloroform	3:1; TE gesättigt
Natriumacetat	3 M; pH 5,2 (mit HCl eingestellt)
Nährboden	1.5% (w/v) Bacto-Agar (Applichem #A0949)

		50 µg/µl Ampicillin (Applichem #A0839) in LB-Medium autoklaviert
dNTP-Gemisch		10 mM dATP (Roche #1969064) 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Oligonokleotide		100 pmol/µl in ddH_2O (MWG)
DEPC-H_2O		H_2O + 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gelöst; autoklaviert
NH_4Ac	10 M	
SSC (20-fach)		175,3 g/l NaCl 88,2 g/l Natriumacetat ad 1l dd H_2O pH 7,2; (mit HCl eingestellt) autoklaviert
50% Formamid/2xSSC		50% (v/v) Formamid (DEPC-H_2O) 2 x SSC
PBS		4 mM NaH_2PO_4 x H_2O 16 mM Na_2HPO_4 x2H_2O 150 mM NaCl pH 7.3 (mit HCl eingestellt) autoklaviert
Paraformaldehyd (PFA)		4% (w/v) PBS
PFA/Glutaraldehyd		4% (w/v) PFA 0,1% Glutaraldehyd in PBS
PBT		PBS +1% (v/v) Tween 20
25% Methanol		25% (v/v) Methanol in PBT
50% Methanol		50% (v/v) Methanol in PBT
70% Methanol		70% (v/v) Methanol in PBT
H_2O_2		6% (v/v) H_2O_2 in PBT
Proteinase K		5 µg/ml in PBT
Glycin		2 mg/ml in PBT
Hybridisierungsmix		50% Formamid (deion.) 5x SSC; pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X 50 µg/ml Heparin (Sigma #H9399) 0,5 mg/ml tRNA (Roche #109525) 5 mM EDTA; pH 8,0

	DEPC-H_2O
Lösung I	50% Formamid 1x SSC; pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X-100 DEPC- H_2O
Lösung I/MABT	50% (v/v) Lösung I 50% (v/v) MABT
MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7.5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X
Blocklösung	2% (w/v) Blockreagenz (Roche #1096176) 20% Schafserum (hitzeinaktiviert) (Sigma #S-2236) in MABT
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9.5 50 mM $MgCl_2$ 0,5% (v/v) Tween-20 0,2 mg/ml Levamisole (Sigma #L9756)
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP (Roche #1681451) in NTMT
Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol
Hybridisierungsmix	2,5 ml Formamid 1,25 ml 20x SSC 50 mg Blockreagenz (Roche #1096176) 295 ml bidestiliertes Wasser bei 65°C lösen 50 µl 0,5 M EDTA 5 µl Tween-20 50 µl CHAPS (10%) 100 µl Heparin (1 mg/ml) 500 µl Hefe-tRNA (10 mg/ml)
B-Block-Lösung	2% Blockreagenz (Roche #1096176) 10% Ziegenserum in PBT
NTM	100 mM Tris pH 9.5 100 mM NaCl 50 mM $MgCl_2$
Aquatex	(Merck #1.07961.0500)
100 mM Zitratpuffer	100 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH6 (mit Zitronensäure eingestellt)
Verwendeter Bakterienstamm:	*Echerichia coli* JM 109 (recA1, lacZΔM15)

2.2 Erzeugung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur gerichteten Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren wurden zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen gewählt, die inkompatible überhängende DNA-Enden generieren. Diese wurden im Allgemeinen von Roche oder NEB bezogen und zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer angesetzt. Der Vektor und das Fragment wurden mit entsprechenden Enzymen mindestens 2 Std. bei 37°C verdaut. Für eine analytische Spaltung wurde ein Aliquot des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein 20 µl-Ansatz bestand aus:

0,1 Volumen 10xPuffer (1,2,3 oder 4)
0,1 Volumen BSA 1 µg/ µl (falls vorgesehen)
(je) 1 µl Restriktionsenzym
1 µl DNA (1µg /µl)
ad 20 µl mit dest.H_2O

Diente der Ansatz einer Linearisierung für die Herstellung einer Sonde für die *in situ* Hybridisierung, so wurden 40 µl-Ansätze angesetzt, in die 12 µg DNA und die entsprechenden Puffermengen eingesetzt wurden.

2.3 Dephosphorylierung von DNA

Um die Frequenz der Vektor-Religation bei Spaltungen mit nur einem Restriktionsenzym zu verringern, erfolgte eine Dephosphorylierung der entstandenen Enden mit alkalischer Phosphatase (Roche #M029OS). Dem Restriktionsansatz wurde die entsprechende Menge Reaktionspuffer und die Enzymaktivität von 1U alkalischer Phosphatase hinzugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform versetzt und die DNA mit Ethanol extrahiert (vgl. 2.9).

2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von geschnittenen DNA-Molekülen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Als Gel- sowie als Laufpuffer wurde das TAE-Puffersystem eingesetzt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8 – 2% (w/v) verwendet. Der aufgekochten Agaroselösung wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und die zu analysierenden Proben vor Beladung des Gels mit 0,25 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt.

Die spätere Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Fragmente erfolgte im Vergleich zu einer 1kb-DNA-Leiter (GibcoBRL #15615-024).

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte schließlich bei einer konstant gehaltenen Spannung von 5 Volt/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente

wurden im Anschluss durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage (Phase, Lübeck) fotografiert. Sollten DNA-Fragmente zur Ligation eingesetzt werden, wurde die DNA-Bande mit einer Hand-UV-Lampe (Konrad Benda) bei 366nm detektiert und aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.5).

2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte aus hochschmelzenden Agarose-Gelen und wurde mit der „Glasmilch-Methode“ (Vogelstein and Gillespie 1979) mit Hilfe des Genomed-Jet sorb Gel Extraction Kit/600 durchgeführt. Hierfür wurden die Gelstücke gewogen und pro 0,1 mg Agarose 300 µl Puffer A1 zugegeben. Anschließend wurden 12 µl Glasperlen zugefügt und diese wurden durch Pipettieren homogen verteilt. Der Ansatz wurde bei 56°C für 10 min. und 1400 Upm auf dem Schüttler inkubiert und 15 sec. bei 13000 Upm zentrifugiert. Die DNA befand sich an den Glasperlen gebunden im Sediment. Der Überstand wurde dann abgesaugt und 500 µl Puffer A1 zugegeben, wobei das Sediment hierbei mit einer Pipette gelöst wurde. Anschließend wurde erneut für 15 sec. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf das Präzipitat wurden anschließend 500 µl Puffer A2 gegeben und durch Pipettieren gelöst. Daraufhin wurde 15 sec. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Reaktionsgefäß offen für 45 sec. im Heizblock inkubiert. Dann wurden 20 µl TE zugegeben und das getrocknete Sediment gelöst. Darauf wurde 5 min. bei 56^{o}C und 1400 Upm geschüttelt und in der Zentrifuge 2 min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde zuletzt in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle wurden 10% des Volumens der eluierten DNA auf ein Gel aufgetragen, um die Konzentration zu bestimmen.

2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um geschnittene DNA-Fragmente mit Vektor-DNA zu verknüpfen, wurden diese mit 1 U T4-DNA-Ligase (Gibco) im vom Hersteller mitgelieferten Puffer (5 x T4-Ligase Puffer, Gibco) bei Raumtemperatur für 2 Std. in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Dabei wurden in der Regel 100 ng Vektor-DNA und 300 – 500 ng Insert-DNA eingesetzt.
Wurde bei der Ligation von einer durch PCR mit der *Taq*-Polymerase amplifizierten Sequenz ausgegangen und diese in den T-Vektor kloniert, wurde Ligase und der 2-fach-

Puffer des pGEM-T Kits (Promega #A3600) verwendet. Ein Ligationsansatz des "pGEM-T Kits" war wie folgt zusammengesetzt:

5 µl T4-Ligase Puffer (2 x)
1 µl pGEM-T Vektor (50 ng/ µl)
x µl PCR-Produkt
1 µl T4-Ligase
ad 10 µl ddH_2O

2.7 Transformation eines Ligationsansatzes in kompetente *E.coli*-Zellen

Auf 5 µl Ligationsansatz wurden 95 µl kompetente *E.coli*-Zellen gegeben. Anschließend wurde bei 30 min. auf Eis inkubiert und für 45 sec. bei 42°C ein Hitzeschock ausgelöst. Daraufhin wurde der Ansatz 1 min. auf Eis abgekühlt und 100 µl LB-Medium zugegeben. Es wurde dann 10 min. bei 37°C und 1050 Upm inkubiert und die Suspension auf Antibiotikum- haltigen Selektivnährböden ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert (Fritsch et al. 1989). Die herangewachsenen Bakterienkolonien wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, welche hauptsächlich der Analyse der Klone, sowie der Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA dienten.

2.8 Präparation von DNA aus E.*coli*-Plasmiden

Die im folgenden beschriebenen Methoden stellen Modifikationen der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979) und Birnboim (Birnboim 1983) dar. Die alkalische Lyse wird angewendet, um aus Bakterien Plasmid-DNA zu isolieren. Durch die Zugabe von NaOH zum Zellextrakt wird der pH-Wert weit ins alkalische verschoben. Dadurch lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen sowohl der chromosomalen als auch der Plasmid-DNA, wobei die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Konformation in der Lage ist, vollständig zu renaturieren. Die chromosomale DNA, die durch die einzelnen Präparationsschritte zerstückelt wurde, kann nach Neutralisation des pH-Wertes mit Kaliumacetat und Eisessig nicht renaturieren, es bilden sich DNA-Doppelstränge mit nur kurzen komplementären Bereichen und durch die ungerichtete Verbindung vieler DNA-Einzelstränge kommt es zur Ausbildung einer verworrenen DNA-Masse. Diese kann relativ leicht zusammen mit dem durch die Neutralisation ausgefallenen NaOH abzentrifugiert werden. Bei diesem Zentrifugationsschritt setzen sich ferner Zellmembran- und Zellwandbestandteile sowie Proteine als Präzipitat ab. Die Isolation von Plasmiden in kleinem Maßstab diente der

Kontrolle einer erfolgreichen Insertion in den verwendeten Vektor. Die Präparation im größeren Maßstab diente der Präparation größerer Mengen DNA.

2.8.1 Präparative Isolierung von Plasmiden mit der Minipräparation

Eine von der Platte gepickte Kolonie wurde für 12-14 Std. mit 6 ml LB-Amp-Medium bei 37°C inkubiert. Die DNA der Klone wurde mit Hilfe des QIAGEN-Mini-Kits (#12123) aus den Zellen isoliert:

Die Zellen wurden 5 min. bei 6000 Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 150 µl Puffer P1 auf das Präzipitat gegeben und das Sediment resuspendiert. Dann wurden 200 µl P2 zugegeben, der Ansatz durchmischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um eine alkalische Lyse zu ermöglichen. Durch Zugabe von 175 µl Puffer P3 und mischen, wurde der Ansatz neutralisiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min. auf Eis. Im folgenden wurde der entstandene Niederschlag mittels einer 10 min. Zentrifugation bei 13000 Upm sedimentiert. Der klare, plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Isopropanol für die Präzipitation der DNA zugegeben. Nach erneutem Mischen und einer Zentrfugation von 10 min. bei 13000 Upm wurde die präzipitierte DNA mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde luftgetrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

2.8.2 Präparative Isolierung von Plasmiden mit der Maxipräparation

Für Plasmid-Präparationen wurde das QIAGEN Plasmid MaxiKit (#12163) verwendet. 100 µl Bakterienkultur wurden auf 100 ml LB-Amp-Medium gegeben und für 12-16 Std. bei 37°C schüttelnd (200 Upm) inkubiert. Die Bakterien-Zellen wurden anschließend durch eine 15 minütige Zentrifugation (6000 Upm) geerntet und das Bakterien-Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Darauf folgend wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, 4-6mal invertiert und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml 4°C kalten P3 wurde 4-6 mal invertiert und 20 min. auf Eis inkubiert. Dann wurde bei 13000 Upm für 30 min. bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Äquilibrierung der QIAGEN-Säule (Qiagen-tip 500) erfolgte durch Zugabe von 10 ml QBT-Puffer. Der zuvor entnommene Überstand wurde auf die Säule gegeben, welche anschließend mit 2x30 ml

Puffer QC gewaschen wurde. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach kurzem Mischen und anschließender Zentrifugation (15000 Upm) für 10 min. wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet für 10 min. getrocknet. Die Plasmide wurden anschließend in 100 µl TE aufgenommen.

2.9 Gewinnung von DNA aus Maus- Gewebebiopsien

Für die Genotypisierung von transgenen Tieren wurden Schwanzspitzenbiopsien mit 0,7 ml 50 mM Tris/HCl (pH8), 100 mM EDTA, 0,5% SDS versetzt. Anschließend wurden 35 µl einer 10mg/ml Lösung Proteinase K hinzgegeben. Die Biopsien wurden dann O/N bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert, um durch den Proteinase K-Verdau das Gewebe aufzulösen. Daraufhin wurde 1 Volumen Phenol hinzugegeben und das Gemisch 5 min. invertiert, so dass die organische und die wässrige Phase miteinander vermischt wurden. Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt. Daraufhin wurde die obige, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) hinzugefügt und erneut 5 Minuten invertiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 Upm. Die obige wässrige Phase wurde abermals entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (pH6) und anschließend 1 Volumen 100% Ethanol wurde die DNA beim invertieren präzipitiert. Durch eine 1 minütige Zentrifugation wurde die genomische DNA pelletiert. Der alkoholische Überstand wurde mit einer Pipette entnommen und verworfen. Durch Zugabe von 1 ml 70% Ethanol und anschließendem Mixen wurde die DNA von restlichem Phenol und SDS getrennt. Daraufhin wurde 2 min. bei 13.000 Upm zentrifugiert, um die DNA zu konzentrieren. Die genomische DNA wurde daraufhin mit 0,1 ml 10 mM Tris/HCl (pH8); 1 mM EDTA gelöst und 1 µl in die PCR für die Genotypisierung eingesetzt.

2.10 RNA-Isolierung aus Mausembryonen

Aus Embryonen wurden die Augenanlagen herauspräpariert und direkt in flüssigen Stickstoff überführt und bei –80°C gelagert.

Für die RNA-Isolierung wurden einzelne Augengewebe mit einem Mörser homogenisiert und mit dem RNeasy Mini kit (Qiagen #74104) weiterverarbeitet. Hierbei wurde das Gewebe mit 350 µl RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol (1/100) versetzt. Durch eine

anschließende zwölfminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurden die Zellfragmente abzentrifugiert und von dem RNA-haltigen Überstand getrennt. Die Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Volumen 70% Ethanol hinzugegeben. Anschließend wurde mit einer Pipette verschmischt. Die Lösung wurde daraufhin auf die Säule gegeben und 15 sec. bei 12.000 Upm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde darauffolgend wiederholt. Desweiteren wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 sec. zentrifugiert (12.000Upm), die durchgelaufene Lösung verworfen und ein neues Auffanggefäß untergesetzt. Die Säule wurde dann mit 500 µl RPE-Puffer befüllt und 15 sec. bei 12.000 Upm zentrifugiert. Der Schritt wurde wiederholt, wobei für 2 min. bei 13.000 Upm zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde ein neues Auffanggefäß untergesetzt und die Säule bei 1 min. trocken zentrifugiert. Die RNA wurde zuletzt durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem H_2O, 5-minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 12.000 Upm gesammelt und bei -80°C gelagert. Bei der weiteren Verwendung wurde die RNA auf Eis gehalten.

2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die quantitative Analyse der Nukleinsäuren erfolgte durch Messung in einem Spektralphotometer (Pharmacia; Ultrospec2000) mit verdünnten Nukleinsäuren (1:50, 1:100 oder 1:300) in einer Quarzglasküvette. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 nach Abzug des Referenzwertes für das verwendete Lösungsmittel einer ungefähren Konzentration von 30 µg/ml.

2.12 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die PCR-Reaktion diente der enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen und stellt eine Variation des Verfahrens von Saiki et al. (1988) dar. Für die gezielte Vermehrung wurden Oligonukleotide aus den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz gewählt und von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert. An den 5'-Enden dieser Oligonukleotide wurden, falls notwendig, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingebaut, um das Klonieren in entsprechend geöffnete Vektoren zu ermöglichen. An den 5'-Enden dieser Restriktionsschnittstellen wurden 3 Nukleotide angefügt, damit die amplifizierte DNA von einer Restriktionsendonuklease geschnitten werden konnte. Sollte das amplifizierte PCR-Produkt anschließend in einen Vektor kloniert werden, der der Generierung von Proteinen diente, wurde bei der Wahl des

5'-Oligonukleotide darauf geachtet, dass das Leseraster des Vektors nach der Klonierung unverändert in das Leseraster der amplifizierten Sequenz überging. Als Polymerase für die gerichtete Klonierung wurde die *Taq*-Polymerase *expand* verwendet, die zusätzlich einen „proofreading"-Mechanismus besitzt. Alternativ wurde auch mit der *Taq*-Polymerase und dem dazugehörgen Puffersystem amplifiziert (Roche #1146165), die eine höhere Fehlerrate beim Einbau der Nukleotide besitzt, jedoch DNA-Fragmente synthetisiert, die zu etwa 50% einzelne Adenin-Überhänge an ihren 3'-Enden besitzen. Dieser Umstand wurde ausgenutzt, um die PCR-Produkte direkt und ungerichtet mit Vektoren zu ligieren (pGEM-T; Promega), welche stumpfe Enden besaßen und an ihren 5'-DNA-Enden mit entsprechenden Thymidin-Überhängen versehen waren. Aufgereinigte PCR-Produkte konnten in Ligationen mit dem so präparierten Vektor eingesetzt werden.
Die PCR-Reaktionen wurden in einer MWG-Biotech-Maschine (Primus) unter Verwendung dünnwandiger 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt:

5 µl 10xPuffer
8 µl NTP´s (1,25 mM)
5 µl Oligonukleotid 1 (20 pmol/µl)
5 µl Oligonukleotid 2 (20 pmol/µl)
0,5 µl *Taq*-Polymerase (Expand High Fidelity)
1 µl DNA (1 ng/µl)
25,5 µl dH_2O

Im Folgenden ist der Ablauf einer PCR mit seinen Zyklen und den jeweiligen Temperaturen abgebildet:

	5min.	95°C
Zyklenanzahl x {	1min.	95°C
	1min.	58°-66°C
	1min.	72°C
	5min.	72°C
	∞	4°C

2.12.1 Verwendete Oligonukleotide

	Oligonukleotide (in 5´-3´-Orientierung):
Bezeichnung	**Isolierung einzelner CNE-Sequenzen aus genomischer DNA**
CNE25kb fw	GCAACATGAAAGTAGAGCAAG
CNE25kb bw	CACAGAAGTATGAATTGAAGC
CNE87kb fw	CCAGTGCTTGGTCTCTGA
CNE87kb bw	CCTGTAGCTCCTATGAAAC
CNE114kb fw	TTAACGTCACGTCTCCACAG
CNE114kb bw	TATAGCACCACCCTGTTCTC
CNE129kb fw	CGATGTTATGTCTCTTGTCAC
CNE129kb bw	GGAGATGCAATCAACTCCTAC
CNE140kb fw	GATCAGATTGTCCACATGCAAC
CNE140kb bw	CATGTCTCCATTCTCCACCATC
CNE168kb fw	GGTAGCATACTAGAAGAATCAG
CNE168kb bw	CCAACTAGGCCATCTTCTGAT
CNE175kb fw	GCTGATTAGCAGGAGGTTC
CNE175kb bw	GGTGTTGGCTCACAACCATC
CNE190kb+195kb fw	TAGTGAGAAGCTGGAAGCAG
CNE190kb+195kb bw	CCACTCTCAGTTCTATTGTGG
CNE190kb fw	GAGGATGTGGAGTTTAAGGTC
CNE190kb bw	GTCCACTTTGCAGGAATGATC
CNE195kb fw	CTGAGCAACCAATTACTGTAC
CNE195kb bw	GCTTATTCTCTGGATTCCTAC
	RT- PCRs
Dkk1fw	TTGCGTCCTTCGGAGATGATGG
Dkk1bw	ACTCCTCATCTTCAGCGCAAGG
HPRTfw	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
HPRTbw	CACAGGACTAGAACACCTGC
	Deletion und Mutagenese

Deletionsprimer fw	CAGTGTTGGACCATCACTT
Deletionsprimer bw	AAGTGATGGTCCAACACTG
CNE195kb (TCF/Lef) fw CNE195kb (TCF/Lef) bw	ATGAATGAAACTTCAAAGGGCAAGGGTCA TGACCCTTGCCCTTTGAAGTTTCATTCAT
CNE195kb Mut(TCF/Lef) fw CNE195kb Mut(TCF/Lef) bw	ATGAATGAAACTTGAATTCGCAAGGGTCA TGACCCTTGCGAATTCAAGTTTCATTCAT
	Genotypisierungen
LacZfw LacZbw	GTTCCGTCATAGCGATAACGAG CACTTACGCCAATGTCGTTATCC
Dkk1ko1 Dkk1ko2 Dkk1ko3	AGAACTAACCCAGCCCCACAGCAGA CTCCTCAGGGAAGACAACAAAGCCG GGGTCAACTCCAAGTTCCACCCAAA

Nach der PCR wurden die amplifizierten Moleküle zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.12.2 Reverse Transkription

Ca. 1 µg RNA wurden mit 10 µM Oligo dT-Primern 10,5 µl in DEPC-H_2O 10 Min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde für die reverse Transkription das „Expand Reverse Transcriptase"-System (Roche #1785834) verwendet. Folgender Ansatz lag dieser Reaktion zugrunde:

0,1 Vol. NTP's (10mM)
0,1 Vol. DTT
0,2 Vol. Puffer
0,1 Vol. Reverse Transkriptase
0,5 µl RNase Block

Die reverse Transkription wurde für 1 Std. bei 42°C durchgeführt und das Reaktionsgemisch bei 4°C gelagert. In die PCR- Amplifikationen wurden 2 µl dieses Ansatzes eingesetzt.

2.12.3 Mutagenese

In dieser Arbeit wurden innerhalb des CNE195 gezielte Basenaustausche in die Lef1-Bindestelle eingeführt, um diese zu zerstören. Hierbei wurde nach den Angaben des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene #200578) vorgegangen.
Es wurden jeweils komplementäre Oligonukleotide der entsprechenden Sequenz (siehe 2.12.1) mit den Basenaustauschen verwendet. In einer PCR-Reaktion, in der das Ursprungsplasmid als Template eingesetzt wurde, erfolgte durch die Anlagerung der Mutagenese-Primer und der Verlängerung durch die Taq-Polymerase (Triple-Master-PCR-System, Eppendorf #0032008.216) erneut ein zirkulärer Strang. Weiterhin wurde in den folgenden Zyklen ein doppelsträngiges Plasmid generiert, welches auf den komplementären Strängen die jeweilige Punktmutation trug. Zudem befand sich auf jedem Strang ein Einzelstrangbruch.
Um nach der PCR die generierten PCR-Produkte von dem Ursprungsplasmid zu selektionieren, wurde durch einen *DpnI*-Verdau, welcher ausschließlich die durch *E.coli* methylierte Sequenz erkennt, zerschnitten. Mit dem aufgereinigten, mutagenisierten Plasmid wurde eine Transformation in kompetente Zellen durchgeführt. Die transformierten Bakterien führten eine Reparatur der Einzelstrangbrüche durch, so dass die mutagenisierte DNA zirkulär und ohne Brüche vorlag.
Aus den transformierten Bakterien wurden am darauffolgenden Tag Mini-Kulturen angeimpft und am nächsten Tag die Plasmid-DNA gewonnen. Da durch die eingefügte Mutagenese eine *EcoRI*-Schnittstelle generiert wurde, konnte durch Restriktionsverdaus eine eindeutige Unterscheidung zwischen den mutierten Plasmiden und Ursprungsplasmiden vorgenommen werden. Die korrekte Etablierung der Punktmutation wurde durch eine Sequenzierung durch das BMFZ (siehe 2.13) überprüft.

2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von generierten genomischen DNA- Fragmenten wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

2.14 Generierung transgener Mäuse

Durch Vorkerninjektionen wurden, modifiziert nach Gordon und Ruddle (1983), die zu testenden Reporterfragmente in fertilisierte Oozyten injiziert. Durch anschließende Rekombination wurden dann eine oder mehrere Kopien zufällig in das Genom integriert, wodurch die *lacZ*-Genexpression in jeder Zelle des Organismus durch die regulatorisch

fungierenden Sequenzen gesteuert wird. Die Generierung der transgenen Mäuse wurde den Richtlinien der Bezirksregierung Düsseldorf entsprechend im Zentrallabor für transgene Tiere der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.14.1 Isolierung von DNA- Fragmenten für die Mikroinjektion

Um die zu testenden DNA- Fragmente von bakterieller Sequenz zu trennen, wurden diese durch Restriktionsendonukleasen verdaut, durch Gelelution isoliert und in Injektionslösung aufgenommen. Nach einer Konzentrationsbestimmung wurden die isolierten Fragmente mit Injektionslösung auf 1,5 ng/µl eingestellt und bis zu der Injektion bei -20°C gelagert.

Lösungen: Lösung1: 7,5 mM Tris/HCl
0,1 mM EDTA
pH 6,8

Lösung2: 7,5 mM Tris/HCl
0,1 mM EDTA
pH 7,8

Injektionslösung: Lösung1/Lösung2: 2/3

2.14.2 Vasektomieren männlicher Mäuse

Nach einer gewichtsabhängigen Narkose wurde das Fell mit 70% EtOH desinfiziert und durch einen transversalen Schnitt geöffnet. Einer der beiden Hoden wurde aus dem Skrotum gezogen und mit einer Pinzette der Vas deferens freigelegt und fixiert. Eine weitere Pinzette wurde über einer Bunsenbrennerflamme erhitzt und der Vas deferens durchgetrennt und verschlossen. Der Hoden wurde dann in das Skrotum zurückgesteckt und der Vorgang mit dem zweiten Hoden wiederholt. Die Bauchdecke wurde anschließend vernäht und das Fell geklammert. Nach einer Woche wurden die Klammern von den Mäusen entfernt und nach weiteren zwei Wochen wurden die Männchen in den Versuch aufgenommen.

Lösungen Narkotikum: 1,6 ml PBS
300 µl Ketamin
75 µl Xylazin

2.14.3 Superovulation und Isolation fertilisierter Oozyten

Um bei jungfräulichen Oozytenspender-Weibchen den Sexualzyklus einzuleiten, wurden die Tiere hormonell behandelt. Diese Behandlung führte gleichzeitig zu einer vermehrten Ausschüttung der Oozyten.

Vier Wochen alte, jungfräuliche *F_1(C57BL/6xC_3H)*-Weibchen dienten als Eizellen-Spender. Um eine Superovulation hervorzurufen, wurde den Weibchen gegen Mittag des

ersten Tages 8 U follikelstimulierenden Hormons PMS (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Sigma #G4877) intraperitoneal injiziert. Nach 48 Std. wurden den Tieren 7 U des Hormons HCG (humanem Choriongonadotropin, Sigma #CG5) injiziert und mit vertilen *F_1(C57BL/6xC_3H)*-Männchen verpaart. Am darauf folgenden Morgen wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und die fertilisierten Oozyten aus den befruchteten Weibchen isoliert. Hierfür wurden die Eileiter isoliert und in 500 µl M2-Medium (Sigma #M7167) überführt. Die Zygoten wurden dann aus den Eileitern entnommen. Durch Zugabe von 20 µl Hyaluronidase (Sigma #4272) und anschließender 5 min. Inkubation wurden die Zygoten von den umgebenden Kumuluszellen abgelöst. Die Oozyten wurden daraufhin gesammelt und durch mehrere Waschschritte in M2-Medium gereinigt. Um ein Austrocknen der Lösungen zu verhindern, wurden die Reaktionskammern mit einem sterilen Öl (Sigma #M5310) überschichtet.

2.14.4 Pronukleare DNA-Mikroinjektion in Maus-Zygoten

Bei der Mikroinjektion wurden isolierte DNA-Fragmente mit einer Konzentration von ca. 1,5 ng/µl mit einem Mikromanipulator in isolierte Mauszygoten injiziert. Die Injektionen erfolgten mit einer speziellen Mikromanipulationsanlage, bestehend aus einem Umkehrmikroskop und zwei Mikromanipulatoren (Leitz Labovert FS). Die isolierten und gereinigten Zygoten wurden in mit Öl überschichtetes M2-Medium in der Injektionskammer des Objektträgertisches überführt.

Die Mikromanipulatoren dienten der Befestigung und Steuerung der Halte- und der Injektionsadeln. Die befestigten Nadeln wurden so eingestellt, dass sie auf dem beweglichen Objektträgertisch über den Objektträger reichten.

Die Haltenadeln aus Glaskapillaren (Havard #GC110-10) wurden mit einem Glasziehgerät (Kopf #M720) ausgezogen. Die Enden der Kapillaren wurde durch einen Platindraht gebrochen und abgeflämmt (Bachofer), um den richtigen Kapillarendurchmesser zu generieren und die Zygoten beim Ansaugen nicht durch scharfe Bruchkanten zu beschädigen. Um ein Ansaugen der Embryonen zu ermöglichen, wurde die Haltenadel mit M2-Medium gefüllt und Luftblasenfrei mit einer über Öldruck funktionierenden Stellschraube versehenen Glasspritze mit dem Mikromanipulator verbunden.

Die Injektionsnadeln (Havard #GC120TF-10) wurden entsprechend den Haltenadeln generiert, und in die DNA-Lösung eingetaucht, wodurch über die wirkenden Kapillarkräfte die DNA-Lösung in der Nadel bis zur Spitze reichte. Die Injektionsnadel wurde mit einem Luftdrucksystem verbunden und in den Mikromanipulator eingespannt. Über Luftdruck

wurde bei den Injektionen die DNA-Lösung in die männlichen Vorkerne injiziert. Nach der Injektion wurden die injizierten Eizellen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 in M16-Medium (Sigma #M7292) gelagert.

2.14.5 Embryotransfer in das Ovidukt von Rezipienten-Mäusen

Durch Verpaarungen zwischen *F_1(C57BL/6xC_3H)*-Weibchen mit vasektomierten Männchen am Vortag wurde ein am Versuchstag scheinträchtiges Weibchen in den Versuch aufgenommen. Die scheinträchtige Maus wurde intraperitoneal mit einem Narkotikum in Abhängigkeit des Körpergewichtes injiziert. Nach vollständiger Narkose wurde das Fell mit Ethanol gereinigt und durch einen dorsolateralen Schnitt geöffnet. Ovar, Eileiter und der Uterus wurden an dem Fettpolster aus der Öffnung gezogen und das Ovidukt an dem anliegenden Fettgewebe mit einer Klemme fixiert. Unter einem Stereomikroskop wurde das Gewebe über dem Eileiter aufgerissen und evtl. austretendes Blut entfernt. Als Transfernadel diente eine Glaskapillare, die am Bunsenbrenner gezogen und mit einem Glasschneider durchgeschnitten wurde. Das Ende wurde an der Flamme abgerundet. Beim Befüllen der Kapillare mit den Zygoten wurde zunächst M2-Medium aufgenommen, dann zwei Luftblasen und anschließend die Zygoten. Daurauf folgend wurden ca. 30 injizierte Zygoten mit einer Transfernadel in das freiliegende Infundibulum transferiert. Die freigelegten Organe wurden anschließend wieder in die Bauchhöhle gelegt und die Oberhaut geklammert.

2.15 Nachweis der Reportergen-Aktivität

Als Reporter wurde in dieser Arbeit das *lacZ*-Gen verwendet. Produkt dieses Genes ist β-Galaktosidase, welches die Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indosyl-β-D-Galaktosid) katalysiert. Die enzymatische Aktivität der β-Galaktosidase ist detektierbar, da eine Blaufärbung in den exprimierenden Zellen entsteht.

Zunächst wurden die Embryonen zu dem gewünschten Entwicklungstag aus den Weibchen isoliert und in kaltes PBS überführt. Die entsprechenden Dottersäcke wurden für die Genotypisierung weiterbehandelt. Die Embryonen wurden in PBS gewaschen und in kalter Fixierlösung 60-90 min. fixiert. Anschließend wurden die Embryonen 10 min. in Waschlösung bei RT gewaschen und 4h- O/N in Färbelösung im Dunkeln bei 37°C gefärbt. Daraufhin wurden die Embryonen 10 min. in 4% PFA gewaschen und in 4% PFA gelagert.

Lösungen	Fixierlösung	1% Formaldehyd

	0,2% Glutaraldehyd 2 mM $MgCl_2$ 5 mM EGTA 0,02% NP-40 in PBS
Waschlösung	0,02% NP-40 in PBS
Färbelösung	5 mM $K_3Fe(CN)6$ 5 mM $K_4Fe(CN)6$ 2 mM $MgCl_2$ 0,01% Na-Desoxycholat 0,02% NP-40 1 mg/ml X-Gal in PBS

Zu der Reporter-Aktivität in transgenen Embryonen wurde mit *lacZ*-spezifischen Primern durch PCR transgene Embryonen identifiziert.

2.16 Hybridisierungstechniken: *in situ*-Hybridisierung

Die Methode der „Whole mount" *in situ*-Hybridisierung ermöglicht es, im gesamten Embryo („*Whole mount*") Transkripte mit Hilfe von markierten komplementären RNA-Sonden nachzuweisen. Nach erfolgter Hybridisierung können die markierten Sonden mittels spezifischer enzymgekoppelter Antikörper durch Umsetzen eines Farbsubstrates detektiert werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methode stellt eine Modifikation des Verfahrens nach D. Wilkinson (1998) dar.

2.16.1 Synthese der komplementären RNA-Sonden

Wie in 2.2 beschrieben, wurden cDNAs von den zu testenden Genen, die in bakteriellen Vektoren kloniert vorlagen, am 5'-Ende linearisiert. Mit Hilfe einer RNA-Polymerase wurde dann vom 3'-Ende transkribiert und die komplementäre mRNA generiert. Hierbei wurden die Uracil-Basen mit Digoxigenin markiert, das anschießend durch einen Digoxigenin-Antikörper, der mit einem Reporter-Enzym gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden konnte.

Pro 20 µl Ansatz wurden ca. 1 µl (1µg/µl) des linearisierten Plasmids, 2 µl 10x Transkriptionspuffer (0,4 M Tris/HCl, pH 8,0; 60 mM $MgCl_2$; 100 mM Dithiothreitol; 20 mM Spermidin; Roche #1465384), 2 µl 10x DIG-Nukleotid-Mix (Roche #1277073), 1 µl RNase Block (Stratagen #1010676), 2 µl RNA-Polymerase (T3 Roche #1031163; T7 Roche #881767, SP6 Roche #810274) und 12 µl H_2O vermischt und für 8 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 10 M NH_4Oac und 40 µl Ethanol zur Fällung der RNA zugegeben, durchmischt und für 8 Std. bei -20°C inkubiert. In Folge wurde der

Ansatz zentrifugiert (45 min.; 13000 Upm; 4°C), der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 100 µl Ethanol (70%) gewaschen. Zuletzt wurde die RNA 2 min. bei 13000 Upm zentrifugiert und das Sediment in 50 µl 50% Formamid/2xSSC pH 7,5 aufgenommen. Ein Aliquot der RNA-Sonde wurde gelelektrophoretisch überprüft, der Rest konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die Genaktivität wurde sowohl in ganzen Embryonen „whole mount", als auch auf Paraffinschnitten detektiert.

Probe	Linearisierung	RNA- Polymerase	Bezug
Dkk1	*SalI*	T7	C. Niehrs
Bmp4	*EcoRI*	Sp6	B.L.M. Hogan
Fgf8	*PstI*	T7	G. Martin
Shh	*HindIII*	T3	A. P. McMahon

2.16.2 Ganzkörper- oder „Whole mount" *in situ*-Hybridisierung

2.16.2.1 Isolierung und Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung

Nach der Präparation der Embryonen an den zu analysierenden Entwicklungszeitpunkten wurden sie kurz in PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Am nächsten Tag wurden sie für 10 min. in 50% Methanol/PBT inkubiert und in 100% Methanol überführt. Nach erneuter 10 minütiger Inkubation wurde das Methanol durch frisches ersetzt. In diesem Zustand konnten die Embryonen entweder bei -20°C gelagert werden oder nach 12 Std. bei –20°C in die „Whole-mount" *in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden.

Zunächst wurden die Embryonen durch die Inkubation in 75%, 50% und 25% Methanol rehydriert. Anschließend wurden diese zweimal 10 min. in PBT gewaschen. Daraufhin wurden die Embryonen 5 min. mit 6% H_2O_2 (v/v in H_2O) gebleicht und dann 2x 5 min. in PBT inkubiert. Je nach Alter der Embryonen wurden sie dann 5-12 min. mit Proteinase K behandelt, um die Permeabilität der RNA-Sonden zu erhöhen. Im Anschluss erfolgte eine 2x 5 min. Inkubation in PBT. Um die Aktivität der Proteinase K abzustoppen, erfolgte eine zusätzliche 5 min.-Inkubation in Glycin (2 mg/ml PBT). Anschließend wurden die Embryonen für 20 min. in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich #3802) nachfixiert. Hiernach wurde erneut kurz mit PBT gewaschen und Hybridisierungsmix zur Prähybridisierung zugegeben. Die Inkubation erfolgte 3 Std. bei 65°C. Zu dem

Hybridisierungsmix (~1 µg/ml) wurde 1 mg/µl RNA-Sonde zugegeben, für 5 min. bei 65°C denaturiert und die Embryonen nach der Prähybridisierung über Nacht hybridisiert.

2.16.2.2 Entfernung unpezifisch gebundener Sonde und Antikörperinkubation

Zur Entfernung unspezifisch gebundener RNA-Sonde. wurde zweimal für 30 min. mit Hybridisierungsmix, zweimal für 30 min. mit Lösung I und einmal für 20 min. mit Lösung I/MABT gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten mit vorgewärmten Lösungen bei 65°C. Im Anschluss wurde zweimal für 10 min. mit MABT gewaschen, bevor die Embryonen zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 3 Std. mit Blocklösung + 20% Schafserum inkubiert wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Blocklösung durch den mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000 in Blocklösung; Roche #1093274) ersetzt und 12 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.

2.16.2.3 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Embryonen 2x 12 min.; 1x 20 min.; 1x 30 min.; 1x 45 min.; 8x 60 min. bei Raumtemperatur mit MABT gewaschen und 30 min. mit NTMT behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers. Zur Beendigung der Farbreaktion wurde mit PBT abgestoppt. Es folgte mehrmaliges Waschen mit PBT, bevor die Embryonen in 4% PFA fixiert und bei 4°C gelagert werden konnten.

2.16.3 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Die im Folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, Transkripte in Geweben oder Organen auf zuvor angefertigten Paraffinschnitten nachzuweisen. Diese Methode erlaubt eine genauere Analyse der Lokalisation der Transkripte in dem betreffenden Gewebe oder Organ als die Methode der „*Whole mount*"-Hybridisierung.

Nach Herstellung der Paraffinschnitte wurde das Paraffin zunächst von den Präparaten entfernt. Dies geschah durch folgende Inkubationsschritte:

3 x 7 min.	Xylol
2 min.	Xylol/Ethanol
2 x 2 min.	Ethanol (abs.)
je 1 min.	96%, 90%, 70%, 50% Ethanol

2x 5 min.	PBS

Nach 15 min.-Inkubation bei 37°C mit Proteinase K wurde zur Inaktivierung dieses Enzyms 5 min. in Glycin inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte für jeweils 5 min. in PBS und eine Nachfixierung der Präparate für 20 min. bei Raumtemperatur in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min. in PBS wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet (ImmEdge-Pen; Vector Laboritories Inc.) und in eine wasserdampfgesättigte Kammer gelegt. Anschließend wurden auf jeden Gewebeschnitt 5 µl Hybridisierungsmix gegeben und zwei Std. bei 70°C vorhybridisiert. Nach 5 min. Denaturierung bei 95°C des RNA-Sonde-haltigen (~1ng/µl) Hybridisierungsmixes wurde die Prähybridisierungslösung durch diesen ersetzt und über Nacht bei 70°C inkubiert.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener RNA-Sonde wurde am nächsten Tag zweimal für 15 min. in 50% Formamid/2xSSC bei 65°C inkubiert und nochmals zweimal für 10 min. in PBT gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit B-Block-Lösung, die anschließend gegen den mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000 in B-Blocklösung; Roche #1093274) ausgetauscht wurde. Die Antikörperinkubation erfolgte für 2 Std. bei 37°C. Zum Entfernen unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde in Folge dreimal für 10 min. mit PBT gewaschen, zweimal für 10 min. mit NTM inkubiert und zuletzt zur Detektion des Antikörpers die Färbelösung auf die Schnitte gegeben. Nach erfolgter Farbreaktion wurden die Präparate in Aquatex eingedeckelt.

2.17 Histologie

2.17.1 Anfertigung von Paraffindünnschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Daraufhin wurden sie durch Inkubation in 70% Ethanol über Nacht und jeweils für 2 Std. in 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol unter leichtem Schütteln entwässert. Danach wurden sie in 1-Butanol überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen in ein Paraffinbad gegeben und zunächst 2 Std. bei 60°C inkubiert. Dann wurde ein Vakuum angelegt und weitere 2 Std. inkubiert. Anschließend konnten die Präparate eingebettet werden. Nach Aushärtung über Nacht wurden an einem Mikrotom (Leica RM 2035) 7 µm dicke Paraffindünnschnitte hergestellt. Diese wurden zu Streckung in ein Wasserbad (45°C, GFL 1052) überführt und auf

Objektträger gezogen (SuperFrost Plus, Menzel Thermo Scientific #09498). Zur vollständigen Streckung und Antrocknung auf dem Objektträger folgte eine Inkubation auf einem Heizblock (30-60 min. 45°C) und Trocknung bei 37°C über Nacht. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Objekträger bei Raumtemperatur oder bei 4°C gelagert werden.

2.17.2 Hämatoxylin/ Eosin- Färbung

Bei der Hämalaun/Eosin-Färbung werden basophile Zell- und Gewebeanteile, wie DNA blau gefärbt und azidophile Bestandteile rot. Die zu färbenden Paraffindünnschnitte wurden hierbei in Glasgondeln folgendermaßen inkubiert:

Xylol	3x 7 min.
Xylol/Ethanol	2 min.
Ethanol	2x 2 min.
96% Ethanol	1 min.
90% Ethanol	1 min.
70% Ethanol	1 min.
50%Ethanol	1 min.
H_2O bidest.	2 min.
Hämalaun	1 min.
H_2O	10 min.
Eosin	30 sec.
H_2O bidest.	10 sec.
50% Ethanol	10 sec.
70% Ethanol	10 sec.
90% Ethanol	10 sec.
96% Ethanol	10 sec.
Ethanol	2x 10 sec.
Xylol/Ethanol	1 min.
Xylol	3x 5 min.

Bei zuvor *lacZ*-gefärbten Mausembryonen wurde die Hämalaun- Färbung auf Grund der Blau-Färbung weggelassen. Anschließend wurden die Objektträger mit Entellan-Eindeckelmedium eingedeckelt.

Lösungen	Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol
	Hämalaun	MAYER, Mayers Hämalaun- Lösung (1:4) (Merck #109249.00)
	Eosin	96% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Eosin G (Merck #1.5935.0100) 1% (v/v) Essigsäure die Lösung wurde filtriert

2.18 Proteinbiochemische Methoden

2.18.1 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Die Herstellung von GST-Fusionsproteinen erfolgte nach Smith und Gordon (1990). Zur Expression der Fusionsproteine wurde der *pGEX-4T3*-Vektor (GE-Healthcare #27-4583-01) verwendet. Dieser Vektor kodiert für Glutathion S-Transferase (GST). Wird eine cDNA in die „multiple cloning site" (mcs) in das Leseraster kloniert, kann ein Fusionsprotein der GST-kodierenden Region und der kodierenden Sequenz der cDNA-produziert werden. Als resultierendes Genprodukt entsteht ein Fusionsprotein mit der GST am N-terminalen Proteinende. Die GST dient der Aufreinigung des Fusionsproteins durch eine Affinitätschromatographie. Der *pGEX-4T3*-Vektor besitzt ein Ampicillinresistenzgen (*ampr*) und einen tac-Promotor (*Ptac*) für eine effiziente Expression des Fusionsproteins. Die Transkription des Fusionsproteins kann durch die Bindung von IPTG an den Repressor induziert werden.

50 ml einer Bakterien-Übernachtkultur, die mit dem entsprechendem *pGEX-4T-3*-Konstrukt transformiert war, wurden mit dem 1,5-fachen Volumen LB/Amp-Medium verdünnt und auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert (185 Upm). Bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,8 wurden die Zellen durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM) induziert und die Kultur für 2 Std. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Bakterienkultur wurde 30 min. bei 6000 Upm und 4°C in einer Beckman-Ultrazentrifuge abzentrifugiert und das Sediment in 20 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml Aliquots aufgeteilt und jedes 6x 10 sec. sonifiziert (Branson Sonifier: Duty Cycle: 50%; Output:6). Zur Erleichterung der Solubilisierung der Fusionsproteine wurde für 30 min. auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (20 min; 6000 Upm; 4°C; Heraeus). Zum Überstand wurde 1 ml einer äquilibrierten 50%-Glutathion-Sepharose 4B-Suspension gegeben und erneut für 30 min. bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (2 min; 1700 Upm; 4°C Heraeus) und mit 2 ml Lysepuffer versehen, invertiert und die Sepharose erneut abzentrifugiert (2min ; 1700 Upm; 4°C; Heraeus). Danach wurde erneut 2x mit 2 ml Lysepuffer gewaschen und zentrifugiert (2 min; 1700 Upm; 4°C; Heraeus).

Um die gebundenen GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Sepharose und dem Transferase-Anteil zu trennen, wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit 0,15 µmol Thrombin inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zentrifugation von der Sepharose getrennt und entsprechende Aliquots bei –20°C gelagert. Jeweils ein 20 µl Aliquot wurde zudem entnommen, denaturiert und auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel kontrolliert.

Lösungen	Lysepuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,0 500 mM NaCl 10% Glycerin 1%Triton X-100 Proteaseinhibitoren: 1 mM PMSF 1 Tablette Complete mini a 10 ml in ddH_2O

2.18.2 Gelretardationsanalyse

Diese Analyse basiert auf der Tatsache, dass ein stabiler Peptid-DNA-Komplex langsamer durch ein Polyacrylamidgel wandert, als ein freies DNA-Fragment (nach Fried und Crothers, 1981). Hierdurch können Rückschlüsse auf die DNA-Bindeeigenschaft eines Proteins bzw. dessen Bestandteile getroffen werden. Zunächst wurde eine doppelsträngige DNA aus zwei komplementären Einzelsträngen generiert. Die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide (je 1 nM) wurden in einem 100 µl Ansatz 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur aneinandergelagert. Die doppelsträngigen Oligonukleotide imitierten die zu bindende dsDNA und wurden durch eine T4-Polynukleotidkinase mit γ^{32}P markiert:

1 µl ds Oligo-Nukleotide (10 pM)
3 µl Polynukleotidkinase-Puffer (10x NEB #1007-20)
1 µl Polynukleotidkinase (10 U NEB #201)
3 µl γ^{32} P-ATP (Amersham #AA0068)
22 µl ddH_2O

Die radioaktive Markierung erfolgte für 30 min. bei 37°C. Die Effizienz der Markierung wurde anschließend über einen Zentilationszähler bestimmt. Anschließend wurden die radioaktiv-markierten Oligonukleotide nach den Angaben des Herstellers mit dem „Qiaquick Nucleotide removal kit“ (Qiagen #28306) aufgereinigt.

In die Bindeansätze mit einem Volumen von 20 µl wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

2 µl DNA (20.000 Cpm)
4 µl Protein (100 ng)
2 µl Gel-Retardationspuffer (10x)
2 µl poly dIdC
ad 20 µl dest. H_2O

Zur Überprüfung der Bindespezifität wurden dem Ansatz zusätzlich nicht-radioaktiv-markierte Oligonukleotide als Kompetitor zugefügt. Von beiden wurden in diese Ansätze entweder die 100-fache oder die 500-fache Konzentration eingesetzt.

Für die Bildung eines Komplexes zwischen dem zu testenden Protein und der markierten DNA wurden die Ansätze für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden diese ohne Auftragspuffer auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um Protein-DNA-Komplexe von ungebundenen Oligonukleotiden zu trennen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurde das Gel getrocknet und über Nacht eine Phosphoimagerplatte aufgelegt (wie in 2.18.5 beschrieben).

Lösungen:	2x Retardationspuffer-Puffer	100 mM Tris/HCl pH8,0 800 mM KCl 4 mM β-Mercaptoethanol 10 mM MgCl 20% Glycerol 20 µM $ZnCl_2$ 2 µg Poly (dI-dC)

2.18.3 Gelelektrophoretische Trennverfahren

2.18.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet (nach Laemmli, 1970). Proteine wurden hierbei mit 4x Auftragspuffer versehen und nach dem Molekulargewicht in vertikalen Biometra Minigel-Twin-Gelapparaturen aufgetrennt. Das Volumen des Trenngels betrug 12 ml und war je nach Größe der aufzutrennenden Proteine aus 6-12,5% Acrylamid (30%Stammlösung) in 2x MDE Gelsolution (Biowhittaker Molecular Applications #50620), 0,25 Volumen Trenngelpuffer und 10% SDS in dH2O zusammengesetzt. Zur Polymerisation des Trenngeles wurden 5 µl TEMED und 5 µl/ml 40% APS zugegeben und das Trenngel luftblasenfrei in die Gelkammer gegossen. Zur Fokussierung der Proben wurde dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet, welches 0,15 Volumen 2x MDE Gelsolution, 0,13 Volumen Sammelgelpuffer in dH_2O enthielt. Zur Polymerisation wurden 5µl TEMED und 5 µl/ml 40% APS zugegeben und die Lösung auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Die zu trennenden Proben liefen bei 25 mA und 100 V durch das Sammelgel. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte anschließend für ca. 1,5 Std. bei 50 mA und 180 V. Bei radioaktiv-markierten Proteinen wurde der Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences # RPN800) verwendet. Folgte nach der Auftrennung eine Silbergelfärbung, wurde der SDS-PAGE Marker for Molecular Weight (Sigma #SDS-6H) eingesetzt.

Lösungen:	4x Auftragspuffer	400 mM Tris/HCl pH8,8 8% β-Mercaptoethanol 40% Glycerin 12% SDS

	0,4% Bromphenolblau
10x Laufpuffer	0,25 M Tris 2 M Glycin pH2.7 1% SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH6,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH8,8 1% SDS

2.18.3.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese diente der Analyse einer verzögerten Laufeigenschaft von Oligonukleotiden aufgrund der Bildung eines DNA-Protein-Komplexes. Ein großes Polyacrylamidgel (200x 200x 1 mm^3 und 60 ml Volumen) wurde aus folgenden Komponenten zusammengesetzt: 0,25x TBE; 5% Acrylamid; 25 µl TEMED; 125 µl 40% APS in dH_2O.

Lösungen:	5x TBE	20 ml/l 0,5 M EDTA pH 8,0 54 g/l Tris 27,5 g/l Borsäure

2.18.4 Proteinnachweis durch Immunodetektion

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinmengen von GSK3β (Cell signaling #9315) und phosphoryliertem GSK3β (Cell signaling #9336) im Vergleich zu Aktin in isolierten Augenanlagen bestimmt. Aus frisch isolierten Embryonen wurden zunächst die Augenanlagen isoliert, direkt in flüssigen Stickstoff übertragen und bei –80°C gelagert. Für die Proteinbestimmung wurden die Anlagen auf Eis mit 100 µl RIPA-Puffer, der Proteinase-Inhibitoren beinhaltet (Roche#14316900), versehen und das Gewebe homogenisiert. Anschließend wurde 1/3 Volumen Probenpuffer hinzugefügt und das Gemisch 3 min. bei 95°C denaturiert. Das Gewebe wurde anschließend direkt in den Proteinnachweis eingesetzt oder bei –20°C eingefroren.

Für die Analyse wurden die in der PAGE getrennten Proteine aus der Polyacrylamid-Matrix durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (nach Towbin, 1979). Dieser Transfer dient der Detektion von Proteinen durch eine folgende Antikörperreaktion. Neben dem spezifischen Erstantikörper wird ein Zweitantikörper benutzt, der an bestimmte Epitope des Erstantikörpers bindet. Der Zweit-Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert, die eine Aktivierung von Substraten katalysiert. Unter Aussendung von Licht fallen diese in den Grundzustand

zurück. Dieses Phänomen wird als Chemo-Lumineszenz bezeichnet und kann der spezifischen Detektion von Proteinen dienen.

Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte über einen elektrophoretischen Transfer der Proteine von Kathode Richtung Anode. 3 Whatman-Papiere wurden hierfür zunächst in Anode II-Puffer und 6 Lagen Whatman-Papier in Anode I-Puffer getränkt und beide aufeinander in die Apparatur gelegt. Nachdem die Nitrozellulose-Membran 10 min. in Kathodenpuffer inkubiert worden war, wurde sie auf die Papierstapel luftblasenfrei aufgebracht. Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und auf der Nitrozellulose-Membran plaziert. 9 Lagen Whatman-Papier, die zuvor in Kathodenpuffer inkubiert worden waren, wurden luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht. Die Kathode der Elektroblotting-Apparatur (CTI) wurde dann befestigt und anschließend wurden die Proteine 1 Std. bei 110 mA auf die Nitrozellulose-Membran transferiert.

Die auf die Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine wurden durch eine reversible Ponceau-S-Färbung detektiert. Hierfür wurde die Membran zunächst 5 min. in H_2O (bidest.) gewaschen. Durch 5 min.-Inkubation in 10% Ponceau S (Sigma #P7767)-Lösung wurden die Markerbanden detektiert. Anschließend wurde die Farbe durch H_2O vollständig abgewaschen. Dann wurde 2x 5 min. in PBT gewaschen und unspezifische Bindestellen auf der Nitrozellulose-Membran 4 Std. mit Blockierlösung abgedeckt.

Über Nacht wurde die Nitrozellulose-Membran mit einem Erst-Antikörper, der 1:2000 in Blockier-Lösung verdünnt wurde, bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde 3x 10 min. mit PBT bzw. TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Peroxidase-konjugiertem Zweit-Antikörper (aus Kaninchen; Jackson Immunoresearch #305-035-045), der 1:2000 in PBT verdünnt wurde, 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3x 15 min. mit PBT gewaschen.

Zur Detektion der entstandenen Chemolumineszenz wurde das Amersham Western blotting detection system (#RPN 2132) verwendet. Hierbei wurden zunächst die Lösungen A und B in einem Verhältnis von 40:1 vermischt. Die Nitrozellulose-Membran wurde aus der Waschlösung entnommen und mit der zuvor Protein-exponierten Seite nach oben auf eine Saran-Folie gelegt. Dann wurde das Detektions-Reagenz auf die Membran gegeben und 5min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran von überschüssigem Reagenz befreit und in eine Autoradiographie-Kassette gelegt.

Im abgedunkelten Fotolabor wurde dann ein lichtempfindlicher Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) zur Detektion der Chemolumineszenz für mindestens 30 sec. auf die

Membran gelegt, entwickelt und fixiert. Hierbei wurde der Film 5 min. in Entwickler-Lösung (Kodak) gegeben. Nach dem folgenden Zwischenwässern wurde 5 min. mit Fixierlösung fixiert und erneut 5-10 min. mit H_2O gewaschen. Abschließend wurde der Film getrocknet.

Lösungen:	RIPA- Puffer	150 mM NaCl 1% NP40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS 50 mM Tris/HCl (pH8)
	TBST	10 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1% Tween-20 pH 7,2
	Anode II-Puffer	300 mM Tris 20% Methanol
	Anode I-Puffer	25 mM Tris 20% Methanol
	Kathodenpuffer	40 mM ε-AminoKapronsäure
	Blockierlösung	PBT bzw. TBST 5% Trockenmilch
	Fixierer	20 g Natriumthiosulfat 2 g Natriumdisulfit /l

2.18.5 Detektion von radioaktiv-markierten Proteinen mit dem Phosphoimager

Zur Autoradiographie wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, auf ein Whatman-Papier übertragen und mit Saran-Folie abgedeckt. Das Gel wurde dann 1 Std. bei 65°C vakuumgetrocknet und über Nacht auf eine Phosphoimager-Platte (Fuji-Film BAS #MS2025) exponiert. Am darauffolgenden Tag wurden die radioaktiven Signale der Platte durch den Phoshoimager (Fuji-Film BAS) detektiert und mit der entsprechenden Software (Image Gauge) ausgewertet.

2.19 Tierhaltung und Mausstämme

Die Maushaltung–und zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie generiert (*Tg107*), aus welcher durch Verpaarungen mit *Dkk1*$^{+/-}$-

Mäusen eine weitere Mauslinie generiert wurde (*Tg110)*. Zudem wurden *Shh*$^{-/-}$-Mäuse und *Hx*-Mäuse analysiert. Die Linien wurden in den Stammhintergründen *C57BL/6 (Tg107, Tg110* und *Hx), NMRI (Wildtyp)* und *C3H (Shh*$^{-/-}$*)* gehalten.

2.20 Isolierung definierter Embryonalstadien

Für die Untersuchungen an Mausembryonen wurden je 1-2 geschlechtsreife Mäuseweibchen in den Käfig eines Männchens gesetzt. An dem nachfolgenden Morgen konnte anhand des Vaginalpfropfes eine Paarung in der Nacht zuvor identifiziert werden. Die Weibchen wurden dann von den Männchen getrennt und 12 Uhr Mittag dieses Tages als Tag (E) 0,5 der Embryonalentwicklung definiert. Nach Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen aus den Uteri in eiskaltem PBS freipräpariert.

2.21 Dokumentation

Die Fotodukumentation wurde an einem Stereo-Mirkoskop (Zeiss Stemi SV11) durch eine digitale Kamera (Zeiss AxioCam Mr) und dem dem dazugehörigen Aufnahmeprogramm (AxioVision AC; Rel.4.5) durchgeführt. Die Dokumentation von Gewebeschnitten wurde an einem Mikroskop (Leica TCS NT, Leica, Heidelberg) durchgeführt. Die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Photoshop 7.0 vorgenommen.

2.22 Identifizierung von CNEs

Für die Identifizierung putativer *Dkk1* cis regulatorischer Sequenzen wurden unter Verwendung unterschiedlicher Software-Programme kombinierte Internet-Recherchen vorgenommen, die sequenzierte Spezies miteinander vergleichen und Übereinstimmungen anzeigen.

Verwendete Software:

ECR-Browser: http://www.ecrbrowser.dcode.org

VISTA: http://www.pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2

Ensembl: http//www.ensembl.org

2.23 *lacZ*-Reporterkonstrukte

Für die Generierung transgener Mäuse wurden genomische Fragmente aus den *BAC*-Klonen *RP23-118N16*, *RP23-98J4* und *RP23-182C8* PCR-amplifiziert. Das *Dkk1*-Promotor-Fragment, welches 470bp 5’ zum ersten *Dkk1*- Exon und 60bp des ersten *Dkk1*-

Exons beinhaltete, wurde in den T- Vektor (Promega) subkloniert. Anschließend wurde dieses mit *Sal/BamHI* in das Leseraster des *lacZ*-Reportergens innerhalb des *pPD46.21*-Vektors einkloniert. Die Transkription von *lacZ* wird in diesem Vektor durch ein Polyadenylierungssignal des SV40 terminiert. Ein weiteres Promotorfragment wurde durch eine PCR geneiert und durch einen *HindIII/SphI*-Verdau mit dem 470 bp-Fragment kombiniert, wodurch ein 2,785kb-*Dkk1*-Promotor-Fragment entstand. Die identifizierten CNEs wurden mit den entsprechenden Primern amplifiziert (vgl. 2.12.1). Die Primer wurden so gewählt, dass eine zusätzliche Sequenz von mindestens 50bp 5´und 3´ der CNEs vorhanden waren. Die PCR- Produkte wurden in den T- Vektor subkloniert und durch einen *NotI/Bsp120I*-Verdau in den mit *NotI* linearisierten *Dkk1*- Promotor-*lacZ*-Vektor endkloniert.

Durch *SwaI/NotI*-Restriktionsverdaus wurden die zu testenden Reporterfragmente von dem Vektorrückgrad isoliert und entsprechend für die Zygoten-Injektionen weiterverwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse des regulatorischen Potentials eines 1,8kb *Dkk1*-Promotorfragmentes in transient transgenen Embryonen

Durch Zellkulturexperimente konnte dargelegt werden, dass eine direkte Aktivierung der humanen *Dkk1*-Expression durch TCF/LEF-Faktoren erfolgen kann (Chamorro et al., 2005; Gonzalez-Sancho et al., 2005; Niida et al., 2004). Des Weiteren bindet p53, ein Tumorsuppressorprotein, an eine Zielsequenz 2,1 kb 5' zum humanen *Dkk1*-Transkriptionsstart (Wang et al., 2000).

Innerhalb des Mausgenoms konnten 5' zum *Dkk1*-Transkriptionsstart sechs dem humanen *Dkk1*-Lokus entsprechende TCF/LEF-Bindestellen und eine p53-Bindestelle identifiziert werden (Abb. 9). Zunächst wurde getestet, ob ein entsprechendes Promotorfragment des Maus- *Dkk1*-Lokus hinreichend für eine gewebespezifische Reportergen-Aktivierung in *lacZ*-exprimierenden Reporterembryonen am Tag E12,5 ist. Dieser Entwicklungszeitpunkt wurde gewählt, da in diesem Zeitraum das differentielle *Dkk1*-Expressionsmuster eingehend charakterisiert ist (Monaghan et al., 1999; Nie, 2005).

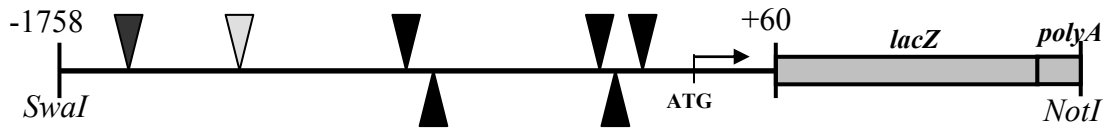


Abb. 9: Schematische Darstellung des *Dkk1*-Promotor-Reporterfragments. Verschiedene TCF/LEF-Bindestellen (schwarze Dreiecke) und eine p53-Bindestelle (graues Dreieck) innerhalb des Promotorfragmentes sind angedeutet. Bei der Generierung des Reporterkonstruktes wurden die ersten 60 bp des ersten *Dkk1*-Exons mit einbezogen. Als Reporter diente das *lacZ*-Gen, dessen Transkription durch ein polyA terminiert wurde. Das Reporterfragment wurde über *SwaI* und *NotI*-Restriktionsbindestellen aus dem Plasmid isoliert.

Im Vergleich zum endogenen *Dkk1*-Expressionsmuster konnte in keinem der sieben transgenen Embryonen eine gewebespezifische Reporteraktivität nachgewiesen werden (Abb. 10A, B). Dieses Ergebnis zeigt, dass das getestete *Dkk1*-Promotorfragment nicht hinreichend für eine gewebespezifische Expression zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ist, und für die gewebespezifische *Dkk1*-Expression zusätzliche Sequenzen benötigt werden.

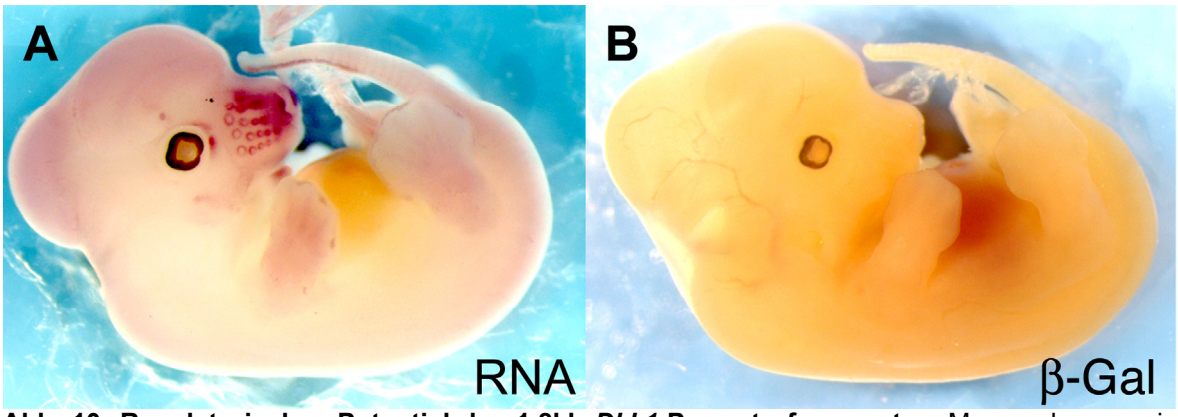


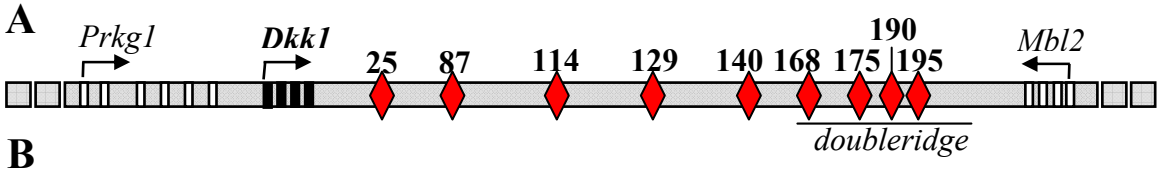
Abb. 10: Regulatorisches Potential des 1,8kb *Dkk1*-Promotorfragmentes. Mausembryonen in der Seitenansicht zum Tag E12,5. **A)** „Whole mount" *Dkk1* situ-Hybridisierung. *Dkk1*-Expression in den Augenanlagen, dem Haarfollikelmesenchym und den Gliedmaßenknospen. **B)** Transient transgener Mausembryo nach einer Zygoten-Injektion des *Dkk1*-Promotorkonstruktes. Eine Reporteraktivität blieb aus.

3.2 Identifizierung unterschiedlicher CNEs im Bereich des *Dkk1*-Lokus

Evolutionär konservierte Sequenzen, die nicht für Gene kodieren, stellen häufig Mediatoren der gewebespezifischen Regulation eines differentiell exprimierten Genes dar. Um solche genregulatorischen Bereiche zu identifizieren, wurden Sequenzvergleiche der Genome von evolutionär weit entfernten Spezies (Frosch, Huhn und Säuger) im Bereich des *Dkk1*-Lokus zwischen dem *Dkk1*-Gen und den benachbarten Genen *Mbl2* und *Prkg1* vorgenommen. Es konnten insgesamt neun phylogenetisch konservierte Sequenzen nachgewiesen werden, die entsprechend ihrer relativen Distanz in kb zum Maus-*Dkk1*-Transkriptionsstart benannt wurden (Abb. 11A). Alle konservierten Sequenzen sind 3' des *Dkk1*-Genes mit einer Entfernung von 25- 195 kb lokalisiert und weisen eine Länge von 104 bp bis 482 bp auf. Die CNEs sind evolutionär mindestens vom Huhn bis zu den Säugern, mit mehr als 75% Sequenz-Identität zwischen diesen Spezies konserviert worden (vgl. Anhang 1).

Durch Sequenzvergleiche innerhalb des Genomes einer einzelnen Spezies konnten weder Homologien der CNEs untereinander, noch zu anderen konservierten Sequenzen identifiziert werden (nicht gezeigt). Die untersuchten CNEs müssen demnach phylogenetisch unabhängig entstanden sein. Vier der identifizierten CNEs, CNE 168, 175, 190 und CNE 195, sind innerhalb der Region der einleitend bereits erwähnten *doubleridge*-Deletion lokalisiert.

A



B

CNE	genom. Lokalisation	Länge (bp)	Identität(%)
25	23710960-23710739	222	73,4
87	23648599-23648230	370	77,3
114	23622077-23621596	482	85,5
129	23606663-23606538	126	71,4
140	23596091-23595906	186	73,1
168	23567548-23567397	152	73,7
175	23560436-23560333	104	71,2
190	23545925-23545660	266	80,8
195	23541198-23540787	412	70,6

Abb.11: Konservierte, nicht kodierende Sequenzen im Bereich des *Dkk1*-Lokus. A) Identifizierte CNEs (rote Rauten) sind entsprechend ihren Entfernungen zum Maus *Dkk1*-Transkriptionsstart benannt (Zahlen in kb). Die Lozi der benachbarten Gene *Prkg1* und *Mbl2* sind angedeutet. Vier CNEs liegen innerhalb der *doubleridge*-Region. **B)** genomische Lokalisation, Länge und Identität der CNEs zwischen den Spezies Huhn, Maus und Mensch. Verwendete Datenbanken: siehe Material und Methoden.

3.3 Analyse des regulatorischen Potentials identifizierter CNEs

Die identifizierten CNEs wurden entsprechend ihrer Anordnung in unterschiedlichen Kombinationen in den Promotorvektor kloniert und deren gemeinsamer regulatorischer Einfluß auf den *Dkk1*-Promotor getestet (in dieser Arbeit getestete Kombinationen: siehe Anhang 2). Das Reportermuster wird im Folgenden als „*Dkk1*-endogen“ bezeichnet, wenn dieses dem publizierten *Dkk1*-Muster entspricht, bzw. dem der selbst durchgeführten *Dkk1*-Hybridisierungen. Die Kombination aller neun CNEs führt in zwei von sieben transgenen Embryonen zu einer β-Gal-Aktivität in *Dkk1*-spezifischen Expressionsorten, wie kraniofaszialen Derivaten und schwach innerhalb der Augenanlagen und der Gliedmaßenknospen (Abb. 12A-C, im Vergleich zu Grotewold et al., 1999; Monaghan et al., 1999; und Nie, 2005). Neben diesen *Dkk1*-spezifischen Expressionsorten ergaben sich Aktivitäten in dorsalen Kopfstrukturen, inklusive des Telenzephalons und lateral des sich entwickelnden Rückgrades (Abb. 12C). Um die regulatorischen Zusammenhänge der CNEs eingehender zu analysieren, wurden die aktivierenden Fähigkeiten ohne die CNEs 87, 129 und 140 getestet. Die Reporteraktivierung der transgenen Embryonen erfolgte in vergleichbaren *Dkk1*-spezifischen Domänen, wobei die Aktivität innerhalb des Kopfes distinkter erfolgt (Abb. 12D–E). Zudem ergibt sich eine Aktivität innerhalb des

Telenzephalons (Abb. 12E). Für die weiter reichende Charakterisierung wurde eine Kombination der CNEs 25, 114, 190 und 195 getestet. Diese führen untereinander zu einer identischen Reporteraktivität im Gehirn, in den Augenanlagen, in kraniofaszialen Bereichen und den Gliedmaßenknospen zum Zeitpunkt E11,5 und E12,5 (nicht gezeigt; Abb. 12G-I). In diesen Stadien der Organogenese sind die getesteten CNEs 25, 114, 190 und 195 demnach ausreichend, um eine dem endogenen *Dkk1*-Muster sehr ähnliche Reporteraktivität hervorzurufen.

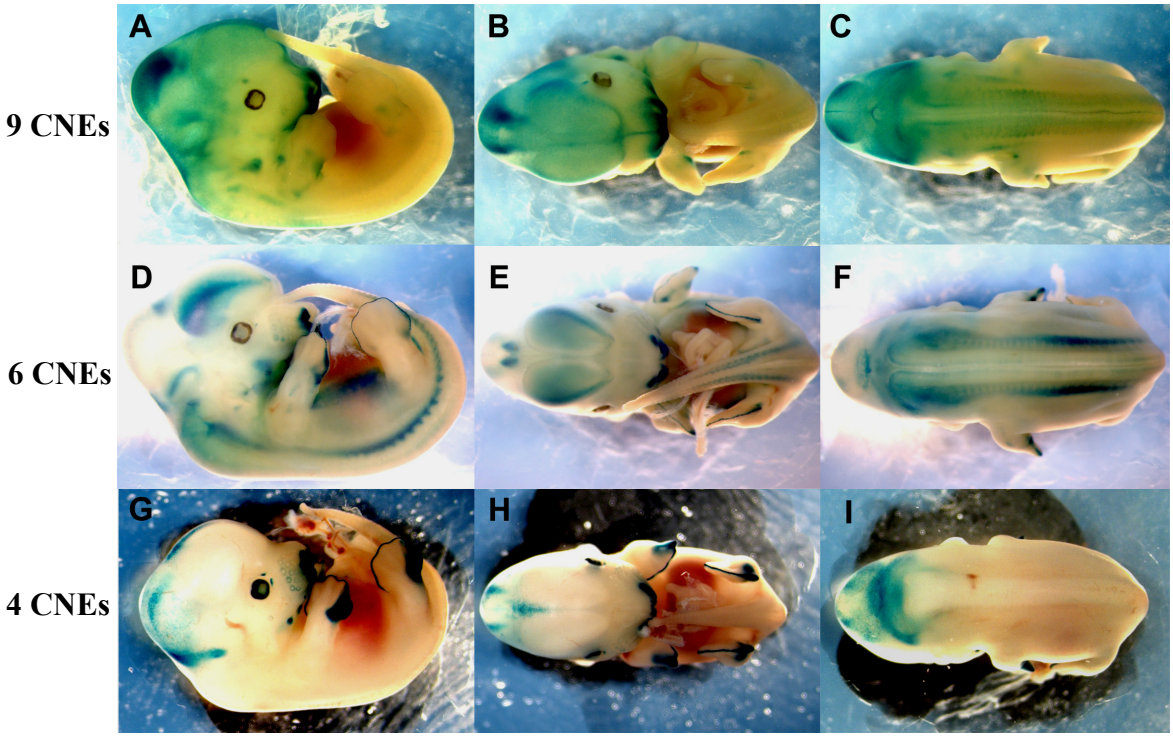


Abb. 12: CNE-vermittelte Reporteraktivität. *lacZ*-gefärbte Embryonen am Tag E12,5 in der Seitenansicht (**A, D, G**), ventraler Ansicht (**B, E, H**) und in der dorsalen Ansicht (**C, F, I**). **A) - C)** durch die CNEs 25–195 vermittelte Aktivität in *Dkk1*-spezifischen Expressionsdomänen der Augenanlagen, dem ersten Kiemenbogen, den Gliedmaßenknospen, innerhalb des Kopfes und lateral zu der sich entwickelnden Wirbelsäule. **D – F)** Die CNEs 25, 114, 168, 175, 190 und 195 verursachen ein Reporteraktivierung in vergleichbaren Domänen. **G) - I)** Die CNEs 25, 114, 190 und 195 verursachen eine Aktivierung im Gehirn, den Augenanlagen, Derivaten des ersten Kiemenbogens und den Gliedmaßenknopspen.

3.4 Analyse des regulatorischen Potentials der CNEs 25, 114, 190 und 195 durch die Generierung einer transgenen Mauslinie

Da die CNEs 25, 114, 190 und 195 zusammen ausreichend sind, die *Dkk1*-Regulation innerhalb eines distinkten Zeitfensters der Entwicklung wiederzuspiegeln, wurde durch die Generierung einer transgene Mauslinie getestet, ob die räumlich zeitliche Dynamik der Reporteraktivität die *Dkk1*-Regulation während der gesamten Entwicklung wieder spiegelt. Die transgenen Embryonen weisen eine Aktivität in der anterioren Kopffalte (Ko), sowie

dem anterioren Mesendoderm am Tag E7,5 auf (Abb 13A). Eine Reporteraktivität im ventralen Mittelhirn, den Augenanlagen (A), dem ersten Kiemenbogen (Ki), sowie distinkter Domänen der Gliedmaßenknospen, (Gl), wie der AER und der PNZ ergibt sich am Tag E10,5, ähnlich der endogenen *Dkk1*-Expression (Abb. 13B, 13C). Eine Aktivierung in Derivaten des ersten Kiemenbogens, in den Augenanlagen und den Gliedmaßenknospen erfolgt zum Zeitpunkt E12,5 (Abb. 13D). β-Gal wurde zusätzlich in den osteogenen Zentren (oZ) der Knochen, wie für die *Dkk1*-Expression bereits beschrieben, am Tag E15,5 detektiert (Abb. 13E, vgl. Monaghan et al., 1999).

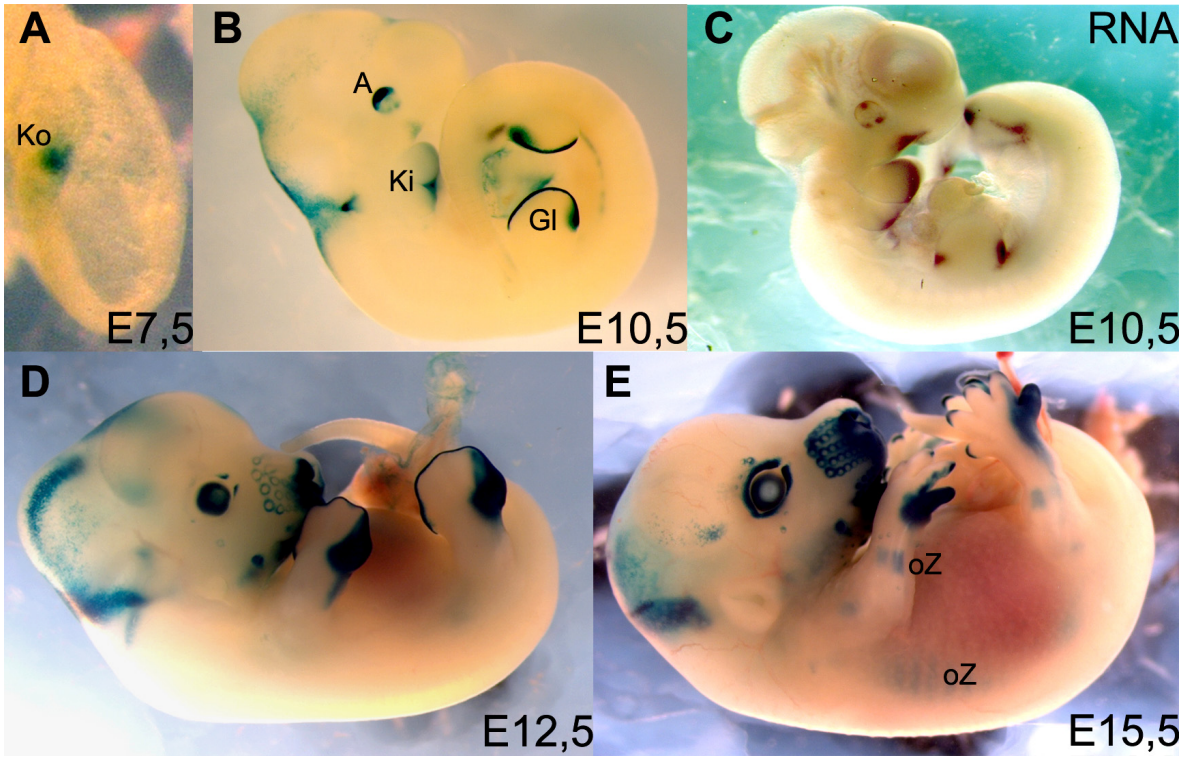


Abb. 13: Räumlich-zeitliche Dynamik der Reporteraktivierung einer generierten transgenen Mauslinie. A), B), D), E) β-Gal-Aktivität in transgenen Embryonen. **C)** *Dkk1*-in situ Hybrisidierung. Embryonen sind in der Seitenansicht dargestellt, Entwicklungstage sind angedeutet. **A)** Aktivität in der Kopffalte (Ko) und dem anterioren Mesendoderm. **B)** Aktivität in den Augenanlagen, dem ersten Kiemenbogen, der AER und der PNZ der Extremitätenknospen, sehr ähnlich dem endogenen *Dkk1*-Expressionsmuster (vgl. **C**)). **D)** Reporteraktivität in Derivaten des ersten Kiemenbogens, den Augenanlagen und den Extremitätenknospen. **E)** Eine zusätzliche Aktivierung erfolgt in den osteogenen Zentren der Knochen (oZ) am Tag E15,5.

3.5 Charaktrisierung der Reporteraktivierung in neuroektodermalen Derivaten

Im Folgenden wurde eine genaue Charakterisierung der Reportergenexpression innerhalb neuroektodermaler Kopfderivate vorgenommen. Die β-Gal-Aktivität im ventralen Dienzephalon beginnt angrenzend zur Rathke´s Tasche (RT) am Tag E9,5 (Abb. 14A). Während der ektodermalen Invagination in Richtung des dritten Ventrikels verstärkt sich

in diesem Bereich die Aktivität (Abb. 14B). Eine distinkte Aktivität innerhalb des dorsomedialen Telenzephalons, des ventralen Thalamus und im Mesenzephalon ist am Tag E11,5 detektierbar (Abb. 14C). Die Aktivität in dem delaminierenden dritten Ventrikel ist zu diesem Entwicklungszeit bis in die Hypophsenanlage erweitert (Abb. 14E). Die Aktivität in dieser Region ist der für *Xenopus*-Embryonen beschriebenen *Dkk1*-Expression sehr ähnlich (Monaghan et al., 1999). Die Aktivität in diesen Bereichen nimmt bis zum Zeitpunkt E12,5 zu und ist zudem innerhalb des Rhombenzephalons detektierbar (Abb. 14D). Wie transversale Schnitte nahe legen, wird der Reporter ausschließlich in dem posterioren Teil der Hypophysenanlage aktiviert (Abb. 14F). Die Aktivität des Reporters ist nach der Induktion der Hypophyse am Tag E13,5 nicht mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt). Zudem sind Aktivitätsdomänen in lateralen Bereichen des dorsalen Mesenzephalons identifizierbar, die E10,5 beginnen und mindestens bis E13,5 anhalten (Abb. 14C, D; nicht gezeigt). Eine *Dkk1*-Expression in lateralen telenzephalischen Regionen wurde bereits früher beschrieben (Monaghan et al., 1999).

Während der Augenentwicklung wird der Reporter innerhalb der sich entwickelnden Retina zum Zeitpunkt E9,5 aktiviert (Abb. 14G). Diese Expressionsdomäne dehnt sich bis zum Tag E10,5 auf das sich bildende Pigmentepithel (rPe) und schwächer auf den ventralen Anteil aus (Abb. 14H; nicht gezeigt). Die Aktivität in den anterioren Anteilen der Augenanlagen erscheint am Tag E11,5 (Abb. 14I). Die Aktivität ist zum Zeitpunkt E14,5 im Mesenchym der Augenlider und der Grenze zwischen der neuralen Retina und dem Pigmentepithel detektierbar, an der sich die ziliäre Zone bildet (Abb. 14K). Postnatal ist der Reporter ausschließlich in der ziliären Zone aktiv, wie die Reporteraktivität zwei Monate alter Mäuse nahe legen (Abb. 14K). Die Reporteraktivität ist demnach auch der *Dkk1*-Expression adulter Mäuse identisch. Zusammenfassend spiegelt der Reporter die Regulation von *Dkk1* in neuroektodermalen Derivaten wieder. Zudem konnte die in *Xenopus* beschriebene *Dkk1*-Expression auf die Mausentwicklung übertragen und erweitert werden.

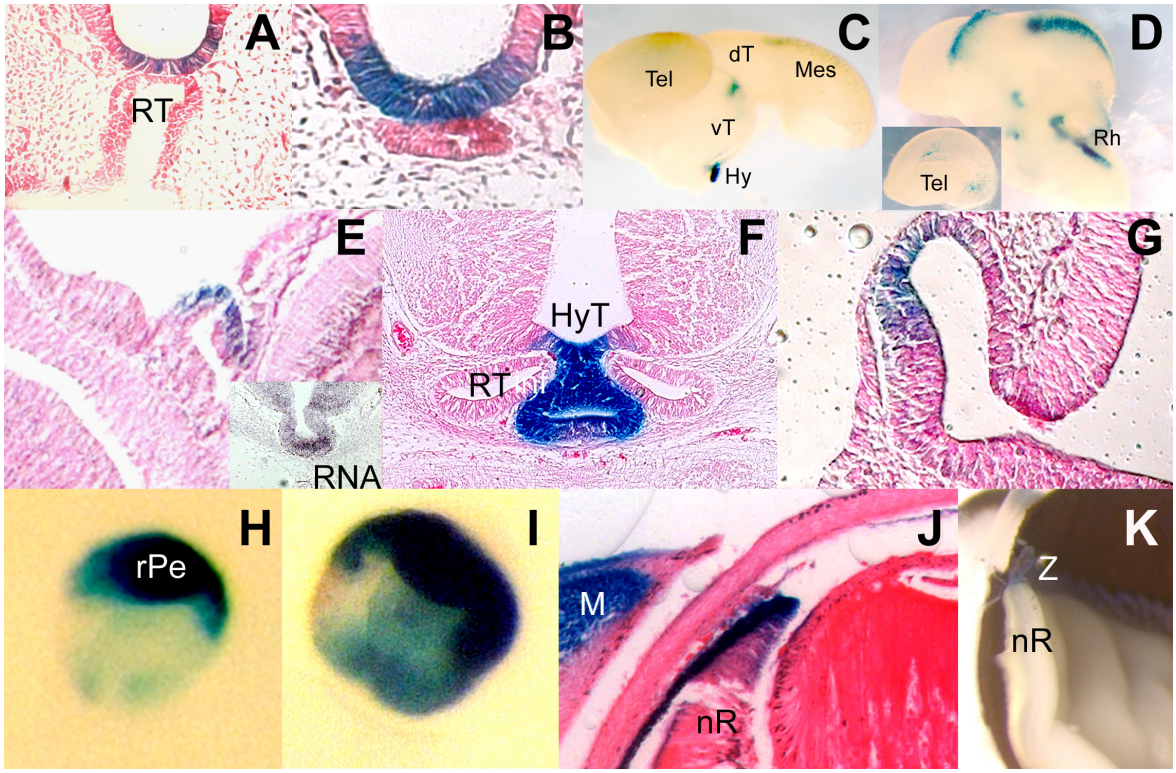


Abb. 14: Dynamik der Reporteraktivität während der Entwicklung neuroektodermaler Derivate. A+B) Transversale Schnitte: Reporteraktivität im ventralen Mesenzephalon, angrenzend zur Rathke´s Tasche (RT) zum Zeitpunkt E9,5. **C)** Vorder-und Mittelhirn in der Seitenansicht. Eine Aktivität ist im Telenzephalon (Tel), dem ventralen Thalamus (vT), im dorsalen Mesenzephalon (Mes) und der Hypophysenanlage (Hy) zum Zeitpunkt E11,5 detektierbar. **D)** E12,5; Reporter-Aktivität innerhalb des Rhombenzephalons (Rh). **E) + F)** Laterale und transversale Schnitte. Die *Dkk1* spezifische Reporteraktivität ist am Tag E11,5 und 12,5 vom Hypothalamus (HyT) in die Hypophyse ausgedehnt. Die Rathke´s Taschen (RT) bleiben von einer Aktivität ausgeschlossen. **G)- K)** Reporteraktivität während der Augenentwicklung. Die Aktivität dehnt sich von der dorsalen Retina (E9,5; **G)**) zwischen E10,5 und E11,5 nach ventral und auf das pigmentierte Epithel (rPe) aus **(H); I)). J)** Die Reporteraktivität ist E14,5 auf die anteriore neurale Retina (nR), das Mesenchym der Augenlieder (M) und auf den angrenzenden Bereich der Linse beschränkt. **K)** Reporteraktivität in der ziliären Zone (Z) in den Augen adulter Mäuse (zwei Monate).

3.6 Von der *Dkk1*-Expression abweichende Reporteraktivität

In den Gliedmaßenknospen und der mesenchymalen Domäne des vomeronasalen Organes aktivieren die CNEs den Reporter abweichend vom endogenen *Dkk1*-Muster. Diese sind im Folgenden näher charakterisiert.

3.6.1 Reportergen-Aktivität während der Gliedmaßen-entwicklung

In den sich entwickelnden Gliedmaßenknospen ist der Reporter in der AER und innerhalb der ZPA vom Zeitpunkt E10,5- E11,5 aktiv (Abb. 15A; nicht gezeigt). In der AER nimmt die Aktivität von E10,5 bis E12,5, identisch zur *Dkk1*-Expression in dieser Region ab (vgl.

15A, B mit 15D, E). In den sich entwickelnden Gliedmaßenknospen werden im weiteren Verlauf zum endogenen *Dkk1*-Muster abweichende Aktivitätsdomänen detektiert. Zudem bleibt die interdigitale Aktivität am Tag E12,5 aus (vgl. Abb. 15B mit 15E). Nach der AER-Degenerierung erscheint eine Aktivitätsdomäne an den distalen Enden der einzelnen Zehen (vgl. Abb. 15C mit 15F). Von diesen Stadien an werden durch die Färbung die Zehen vier und fünf markiert.

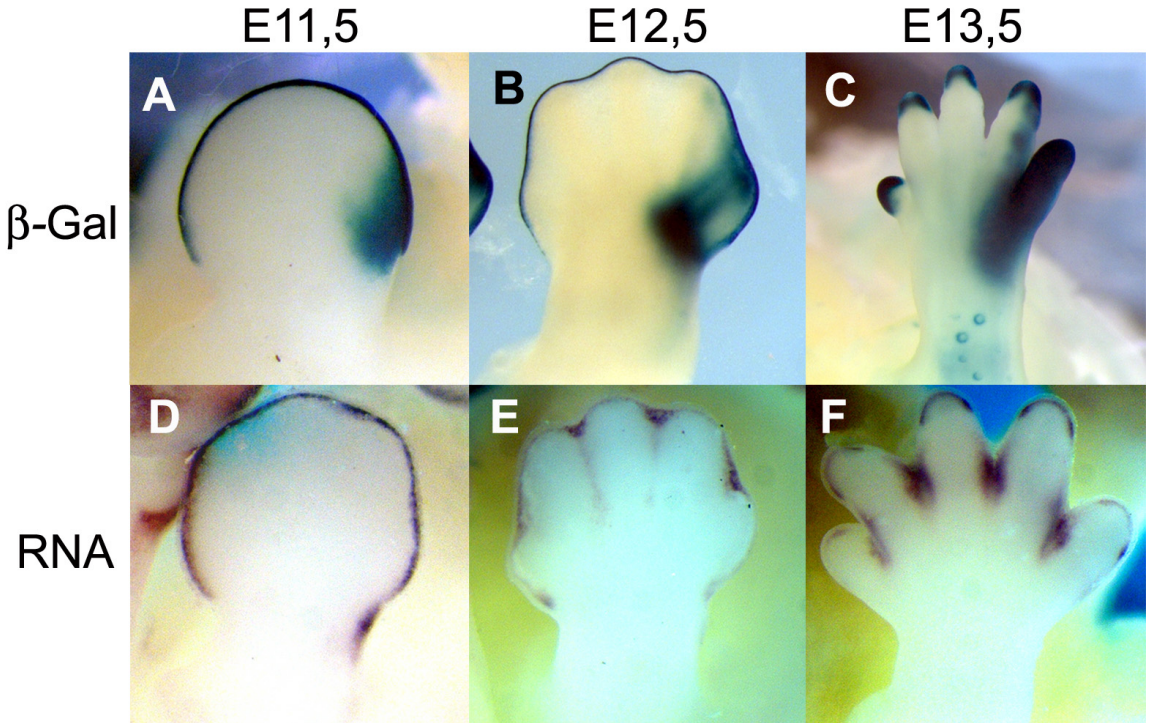


Abb. 15: Reporteraktivität im Vergleich zur endogenen *Dkk1*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung. A)- C) Reporteraktivität an den Entwicklungstagen E11,5- E13,5. **D) – F)** *Dkk1*-Expression innerhalb dieses Zeitraums zum Vergleich**. A)** Der Reporter ist abweichend von der *Dkk1*-Expression in einer posterioren mesenchymalen Domäne aktiv. Diese markiert im weiteren Verlauf die Zehen vier und fünf. (**B)**, **C)**). Die interdigitale Aktivierung bleibt aus (vgl. **E)**).

3.6.1.1 Analyse des Einflusses einer zusätzlichen anterioren *Shh*-Expression auf die Reporteraktivität in den Gliedmaßen

Während früher Gliedmaßenstadien kann neben der AER-spezifischen Reporteraktivitätsdomäne eine mit der *Shh*-Expression überlappende Reporter-Aktivierung in der ZPA detektiert werden (Abb. 16A, B). Durch Kreuzungen der transgenen Mauslinie in den *Hx*/+ (*Hemimelic extratoes)*-Maushintergrund wurde untersucht, ob eine zusätzliche *Shh*-Domäne hinreichend für die Aktivierung einer *Dkk1*-Expressionsdomäne ist. Hierbei würde sich durch die anteriore *Shh*-Expression eine zusätzliche anteriore Reporter-Domäne ergeben. Es konnte jedoch keine anteriore Aktivierung des Reporters am Tag E11,5 identifiziert werden (Abb. 16C). Auch die präaxial-polydaktylen Gliedmaßen während des

dreizehnten Entwicklungstages sind nicht von einer Reporteraktivität gekennzeichnet (Abb. 16D). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass in Übereinstimmung mit Analysen über die Aktivierung von *Dkk1* (Grotewold et al., 1999) die *Shh*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung alleine nicht hinreichend für eine Aktivierung des Reporters ist.

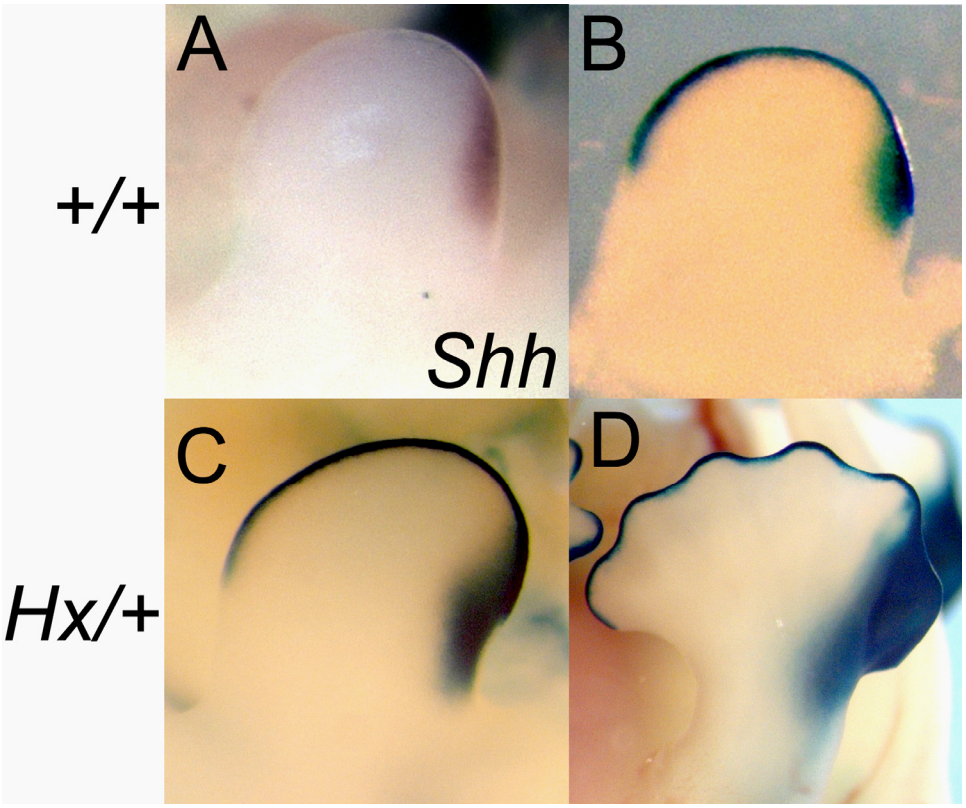


Abb. 16: Reporter-Aktivität im *Hx*-Hintergrund. Posteriore Extremitätenknospen in der dorsalen Ansicht. **A)+ B)** Die *Shh*-Expression in der ZPA überlappt am Tag E11,5 mit der Reporteraktivität. **C) + D)** Reporteraktivität in einem *Hx/+*-Hintergrund am Tag E11,5 und E13,5. Die anteriore *Shh*-Domäne ist alleine nicht hinreichend, um eine Reporteraktivierung zu bewirken.

3.6.2 Reporteraktivität innerhalb des vomeronasalen Organs

Die generierte Reporterlinie repräsentiert die *Dkk1*-Regulation innerhalb kraniofaszialer Kopfbereiche. Im Vergleich zur endogenen *Dkk1*-Expression bleibt jedoch eine Reporteraktivität innerhalb des vomeronasalen Mesenchymes aus (Abb. 17A,C). Wie transversale Schnitte der zuvor generierten transgenen Embryonen zeigen, in denen das Konstrukt mit den CNEs 25, 114, 175, 190 und 195 getestet wurde, wird für die Aktivierung in dieser Domäne mindestens eines der beiden CNEs 168 oder 175 benötigt (Abb. 17 B, D).

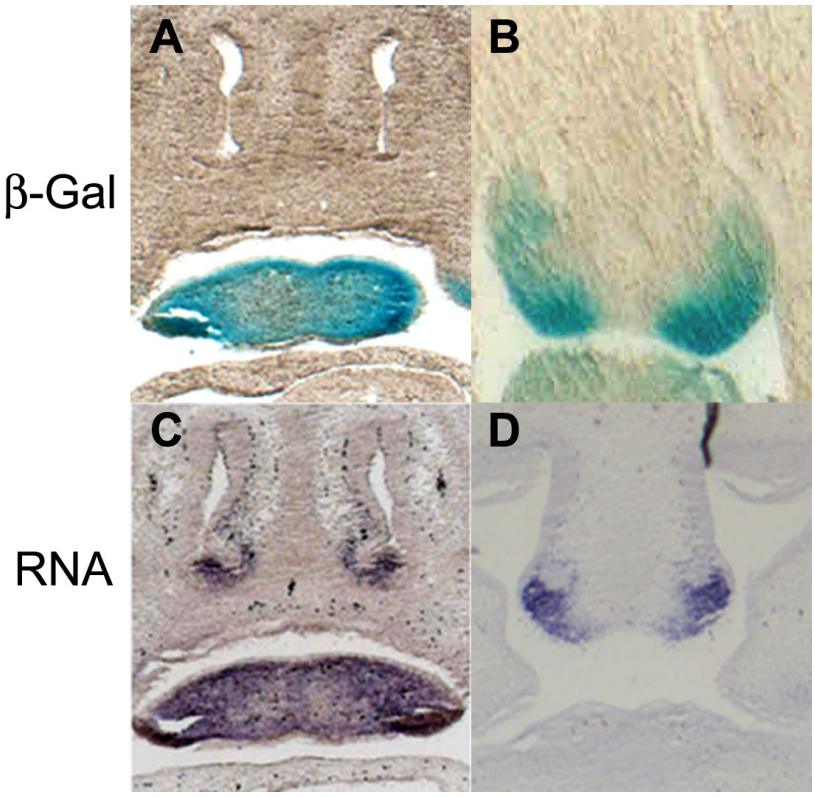


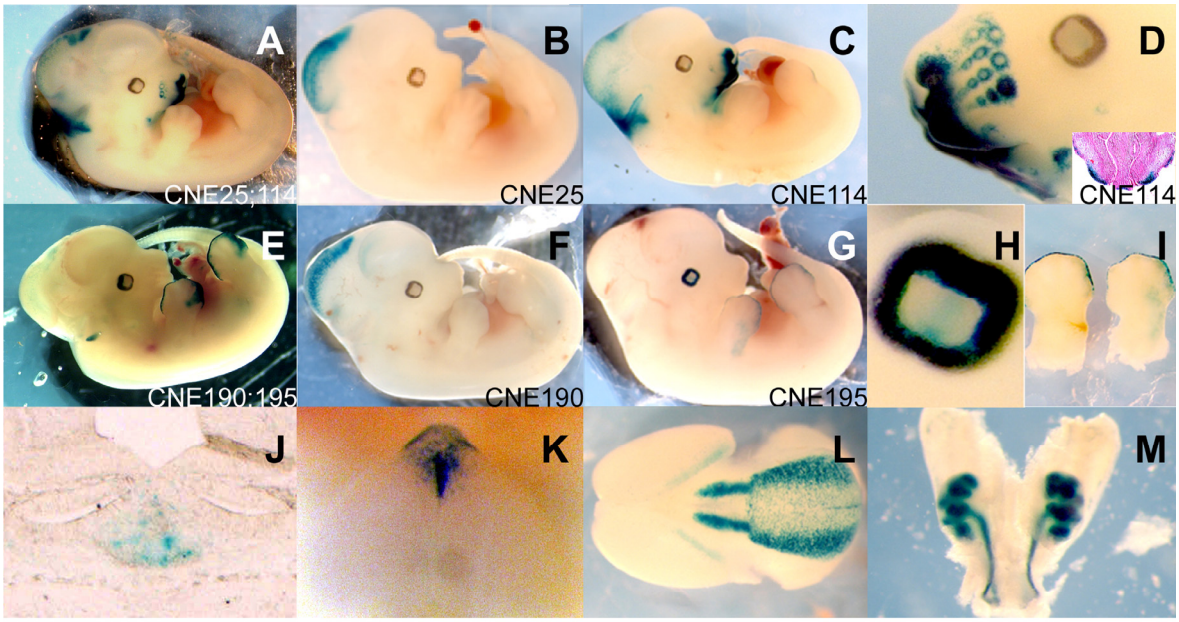
Abb. 17: Reporteraktivität innerhalb des vomero-nasalen Mesenchyms im Vergleich zur *Dkk1*-Expression. Transversale Schnitte im Bereich des vomeronsalen Organs. **A)** Die β-Gal-Färbung bleibt im Gegensatz zum Zungen-Mesenchym innerhalb des vomeronasalen Organs aus (Vgl. **C)**). **B)** Reporteraktivität innerhalb des vomeronasalen Organes bei den zuvor getesteten Konstrukten. **D)** *Dkk1*-Expression im Vergleich.

3.7. Charakterisierung des regulatorischen Potentials der CNEs 25, 114, 190 und 195

In weiterführenden Analysen wurde der regulatorische Einfluss der CNEs 25, 114, 190 und 195 aufeinander bzw. deren aktivierende Fähigkeiten im Einzelnen untersucht. Die CNEs 25 und 114 verursachen zusammen eine Aktivität in distalen kraniofaszialen Domänen, wie Schnurrbartmesenchym, der Zungenanlage, im Mesenchym der Zahnanlagen, sowie innerhalb dorsaler Regionen des Mesenzephalons und des Dienzephalons (Abb. 18A). Des Weiteren wurden die CNEs 25 und 114 in separaten Reporterkonstrukten getestet. CNE 25 alleine bewirkt eine Aktivierung innerhalb des lateralen Mesenzephalons (Abb. 18B), wohingegen CNE 114 alleine hinreichend für eine Regulation in kraniofaszialen Derivaten, mit Ausnahme der mesenchymalen Domäne des vomeronasalen Organes ist (Abb. 18C und D; Einsatz in 18D).

Um die regulatorischen Fähigkeiten der CNEs 190 und 195 zu analysieren, wurde ein 5,7 kb großes genomisches Fragment, welches ausschließlich diese beiden CNEs beinhaltet, untersucht. Beide exprimierende Embryonen sind von einer charakteristischen Aktivität in den Gliedmaßenknospen, dem otischen und dem optischen Vesikel geprägt (Abb. 18E). Wie auch CNE 25 führt das CNE 190 alleine zu einer Reporteraktivierung ausschließlich

in dorsalen Gehirn-Arealen (Abb. 18F), wohingegen CNE 195 alleine hinreichend für eine Aktivierung in den Augenanlagen und in den Gliedmaßenknospen ist (Abb. 18G- I).



N

	n=	Gehirn	Metanephros	Hypophyse	otisches Vesikel	Genitaltuberkel	kraniofaszial	optisches Vesikel	Gliedmaßen
CNE25;114;190;195	4/8	+	+	+	+	+	+	+	+**
CNE25 + CNE114	3/6	+	+	-	-	-	+	-	-
CNE25	3/6	+	+	-	-	-	-	-	-
CNE114	3/4	+	+	-	-	-	+*	-	-
CNE190 + CNE195	2/4	+	+	+	+	+	-	+	+
CNE190	4/11	+	+	-	-	-	-	-	-
CNE195	2/6	+	+	-	-	-	-	+	+
		allgemein		**kombinatorisch**			**spezifisch**		

* = Mandibeln, Maxillen, Zungen, Haarfollikel
**= AER, PNZ

Abb. 18: Regulatorische Beziehung der CNEs 25, 114, 190 und 195. **A)** CNEs 25 und 114 sind hinreichend für eine Reporteraktivierung in kraniofaszialen Domänen. **B)** CNE 25 besitzt eine aktivierende Fähigkeit in Gehirnarealen. **C) + D)** CNE114 ist hinreichend für eine Reporteraktivierung in kraniofaszialen Domänen, ausgenommen des vomeronasalen Organes (siehe Vergrößerung). **E)** CNE190 und 195 sind hinreichend für eine Reporteraktivierung in den Gliedmaßenknospen, den Augenanlagen und des otischen Vesikels. **F)** CNE 25 besitzt wie CNE90 eine aktivierende Fähigkeit in Arealen des Gehirnes. **G- I)** CNE195 ist hinreichend für eine Reporteraktivierung in den Augenanlagen und den Gliedmaßenknospen. **J) + K)** in der Hypophsenanlage und dem Genitaltuberkel fungieren die CNEs 190 und 195 in Kombination Reporter-aktivierend. **L) und M)** redundante regulatorische Fähigkeiten der CNEs in den dorsalen Gehirnarealen und dem Metanephros. **N)** Zusammenfassung der regulatorischen Charakteristika der CNEs.

3.8 Analyse der *Dkk1*-Regulation während der Augenentwicklung

Die transgene Mauslinie spiegelt das endogene *Dkk1*-Expressionsmuster während der Augenentwicklung wieder. In diesem Gewebe ist CNE 195 alleine hinreichend für eine Reportergen-Aktivierung. In weiterführenden Experimenten wurde dieses CNEs verwendet, um die direkte *Dkk1*-Regulation während der Augenentwicklung zu analysieren.

3.8.1 Analyse der Lef1 vermittelten *Dkk1*-Aktivierung

CNE 195 ist alleine hinreichend, um die Aktivierung in der anterioren Retina, dem retinalen Pigmentepithel, und dem Übergang der Retina in den optischen Nerv zu vermitteln (Abb. 19A und B). Um mögliche Trankriptionsfaktoren zu identifizieren, die eine Aktivierung der *Dkk1*-Expression bewirken könnten, wurde nach konservierten Zielsequenzen von Trankriptionsfaktoren innerhalb des CNE 195 gesucht (Abb. 19G). Da die 3'-Region mögliche Bindestellen für Pax- und TCF/LEF-Faktoren enthielt, Faktoren, die während der Augenentwicklung von Bedeutung sind, wurde zunächst durch eine 96 bp Deletion der 3'-Region des CNEs 195 untersucht, ob dieses Fragment für die Aktivierung benötigt wird. Ein entsprechendes Reporterkonstrukt führt zu einem kompletten Verlust der Aktivität in den Augenanlagen, wohingegen die Aktivität in den Gehirn-Domänen und den Gliedmaßenknospen erhalten bleibt (Abb. 19C und D; Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass der 3´-Bereich des CNE 195 Transkriptionsfaktorbindestellen beinhaltet, die für die Regulation von *Dkk1* in den Augen essentiell sind. Da *Dkk1* in den Augenanlagen mit *Lef1* koexprimiert wird (eigene Beobachtung; Liu et al., 2006), wurde getestet, ob die Lef1-Bindestelle für eine Reporteraktivierung benötigt wird. Für diese Analysen wurden C/g; A/t; G/t und G/c-Punkt-Mutationen innerhalb der Konsensussequenz für die Lef1-Bindestelle des ursprünglichen CNE 195-Konstruktes eingefügt. Im Vergleich zum wildtypischen CNE 195 führen die Punktmutationen zu einem drastischen Verlust der aktivierenden Eigenschaften dieses CNEs (Abb. 19E und F). Die Lef1-Bindestelle wird demnach für die Augen-spezifische *Dkk1*-Expression benötigt. Um zu testen, ob das Lef1-Protein direkt an diese konservierte Binde-Sequenz bindet, wurden EMSA-Studien durchgeführt. Das Lef1-Protein führt zu einer Reduktion der Mobilität eines radioaktiv markierten 29 bp Oligonukleotids (siehe 2.12.1) durch ein natives Gel, welches in seinem Zentrum die TCF/LEF-Bindestelle beinhaltet (Abb. 19H, erste Spur). Im Vergleich dazu besitzt das Lef1-Protein eine drastisch reduzierte Affinität zu dem mutierten Oligonukleotid (Abb. 19H, zweite Spur). Eine 100- bzw. 500-fache Konzentration des nicht-markierten Oligonukleotids führte zu einer Kompetition der spezifischen Bindung (Abb. 19H, dritte und vierte Spur). Die konservierte Lef1-Bindestelle innerhalb des CNE 195 wird demnach direkt von Lef1 während der Augenentwicklung angesteuert.

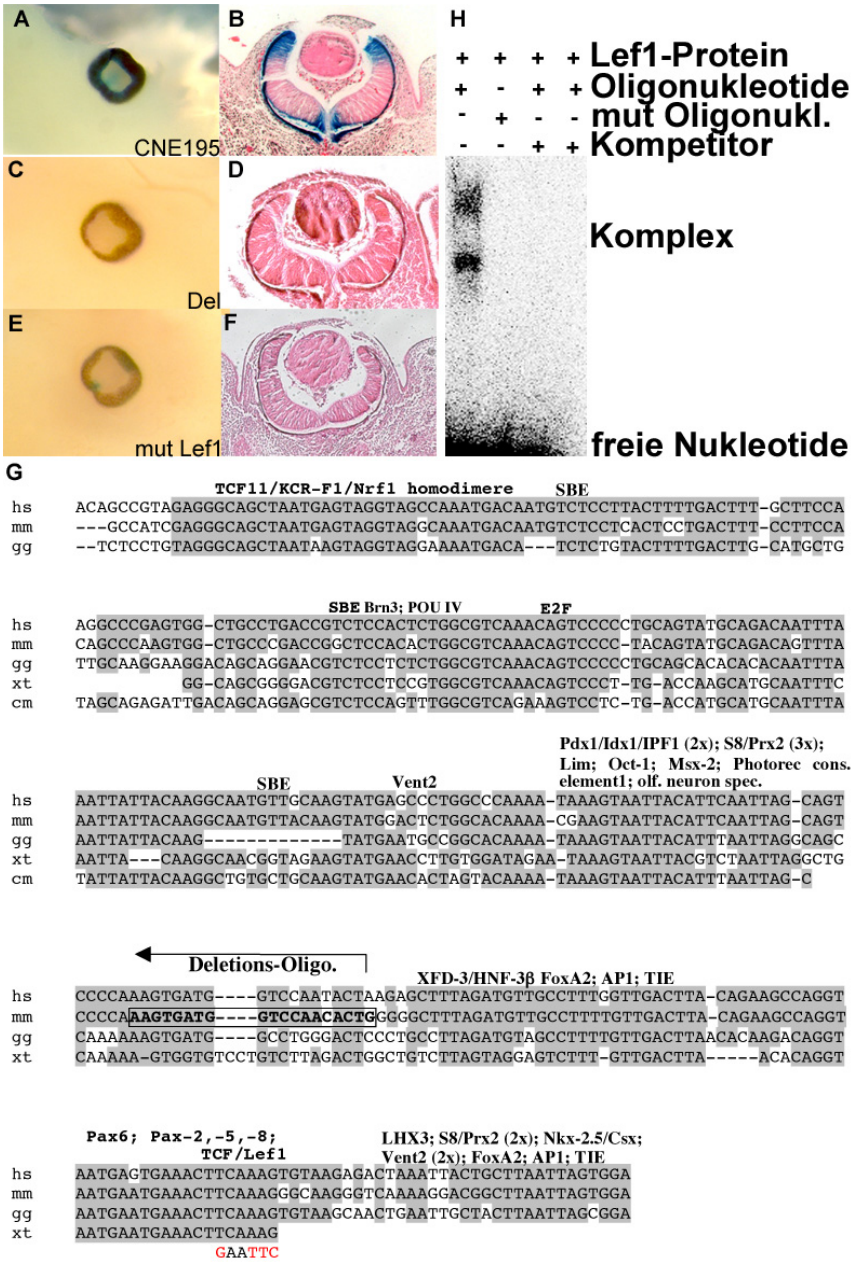


Abb. 19: Aktivierung des Reporters durch Lef1. A), C), E) Reporteraktivität in den Augenanlagen am Tag E12,5 (Aufsicht). **B), D), F)** transversale Schnitte gefärbter Augenanlagen. **A) + B)** Charakteristische, durch das CNE195 verursachte Reporteraktivität in der neuronalen Retina und dem rPE. **C) + D)** Eine 96bp Deletion des 3´-Bereiches (siehe **G)** Deletions-Oligo) führt zu einem Ausfall der Reportergenexpression innerhalb der Augenanlagen. **E)** + **F)** Eine Punktmutation in der konservierte Lef1- Bindestelle (rote Buchstaben in **G)** führt zu einer drastischen Reduktion der Reporteraktivität. **H)** Lef1 führt durch die Bindung an das CNE 195 Oligo zu einer Verminderung ihrer Laufgeschwindigkeit durch ein natives Gel (linke Spur). Eingefügte Punktmutationen innerhalb der Oligonukleotide führen zu einem Ausfall der Bindung (zweite Spur). Unmarkierte Oligonukleotide in 100-facher und 500- facher Konzentration führen zu einem Verlust der Bande (dritte und vierte Spur). **G)** Sequenz des CNE195. Mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen, Deletionsprimer und die mutagenisierte Lef1-Bindestelle sind angezeigt.

3.8.2 Analyse der *Dkk1*$^{+/-}$-Haploinsuffizienz während der Augenentwicklung

Bei den funktionellen Analysen konnte festgestellt werden, dass ca. 50% (22/43) der *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen in einem *C57BL/6*-Hintergrund am Tag E12,5 variierende Augendefekte vorweisen. Die phänotypische Varianz reicht von uni- oder bilateralen Mikrophthalmien mit anterioren Defekten, bis hin zu Anophthalmien, dem Verlust gesamter Augenanlagen (Abb. 20A– D). Mit zunehmender Stärke des Phänotyps resultieren zudem nasale kraniofasziale Defekte (vgl. Abb. 20C und D). Weiterhin verbleiben stark betroffene optische Vesikel, im Gegensatz zu wildtypischen Augenanlagen, angrenzend zum Dienzephalon (Abb. 20E oben). Mirophthalmie-Augen sind zudem durch einen überpigmentierten optischen Nerv gekennzeichnet (Abb. 20F). Postnatal ist die Mikrophthalmie mit der Etablierung geschlossener Augenlider assoziiert (Daten nicht gezeigt).

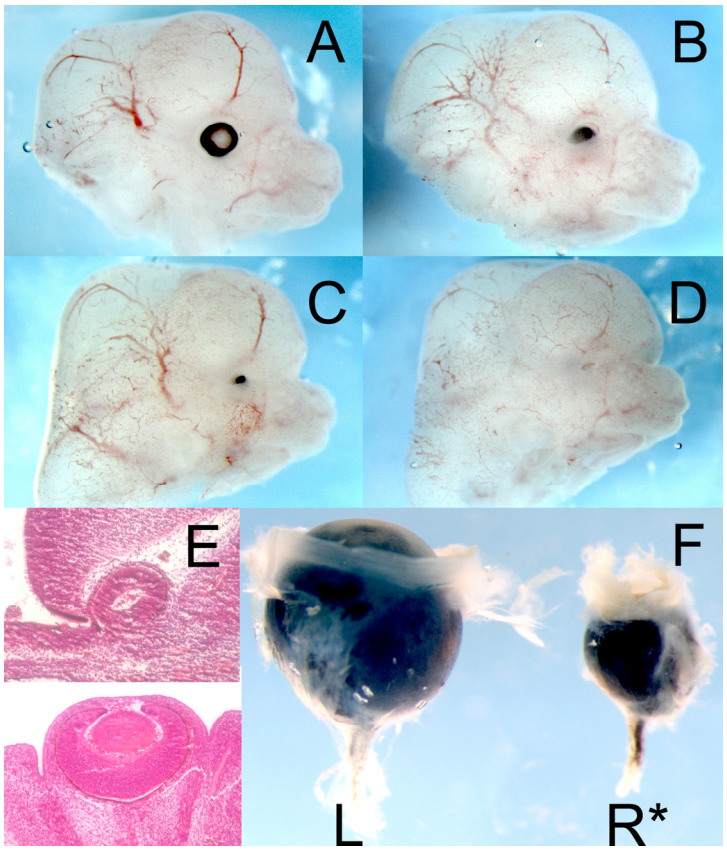


Abb. 20: *Dkk1*-Haploinsuffizienz während der Augenentwicklung. **A)- F)** Phänotypische Varianz in *Dkk1*$^{+/-}$-Kopfanlagen am Entwicklungstag E12,5. **A)- D)** Kopfanlagen in der Seitenansicht. **A)** unbeeinträchtigte Kopfanlage. **B)** Unilaterale Mikrophthalmie. **C)** Starke Mikrophthalmie mit kraniofaszialem Defekt. **D)** Anophthalmie mit kraniofaszialem Defekt. **E)** Hämalaun/Eosin-Färbungen transversaler Schnitte *Dkk1+/-*-Embryonen. Stark beeinträchtigte Augenanlagen (oben) verbleiben in Kontakt zum Dienzephalon. **F)** Präparierte Augen einer 2 Monate alten Maus mit bilateraler Mirkrophthalmie. Das mutante Auge (R*) weist einen anterioren Defekt und einen überpigmentierten optischen Nerv auf.

3.8.3 Analyse des Einflusses der reduzierten *Dkk1*-Aktivität auf das Reportermuster in den Augenanlagen

Durch die Generierung von *Dkk1*$^{+/-}$*; lacZ*-Mäusen wurde der Einfluss der reduzierten *Dkk1*-Aktivität auf das Muster der Reporteraktivität innerhalb der Augenanlagen zu unterschiedlichen Entwicklungstagen untersucht. Das Reportermuster wurde mit den *Dkk1*-Expressionsniveaus aus isolierten Augenanlagen verglichen. Am Tag E10,5 können keine morphologischen Augendefekte detektiert werden (vgl. Abb. 21A, mit B; n=12). Zudem sind keine Veränderungen in dem Muster der Reporteraktivität oder dem *Dkk1*-Expressionsniveau detektierbar (Abb. 21A´, B´ vgl. G). Diese Daten legen nahe, dass die Augeninduktion in *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen unbeeinträchtigt ist.

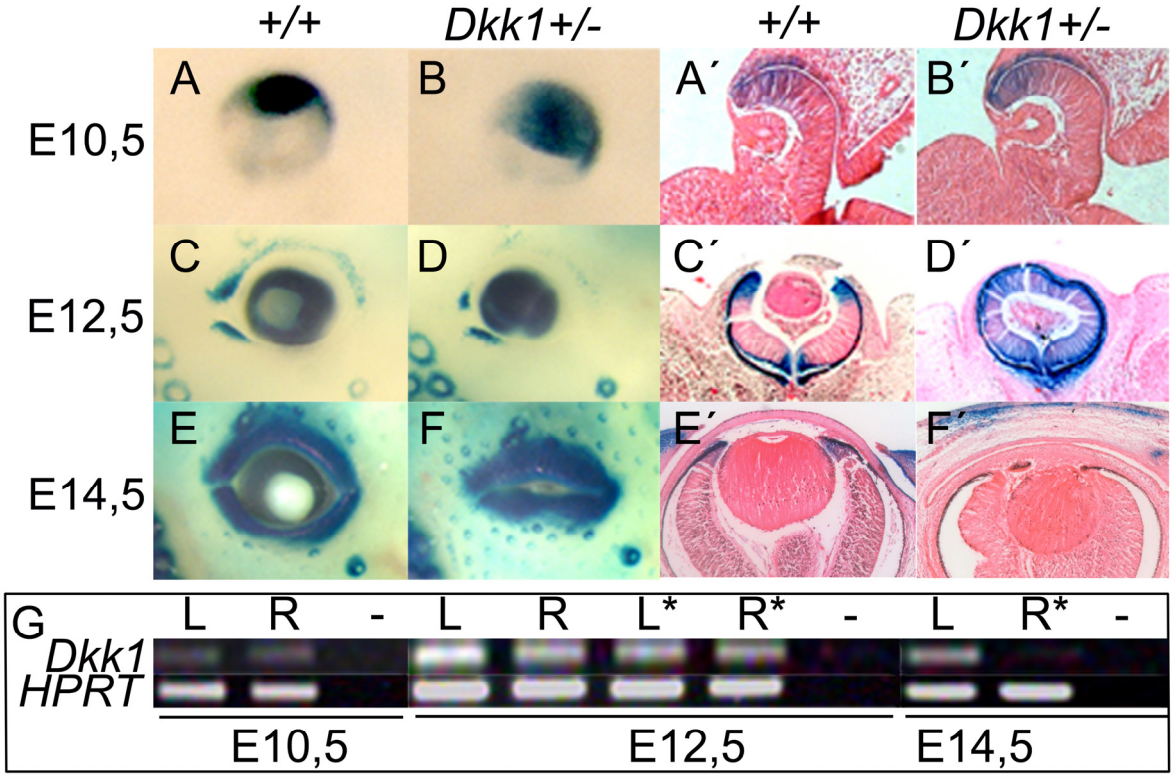


Abb. 21: Der Einfluss einer reduzierten *Dkk1*-Aktivität auf die Musterbildung der Augenanlagen. A) –F´) βGal-Färbung wildtypischer Embryonen im Vergleich zu *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen während verschiedener Embryonalstadien. **A) - F)** Augenanlagen in der Aufsicht. (**A)**, **C)**, **E)**) wildtypische Embryonen, **B)**, **D)**, **F)** *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen. Die Augenentwicklung von *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen am Tag E10,5 ist identisch zum Wildtyp. Das Reportermuster ist ebenfalls unverändert (vgl. **A)** mit **B)** und **A´)** mit **B´)**). Die Mikrophthalmie ist zum Zeitpunkt E12,5 detektierbar (**D)**, im Vergleich zu **C)**). Innerhalb der Augenanlagen ist das Reportermuster im Vergleich zum Wildtyp diffus (**D´)**, vgl. **C´)**). Betroffene Augenanlagen sind im Vergleich zum wildtypischen geschlossen (**F)** vgl. **E)**). **F´)** die Reporteraktivität in der Retina defekter Augenanlagen ist im Vergleich zum Wildtyp verloren gegangen (**F´)** vgl. **E´)**). **G)** *Dkk1* RT-PCRs isolierter Augenanlagen heterozygoter Embryonen an unterschiedlichen Entwicklungstagen**.** (L= linke Augenanlage; R= rechte Augenanlage; L* bzw. R*= Mikrophthalmie-Augen. Die *Dkk1*-Expression in defekten Augenanlagen ist am Tag E14,5 nicht mehr nachweisbar.

Mikrophthalmien sind am Tag E12,5 sichtbar, wobei betroffene Augenanlagen malformiert und überpigmentiert sind (Abb. 21C, D). Die Reporteraktivierung in defekten Augenanlagen erscheint diffus und die Linsenanlage ist deutlich beeinträchtigt (Abb. 21C´, D). Mit diesem Befund geht ein leicht reduziertes *Dkk1*-Expressionsniveau einher (Abb. 21G). Im Gegensatz zu wildtypischen Augen sind Mikrophthalmie-Augen am Tag E14,5 geschlossen und von anterioren Augendefekten gekennzeichnet (Abb. 21E, F). Sowohl die Reporteraktivität, als auch die *Dkk1*-Expression sind in diesem Stadium in beeinträchtigten Augen nicht mehr nachweisbar (Abb. 21E´ und F). Diese Daten legen zusammenfassend nahe, dass den Augen-Fehlbildungen in *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen ein zum endogenen *Dkk1*-Niveau reduziertes Niveau zugrunde liegt. Das Maß der Herunterregulation korreliert mit der Stärke des Phänotyps, sodass sich eine Dosisabhängigkeit vermuten lässt. Ein regional begrenztes Dkk1-Mindestmaß wird zudem für die Aufrechterhaltung der *Dkk1*-Expression benötigt, da es zu einem späteren Zeitpunkt zum Verlust der *Dkk1*-Expression kommt. Aufgrund des veränderten Reportermusters deutet sich auch ein Einfluss auf grundlegende Musterbildungsvorgänge an.

3.8.4 Analyse des Einflusses der *Dkk1*-Haploinsuffizienz auf den kanonischen Wnt-Signalweg

Da eine direkte Interaktion des Lef1-Proteins mit dem CNE 195 nachgewiesen werden konnte, wurde eine Rückkopplung der Dkk1-Aktivität mit dem kanonischen Wnt-Signalweg angenommen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Gesamtmenge Gsk3β-Protein mit der phosphorylierten, aktiven Form des GSK3β-Proteins in isolierten Augenanlagen verglichen (Abb. 22). Im Vergleich zu den intakten Augenanlagen ist im

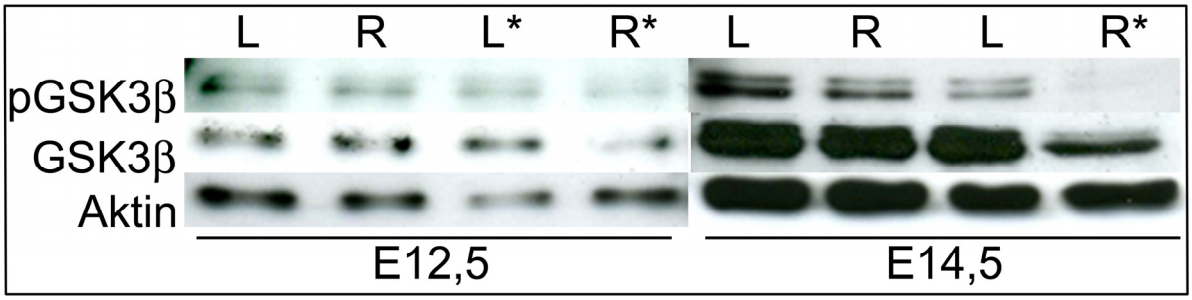


Abb. 22. Die *Dkk1*-Haploinsuffizienz führt zum Verlust des kanonischen Wnt-Signalweges in heterozygoten *Dkk1*-Embryonen. GSK3β-Proteinmengen und phosphoryliertes pGSK3β in isolierten linken (L) und rechten (R) Augenanlagen an den Entwicklungstagen E12,5 und E14,5 im Vergleich zum Aktin-Abgleich („L*"= schwacher Phänotyp links; „R*"=starker Phänotyp rechts). Schwache Veränderungen der GSK3β und der phosphorylierten Form sind am Tag E12,5 detektierbar. In betroffenen Augenanlagen ist GSK3β am Tag E14,5 reduziert und der pGSK3β-Anteil nicht mehr nachweisbar.

Falle eines starken Phänotyps zum Zeitpunkt E12,5 sowohl die Gesamtmenge GSK3β als auch die phosphorylierte Form reduziert (Abb. 22R*). Schwächer beeinträchtige Augenanlagen weisen ein im Vergleich zu unveränderten Augenanlagen ein identisches Maß vor (R*, L* im Vergleich zu L und R). GSK3β ist am Tag E14,5 stark reduziert und phosphoryliertes GSK3β nicht nachweisbar. Die dargelegten Resultate legen nahe, dass die Reduktion der Dkk1-Menge zu einer Beeinträchtigung des kanonischen Wnt-Signalweges führt. Die Dkk1 vermittelte Wnt-Inhibition während der Augenentwicklung ist demnach essentiell für die Aufrechterhaltung des kanonischen Wnt-Signalweges.

3.9 Identifikation zusätzlicher *Dkk1*-Expressionsdomänen

In dieser Arbeit konnten erstmalig *Dkk1*-spezifische Expressionsdomänen in ektodermalen Kopf-Arealen, wie dem otischen Vesikel nachgewiesen werden. Zudem konnten Expressionsdomänen in posterioren Domänen des Embryos während der Segmentierung innerhalb posteriorer Somiten, in der sich entwickelnden Nierenanlage und der externen Genitalplakode aufgedeckt werden. Im Folgenden ist die räumlich zeitliche Dynamik der Reporteraktivität im Vergleich zur endogenen *Dkk1*-Expression innerhalb der genannten Gewebe charakterisiert.

3.9.1. *Dkk1*-Expression im otischen Vesikel

Die Reporteraktivität ist erstmalig nach der Invagination des Oberflächenektoderms des des sich bildenden otischen Vesikels am Tag E9,5 detektierbar (Abb. 23A). Die Aktivität erstreckt sich hierbei angrenzend zum Neuralrohr, einem Ort, an dem sich akkustische Ganglien bilden werden (Vergrößerung in Abb. 23A). *Dkk1* wird in diesem Zeitraum schwach exprimiert (Abb. 23C). Die Aktivität erstreckt sich am Tag E12,5 proximal vom endolymphatischen Dukt bis hin zum Sakkulus, sehr ähnlich der *Dkk1*-Expression (nicht gezeigt; Abb. 23B+ D). Zu späteren Zeitpunkten ist eine Aktivität innerhalb des Innenohrs nicht mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt).

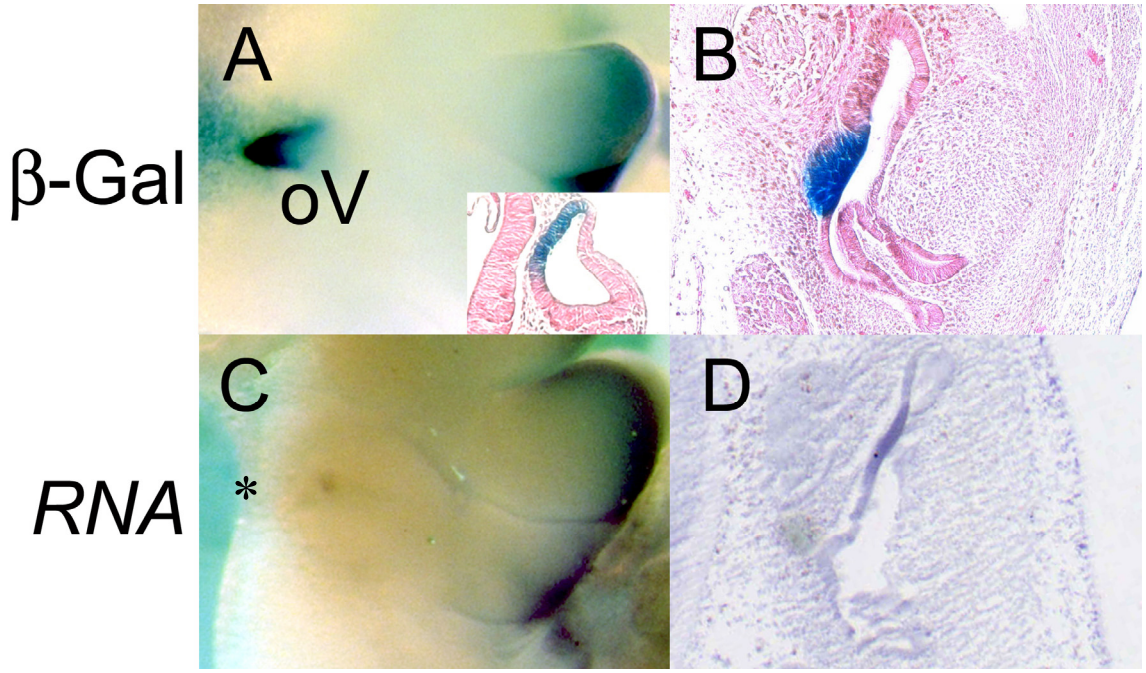


Abb. 23*:* **Reporteraktivität im Vergleich zur *Dkk1*-Expression während der Innenohr-Entwicklung. A)+C)** Reporteraktivität im Vergleich zur *Dkk1*-Expression im otischen Vesikel (oV) am Tag E9,5. Die *Dkk1*-Expression ist in derselben Region schwer nachweisbar (**C; (*)**). **(B + D)** Reporteraktivität im medialen Teil des otischen Vesikels im Vergleich zur *Dkk1*-Expression am Tag E12,5.

3.9.2 *Dkk1*-Expression während der Organogenese des posterioren Embryos, sowie im Metanephros und den externen Genitalanlagen

Wie oben gezeigt, erfolgt eine schwache Aktivität in gastrulierenden mesenchymalen Zellen zum Zeitpunkt E7,5. Während der embryonalen Segmentierung wird der Reporter innerhalb des posterioren Mesoderms und weniger intensiv in dem sich schließenden Neuralrohr aktiviert (Abb. 24A). Nach der embryonalen Drehung ist eine Reporteraktivität in den posterioren Somiten und dem posterioren Neuralrohr detektierbar (Abb. 24B). Die Reporteraktivierung in den posterioren Somiten ist am Tag E9,5 nicht mehr detektierbar, und innerhalb des Neuralrohres stark reduziert (nicht gezeigt). Die Reporteraktivität ist am Tag E10,5 auch im Neuralrohr nicht mehr nachzuweisen (nicht gezeigt).

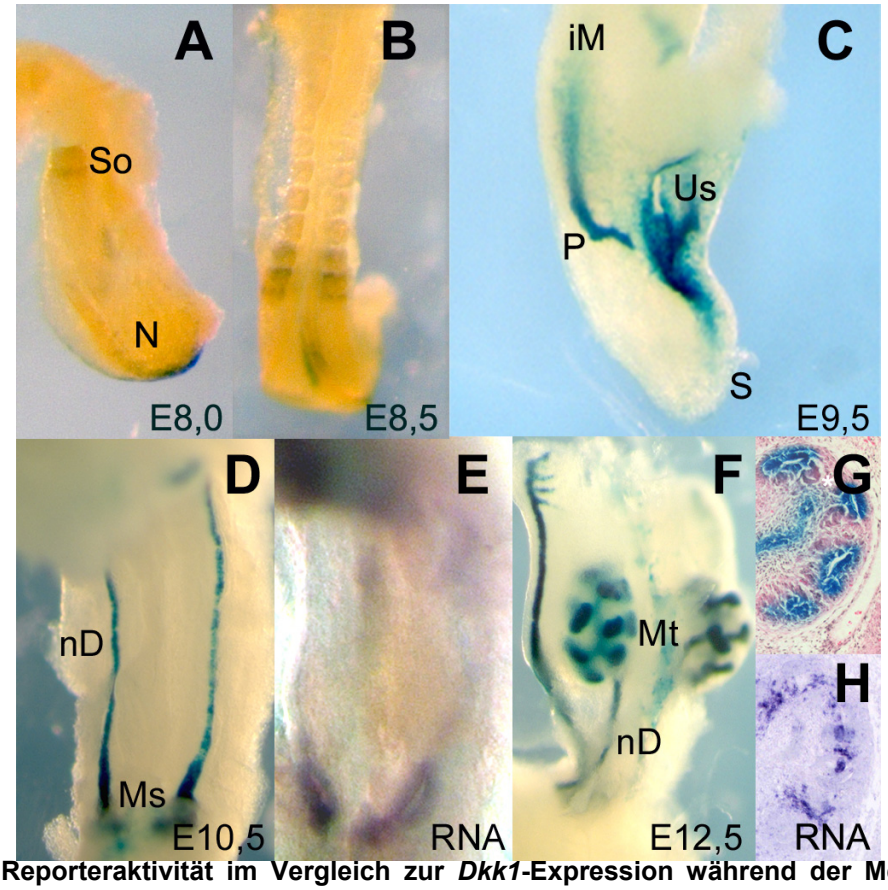


Abb. 24: Reporteraktivität im Vergleich zur *Dkk1*-Expression während der Metanephros-Entwicklung. (**A) + B)**) Reporteraktivität vor und nach der embryonalen Drehung in den posterioren Somiten (So), und der Neuralfalte (N). **C)** Reporteraktivität in dem Pronephros (P), dem Urogenitalsinus (Us) und dem distalen Ende der Schwanzspitzen (S). **D)** Reporteraktivität im nephrischen Dukt (nD), und dem Mesonephros (Ms), ähnlich der *Dkk1*-Expression (**E)**). **F)** Reporteraktivität in dem sich entwickelnden Metanephros (Mt), und dem nephrischen Dukt (nD). **G) + H)** transversale Schnitte durch den Metanephros. Die Reporteraktivität innerhalb des Metanephros ist der *Dkk1*-Expression sehr ähnlich.

In intermediären mesodermalen Zellen, die posterior aggregiert den Pronephros bilden, sowie mesenchymal an der kloakalen Membran, kann am Tag E9,5 eine Aktivität detektiert werden (Abb. 24C). Weiterhin ist die Reporteraktivierung in der ventralen mesodermalen Region, vom Urogenitalsinus (Us) bis zum distalen Ende des Schwanzes (S) reichend, detektierbar. Diese Domäne ist identisch zu der *Dkk1*-Expression in *Xenopus*-Embryonen (Monaghan et al., 1999). Der Reporter wird im nephrischen Dukt und innerhalb des Urethers, identisch zur *Dkk1*-Expression am Tag E10,5 aktiviert (Abb. 23D, E). Nach der Differenzierung des Mesonephros zum Metanephros wird der Reporter im Urether, sowie in den Knospen, als auch in den renalen Vesikeln dem *Dkk1*-Expressionsmuster sehr ähnlich exprimiert, wie für den Tag E12,5 dargestellt (Abb. 24F, G, vgl. Abb. 24H). Zu späteren Zeitpunkten wird der Reporter, wie für die *Dkk1*-Expression beschrieben, in S-förmigen und Komma- förmigen Körperchen aktiviert (nicht gezeigt).

3.9.3 *Dkk1*-Expression im Genital-Tuberkel

Externe Genitalien, entstehen während der Embryonalentwicklung in einer kaudalen Region, aus einer Anlage, die als Genital-Tuberkel bezeichnet wird. Diese differenziert später in einen Penis bei Männchen und einer Klitoris bei Weibchen. Bisherige Studien konnten zeigen, dass die Entwicklungsprozesse während der Entwicklung externer Geschlechtsorgane durch ähnliche Signalzentren gesteuert werden, wie bei der Gliedmaßenentwicklung (Dolle et al., 1991, Yamaguchi et al., 1999). Im Gegensatz zu der bekannten Dynamik der *Dkk1*-Expression während der Gliedmaßenentwicklung ist die Expression während der Genitalentwicklung bislang nicht beschrieben.

Während der externen Genitalplakoden-Induktion, wird der Reporter in der Region der Urogenital-Sinus aktiviert (Abb. 25A). Im weiteren Verlauf ist die Aktivität in dem distalen urethralen Epithelium und schwächer in dem angrenzenden Mesoderm existent (Abb. 25B). Zudem wird der Reporter im Mesenchym der ventralen Mittellinie gebildet. Während der Degeneration des distalen Epithels nimmt die Expression in dieser Domäne ab und verlagert sich an die lateralen Seiten (Abb. 25C). Im weiteren Verlauf der Entwicklung nimmt die Aktivität in diesen Domänen stetig ab und ist nach E16,5 nicht mehr nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Die *Dkk1*-Expression während der Entwicklung externer Genitalien ist der Reporteraktivität sehr ähnlich (Abb. 25D- F).

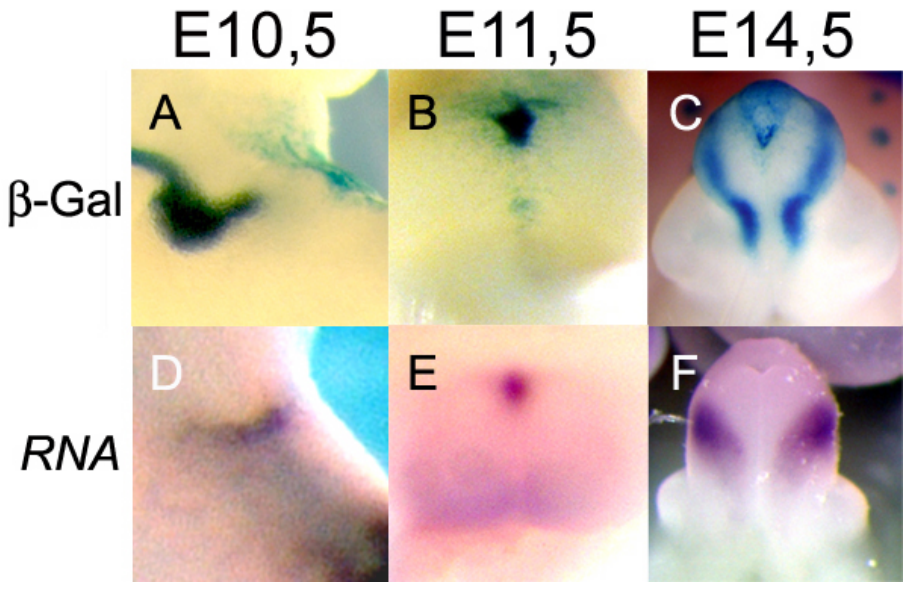


Abb. 25: Reporteraktivität im Vergleich zur *Dkk1*-Expression während der externen Genitalentwicklung. **A)** Reporterexpression im Urogenitalsinus. **B)** Aktivität im distalen urethralen Epithelium und in der ventralen Mittellinie zum Stadium E11,5. **C)** Reporterexpression in dem distalen Epithel und den ventralen mesenchymalen Domänen nimmt ab. **D) – F)** *Dkk1*-Expression während der externen Genitalentwicklung, sehr ähnlich der Reporterexpression.

3.10 Funktion von *Dkk1* während der Urogenitalentwicklung

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen zusätzlichen Expressionsdomänen während der Organogenese des posterioren Embryos ergab sich die Annahme, dass *Dkk1* während der Entwicklung der externen Genitalien und des Metanephros eine Rolle spielt. Auf dieser Grundlage wurden *Dkk1*-defiziente Embryonen auf bislang nicht bekannte Funktionen hin untersucht.

3.10.1 Analyse der *Bmp4*- und *Fgf8*-Expression im Genitaltuberkel von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen

Die *Fgf8*-Expression innerhalb des distalen urethralen Epithels wird, ähnlich wie innerhalb der AER, das Auswachsen in proximo-distaler Achse gesteuert (Ogino et al., 2001). Neben *Fgf8* spielen auch *Shh* und *Bmp4* eine Rolle. *Bmp4* wird innerhalb des distalen urethralen Epitheliums und in dem distal-ventralen Mesenchym, angrenzend zum distalen urethralen Epithels exprimiert. Bislang ist nicht geklärt, ob in den Genitaltuberkeln *Bmp4* regulatorisch unterhalb oder oberhalb von *Shh* liegt (Ingham und McMahon, 2001; Zhang et al., 2001). Die Analysen dieser Zusammenhänge und die Funktion von *Dkk1* in diesen Prozessen ist im Folgenden dargestellt.

Um zu prüfen, ob sich der Verlust von *Dkk1* auf die Musterbildung innerhalb des Genitaltuberkels auswirkt, wurde die transgene Mauslinie in einem *Dkk1*$^{-/-}$-Hintergrund untersucht. Eine veränderte Aktivität in dem ventralen Genitaltuberkel kann am Tag E12,5 nachgewiesen werden, da die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp sowohl distal, als auch im ventralen Mesenchym verändert ist (Abb. 26D). Das veränderte Rportermuster deutet demnach auf eine fehlerhafte Musterbildung hin. Da die *Dkk1*-Expression in der externen Genitalplakode zum Großteil mit der *Bmp4*-Expressionsdomäne überlappt, wurde der Einfluss des *Dkk1*-Verlustes auf die *Bmp4*-Expression untersucht. Diese erscheint in der distalen, lateralen Domänen abgeschwächt und ventral nach medial verschoben (Abb. 26B; E). Da in den *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen die Reporteraktivität im distalen Bereich verstärkt ist (siehe Vergrößerung in Abb. 26D), wurde überprüft, ob diese mit einer erweiterten *Fgf8*-Expression in dieser Domäne korreliert. Weder im Wildtyp, noch in den *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen kann jedoch eine *Fgf8*-Expression zu diesem Stadium detektiert werden (Abb. 26C; F). Da zum Tag E12,5 bereits morphologische und molekulare Veränderung detektierbar sind, lag die Vermutung nahe, dass sich der Phänotyp bereits früher etabliert.

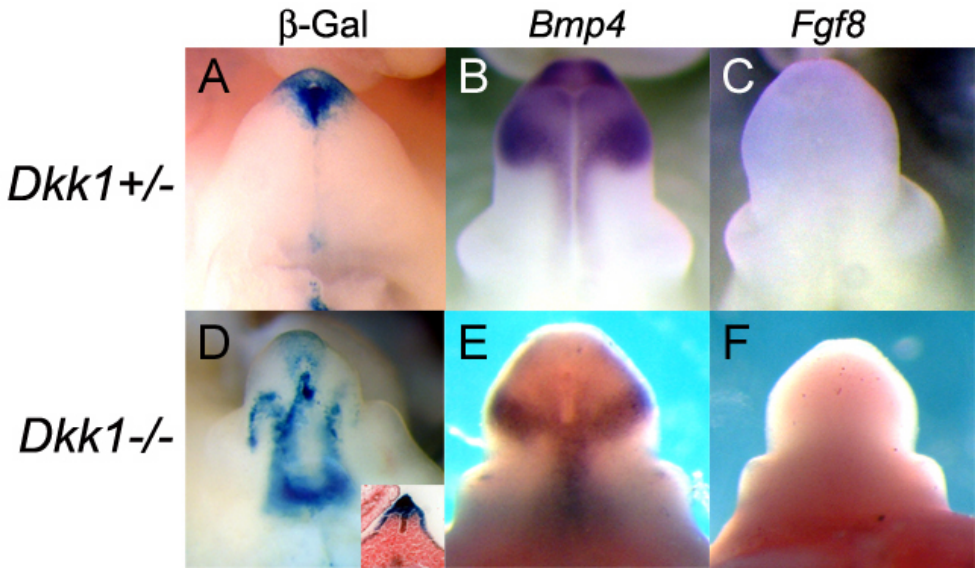


Abb. 26: Analyse der *Bmp4*-und der *Fgf8*-Expression in den Genitaltuberkeln *Dkk1-/-*-Embryonen. Ventrale Ansicht von Genitaltuberkeln am Tag E12,5. **A) + D)** βGal-Aktivität in *Dkk1*$^{+/-}$ (bzw. *Dkk1*$^{+/+}$) und *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen. Die βGal-Aktivität zeigt ein verändertes Muster. **B) + E)** Die *Bmp4*-Expression ist nach medial veschoben. **C) + F)** *Fgf8* ist nicht ektopisch induziert.

3.10.2 Analyse der Induktion externer Genitalien in *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen

Die vorherigen Daten deuten an, dass der Phänotyp bereits vor dem Tag E12,5 induziert wurde. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des *Dkk1*-Ausfalls auf die Induktion des Genitaltuberkels untersucht. Zudem wurde diese mit der Expression in den Hintergliedmaßen verglichen, um Unterschiede der genetischen Zusammenhänge während der Gliedmaßenentwicklung darzulegen. Da die *Shh*-Expression für die Induktion des Genitaltuberkels essentiell ist, wurde zunächst das Expressionsmuster dieses Genes untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp ist die anteriore Expressionsgrenze, ähnlich wie die proximale in den Hintergliedmaßen verändert (Abb. 27A, B). Die *Bmp4*-Expression erscheint im Gegensatz zum Wildtyp in diesem Zeitraum diffus (Abb. 27C, D). Wie oben bereits dargelegt, ist in den Gliedmaßenknospen die zusätzliche anteriore *Shh*-Expression nicht hinreichend, eine *Dkk1*-Expression zu induzieren. Ob *Shh* für die *Dkk1*-Expression benötigt wird, wurde durch die Expression von *Dkk1* in *Shh*$^{-/-}$-Embryonen untersucht. Im Gegensatz zur der *Dkk1*-Expression in dem distalen Ende des Schwanzes, ist in *Shh*$^{-/-}$-Embryonen die *Dkk1*-Expression innerhalb des Urogenitalsinus nicht existent (Abb. 27E, F). Des Weiteren ist die *Dkk1*-Expression in den Gliedmaßenanlagen verlagert. *Shh* wird demnach in dem Urogenitalsinus für die *Dkk1*-Expression benötigt. Da in den Gliedmaßen die *Dkk1*-Expression mit der Expression von *Bmp4* zusammenhängt, wurde untersucht, ob

der Verlust der *Dkk1*-Expression in den Genitaltuberkeln von *Shh*$^{-/-}$-Embryonen auf dem Fehlen der *Bmp4*-Expression basiert. Wie in Abb. 26H gezeigt, ist in dem Urogenitalsinus der *Shh*$^{-/-}$-Mäuse, ähnlich dem Wildtyp die *Bmp4*-Expression erhalten geblieben (Abb. 27G). Diese Analyse deuten demnach an, dass Bmp4 in der Hierarchie oberhalb von Shh liegt, aber nicht in der Lage ist, die *Dkk1*-Expression zu induzieren.

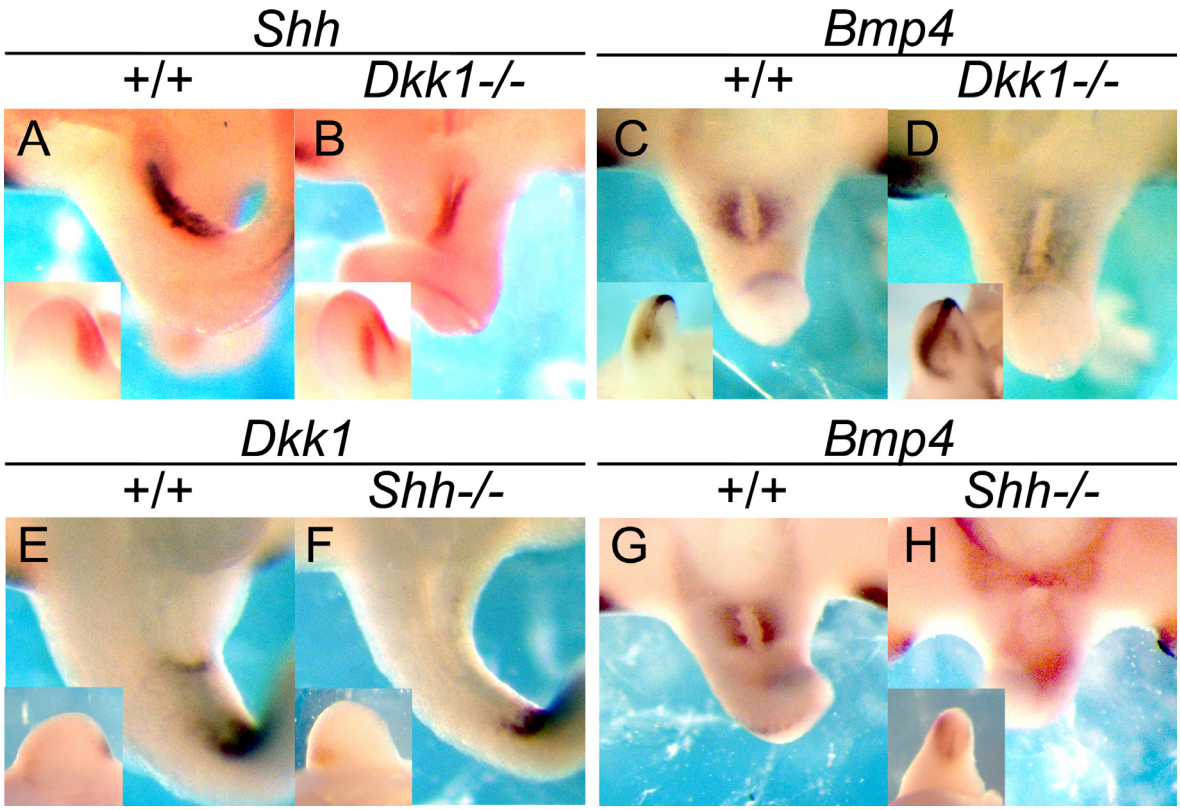


Abb. 27: Zusammenhang zwischen *Dkk1*, *Shh* und *Bmp4* während der Genitaltuberkelentwicklung. Urogenitalsinus unterschiedlicher Genotypen am Tag E10,5. (**A)**, **C)**, **E)**, **G)**) Expression in wildtypischen Genitaltuberkeln. Vergrößerungen zeigen die Expressionen in den Hintergliedmaßen. **B)**, **D)** *Shh*-und *Bmp4*-Expression in dem Genitaltuberkel von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen. **F)**, **H)** *Dkk1*- und *Bmp4*- im *Shh*$^{-/-}$-Hintergrund.

3.10.3 Analyse der *Dkk1*-Funktion während der Nierenentwicklung

Wie in Abb. 26 gezeigt ist, konnte das *Dkk1*-Expressionsmuster während der Metanephros-Entwicklung erweitert werden. Aus diesem Grund wurden die Nierenanlagen von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen untersucht. Mit einer geringen Frequenz können in dem posterioren Bereich der Nierenanlagen mediale Fusionen detektiert werden (Abb. 28A, B). Zudem sind die Metanephri in ihrer Größe deutlich reduziert. Dementsprechend ist die dorsale Aorta nicht medial zwischen den beiden Metanephrii lokalisiert, sondern umgibt die Metanephri. Des Weiteren deutet das veränderte Reportermuster auf eine fehlerhafte Musterbildung hin. Da *Dkk1* häufig mit *Bmp4* koexprimiert wird, wurde zunächst der Einfluss des *Dkk1*-Verlustes

auf die *Bmp4*-Expression untersucht. In den anterioren Domänen des Metanephros von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen kann im Vergleich zum wildtypischen Metanephros keine Veränderung der *Bmp4*-Expression detektiert werden (Abb. 28C, D). Posterior erscheint im Vergleich dazu das Muster der *Bmp4*-Expression in *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen verändert zu sein (Abb. 28E, F). Weiterhin wurde innerhalb des posterioren Metanephros die Expression von *Fgf8* untersucht. In den posterioren Domänen erscheint auch das Muster der *Fgf8*-Expression verändert zu sein (Abb. 28G, H). Diese initialen Untersuchungen deuten an, dass *Dkk1* bei der Musterbildung der Nierenanlagen involviert ist, da sowohl Bmp4, als auch Fgf8 ektopisch exprimiert werden, Faktoren, die in der Musterbildung der Nieren eine Rolle spielen.

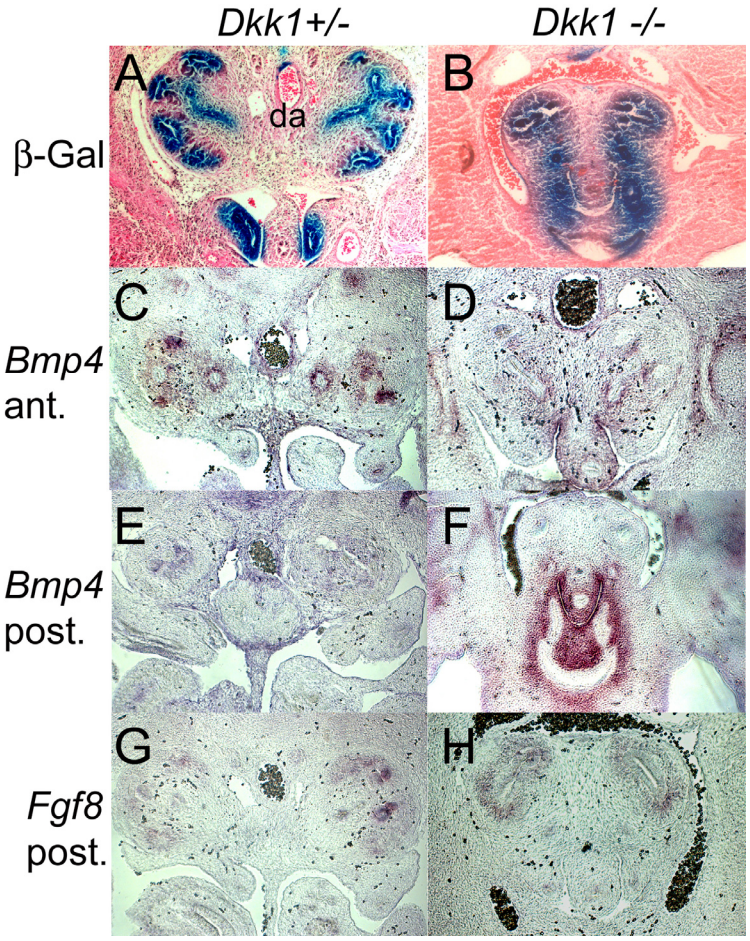


Abb. 28: Analyse der *Dkk1*-Funktion während der Nierenentwicklung. Querschnitte durch die Metanephros-Anlagen Linke Seite: *Dkk1*$^{+/-}$- (oder *Dkk1*$^{+/+}$) Metanephri. Rechte Seite: *Dkk1*$^{-/-}$-Metanephri. **A)**, Distinktes Aktivitätsmuster in der Nierenanlage. Beide Anlagen sind durch die dorsale Aorta (da) getrennt. **B)** In Dkk1$^{-/-}$-Embryonen sind die beiden Hälften miteinander fusioniert. Die *Bmp4*-Expression in dem anterioren Metanephros ist unverändert (**C)** und **D)**) und weist im posterioren Bereich ein verändertes Muster auf (vgl. **E)** mit **F)**). In diesem Bereich ist die *Fgf8*-Expression in *Dkk1*$^{-/-}$ Embryonen ebenfalls verändert (vgl. **G)** mit **H)**).

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die *Dkk1*-Regulation während der Organogenese sind hauptsächlich vier von neun identifizierten CNEs, CNE 25, 114, 190 und 195 von Relevanz. Mit diesen CNEs wurde eine transgene Mauslinie generiert, durch die ein Großteil der *Dkk1*-Regulation während der Entwicklung sichtbar gemacht werden kann. Des Weiteren wurden die regulatorischen

Charakteristika der vier CNEs untersucht. Für die *Dkk1*-Regulation in der Nierenanlage und dorsalen Gehirnarealen ergab sich eine regulatorische Redundanz dieser CNEs. Weiterhin sind die CNEs 190 und 195 zusammen sowohl nötig, als auch hinreichend für die *Dkk1*-Aktivierung in den Innenohranlagen, dem Infundibulum der Hypophyse und der externen Genitalplakode. CNE 114 ist alleine für die *Dkk1*-Expression in distinkten kraniofaszialen Domänen, mit Ausnahme des vomeronasalen Organes, hinreichend. Für die Reporteraktivierung in den Augenanlagen, sowie der AER und dem posterioren Mesenchym der Gliedmaßenknospen ist das CNE 195 sowohl nötig als auch hinreichend. Innerhalb dieses Gewebes ist das CNE 195 alleine hinreichend, eine Aktivierung hervorzurufen. Die Aktivierung wird über eine konservierte TCF/LEF-Bindestelle innerhalb des CNEs vermittelt, an welche Lef1 direkt bindet.

50% der *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen weisen eine Haploinsuffizienz während der Augenentwicklung auf, die mit der Etablierung drastischer Phänotypen assoziiert ist. Diese reichen von leichten Mikrophthalmien, bis hin zu Anophthalmien. Die Manifestierung dieser Phänotypen hängt mit einer Verringerung der Dkk1-Dosis zusammen, die eine Veränderung der Augen-Musterbildung bewirken. Dies ist dadurch begründet, dass sich eine Verringerung der Dkk1-Dosis auf die Aufrechterhaltung des kanonischen Wnt-Signalweges auswirkt, die essentielle Funktionen während der Augenentwicklung besitzen. Durch die transgene Mauslinie konnten zusätzliche *Dkk1*-Expressionsdomänen innerhalb unterschiedlicher Organe während der posterioren Entwicklung identifiziert werden. Zu diesen gehören u.a. die Nierenanlage und die Anlage der externen Genitalien. In *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen ist die Musterbildung des Genitaltuberkels beeinträchtigt, was durch eine veränderte *Bmp4*-Expressionen angezeigt wird. Diese basieren auf eine fehlerhafte Musterbildung während der Induktion des Genitaltuberkels, was durch veränderte *Shh* und *Bmp4*-Expressionsmuster angezeigt wird. Umgekehrt ist die Anwesenheit des *Shh*-Genes für die Expression von Dkk1 essentiell. Ohne diese ist *Bmp4* nicht in der Lage, eine *Dkk1*-Expression zu bewirken. Während der Nierenentwicklung zeigen *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen posteriore Fusionierungen auf. In diesen Bereichen ist sowohl die *Bmp4*, als auch die *Fgf8*-Expression verändert. Durch diese Untersuchungen deutet sich an, dass *Dkk1* in grundlegenden Mechanismen während der Urogenitalentwicklung involviert ist.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des differentiell exprimierten Wnt-Antagonisten Dkk1 während der Embryonalentwicklung analysiert. Hierbei konnten verschiedene regulatorische Charakteristika neu identifizierter, konservierter Enhancer offengelegt werden. Die Relevanz der distinkten *Dkk1*-Regulation äußert sich bei der Etablierung Augen-spezifischer *Dkk1*-Haploinsuffizienzen, die mit der Errichtung unterschiedlich starker Augendefekte assoziiert ist. Diesen Defekten liegt eine fehlerhafte Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg zugrunde, sodass eine direkte Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg angenommen werden kann. Zudem konnten zusätzliche *Dkk1*-Expressionsdomänen, z.B. innerhalb des Urogenitalsystems, der Hypophysenanlage und der Innenohranlage identifiziert werden. Die Funktion von *Dkk1* wurde während der Entwicklung des Urogenitalsystems untersucht.

4.1 Die Relevanz des *Dkk1*-Promotors für die gewebespezifische *Dkk1*-Regulation

Bei den Analysen der regulatorischen Fähigkeiten des *Dkk1*-Promotors konnte herausgefunden werden, dass ein 1,8 kb großes *Dkk1*-Promotorfragment nicht zu einer gewebespezifischen Aktivierung befähigt ist (Abb. 10). Der Befund deutet darauf hin, dass die zuvor analysierten TCF/Lef1-Bindestellen innerhalb des äquivalenten humanen *Dkk1*-Promotors nicht von Relevanz für die gewebespezifische *Dkk1*-Regulation sind. Eine begrenzt gewebespezifisch aktivierende Fähigkeit ist bereits für den *Sox9*-Promotor gezeigt worden (Bagheri-Fam et al., 2006). Um die Bedeutung des *Dkk1*-Promotors weitergehend zu analysieren, wurde dieser während der CNE-Analyse (siehe unten) durch den β-Globin-Minimalpromotor ersetzt. Hierbei ergaben sich im Vergleich zur *Dkk1*-Promotoraktivität in Kombination mit den CNEs z.T. unvollständige, schwächere Aktivitäten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass der eigenständig inaktive *Dkk1*-Promotor die CNE vermittelte Aktivierung steigert. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass der *Dkk1*-Promotor während anderer Entwicklungszeitpunkte regulatorische Fähigkeiten besitzt.

4.2 Identifizierung unterschiedlicher CNEs

Bei der Suche nach regulatorischen Elementen konnten neun CNEs im 3'-Bereich des *Dkk1*-Lokus nachgewiesen werden (Abb. 9). Vergleiche der CNEs untereinander ergeben, dass diese Sequenzen im Laufe der Evolution unterschiedlich stark konserviert worden sind. Zudem bestehen weder Sequenzhomologien untereinander, noch zu anderen Sequenzen (nicht gezeigt), sodass davon auszugehen ist, dass diese Regulatoren unabhängig voneinander entstanden sind. Da CNEs häufig von regulatorischer Relevanz für entwicklungsbiologisch exprimierte Gene sind, wurde der Einfluss der identifizierten CNEs auf das bakterielle *lacZ*-Gen in transgenen Embryonen untersucht. Die Analyse aller CNEs in transient exprimierenden transgenen Mäuse zusammen ergab neben bekannten *Dkk1*-Expressionsdomänen artifizielle Aktivitätsdomänen (Abb. 12). Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen vorheriger Studien, in denen ebenfalls gezeigt worden ist, dass CNEs nicht immer als Enhancer fungieren, sondern häufig Silencer darstellen, sterische Funktionen einnehmen, bzw. zu einer unspezifischen Aktivierung führen können (Bagheri-Fam et al., 2006). Durch den Test weiterer Konstrukte konnte dargelegt werden, dass für die *Dkk1*-Regulation hauptsächlich vier der CNEs, CNE 25, 114, 190 und 195 von regulatorischer Relevanz sind. Durch die Generierung einer transgenen Mauslinie wurde die Dynamik der aktivierenden Eigenschaften dieser Kombination untersucht und mit dem endogenen *Dkk1*-Expressionsmuster verglichen. Hierdurch ergab sich, dass diese CNEs zusammen während der gesamten Entwicklung ein Reportermuster verursachen, dessen Dynamik der *Dkk1*-Expression sehr ähnlich ist (Abb. 13 und Abb. 14). Diese CNEs machen demnach eine Visualisierungen der endogenen *Dkk1*-Regulation möglich.

4.3 Regulatorische Redundanz der CNEs

Durch weiter eingrenzende Konstrukte wurden die aktivierenden Fähigkeiten der einzelnen CNEs untersucht. In Arealen des Gehirnes und des Metanephros besitzen alle CNEs eine aktivierende Fähigkeit (Abb. 18), wodurch sich in diesen Geweben eine regulatorische Redundanz annehmen lässt. Demnach wird in diesen Geweben die *Dkk1*-Expression unabhängig durch mehrere Enhancer sichergestellt. Eine Redundanz regulatorisch fungierender Sequenzen ist bereits durch vorherige Analysen gezeigt worden (Bagheri-Fam et al., 2006; Cretekos et al., 2008). Aufgrund der regulatorischen Redundanz von CNEs wird angenommen, dass Deletionen von CNEs zu lebensfähigen Mäusen ohne offensichtliche Phänotypen führen können (Ahituv et al., 2007). Dieser Befund könnte

erklären, dass *doubleridge*-defiziente Embryonen einen im Vergleich zu *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen relativ milden Phänotyp aufweisen (siehe unten).

4.4 Die *Dkk1*-Regulation *doubleridge* assoziierter CNEs

In *doubleridge* defizienten Embryonen ist die *Dkk1*-Expression in der Kopfanlage, den Gliedmaßenknospen und der Spitze des Schwanzes drastisch reduziert. Diese Verminderung des Dkk1-Signals führt zur Polydaktylie der Vordergliedmaßen (Adamska et al., 2003; McDonald et al., 2004). Eine weitere Reduktion des Dkk1-Maßes durch eine Kombination mit einem *Dkk1*$^{+/-}$-Allel führt zu stärkeren Phänotypen, wie Anopththalmie, Hydrozephalie und hypoplastischen nasalen Kopfstrukturen. Deshalb wird vermutet, dass die durch Dkk1 bewerkstelligte Wnt-Inhibition während der Entwicklung dieser Organe in einer Dkk1-Dosis-Abhängigkeit verläuft. In dieser Arbeit wurden erstmalig vier regulatorische Sequenzen identifiziert, die innerhalb der *doubleridge*-Region lokalisiert sind und eine Reporteraktivierung u.a. in den Gliedmaßenanlagen und den Augenenanlagen vermitteln, Anlagen, die bei der *doubleridge*-Deletion betroffen sind. In beiden Geweben ist das CNE 195 alleine hinreichend, eine Reporteraktivierung zu bewirken. Weiterhin fungieren CNE 190 und CNE 195 kombinatorisch aktivierend in der Hypophysenanlage, der Innenohranlage und der Anlage externer Genitalanlagen. In diesen Geweben sind die Defekte in *doubleridge*-defizienten Embryonen nicht im Detail untersucht worden. Da eine defekte Hypophysenentwicklung zu Hydrozephalie führen kann (Picketts, 2007), könnte die Eliminierung der Hypophysenregulatoren die Ursache des Gehirnphänotyps in *doubleridge*-defizienten Embryonen sein.

Da die CNEs 190 und 195 in Wirbeltiergenomen durch eine isolierende Sequenz von lediglich ca. 4 kb voneinander getrennt sind, läßt sich vermuten, dass diese CNEs als regulatorische Einheit fungieren. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass der beobachtete *doubleridge*-defiziente Phänotyp in einem Verlust von *doubleridge*-assoziierten CNEs begründet liegt.

4.5 Die *Dkk1*-Regulation während der Gliedmaßenentwicklung

Im Gegensatz zu der AER-spezifischen Reporter-Aktivierung, wird die *Dkk1*-Expression in den interdigitalen Domänen nicht durch die identifizierten CNEs vermittelt (Abb. 15). Grundsätzlich könnte dies bedeuten, dass zusätzliche regulatorische Sequenzen existieren, die aufgrund der Distanz zum *Dkk1*-Lokus nicht erfasst worden sind. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass der Regulator für die interdigitale Expression während der

Mausentwicklung eine Besonderheit darstellt oder evolutiv nicht stark konserviert ist. Letzteres kann auch angenommen werden, da die Regulation der Extremitäten-Entwicklung von Vertebraten durch Anpassung an unterschiedlichste Lebensbedingungen stark variiert (Stopper und Wagner, 2005). Beispielsweise steuern sowohl in Hühnern als auch in Mäusen *Bmp*-Gene die Apoptose im interdigitalen Mesenchym, was zu der Etablierung unabhängiger Zehen führt (Macias et al., 1997, Guha et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird in Enten-Embryonen das apoptotische Programm inhibiert, was zu der Etablierung von Schwimmhäuten führt (Weatherbee et al., 2006). Da Bmp4 bei der Induktion des programmierten Zelltodes *Dkk1* aktiviert (Grotewold und Rüther, 2002), kann demnach davon ausgegangen werden, dass Spezies-spezifische Unterschiede der *Dkk1*-Regulation zwischen höheren Vertebraten existieren. Die extreme genetische Variabilität währen der Induktion des Zelltodes wird auch dadurch ersichtlich, dass bei den zu den Säugetieren gehörenden Fledermäusen die Induktion des interdigitalen Zelltodes durch eine Modifikation des Bmp-Signalweges durch den Bmp-Inhibitor Gremlin die Induktion des Zelltodes inhibiert wird. Auf dieser Grundlage basierend wird angenommen, dass Fledermäuse im Laufe der Evolution ihre Flugfähigkeit erlangt haben (Weatherbee et al., 2006). Weiterhin konnte 2008 von Cretekos et al. gezeigt werden, dass Unterschiede innerhalb der Sequenzen von Enhancern direkt mit morphologischen Veränderungen zusammenhängen, da der identifizierte Fledermaus-Enhancer in transgenen Mäusen zu der Entwicklung verlängerter Knochen führt.

Alternativ könnte die interdigitale *Dkk1*-Expression durch andere regulatorische Mechanismen bewirkt werden. Hierfür kommen, wie einleitend erläutert, eine Vielzahl von Möglichkeiten in Frage.

Die Aktivitätsdomäne im posterioren Mesenchym der Gliedmaßenknospe ähnelt der *Shh*-Expression in der ZPA (Abb. 16). Weiterhin ist die Dynamik der Reporter-Aktivität in dieser Domäne der eines zuvor identifizierten *Shh*-Enhancers sehr ähnlich (vgl. Lettice et al., 2003). Aus diesem Grund ergab sich die Vermutung, dass *Shh* einen direkten Einfluss auf die Reporteraktivierung nehmen könnte. Wie Kreuzungen der transgenen Linie in den *Hx*/+-Hintergrund ergaben, führt die Generierung einer zusätzlichen anterioren *Shh*-Domäne nicht zu einer ektopischen anterioren Reporteraktivität. *Shh* ist demnach alleine nicht hinreichend, eine *Dkk1*-Aktivierung zu verursachen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen, bei denen Shh-Proteinkügelchen in die Extremitätenknospen von Hühnerembryonen transplantiert wurden. Auch hier zeigte sich, dass Shh alleine nicht hinreichend ist, eine Induktion der *Dkk1*-Expression zu verursachen

(Grotewold und Rüther, 2002). Zudem ergab der Vergleich der beiden Enhancer-Sequenzen keinerlei Übereinstimmungnen (eigene Beobachtung), sodass sich vermuten lässt, dass die Aktivitäten der beiden Enhancer unabhängig voneinander dasselbe Muster ergeben.

4.6 Kraniofasziale *Dkk1*-Regulation

Die generierte Mauslinie reflektiert die Regulation der *Dkk1*-Expression in einer Vielzahl von Geweben, wie z.B. dem ersten Kiemenbogen und deren Derivaten. Bei der weiteren Analyse ergab sich, dass in den Derivaten die *Dkk1*-Regulation durch unterschiedliche Regulatoren bewerkstelligt wird. Im maxillaren, mandibularen, Zungen- und dem Schnurrhaar-Mesenchym ist das CNE 114 alleine hinreichend, um eine Reporteraktivierung zu induzieren (Abb. 18D). Interessanterweise ist dieses CNE nicht bei der Aktivierung in Derivaten des Zahn-Mesenchyms und der mesenchymalen Domäne des vomeronasalen Organes involviert (Daten nicht gezeigt). Innerhalb des sich entwickelnden Zahn-Mesenchyms konnte eine Reporteraktivität identifiziert werden, wenn mindestens die CNEs 190 und 195 vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). In dieser Domäne kann demnach ebenfalls eine regulatorische Kombination angenommen werden. *Doubleridge*-defiziente Embryonen entwickeln nasale Missbildungen (Adamska et al., 2003; McDonald et al., 2004). Interessanterweise ist ausschließlich der kraniofasziale Regulator des vomeronasalen Organes in der *doubleridge*-Region lokalisiert (Abb. 17). Falls die in der *doubleridge*-Region lokalisierten CNEs hinreichend für die *Dkk1*-Regulation in den Domänen sein sollten, müssten über diese eine transgene *Dkk1*-Expression in einem *doubleridge*-defizienten Hintergrund zu einer Aufhebung der Phänotypen führen. Bei der Analyse der *Fg8*-Regulation konnte bereits gezeigt werden, dass die Regulator-vermittelte Expression von *Fgf8* in transgenen Embryonen im *Fgf8*-defizienten Hintergrund die frühe Lethalität aufheben kann (Beermann et al., 2006). Durch diese Zusammenhänge deutet sich auch an, dass mit zunehmender Entwicklung eine Zunahme der Komplexität der *Dkk1*-Regulation in den sich entwickelnden Derivaten des ersten Kiemenbogens verknüpft ist.

4.7 Die direkte *Dkk1*-Regulation während der Augenentwicklung

Die Mauslinie ist u.a. durch eine Reporteraktivität in den Augenanlagen charakterisiert, die während der Entwicklung identisch zur *Dkk1*-Expression verläuft (Abb. 14). Da das CNE 195 alleine hinreichend für eine Reporteraktivierung in den Augenanlagen ist (Abb. 18), wurde die direkte Aktivierung der *Dkk1*-Transkription untersucht. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass die Lef1-Bindestelle während der Augenentwicklung direkt von Lef1 angesteuert wird, wodurch ein direkter Wnt-Rückkopplungsmechnismus angenommen werden kann (Abb. 19). Lef1 bindet an die kleine Furche der DNA und verursacht sterische Konformationsänderungen der DNA, wodurch der entsprechende Lokus für weitere Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht wird (Love et al., 1995). Da weder die konservierten Lef1-Bindestellen innerhalb des Sequenz-Kontextes anderer CNEs, noch die innerhalb des *Dkk1*-Promotors eine Augenregulation bewirken, lässt sich annehmen, dass weitere Transkriptionsfaktoren bei der trans-Aktivierung des CNE 195 während der Augenentwicklung eine Rolle spielen. Bei der Betrachtung der Sequenz des CNE 195 ist auffällig, dass konservierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen für wichtige Augen-Regulatoren, wie Pax6 und Pax2/5/8 angrenzend an die Lef1-Bindestelle lokalisiert sind (Abb. 19G). Da die Kombination der Lef1-Bindestelle mit augenspezifischen Regulatoren einzigartig für das CNE 195 ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese Faktoren zusammen die Augen-spezifische *Dkk1*-Expression ermöglichen. Für die *Dkk1*-Regulation im Allgemeinen könnte dies bedeuten, dass die CNE vermittelte *Dkk1*-Regulation grundsätzlich vom kanonischen Wnt-Signalweg angesteuert und für gewebespezifische Faktoren zugänglich gemacht wird.

4.8 Dkk1 und die Wechselwirkung mit dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Augenentwicklung

Während der Augenentwicklung weisen unterschiedliche *Wnt*-Gene ein z.T. mit *Dkk1* überlappendes, dynamisches Expressionsmuster auf (Liu et al., 2003; Fokina et al., 2006; Liu et al., 2006; eigene Beobachtung). Durch die Analyse der Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg konnte dargelegt werden, dass deren lokale Wechselwirkung für die Aufrechterhaltung der Augenentwicklung benötigt wird (Abb. 29). Eine Reduktion Dkk1-Aktivität führt zu einer diffusen retinalen Aktivierung der *Dkk1*-Expression (Abb. 29; vgl. Abb. 22). Da Lef1 direkt an das CNE195 bindet, deutet

sich an, dass der kanonische Wnt-Signalweg direkt während der Vermittlung der *Dkk1*-Aktivierung involviert ist. In betroffenen heterozygoten *Dkk1*-Embryonen resultiert im weiteren Verlauf eine Reduktion der Wnt-Signalwegkomponente GSK3β. Damit einher geht ein Verlust von pGSK3β, welches für die Vermittlung der *Dkk1*-Aktivierung benötigt wird. Die Verminderung bzw. der Verlust der *Dkk1*-Expression verläuft proportional zu der Stärke der beobachteten Augenfehlbildungen, sodass davon auszugehen ist, dass Dkk1 in einer Dosis-Abhängigkeit fungiert (Abb. 29D). Die endogene Dkk1-Dosis wird auch für die Linseninduktion benötigt, da die betroffenen Embryonen defekte Linsenanlagen aufweisen (Abb. 21).

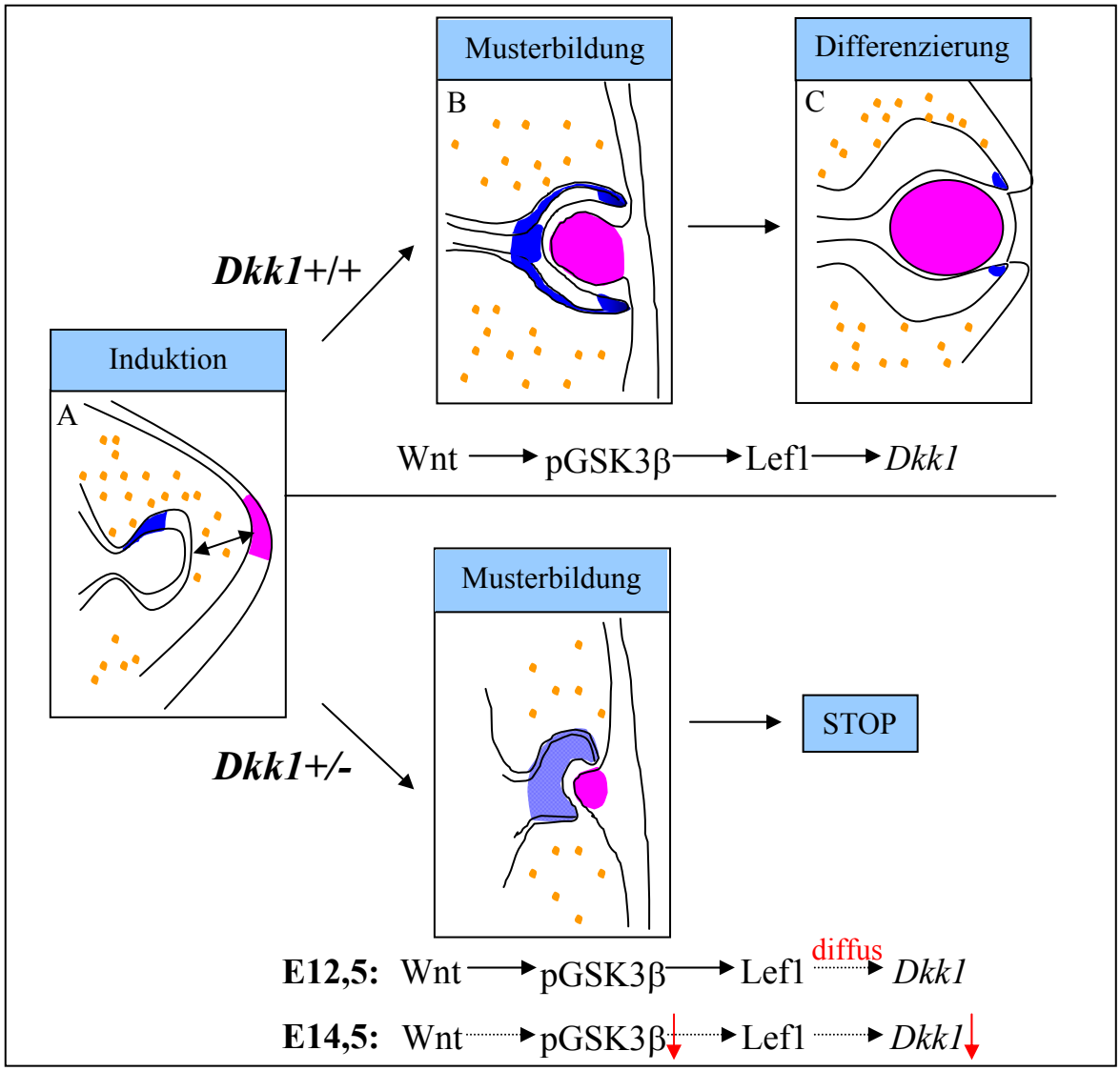


Abb. 29: Modell: Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Augenentwicklung. Schematischer Querschnitt durch die Augenanlagen. Blau: *Dkk1*-Expression; rosa: Linsenektoderm; orange: Kopfmesenchym. **A)** Die Induktion der Augenanlagen. Der Augenbecher interagiert mit dem Oberflächenektoderm, um die Linse zu induzieren. *Dkk1* wird dorsal exprimiert. *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen sind zu diesem Zeitpunkt unbeeinträchtigt. **B)** Während der Musterbildung wird *Dkk1* anterior und zentral exprimiert und bewirkt eine lokale Begrenzung des kanonischen Wnt-Signalweges. Die Interaktion führt im weiteren Verlauf zu einer anterior begrenzten *Dkk1*-Expression (**C**)). **D)** Eine Reduktion von *Dkk1* führt zu einer diffusen Dkk1/Wnt-Wechselwirkung, die zum Arrest der Augen-Entwicklung führt.

Während der späten Gastrulation wird die lokale Inhibition des Wnt-Signales u.a. dafür benötigt, um die Identität der frühen Augenanlagen in der anterioren neuralen Platte aufrecht zu erhalten (Heisenberg et al., 2001; Houart et al., 2002). Für Zebrafisch-Embryonen ist bereits gezeigt worden, dass eine Reduktion von Dkk1 zu einer Dosis-abhängigen Reprimierung der Augenanlagen und des Telenzephalons führt (Caneparo et al., 2007). Weiterhin stellt Dkk1 die Expression spezifischer *sFrps* in der anterioren neuralen Grenze sicher (Caneparo et al., 2007). Auch ein Ausfall von *sFrps* führt zu einer starken Beeinträchtigung der Augenentwicklung, die mit Anophthalmie verknüpft ist (Rasmussen et al., 2001). Im Gegensatz dazu bewirkt ein konstitutiv aktiver Frz-Rezeptor die Induktion zusätzlicher Augen.

Die Inhibition früher Wnt-Signale ist auch mit einer Errichtung des planaren Zellpolaritätsweges (PCP) assoziiert, der für die Polarisierung der Augenanlagen benötigt wird (Lee et al., 2006; Maurus et al., 2005; Moore et al., 2004). Dies könnte bedeuten, dass eine geringfügige Verminderung von Dkk1 sich nicht nur auf den kanonischen Wnt-Signalweg auswirkt, sondern auch den PCP-Signalweg beeinträchtigt. Während der Gastrulation beispielsweise führt Dkk1 zu einer Aktivierung des Wnt/PCP-Signalweges durch die Interaktion mit *Knypek* (Caneparo et al., 2007). Ein Defekt in der Zell-Polarisierung innerhalb der Retina deutet sich bei der Betrachtung der Morphologie und dem Muster der Reporteraktivität in beeinträchtigten Augenanlagen an (Abb. 21D´), und könnte auf einem Defekt während der Errichtung der Polarisierung beruhen. Die Polarisierung der Retina hängt mit der Errichtung unterschiedlicher Retina-Schichten zusammen, die unterschiedliche Neuronentypen beinhalten. Die Vertebraten-Retina bestehen aus drei unterschiedlichen Schichten, die sechs Neuronen-Typen, sowie Müller-Glia-Zellen beinhaltet: die retinale Ganglien-Zellschicht; horizontale, amakrine, bipolare, und Müller-Glia-Zellen in der inneren nuklearen Zellschicht und Stäbchen und Zapfen-Photorezeptoren in der äußeren nuklearen Zellschicht (Harada et al., 2007). Alle diese Neuronen gehen aus der ursprünglichen inneren Zellschicht hervor, wobei diese zunächst proliferieren und durch entsprechende Signale ihr Zellschicksal erlangen, differenzieren und ihre Positionen und Funktionen erlangen. Erste Analysen deuten bereits auf eine Reduktion der Proliferation in defekten Augenanlagen von *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen hin (Daten nicht gezeigt). In Folgeexperimenten wäre demnach auch zu untersuchen, wie sich die Dkk1-Reduktion auf die Etablierung der unterschiedlichen Schichten auswirkt.

4.9 Ausblick I: Die Funktion von *Dkk1* während der Augenentwicklung

Wie oben dargestellt, konnte in dieser Arbeit die Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Augenentwicklung dargelegt werden. Wie sich die Störung bei der Fehlentwicklung während der *Dkk1*-Haploinsuffizienz auf weitere Entwicklungsprozesse auswirkt, ist bisher nicht analysiert worden. Zu Beginn der Augeninduktion werden Augenfeld-Transkriptionsfaktoren (*EFTFs*) in einer Domäne innerhalb der anterioren neuralen Platte exprimiert. In vielen Spezies wird die *EFTF*-Expressionsdomäne durch das Shh-Signal, welches von der prächordalen Platte sekretiert wird, in zwei Domänen aufgespalten (Ekker et al., 1995; Li et al., 1997; Marti et al., 1995 Shimamura et al., 1995). Dies führt zu der Bildung von zwei symmetrischen Augen-Primordien (Chow und Lang, 2001; Li et al., 1997). Da Shh während der Separierung der Augenfelder involviert ist, resultiert in vielen Organismen, in denen Shh fehlt, eine Zyklopädie (Roessler et al., 1996; Chiang el al., 1996). Bei der weiteren Augeninduktion kooperiert *Fgf8* zusammen mit *Bmp4* und *Shh* (Crossley et al., 2001). Zudem fungiert *Fgf8* während der Initiation der retinalen Differenzierung sowohl in Hühnern, als auch in Fisch-Embryonen durch ein Spezies-spezifisches *Fgf*-Signalzentrum als ein Mediator von Shh-Signalen (Crossley et al., 1995). Die gemeinsame Aktivität von *Fgf8* und *Fgf3* ist sowohl nötig als auch hinreichend, um unabhängig vom optischen Nerven eine retinale Differenzierung zu koordinieren (Martinez-Morales et al., 2005). *Dkk1* wird innerhalb des optischen Nervs und in der dorsalen Retina mit *Fgf8* und *Bmp4* koexprimiert (eigene Beobachtung), wodurch sich eine Wechselwirkung zwischen *Dkk1* und den genannten Genen andeutet.

Da vielfach gezeigt werden konnte, dass die Interaktion der sich entwickelnden Retina mit der Linsenanlage für die korrekte Augenentwicklung benötigt wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Ursache des Phänotyps auch in einer defekten Interaktion zwischen der Retina und der Linse begründet liegen könnte. Z.Z. ist jedoch unbekannt, welche Gene oder Entwicklungsvorgänge von der exakten Dkk1/Wnt-Wechselwirkung abhängig sind. An der Spitze der Hierarchie der Linsenentwicklung steht das *Pax6*-Gen, dessen Expression für eine Vielzahl von ablaufenden Prozessen benötigt wird (Lang, 2004). Entgegengesetzt führt eine überschüssige *Pax6*-Aktivität zu ektopischen Augenanlagen (Halder et al., 1995). In der Signalkaskade unterhalb des *Pax6*-Genes liegen *FoxE3*, *Sox2*, *Mab21*/1, *Six3* und *Prox1* (Lang, 2004), Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls für die *Dkk1*-Regulation in Frage kämen. *Bmp7* wird in dem Vorläufer Linsen-Ektoderm exprimiert,

sowie dem Pigmentepithel und dem dorsalen optischen Vesikel und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Linseninduktion (Wawersik et al., 1999). Die *Bmp7*-Expression stoppt am Tag E11,5 der Mausentwicklung in diesen Geweben, einem Zeitpunkt, an dem sich der Augenphänotp in *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen etabliert. Möglicherweise findet eine Interaktion zwischen beiden Genen statt. Diese Hypothese wird auch dadurch verstärkt, dass die Deletion des *Bmp7*-Genes zur variablen Augen-Entwicklung führt, die mit der Etablierung von Mikrophthalmia und Anophthalmien zusammen hängt (Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995).

4.9.1 Die Einordnung der *Dkk1*-Haploinsuffizienz in bekannte Augenfehlbildungen

Die *Dkk1*-Haploinsufizienz verursacht in ca. 50% der Embryonen variierende Phänotypen während der Augenentwicklung, die von anterioren Augenmissbildungen und Mikrophthalmien bis Anophthalmien reichen, wobei entweder eines oder beide Augen betroffen sind. Haploinsuffizienzen, die zu der Etablierung varriierender Augen-Phänotypen führen, sind für eine Vielzahl von Genen nachgewiesen worden. Beispielsweise weisen *Bmp4*$^{+/-}$-Embryonen Augeninsuffizienzen auf, die zu einer anterioren Segment-Dysgenie führen (Chang, et al., 2001). Da in anderen Kontexten eine Wechselwirkung zwischen *Dkk1* und *Bmp4* nachgewiesen werden konnte (Grotewold und Rüther, 2002), wäre zu prüfen, ob eine Interaktion auch während der Entwicklung von Augenanlagen von Relevanz ist. Ähnlich wie für *Bmp4* konnte für *Pax6*, das für die Augeninduktion benötigt wird, gezeigt werden, dass die Inaktivierung eines *Pax6*-Allels hinreichend für die Induktion von Mikrophthalmien ist (Davis-Silberman et al., 2005; Hanson et al., 1994). Für die Expression des *Pax6*-Genes während der Augenentwicklung sind verschiedene Regulatoren verantwortlich (Aota et al., 2003, Zhang et al., 2003). Hierbei bewerkstelligen unterschiedliche Enhancer die Expression in den einzelnen Domänen des Auges, durch deren Deletion eine Reduktion der *Pax6*-Expression und unterschiedliche Augenphänotypen resultieren (Dimanlig et al., 2001; Kleinjan et al., 2006). Weiterhin interagiert *Pax6* mit *Mitf*, das bei der Etablierung des retinalen Pigmentepithels involviert ist und *Pax6* transkriptionell inhibiert (Planque et al., 2001). Auch ein Verlust des *Mitf*-Genes führt durch eine Transformation des Pigmentepithels in retinales Gewebe zur Mikrophthalmie (Hallsoson, et al., 2004). Mutante Zellen in dieser Region hyperproliferieren und exprimieren neuroretinale Markergene (Nguyen und Arnheiter, 2000). Das *Otx2*-Gen wird ebenfalls innerhalb des retinalen Pigmentepithels

exprimiert und wird für die Etablierung dieses Gewebes benötigt (Mertinez-Morales et al., 2003). Da die defekten Augenanlagen in *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen von einer Überpigmentierung gekennzeichnet sind, wurde die Expression beider Gene analysiert. Es deutet sich an, dass die Expression von *Mitf* und *Otx2* in defekten *Dkk1*$^{+/-}$-Augenanlagen entsprechend den Überpigmentierungen verändert, jedoch nicht verloren gegangen sind (Daten nicht gezeigt). Weiterhin führt eine Reduktion des Shh-Signalvermittlers *Gli3* in *Pax6*$^{+/-}$-Embryonen zu einer Verstärkung des *Pax6*-Phänotyps, wodurch eine Wechselwirkung zwischen diesen Genen bei der Augenentwicklung angenommen wird (Zaki et al., 2006). Für die Transkriptionsfaktoren Sox2, Pax6, Otx2 konnte bereits gezeigt werden, dass sie gemeinsam *Rx* regulieren, dessen Ablation zum Verlust der gesamten Augenanlagen führt (Mathers, et al., 1997). Sox2, Pax6 und Otx2 regulieren *Rx* durch die Bindung und der physikalischen Interaktion an einen Enhancer, der ca. 2 kb 5' des *Rx*-Promotors lokalisiert ist (Danno et al., 2008). Da *Pax6* die Differenzierung von Astrozyten in der neuronalen Retina vermittelt (Sakurai und Osumi, 2008), und zudem zum Teil mit *Dkk1* koexprimiert wird, wäre zu untersuchen, ob eine Wechselwirkung dieser Gene mit *Dkk1* während der Augenentwicklung stattfindet.

4.9.2 Einfluss der *Dkk1*-Haploinsuffizienz auf humane Augen-Pathogenesen

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Reduktion der Dkk1-Aktivität zu einer starken Beeinträchtigung der Augenentwicklung während der Mausembryonalentwicklung führt. Gene, die während der Augenentwicklung von Mausembryonen eine Rolle spielen, wie z.B. *Pax6*, *Bmp4*, *Sox2*, sind meist auch bei angeborenen menschlichen Augenfehlbildungen involviert.

Die Reduktion von Pax6 führt zur Aniridia, einem Defekt, bei dem die Linsenentwicklung fehlgeschlagen ist *(*Sisodiya et al., 2001). Zudem reicht die Deletion eines 3'-Bereichs des *Pax6*-Genes bereits aus, um Störungen der Augenentwicklung hervorzurufen (Davis et al., 2008). Glaukom, eine weitere menschliche Augenmissbildung führt zur Blindheit, da retinale Ganglien-Zellen verloren gegangen sind und der optische Nerv degeneriert (Osborne et al., 1999). Zurzeit wird vermutet, dass *Bmp4* bei der menschlichen Fehlentwicklung involviert ist (Chang et al., 2001). Zudem ist bei der menschlichen okularen Kolobomata ein Komplexes genetisches Netzwerk bei der Etablierung der Phänotypen betroffen und führt zu einer Vielzahl von Defekten, wie Mikrophthalmie und Anophthalmie (Gregory-Evans et al., 2004).

Die während der Augenentwicklung stattfindende Wechselwirkung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg ermöglicht auch die Analyse von unterschiedlichen Augen-Pathogenesen, denen ein verändertes Gleichgewicht zwischen der Dkk1-Wnt-Wechselwirkung zugrunde liegen könnte. Hierdurch deutet sich an, dass im Fall der Augenregulation angeborene menschliche Augenkrankheiten existieren, die auf einem reduzierten Dkk1-Maß beruhen. Wie bei den Fehlbildungen der *Dkk1*$^{+/-}$-Embryonen tritt bei menschlichen Fehlbildungen die bilaterale Mikrophthalmie häufiger auf, als die unilaterale, wodurch sich beim Menschen ebenfalls eine Dosis-abhängigkeit während der Augenentwicklung andeutet (Shaw et al., 2005). Beispielsweise könnten Punktmutationen oder Deletionen innerhalb der *Dkk1*-kodierenden Region, bzw. CNE 195 eine reduzierte *Dkk1*-Expression bewirken, wodurch das Dkk1/Wnt-Gleichgewicht gestört ist. Für das *Pax6*-Gen konnte bereits die Relevanz einer nicht-kodierenden Region für die Augenentwicklung dargelegt werden, da hier ein Verlust derselben zur Aniridia führt (Elia et al., 2007). Die Entschlüsselung der direkten *Dkk1*-Regulation durch den kanonischen Wnt-Signalweg während der Augenentwicklung bietet auch neue Strategien für die Unterdrückung der defekten Augenentwicklung durch den gezielten Test unterschiedlicher Medikamente, die Dkk1 auf ein normales Niveau anheben und zu einer Reduktion des Phänotypes führen.

Grundsätzlich ist auch möglich, dass ein Zusammenhang zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Proliferation von retinalen Stammzellen besteht, da Dkk1 sehr charakteristisch in der retinalen ziliären Zone, auch in adulten Mäusen exprimiert wird. Die Reporteraktivierung der transgenen Mauslinie rekapituliert die *Dkk1*-Expression innerhalb der ziliären Zone, einer Domäne, in der die Proliferation und die Differenzierung retinaler Stammzellen stattfinden. Bei diesen Prozessen wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg in den ziliären Zonen Transdifferenzierung von der neuralen Retina reguliert (Liu et al., 2007). Z.B. wird vermutet, dass der kanonische Wnt-Signalweg in adulten Mäusen die Stammzell-Proliferation durch Wnt3a aufrecht erhält (Inoue et al., 2006). *Dkk1* wird in dieser Domäne mit *Wnt3a* koexprimiert (eigene Beobachtung). Da in dieser Arbeit eine Rückkopplung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Wnt-Signalweg identifiziert werden konnte, deutet sich an, dass Dkk1 direkt bei der Differenzierung neuronaler Stammzellen involviert ist. Eine weitere Studie hat bislang gezeigt, dass Dkk1 zusammen mit Noggin und IGF retinales Gewebe von humanen embryonalen Stammzellen induziert (Deepak et al., 2006). Zudem verursacht eine Behandlung kultivierter embryonaler Stammzellen mit rekombinantem Dkk1 eine Inhibition des Wnt-Signales und

die Expression neuraler Marker, wie *Nestin* und *Dlx2* (Verani et al., 2007). Die direkte Regulation von *Dkk1* durch Lef1 während der Augenentwicklung könnte somit für die Regulation eines distinkten Dkk1-Maßes wichtig sein, das für die Kontrolle von Differenzierungsprozessen während der retinalen Stammzellbildung essentiell sind.

4.10 Neu identifizierte *Dkk1*-Expressionsdomänen-und Funktionen

Durch die hohe Sensitivität der βGal-Färbung konnte eine Reportergen-Aktivität in Domänen identifiziert werden, in denen eine *Dkk1*-Expression während der Mausentwicklung bislang nicht oder fragmentarisch gezeigt worden ist. Hierzu zählen die sich entwickelnden externen Genitalien, die Nierenanlagen, die Hypophysenanlage und die Innenohranlagen. In dieser Studie sind die Funktionen von *Dkk1* in der Genitalentwicklung und der Nierenentwicklung untersucht worden.

4.10.1 Funktion von *Dkk1* während der Urogenitalentwicklung

Während der Entwicklung externer Genitalien weist *Dkk1* ein charakteristisches Expressionsmuster auf (Abb. 25). Um die Funktion von *Dkk1* während der Genitaltuberkelentwicklung zu analysieren, wurden $Dkk^{-/-}$-Embryonen analysiert (Abb. 26 und Abb. 27). In der frühen Phase resultiert bei einem Verlust von *Dkk1* ein verändertes *Shh*-Expressionsmuster (Abb. 27), einem Gen, dass für die Induktion des Genitaltuberkels essentiell ist (Perriton et al., 2002). Da die *Shh*-Expression während der Genitaltuberkelentwicklung mit *Bmp4* korreliert, ist die Expression dieses Genes ebenfalls verändert (Abb. 26 und Abb. 27). Dies legt eine Wechselwirkung zwischen *Dkk1* und *Bmp4* bzw. *Shh* während der Genitaltuberkel-Entwicklung nahe. Da in dem umliegenden Mesenchym Wnt5a die Proliferation steuert (Yamahguchi et al., 1999; Li et al., 2002), könnten die beobachteten Phänotypen auch mit einer defekten Wechselwirkung zum kanonischen Wnt-Signalweg verknüpft sein. CNEs 190 und 195 werden gemeinsam benötigt, um *Dkk1* in der Plakode der externen Genitalien zu aktivieren, wodurch auch die direkte Regulation von *Dkk1* während der Genitaltuberkelentwicklung untersucht werden könnte.

In dieser Arbeit ist zudem dargelegt worden, dass *Dkk1* bereits innerhalb des Pronephros exprimiert wird, wie für *Xenopus*-Embryonen gezeigt worden ist (Abb. 26; vgl. Monaghan et al., 1999). Auch in diesem Organ werden unterschiedliche kanonische *Wnt*-

Familienmitglieder charakteristisch exprimiert, deren Expressionen eine distinkte Aufspaltung der Nephrogenese in fetalen Nieren-Explantaten bewirken (Iglesias et al., 2007). Eine Exposition der Nieren-Explantate mit Dkk1 hingegen verursacht eine Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges. Hieraus resultiert eine Reduktion der urethrischen Verzweigung (Iglesias et al., 2007). Zudem ist *Dkk1* in *Lim1*-mutanten Nieren herunterreguliert (Potter et al., 2007), wodurch eine Lokalisation unterhalb von Lim1 angenommen werden kann.

Bei der Analyse der *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen ergaben sich zu einem geringen Anteil in defizienten Embryonen posteriore Fusionierungen der Nierenanlagen (Abb. 28). In den posterior fusionierten Nierenanlagen von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen ist die *Bmp4*-Expression innerhalb der Nieren verloren gegangen, wodurch eine Wechselwirkung zwischen *Dkk1* und *Bmp4* angenommen werden kann. Wie die *Bmp4*-Expression ist auch die *Fgf8*-Expression in den Nierenanlagen von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen verändert. Dies könnte auch die Ursache dafür sein, dass *Dkk1* mit Prostata-Krebs in Verbindung gebracht wird (Hall et al., 2008).

Fusionierte Nierenanlagen sind bereits für *Foxd1*$^{-/-}$-Embryonen beschrieben (Levinson et al., 2005). Wie für *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen geht mit der Fusionierung in diesen Mutanten eine fehlerhafte Musterbildung der urethrischen Verzweigung einher, wodurch die Nephrogenese fehlorganisiert ist. Dies hängt auch hier mit *Bmp4* zusammen, welches in den entsprechenden Geweben heterogen exprimiert wird.

Beim Menschen existieren angeborene Missbildungen der Nieren, die als „Hufeisennieren“ bezeichnet werden. Auch hier führt eine Verwachsung beider Nieren an den unteren Polen dazu, dass die Niere mit dem unteren, gemeinsamen Teil mit der Wirbelsäule assoziiert bleibt (Evans und Resnick, 1981). Welche entwicklungsbiologischen Prozesse genau zu diesem Befund führen, ist zurzeit nicht bekannt. Möglicherweise besteht aber ein Zusammenhang mit dem Verlust der *Dkk1*-Expression während der Nierenentwicklung.

4.10.2 Ausblick II: Unbekannte Funktionen von *Dkk1*

Weitere Expressionsdomänen sind im delaminierenden Ventrikel, das sich in den posterioren Bereich der sich entwickelnden Hypophyse ausdehnt identifiziert worden. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass Dkk1 direkt bei der Modifikation des Wnt-Signalweges während der Hypophysenentwicklung assoziiert sein könnte, da unterschiedliche *Wnt*-Gene, assoziierte Signalwegkomponenten und Antagonisten distinkte Expressionsmuster und dementsprechende Funktionen während der

Hypophysenentwicklung aufweisen (Potok et al., 2008; Brinkmeier et al., 2007; Ai et al., 2007). Zudem ist eine homologe *Dkk1*-Expression in der Hypophysenanlage von *Xenopus*-Embryonen beschrieben (Monaghan et al., 1999). Da die Entwicklung der Hypophyse auch einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung nimmt und entsprechende Defekte mit einer Hydrozephalie assoziiert sein können (Picketts, 2006), könnte auch der Hydrozephalie-Phänotyp von *doubleridge*-defizienten Embryonen an einer Reduktion des Dkk1-Maßes im Infundibulum der Hypophyse begründet liegt. Weiterhin konnten Aktivitätsdomänen innerhalb des Mesenzephalons, und des Rhombenzephalons identifiziert werden. Auch in diesen Bereichen besitzen unterschiedliche *Wnt*-Gene charakteristische Expressionsdomänen. Hier sind *Wnt*-Gene mit der neuronalen Proliferation involviert (Megason and McMahon, 2002). Neben diesen Bereichen konnte eine Reporter-Aktivität im dorsalen otischen Vesikel nachgewiesen werden, einer Domäne, in denen eine *Dkk1*-Expression in *Xenopus* beschrieben wurde (Monaghan et al., 1999). Eine Funktion von *Dkk1* ist auch innerhalb der Entwicklung dieses Organs anzunehmen, da *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen keine sichtbaren externen Ohrenanlagen besitzen.

Eine Erweiterung des *Dkk1*-Expressionsmusters konnte auch während der posterioren embryonalen Entwicklung erfolgen. Die generierte Mauslinie die die CNEs 25, 114, 190 und 195 beinhaltet, rekapituliert die *Dkk1*-Expression in sich neu bidenden posterioren Somiten (Abb. 24). In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass *Dkk1* während des Segmentierungsprozesses dem Oszillator-Netzwerk folgend exprimiert wird (Dequeant et al., 2006). Weiterhin werden Wnt-Signale für die Oszillator-Prozesse benötigt (Aulehla et al., 2003; Nakaya et al., 2005) und Wnt3a/β-Catenin ist in der Mesoderm-Bildung involviert (Dunty et al., 2008). Eine Modifikation der Gradienten-ähnlichen Aktivität in den posterioren Somiten könnte Ursache der vertebralen Fusionen in sakralen und lumbaren Regionen von *Dkk1*-Mutanten und kombinierten *Dkk1*+/-*;doubleridge*/*doubleridge*-Embryonen sein (MacDonald et al., 2004).

Da in dieser Arbeit das regulatorische Potential der einzelnen CNEs, auch in den zusätzlichen Expressionsdomänen identifiziert werden konnte, ließe sich in zukünftigen Experimenten auch untersuchen, durch welche Transkriptionsfaktoren *Dkk1* in diesen Organen reguliert wird.

4.10.3 Ausblick III: Potential der generierten *Dkk1*-Reportermauslinie

Die Reporteraktivität der generierten transgenen Mauslinie macht eine Visualisierung der *Dkk1*-Regulation möglich. Anhand der Reportermaus ließe sich deshalb das frühe *Dkk1*-Expressionsmuster und deren Regulation nachvollziehen. Dies wäre vor allem nützlich, da *Dkk1*;*Frz*-Doppelmutanten von einer frühen Letalität während der Gastrulation betroffen sind, Einzelmutanten sich aber wesentlich weiter entwickeln (pers. Mitteilung, Christoph Niehrs), wodurch sich eine bislang unbekannte Funktion dieser Gene andeutet.

Einleitend wurde bereits erwähnt, dass eine veränderte *Dkk1*-Regulation häufig mit der Etablierung unterschiedlicher Krankheitsformen assoziiert ist, sodass für *Dkk1* eine Tumorsuppressor-Funktion angenommen wird (Rubin et al., 2006). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Reporterlinie postnatal die *Dkk1*-Regulation innerhalb der Augen widerspiegelt, wäre zu untersuchen, ob dies auch für weitere Expressionsdomänen zutrifft. Auf dieser Grundlage könnten Veränderungen der gewebespezifischen *Dkk1*-Expression unter dem Einfluss unterschiedlicher Krankheitsformen analysiert werden. Weiterführend könnten unterschiedliche Medikamente getestet werden, die durch die Veränderung der *Dkk1*-Expression einen Einfluss auf die Pathogenese nehmen. Eine veränderte *Dkk1*-Expression hängt beispielsweise häufig mit Veränderungen der Osteoblasten-Differenzierung zusammen und führt deshalb bei der Entwicklung vieler Krebsformen zu Metastasen (Hall et al., 2008; Bu et al., 2008; Kaiser et al., 2008). Da der *Dkk1*-Reporter *Dkk1*-spezifisch in den osteogenen Zentren während der Entwicklung und nach der Geburt aktiv ist (Abb. 13; Daten nicht gezeigt), wären auch Studien der *Dkk1*-Fehlregulation an Mausmodellen möglich, die Knochenkrebs entwickeln.

5 ZUSAMMENFASSUNG/ ABSTRACT

Die Dkk1 vermittelte Inhibition des Wnt-Signalweges spielt eine entscheidende Rolle während unterschiedlicher Vorgänge der Embryonalentwicklung, wie z.B. der Kopfinduktion und der Gliedmaßenentwicklung. Da geringfügige Abweichungen der endogenen *Dkk1*-Expression drastische Malformationen des Embryos zur Folge haben können, ist offensichtlich, dass die distinkte Kontrolle der *Dkk1*-Expression während der Entwicklung exakt gesteuert werden muss. Weiterhin ist eine *Dkk1*-Fehlregulation mit der Etablierung unterschiedlicher Krankheitsformen assoziiert, wodurch das Verständnis der *Dkk1*-Regulation auch eine medizinische Relevanz besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Regulation der *Dkk1*-Expression während der Embryonalentwicklung in transgenen Mausembryonen untersucht. Es konnten neun phylogenetisch nicht kodierende Sequenzen (CNEs) identifiziert werden, die zu Beginn dieser Arbeit in Frage für die *Dkk1*-Regulation kamen. Durch die Untersuchung unterschiedlicher Kombinationen konnte herausgefunden werden, dass hauptsächlich vier dieser CNEs von Relevanz für die Steuerung der *Dkk1*-Expression in unterschiedlichen Geweben sind. Diese repräsentieren bei der *Dkk1*-Aktivierung in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche regulatorische Charakteristika von Enhancern. Die Generierung einer transgenen Mauslinie ermöglichte zudem eine Analyse der Dynamik der *Dkk1*-Regulation. Hierbei ergab sich, dass die CNEs während aller untersuchten Embryonalstadien eine Reporteraktivität verursachen, die der endogenen *Dkk1*-Expression sehr ähnlich ist.

Für die Vermittlung der *Dkk1*-Aktivierung während der Augenentwicklung reicht die Anwesenheit des CNE 195 aus. Innerhalb dieser Sequenz wird die TCF/LEF-Zielsequenz für die Reporteraktivität in den Augenanlagen benötigt, an dessen Zielsequenz Lef1 spezifisch bindet. Bei den Untersuchungen *Dkk1* defizienter Embryonen konnte eine Haploinsuffizienz während der Augenentwicklung identifiziert werden, die mit der Errichtung variierender Phänotypen, von Mikrophthalmie bis zur Anophthalmie reichend, zusammenhängt. In den defekten Augenanlagen führt ein reduziertes Dkk1-Niveau zu einer Veränderung des Reportermusters innerhalb der Augenanlagen, wodurch sich Musterbildungsdefekte andeuten. Die Dkk1-Reduktion führt im weiteren Verlauf zu einem Verlust der Aufrechterhaltung der *Dkk1*-Expression und der kanonischen Wnt-Signalwegkomponente GSK3β. Aufgrund dieser Tatsache kann eine direkte Rückkopplung zwischen Dkk1 und dem kanonischen Signalweg während der Augenentwicklung angenommen werden.

Zudem konnten zusätzliche *Dkk1*-Expressionsdomänen identifiziert werden, wie innerhalb des Genitaltuberkels und des Metanephros. Durch Analysen von *Dkk1*$^{-/-}$-Embryonen konnte in beiden Geweben *Dkk1* in das genetische Netzwerk eingeordnet werden.

ABSTRACT

Dkk1 mediated inhibition of the Wnt-signaling pathway plays an essential role during embryonic development, such as head induction and limb patterning. Because slight aberrations from the endogenous Dkk1 level can lead to dramatic embryonic embryopathies, it is reasonable that *Dkk1* expression has to be very tightly controled during development. Furthermore, *Dkk1* is associated with the establishment of different diseases, implying a medical relevance for the knowledge of *Dkk1* regulation. However, the direct control of *Dkk1* regulation is not known.

In this study, the regulation of *Dkk1* expression during embryonic development was analysed by using the transgenic approach. Nine unique conserved non coding elements (CNEs) were isolated as putative cis regulatory regions. Testing different combinations of these CNEs in transgenic embryos, it was revealed that four of these CNEs mainly are sufficient to govern *Dkk1* regulation. These CNEs represent the different characteristics of enhancers, activating in different tissues. The generation of a transgenic mouse line allowed the analysis of the complex *Dkk1* regulation during embryonic development. These studies revealed that the reporter activity is very similar to the endogenous *Dkk1* expression during development. During eye development, CNE 195 is sufficient to drive reporter activation. A conserved Lef1 binding site within this sequence is required for reporter activity. Further experiments revealed that Lef1 binds to its specific binding site. Analysing *Dkk1* deficient embryos, a haploinsufficiency during eye development was identified, leading to varying phenotypes, ranging from microphthalmia to anophthalmia. Within affected optic cups, a reduced Dkk1 level leads to patterning defects and a loss of the canonical Wnt-signaling component GSK3β. Later on, both a loss of *Dkk1* expression and canonical Wnt components ocurs in the optic cups. Due to this, a direct crossregulatory loop between Dkk1 and the canonical Wnt signaling during eye development can be assumed.

Furthermore, this study led to the identification of additional *Dkk1* expression domains, such as genital tubercle and metanephros. In both organs, *Dkk1* was connected to the known genetic network by analyses of *Dkk1*$^{-/-}$ embryos.

6 ANHANG

6.1 Konsensus-Sequenzen identifizierter CNEs im Bereich des *Dkk1*-Lokus

CNE 25kb

```
Hs          ATTATAGCCTA-GAAGAGCTACAGACTGCTTCAGATGCTAAAAATAAAATAGTTAAAATG
Mm          ATTACAGGCTA-GGAAAGCTACAGACTGCTCCAGGTGCTAAAAATAAAATAGTTAAAACG
Gg          ATTATACCCTCCGTGGAGCTGCAGCTTCGTCCAAAGGCTAAAAATA--GTAGGCAGAAAG

Hs          GAGAGACTTCAATTTGATGCGGGCTGCTCAACAATTTAACTTCTAATTGTCTTGTGGTTA
Mm          GAGAGACTTCAATTAGATGCAGGCTGCTCAACAATTTAACTTCCAATTGCCTTGTGGTTA
Gg          TAGAGACATCAATTAGATGCATACTGCTCAACAATTTAACTTCTAATTGGCTTGTGGTTA
Ac            AGAGGCTTAAATTAGATGTGGGTTGCCCAACAATTTAACTTCTAATTGCCTTGTGGTT

Hs          TTCCACAACTAGGAATTGACCATATTCCGTTTAAAGGAGATTGAAGGTCTCAGGA-----
Mm          TTCCACAAGTGGGAATTGACCATGTTCCGTTTACAGGAGATTTAAGGTCTTGGAGAAA—
Gg          TTCCCCAACTAGGAACCAACCCTGTTGTGTTTAAAGGA--TTGACAGTCTAGCAAAACAG
```

CNE 87kb

```
Hs          AAAGCAGTAAATGTTGTTTGTCTTCATTGCAAAACCA--AGGATAGA--AAACTTTGAAG
Mm          AAAGCAGTAAAGACTGTTTGTCTTCACCGCAAAACCA--AGGCCAGG--AAACTTTGAAG
Ac          AAAGCAGTAAATGTTGTTTGGCTTCTGTGGAAAAACCTCAGGCCCGGGGAATCTTTGAAG
Cm          AAAGCAGTAAATGTTGTTTGCCTTTAGTGCAAAACCC-ATGGCTAGG--AAACTTTGAAG

Hs          TGTTTTCTGTTGCTTAATGTCACCTACTGTTCCTGTCAGCAAACTGAAATAAACCTGATG
Mm          TGTTTTCTGTTGCTTAATGTCACCTACTGTTCCTGTCAGCAAACCGAGATAACCCTGATG
Ac          TATTTTCTGTGATTTAATGTCACCTACTGTTCCTGTCAGCAAACTGAGATAAACCTGATG
Cm          TGTTTTCTGTTC----ATGTCACCTACTGTTTGTGTCAGCAAACTGAGATAAACCTGATG

Hs          GAC-TGAGGTGTCTGGTCTAATTCCTTTATTGACACATAGTCCTGTCTTCAAACACCAGT
Mm          GAC-CTAGGTGTCTGGTCTAATTCCTTTATTGACACACAGTCCTGTCTTCAAACACCAGT
Ac          GACTCAAGGTGTCTGGTCTAATTCCTTTATTGACACATTGTCTTGTCTTCAAATACTTGT
Cm          GACTCAAGGTGTCTGGTCTAATTCCTTTATTGACACACAGTCTTGTCTTCAAACACTTAT

Hs          GTAAATGAATAAGTACTGAGATAGTAATGTGTCAGTAATAGGCTGCCAGATAAATGCCAT
Mm          GTAAATGAATAAGTACTGAGTTAGCAATGTGTCAGTAATAGGCTGCCAGATAAATGCCAT
Gg                                                      GCCAGATAAGTGCCCT
Ac          GCAAATGAATGTGTTCAGAG--AGTAATGCGTCAGTAATAGCCTTCCAGATAAAGGTCCT
Cm          GTAAATGAATAAGTGTCAAGATAGTAATGTGCCAGTAATAGCTTGCCAGTTAAATCCAAT

Hs          TGTTTACGTAC-TGAT-CCCTGCTTCCTAAGGCCCAAACAGCTCA--AAAATCTTACAAA
Mm          TGTTTATATAC-TGAT-CCCTGTTCCTTAAGGCCCAAGCAGCTCA--AAAATCTTACAAA
Gg          TGTTGATGTGC-TGGC-CTTCCCTTCCTAAGGTCCTAACAACCCCC-  ACATCTTACAAA
Ac          TGTTTATGTAC-TGATTCCTTGCTTCCTAAGTTCTTAACAACCTCC   ACATCTTACAAA
Xt          TGTTTGCACAG-GCAG-CCTTGTTGTGTTAGATCCCAGCATCGCACTCAAATCCTACAAA
Cm          TGTTTATACACAGGAT--CCTGCTTCCTCAAGGTCTAACAACT-T   GAAATCCTACAAA

Hs          TTAGCACCTCGCTGAGATCAAAGAATTGTCTTTTCTTTCTGCAATTACCTACTTGGAGAG
Mm          TTAGCACCTCACTGAGATCAAAGAATTGTCTCTTCTTTCTGCACTTACCTACTTGGAGGG
Gg          TTAGCACCTCACCGAGATCAAAGATGTGGCTTTTCTTTCT---TTTACCTACCAGCAGGG
Ac          TTAGCACCTCACTGAGATCAAAG
Xt          TTAACACCTCACAGAGATCAAAGTGTT-----TTCTTTCGGCAATTAACGGCTTGTAAGG
Cm          TTAGCACCTCACTGAGATCAAAGA

Hs          CGGTGCAAGC
Mm          TCAAACAAGC
Xt          CTGAGCAAAC
```

CNE 114kb

```
Hs                AGTTTATATGCCTACCCTGGTTGAAATTGGTTAGCACCTAACTCAAGGAGAGTT
Mm                AGTCTGCATGCTTACCC-AGTAGAAATTGCTTAGCACCTAACTGAAAAAGAGTT
Gg                TAGGGAGAAACACTCCCCGTTTGCGAATGCTTAGCACCCGAGCCAGGAGAGTT

Hs          TACTCCAAGTGCTAGAACTAATGTAAACAGGGAGTCACATTATTACAGCTCCATGTGGTG
Mm          TACTCCGAGTGCTAGAACTAATGTAAACAGAGAATTACATTCTTGCAGCTCCATGTGGTG
Gg          TTGTATAAGTGCTAGAACTAATGTAAACAGAGAATTACACTATTACAGCTGCATGTGGTG

Hs          TTATAATTACATCAGAATGCAGCTCAGTCACTGGCGCATCGTATGCGCCACACTGTCGCC
Mm          TTATAATTACATCAGAATGCAGCCTGGTCACTGGTGCGTCCTACGCGCCACACTGTCGCC
Gg          TTATAATTACCCAAGAATGCAGCTCAGCCACTGGTGCATCATATGCGCCACACTGTCGCC

Hs          ATATTTGCAGATGTTCAGTCTTACTTTTATTAAGCATGACAATGCCCAGCAGGATCCATT
Mm          ATATTTGCAGATGTTCAGTCTTACGTTTATTAAGCATGACAATACCCAGCAGGATCCATT
Gg          AAATTTGCAGATGTTCAGTCTTACTTTTATTAAGCATGACAATGCCCAGCAGGATCTATT

Hs          TTGTCTGATTATCCTCAAATGGAGAAGAATATTAAAAGGCAGGATAATTAAAAATATATG
Mm          TTGTCTGATTATCCTCAAATGGAGAAGAATATTAAAAGGCAGGATAATTAAAAATATATG
Gg          TTCTCTGATTATACTCAAATGGAGAGGAATATTAAAAGGCAGGATAATTAAAAATATATG

Hs          CCCAAACAAAGGATGTGTCTACAATTCCTTTTCTAGTGCTTTGAAATAGTTCAAATTTCT
Mm          CCCAAACAAAGGATGTGTCTACGATTCCTTTTCTAGTGCTTTGAAATAGTTCAAATTTCT
Gg          CCTAAACAAAGGATGTGTCTACAATTCTTTTTCTAGCGCTTTGAAATAGTTCAAATTTCT

Hs          CAGCTGGCTCTCGTGCACAGAGCACTAAAAGGATGTCTTAAATTTAGACATATGTCTTCA
Mm          CAGCTGGCTCTCGTGCACAGAGCATTAAAAGGATGTCTTAAATTTAGACATATGTCTTCA
Gg          CGGCTGGCTCATGTATACAGGGAACCAAAAGGATGTTTTAAATTCAGACATATGTCTTCA

Hs          TTCTGTTTAATGTGCCAGAACAAAAACATAGCTTGAGACCACCATGAATTGATGTCT---
Mm          TTCTGTTTAATGTGCCAGAACAAAAACATAGCTTAAGACCACCATGAACTGATGTCT---
Gg          TTCTGTTTTATGTGCCAGAACAAAAACATAGCTCAGGACCACCATGAATTGATTTTTTT

Hs          AAGTGCTGGAATGCTA
Mm          AAGTGCTGGAA-----
Gg          AAGTGACGACTCG---
```

CNE 129kb

```
Hs          AAGGCAGACAGTCTCTTTTCTCTTCTTTTCAACAGACACTCAGAGGGTCTGTTACTTATT
Mm          AAGGCAGACAGCCGCTTTTCTCTTGCCTTCAACAGACACTCATAGGGTCTGTTACTTATT
Gg          AAGCCAG-CAGCATCTTTTCACCT-CTTTTAGCAGACATTTG-AGAGTCTGGTACTCATT

Hs          ATCTTTGGAAGAAAAGACACAGGTTTCCACAAGCAACTTGAGCTTGTCTCAGTTTTGAGA
Mm          ATCCCTGGAAGAAAGGACACAGGTTTCCACAAGCAACTTGAGCTTGTATCAGTTCCGAGA
Gg          ATCTGCTGAGGGACGGGTACAGGTTTCTGCAAGCGACTGGAGCTGCTATCAGCACAGAGA

Hs          TCAGAA
Mm          TCAGAG
Gg          TCACAG
```

CNE 140

```
Hs          GCACCTCCTGCTGCAATTTATTGACACCAGATGTTCTTTGTATCAGTAAGACTTGTAGCA
Mm          GCACCTCCTGCTGCAATTTATTGACACCAGATGTCCTTTGTATCAGTAAGACTTGTAGCA
Gg          GCATCTCCGGATGTAATTTATAAAAACCAGATGTTTTGTGTATCACTGTGTCTTGTATCA
Ac                                ACCAGATGTGCTTTGTATCAGTAAGACGTTTAACA

Hs          ATGTCTATTTAAAGTTAAATGG--AGTAATTGAAGCCAGAGCATCATACTTTGAATGAAG
Mm          ATGTCTATTTAAAGTTAAATTG--AATAATTGAAGCCAGAGCATCATACTTTGAATGAAG
Gg          GTATCTATTTAAAGTTAAACTGGTAGCAACTGAAGCCAAAGAGGCATGCTTTGATTTAAA
Ac          ATGTCTATGTGAAGTTAAACCAAGAGTAAATGAAGCCAGATAGGCATGCTTTGATTTAAA
```

```
Hs      TAAATCAAAGCACATCACAGTCATAAAAATG--------CAGACTAGGGAAAGCATGAAT
Mm      TAAATCAAAGCACATCACAGTCATAAAAATG--------TAGACGAGGGAAAGCATGAAT
Gg      TAAATCAAAGCATATCAGAGTCATAGCAATTTAATTAGGAAGACTGGATCAAACATGAAG
Ac      TAAATCAAAGCCTATCACAGCCAT

Hs      GAGAGAAATCCATTATAAATGAGCAGC---ATAAGACTGA-ATCTACCTTGCAGCAATTC
Mm      GAAAGAAATCCATTATAAATGAGCAGC---CTATGACTAA-TTAAACCTTGAAGCAATTC
Gg      AGTAGAAGAAAATCATAAACGAGCAGC---AGATGACTGA-TTATACCTTCCAGCAAGTC

Hs      TGAAGAAAAAATCATTCACAGGA----------AATATGTCTACTACCTACC--TTCTCT
Mm      AGAGGAAAAAACAGTTTACAGGA----------CACATGTCTGCTGCCTGCC--TCCTCT
Gg      ACAGGAGGAAACAGTTTACAGAAACGCAACGGACACAGCTCTGCCATCTCTCGTTCACCT

Hs      CATCACTTATTTTCAACCTTTCCTTCTTTCCTTTACTCCT
Mm      CGTTACTGCTTTTC-ATCATTTCCTCTTCT
Gg      CCCTGTCCTTTTCC-TT
```

CNE 168

```
Hs                  TCTTGAGCTTTTTTTAGTCTCCCAGTGCTGTGGAATTAGAGCAGCAAGCTG
Mm                  TCTTGAGCTGTTTTTAGTCTCTTGGTGCTGTGGAATTAGAGAAGCAAACTG

Hs      AAATGATTTATGAAATGAAAAATTCCTGCCCACCCACTTCTGTC-----------ACAAT
Mm      AAATGATTTATGGAATGAAGGATTCCTGCCCACCCAGTTC----------ACAAT
Gg      AAGTGATTTATGAAATGAAG-CTTCCTGCCCACCCAGTGCACAGTTGTTTATGTCTGTCT

Hs      CATGTGCAATAACTACTGTGTTCTGCTATGTGCCATAATATTTAGCTCAGATGTA-----
Mm      CATGTGCAATAACTACTGTTTCCTGCTATTTGCCGCAATATTTAGCTCAGATGTAGGAAA
Gg      GCTTTGAAATAACTACAGTACTATGCTATTTTCAGTAATATTTAGCTCAGACTTAGCCAA

Hs      AAAACCACCCCACAACATACAGAAGA--ATCAATTATAAAAAGAAAC
Mm      GAAAAAAACCCTCACTAAATGCAGAAGAATCAGTTATAAAAAGAAAC
Gg      GAGCCCACTATCCATAGCAGACAGA---------CATAAAAAGAAAC
```

CNE 175

```
Hs      AAATGAGCAGC---ATAAGACTGA-ATCTACCTTGCAGCAATTCTGAAGAAAAAATCATTC
Mm      AAATGAGCAGC---CTATGACTAA-TTAAACCTTGAAGCAATTCAGAGGAAAAAACAGTTT
Gg      AAACGAGCAGC---AGATGACTGA-TTATACCTTCCAGCAAGTCACAGGAGGAAACAGTTT

Hs      ACAGGA----------AATATGTCTACTACCTACC--TTCTCTCATCACTTATTTTCA-AC
Mm      ACAGGA----------CACATGTCTGCTGCCTGCC--TCCTCTCGTTACTGCTTTTC-AT-
Gg      ACAGAAACGCAACGGACACAGCTCTGCCATCTCTCGTTCACCTCCCTGTCCTTTTCC-TTC

Hs      TTTTCCTTCTTTCCTTTACTCCT
Mm      ATTTCCTCTTCT
```

CNE 190kb

```
Hs      ----------CCTAGGCCTTCTAAAGTCTAGTTCAAGCTCCCAA-ACACG-AAACCACA
Mm      -GGGAAGGGGTCCTCAACCTTCTAAAATCAGCCTTCAGCTCCCAA-ACATGGAAACCACA
Gg      -TAACACAAGGCTCCTGTCTACTAATGTCTGA---GAGCTCCAAATGCAGAGAAACCACA
Ac                                                      GAAACCACA
Xt                                                CCAA-ACACGGAAACCATA

Hs      AAGAGTTAATGATAATTGAGATCATATGCTTCTTATCAAAGCTTCCTTAAAAAAAAAAA
Mm      GAGAGTTAATGATAATTGGCATCATATGTTTCTTATCAAAGCGTCCCCAAGAAAAG----
Gg      CAGAGTTAATGATAATTGATATCATATGGTCTTTATCAAAGCTTCCTCAAGAAAAG----
Ac      TGGAGCTAATGATAATTGAGATCATATGTTCTTTATCAAAGCTTCCTCAAG--AAG
Xt      TATTGTTAATGATAAGTGCTATCATGTGTTTTTTATCAGAGCTTCCTCAAGGAAAG

Hs      AAAGCAGCTTAAGGGAA-AATTCGTAAAT-ATGTGTCTTAACCACAGTCTACCAATCCCCTT
Mm      ----TAGCTTAAGGGAA-AATTCATAAAT-ACTTGTCTTGACCACAGTCTACCAATCCTCTT
Gg      ----CAGCTTAAGGGAA-AATCCGTAAAT-GTGTGTCTTGACCACAGTCTACCAATCTTCTT
```

```
Ac          ----CAGCTTAAGGGAAGAATCCATAAATCTCTTGTCTTGACCACAGTCTACCAGTCTTCTT
Xt           TGGCTCTAGGGTAAAA-ATCCATAAAAT-GTTTGTCTTGACCACAGTCTACCAATTGTCTT
Cm           AAGCAGCTTTAAGGAA-AATTCATGAAT-TCATGTCTTGACCATAGTCTACAATGTAGCTT

Hs          CCGCATTGGAGCCTTTAGCTAATTTGTTGACTTAATTACCCAAGGCACAGGAAGGTTAAA
Mm          CCGCATTGGAGCCTCCAGCTAATTTGTTGACTTAATTACCCAAGGCTCAGGAAGGTTAAA
Gg          CCGCATTGGAGCCTTTAACTAATTTGTTGGTTTAATTA-CTGAGGCACAGGAAAGTTTGC
Ac          CC
Xt          CCACGCTGGA
Cm          CCTCTTTGGAGCCTTTCACTAATTTGT

Hs          CAGAGTGATAATCTGATTTTCTCTGATTGCTGATCACTGCAGAAAGTGGTCCGTGGGAAG
Mm          CAGAGTGATAATCTGATTTTCCCTGATTGCTCATCACCGAAGAAAGTGGTCTATAGGATG
Gg          AAGAGTGATAATTGCATATTCTTTGATTGCTGATCATTACATTAAGTGGTCTCTATGAAT

Hs          CAAAAATAAAC-
Mm          CAAAA-TAAA--
Gg          TAAAAATAAAAC
```

CNE 195kb

```
Hs          ACAGCCGTAGAGGGCAGCTAATGAGTAGGTAGCCAAATGACAATGTCTCCTTACTTTTGA
Mm          ---GCCATCGAGGGCAGCTAATGAGTAGGTAGGCAAATGACAATGTCTCCTCACTCCTGA
Gg          --TCTCCTGTAGGGCAGCTAATAAGTAGGTAGGAAAATGACA---TCTCTGTACTTTTGA

Hs          CTTT-GCTTCCAAGGCCCGAGTGG-CTGCCTGACCGTCTCCACTCTGGCGTCAAACAGTC
Mm          CTTT-CCTTCCACAGCCCAAGTGG-CTGCCCGACCGGCTCCACACTGGCGTCAAACAGTC
Gg          CTTG-CATGCTGTTGCAAGGAAGGACAGCAGGAACGTCTCCTCTCTGGCGTCAAACAGTC
Xt                               GG-CAGCGGGGACGTCTCCTCCGTGGCGTCAAACAGTC
Cm                                     CGTCTCCAGTTTGGCGTCAGAAAGTC

Hs          CCCCTGCAGTATGCAGACAATTTAAATTATTACAAGGCAATGTTGCAAGTATGAGCCCTG
Mm          CCC-TACAGTATGCAGACAGTTTAAATTATTACAAGGCAATGTTACAAGTATGGACTCTG
Gg          CCCCTGCAGCACACACACAATTTAAATTATTACAAG-------------TATGAATGCCG
Xt          CCT-TG-ACCAAGCATGCAATTTCAATTA---CAAGGCAACGGTAGAAGTATGAACCTTG
Cm          CTC-TG-ACCATGCATGCAATTTATATTATTACAAGGCTGTGCTGCAAGTATGAACACTA

Hs          GCCCAAAA-TAAAGTAATTACATTCAATTAG-CAGTCCCCAAAGTGATG----GTCCAAT
Mm          GCACAAAA-CGAAGTAATTACATTCAATTAG-CAGTCCCCAAAGTGATG----GTCCAAC
Gg          GCACAAAA-TAAAGTAATTACATTTAATTAGGCAGCCAAAAAAGTGATG----GCCTGGG
Xt          GGATAGAA-TAAAGTAATTACGTCTAATTAG GCTGC-AAAAAGTGGTGTCCTGTCTTAG
Cm          GTACAAAA-TAAAGTAATTACATTTAATTAG C

Hs          ACTAAGAGCTTTAGATGTTGCCTTTGGTTGACTTA-CAGAAGCCAGGTAATGAGTGAAAC
Mm          ACTGGGGGCTTTAGATGTTGCCTTTTGTTGACTTA-CAGAAGCCAGGTAATGAATGAAAC
Gg          ACTCCCTGCCTTAGATGTAGCCTTTTGTTGACTTAACACAAGACAGGTAATGAATGAAAC
Xt          ACTGGCTGTCTTAGTAGGAGTCTTT-GTTGACTTA-----ACACAGGTAATGAATGAAAC

Hs          TTCAAAGTGTAAGAGACTAAATTACTGCTTAATTAGTGGAAACTAGATCA-------
Mm          TTCAAAGGGCAAGGGTCAAAAGGACGGCTTAATTAGTGGAGGCTGGATCAGAAAAGAT
Gg          TTCA
Xt          TTCAAAG
```

Konsensussequenzen konservierter, nicht-kodierender Sequenzen im Bereich des *Dkk1*-Lokus unterschiedlicher Organismen. Basen, die in mehr als zwei Spezies identifiziert wurden, sind grau unterlegt (*Hs = homo sapiens*; *Mm = mus musculus*; *Gg = gallus gallus*; *Ac = Anolis carolinensis*; *Xt = Xenopus tropicalianis; Cm =Callorhinchus millii*). Parameter (ecr-browser): minimal alignment score: 75%; length: 100bp. Konsensus-Sequenzen von *Anolis* und *shark* wurden durch „whole genome shutgun"-Sequenzen (ncbi) identifiziert und eingefügt.

6.2 In dieser Arbeit verwendete Reporterkonstrukte

CNE	kloniertes Fragment (bp)	Abb. 12A-C	Abb. 12D-F	Abb. 12G-I	Abb. 18A	Abb. 18E	Abb. 18B	Abb. 18C+D	Abb. 18F	Abb. 18G-I	Abb. 19C+D	Abb. 19E+F
25	1906	X	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-
87	1066	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	643 (2457)	X	X	X	X	-	-	X	-	-	-	-
129	361	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
140	1153	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
168	1725	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
175	1008	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190	456 (5743)	X	X	X	-	X	-	-	X	-	-	-
195	514	X	X	X	-	X	-	-	-	X	-	-
195 Del	418	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
195 Mut	514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X

PCR-amplifizierte genomische Fragmente wurden in unterschiedlichen Kombinationen in den Promotorvektor kloniert und getestet. Abbildungen, in denen transgene Embryonen dargestellt sind, sind angedeutet.

7 ABKÜRZUNGEN

α	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	*circa*
cDNA	*complementary* DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH_2O	Destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphatgemisch
DNA	doppelsträngige DNA
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo- (10^3)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria Broth
µ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})

M	molar
MgCl	Magnesiumchlorid
Mb	Megabasenpaare
MG	Molekulargewicht
min.	Minute
mol	Mol (6,023 x 10^{23} Teilchen)
mRNA	*messenger*-RNA
n	nano (10^{-9})
N	normal
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NAOH	Natriumhydroxid
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(A)$^+$	polyadenyliert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
Std.	Stunde
sec.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	*standard saline citrate*
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	*Unit*
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolettlicht
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

8 LITERATUR

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997). "β-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J. **16**: 3797-3804.

Adamska, M., McDonald, B.T., Meisler, M.H. (2003). "*Doubleridge*, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb." Dev. Biol. **255**: 350-362.

Adamska, M., McDonald, B.T., Sarmast, Z.H., et al. (2004). "En1 and *Wnt7a* interact with *Dkk1* during limb development in the mouse." Dev Biol. **272**: 134-144.

Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., et al. (1998). "The p53 network." J. Biol. Chem. **273**: 1-4.

Ahituv, N., Zhu, Y., Visel, A., et al. (2007). "Deletion of Ultraconserved Elements Yields Viable Mice." PLOS biol. **5**: e234.

Ai, D., Wang, J., Amen, M. et al. (2007). "Nuclear factor 1 and T-cell factor/LEF recognition elements regulate *Pitx2* transcription in pituitary development." Mol. Cell Biol. **27**: 5765-5775.

Almog, N., Rotter, V. (1997). "Involvement of p53 in cell differentiation and development." Biochim. Biophys. Acta **1333**: F1-F27.

Ang, S. J., Stump, R. J., Lovicu, F. J., McAvoy, J. W. (2004). "Spacial and temporal expression of *Wnt* and *Dickkopf* genes during murine lens development." Gene Expr Patterns **4**: 289-295.

Aota, S., Nakajima, N., Sakamoto, R., et al. (2003). "*Pax6* autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse *Pax6* gene." Dev Biol. **257**: 1-13.

Aulehla, A., Herrmann, B.G. (2004). "Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined." Genes Dev. **18**: 2060-2067.

Aulehla, A., Wehrle, C., Brandi-Saberi, B. et al. (2003). "*Wnt3a* plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis." Dev. Cell **4**: 395-406.

Baeg, G. H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S., Perrimon, N. (2001). "Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless." Development **128**(1): 87-94.

Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T. et al. (1999). "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the Frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." J. Biol. Chem. **274**: 16180-16187.

Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., et al. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**: 683-686.

Bagheri-Fam, S., Barrionuevo, F., Dohrmann, U., et L. (2006). "Long-range upstream and downstream enhancers conrol distinct subsets of the complex spatioemporal *Sox9* expression pattern." Dev Biol. **291**: 382-397.

Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., Clevers, H. (2001). "The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation." EMBO J. **20**: 4935-4943.

Barrow, J. R., Thomas, K.R., Boussadia-Zahui, O., ez al. (2003). "Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge." Genes Dev. **17**: 394-409.

Beddington, R. S. P., Robertson, E.J. (1998). "Anterior patterning in the mouse." Trends Genet. **14**.

Beermann, F., Kaloulis, K., Hofmann, D., et al. (2006). "Identification of evolutionarily conserved regulatory elements in the mouse *Fgf8* locus." genesis **44**: 1-6.

Behrens, J., voon Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., et al. (1996). "Functional interaction of beat-catenin with the transcription factor LEF-1." Nature **382**: 638-642.

Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., et al. (2004). "Ultraconserved Elements in the Human Genome." Science **304**: 1321-1325.

Berg, J., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2006). "Biochemistry." ISBN 0716787245 **6th ed.**

Binnertz, M. E., Kim, K.A., Bright, J.M., et al. (2007). "R-Spondin 1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 14700-14705.

Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkine extraction method for the isolation of plasmid DNA." Methods Enzymol. **100**: 243-255.

Birnboim, H. C. u. D., J. (1979). "A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA." University press.

Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., et al. (2002). "High bone density due to a mtation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **346**: 1513-1521.

Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R., Kimelman, D. (1997). "A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promotor to regulate dorsal axis specification." Genes Dev. **11**: 2359-2370.

Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Cha, K. B., et al. (2003). "TCF and Groucho-Related Genes Influence Pituitary Growth and Development." Dev Biol. **311**: 396-407.

Bu, G., Liu, C.C., Selander, K. et al. (2008). "Brest cancer-derived *Dickkopf1* inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: implication for breast cancer osteolytic bone metastases." Int J Cancer **123**: 1034-1042.

Cadigan, K., Nusse, R. (1997). "Wnt sigaling. A common theme in animal development." Genes Dev. **11**: 3286-32305.

Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J., Nusse, R. (1998). "Wingless repression of *Drosophila frizzled 2* expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing." Cell **93**: 767-777.

Caneparo, L., Huang, Y., Staudt, N. et al. (2007). "*Dickkopf*-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/betacatenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog *Knypek*." Genes Dev. **21**: 465-480.

Cavallo, R., Cox, R., Moline, M., Roose, J., Polevoy, G., et al. (1998). "*Drosophila* TCF and Groucho interact to repress wingless signaling activity." Nature **395**: 604-608.

Chamorro, M. N., Schwartz, D.R., Vonica, A., et al. (2005). "FGF-20 and *DKK1* are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development." EMBO J. **24**: 73-84.

Chang, B., Smith, R.S., Peters, M., et al. (2001). "Haploinsufficient *Bmp4* ocular phenotypes include anterior segment dysgenesis with elevated intraocular pressure." BMC Genetics **2**: 2-18.

Chiang, C., Litingtung, E. Lee, E. et al. (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function." Nature **383**: 407-413.

Chow, R. L. u. L., R. A. (2001). "Early eye development in vertebrates." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 255-296.

Church, V. L., Francis-West, P. (2002). "Wnt signalling during limb development." Int J Dev Biol. **46**: 927-936.

Cretekos, C. J., Wang, Y., Green, E.D. et al. (2008). "Regulatory divergence modifies limb lenghth between mammals." Genes Dev. **22**: 141-151.

Crossley, P. H., Matinez, S., Ohkubo, Y and Rubenstein, J.L.R. (2001). "Coordinate expression of *Fgf8*, *Otx2*, *Bmp4* and *Shh* in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic ans optic vesicles." Neuroscience **108**: 183-206.

Crossley, P. H. u. M., G.R. (1995). "The mouse *Fgf8* gene encodes a family of peptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo." Development **121**: 439-451.

Dale, T. C. (1998). "Signal transduction by the Wnt family of ligands." Biochem J. **329**: 209-223.

Daniels, D. L., Weis, W.I. (2002). "ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules." Mol. Cell. **10**: 573-584.

Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K. et al. (2008). "Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate *Rax* expression." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**: 5408-5413.

Davis, L. K., Meyer, K.J., Rudd, D.S. et al. (2008). "*Pax6* 3´ deletion results in aniridia, autism and mental retardation." Hum Genet. **123**: 371-378.

Davis-Silberman, N., Kalich, T., Oron-Karni, V., et al. (2005). "Genetic dissection of Pax6 dosage requirements in the developing eye." Hum Mol Genet **14**: 2265-2276.

De Robertis, E. M., Kuroda, H. (2004). "Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 285-308.

Dennis, S., Aikawa, M., Szeto, W., et al. (1999). "A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling." J. Cell Sci. **112**: 3815-3820.

Dequeant, M., Glynn, E., Gaudenz, K. et al. (2006). "A Complex Oscillating Network of Signaling Genes Underlies the Mouse Segmentation Clock A Complex Oscillating Network of Signaling Genes Underlies the Mouse Segmentation Clock." Science **314**: 1595-1598.

Dermitzakis, E. M., Clark, A.G. (2002). "Evolution of transcription factor binding sites in mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover." Mol. Biol. Evol. **19**: 1114-1121.

Dimanlig, P. V., Faber, S.C, Auerbach, W. et al. (2001). "The upstream ectoderm enhancer in *Pax6* has an important role in lens induction." Development **128**: 4415-4424.

DiNardo, S., Sher, E., Heemskerk-Jongens, J., et al. (1988). "Two-tiered regulation of spacially patterned *engrailed* gene expression during *Drosophila* embryogenesis." Nature **332**: 604-609.

Dudley, A. T., Lyons, K.M., Robertson, E.J. (1995). "A requirement for bone *morphogenetic protein-7* during development of the mammalian kidney and eye." Genes Dev. **9**: 2795-2807.

Dunty, W. C., Jr., Biris, K. K., Chalamalasetty, R. B. et al. (2008). "Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation." Development **135**: 85-94.

Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, J. J. et al. (1995). "Distinct expression and shared activities of members of the *hedgehog* gene family of *Xenopus laevis*." Development **121**: 2337-2347.

Elia, A. V., Pellizzari, L., Fabbro, D. et al. (2007). "A deletion 3' to the *PAX6* gene in familial aniridia cases. ." Mol Vis. **13**: 1245-1250.

Esteve, P., Bovolenta, P. (2006). "Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens." Curr Opin Neurobiol. **16**: 13-19.

Evans, W. P., und Resnick, M. I. (1981). "Horseshoe kidney and urolithiasis." J Urol. **125**: 620-621.

Evtushenko, V. I., Hanson, K.P., Barabitskaya, O. V. et al. (1989). "An attempt to determine the maximal expression of the rat genome." Mol Biol (Mosk) **23**: 663-675.

Fainsod, A., Deissler, K., Yelin, R., et al. (1997). "The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4." Mech Dev. **63**: 39-50.

Fedders, H., Augustin, R., Bosch, T.C. (2004). "A *Dickkopf*-3-related gene is expressed in differentiating nematocytes in the basal metazoan Hydra." Dev Genes Evol **214**: 72-80.

Fried, M. u. C., D. M. (1981). "Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis." Nucleic Acids Res. **9**: 6505-6525.

Fuhrmann, S., Stark, M.R., Heller, S. (2003). "Expression of *Frizzled* genes in the developing chick eye." Gene Expr Patterns **3**: 659-662.

Gibbs, R. A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., et al. (2004). "Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution." Nature **428**: 493-521.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., et al. (1998). "*Dickkopf*-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." Nature **391**: 357-362.

gMural, R. J., Adams, M.D., Myers, E.W. (2002). "A comparison of Whole-Genome Shotgun-Derived Mouse Chromosome 16 and the Human Genome." Science **296**: 1661-1671.

Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell **107**: 513-523.

Gonzalez-Sancho, J. M., Aguilera, O., Garcia, J.M., et al. (2005). "The Wnt antagonist *DICKKOPF*-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer." Oncogene **24**: 1098-1103.

Gordon, J. W. u. R., F. H. (1983). "Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei." Science **214**: 1244-1246.

Graham, T. A., Clements, W.K., Kimelman, D., Xu, W. (2002). "The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT." Mol. Cell. **10**: 563-571.

Gregory-Evans, C. Y., Williams, M.J., Halford, S., Gregory-Evans, K. (2004). "Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience." J of med. Genet. **41**: 881-891.

Grotewold, L., Theil, T., Rüther, U. (1999). "Expression pattern of *dkk*-1 during mouse limb development." Mech Dev **89**: 151-153.

Grotewold, L., und Rüther, U. (2002). "The Wnt antagonist *Dickkopf*-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death." EMBO J. **1**: 966-975.

Guder, C., Pinho, S., Nacak, T.G., et al. (2006). "An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in *Hydra*." Development **133**: 901-911.

Guha, U., Gomes, W.A., Kobayashi, T. et al. (2002). "*In vivo* evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb." Dev Biol. **249**: 108-120.

Gurdon, J. B. (1992). "The generation of diversity and pattern in animal development." Cell **68**: 185-199.

Habas, R., Dawid, I. B. (2005). "Dishevelled and Wnt signalling: is the nucleus the final frontier?" J. Biol.(4).

Halder, G., Callaerts, P., Gehring, W.J. (1995). "Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*." Science **267**: 1788-1792.

Hall, C. L., Daignault, S.D., Shah, R.B. et al. (2008). "*Dickkopf*-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis." Prostate **68**: 1396-1404.

Hallsson, J. H., Haflidadottir, B. S., Stivers, C. et al. (2004). "The basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor *Mitf* is conserved in *Drosophila* and functions in eye development." Genetics **167**: 233-241.

Hanson, I. M., Fletcher J.M., Jordan, T., et al. (1994). "Mutations at the *Pax6* locus are found in heterogenous anterior segment malformations including Peter´s anomaly." Nat Genet. **2**: 168-173.

Harada, T., Harada, C. und Parada, L. F. (2007). "Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye." Genes Dev. **21**: 367-378.

Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B., Polakis, P. (1998). "Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta." Curr. Biol. **8**: 573-581.

He, T. C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., et al. (1998). "Identification of c-*MYC* as a target of the APC pathway." Science **281**: 1509-1512.

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F., Kemler, R. (2000). "The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates." EMBO J. **19**: 1839-1850.

Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M. et al. (2001). "A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon." Genes Dev. **15**: 1427-1434.

Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., Melton, D.A. (1994). "*Follistatin*, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity." Cell **77**: 283-295.

Hino, K., Satou, Y., Yagi, K., Satoh, N. (2003). "A genome-wide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VI. Genes for Wnt, TGFbeta, Hedgehog and JAK/STAT signaling pathways." Dev Genes Evol **213**: 264-272.

Hoang, B., Moos, M.Jr., Vukicevic, S., Luyten, F.P. (1996). "Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila frizzled*, suggest a role in skeletal morphogenesis." J. Biol. Chem. **271**: 26131-26137.

Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C. et al. (2002). "Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling." Neuron **35**: 255-265.

Hsieh, J. C., Kodjabachan, L., Rebbert, M.L., et al. (1999a). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." Nature **398**: 431-436.

Hsieh, J. C., Lee, L., Zhang, L., et al. (2003). "*Mesd* encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity." Cell **112**: 355-367.

Huelsken, J., Behrens, J. (2002). "The Wnt signalling pathway." J Cell Sci. **115**: 3977-3978.

Hunter, D. D., Zhang, M., Ferguson, J. W. et al. (2004). "The extracellular matrix component *WIF-1* is expressed during, and can modulate retinal development." Mol Cell Neurosci. **27**: 477-488.

Iglesias, D. M., Heuber, P.A., Chu, L. et al. (2007). "Canonical WNT signaling during kidney development." Am J Phsiol Renal Physiol. **293**: F494-500.

Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P., Takada, S. (1997). "Wnt signalling is required for expansion of neural crest and CNS progenitors." Nature **389**: 966-970.

Ingham, P. W., Baker, N.E., Martinez-Arias, A. (1988). "Regulation of segement polarity genes in the *Drosophila* blastoderm by fushi tarazu and even skipped." Nature **331**: 73-75.

Ingham, P. W., McMahon, A. P. (2001). "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles." Genes Dev. **15**: 3059-3087.

Inoue, T., Kagawa, T., Fukushima, M. et al. (2006). "Activation of Canonical Wnt Pathway Promotes Proliferation of Retinal Stem Cells Derived from Adult Mouse Ciliary Margin." Stem Cells **24**: 95-104.

Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. (2003). "Regulation of *lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor* by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/ß-catenin signaling." Mol. Cell Biol. **23**: 1379-1389.

Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., et al. (1999). "The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF." Nature **399**: 798-802.

Jasoni, C., Hendrickson, A., Roelink, H. (1999). "Analysis of chicken *Wnt-13* expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction." Dev Dyn. **215**: 215-224.

Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C. et al. (2002). "Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway." Mol. Cell Biol. **22**: 1172-1183.

Jin, E. J., Burrus, L.W., Erickson, C.A. (2002). "The expression patterns of *Wnts* and their antagonists during avian eye development." Mech Dev **116**: 173-6.

Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H.J., Neal, M.J. (2000). "Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration." Neuroreport. **11**: 3963-3967.

Kaiser, M., Mieth, M., Liebisch, P. et al. (2008). "Serum concentrations of Dkk-1 correlate with the extend of bone disease in patients with multiple myeloma." Eur J Haematol **80**: 490-494.

Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., et al. (2002). "Cbfa-1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**: 303-314.

Kazanskaya, O., Glinka, A., Niehrs, C. (2000). "The role of *Xenopus* dickkopf1 in prechordal plate specification and neural patterning." Development **127**: 4981-4992.

Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, D.W., Hamblet, N.S. et al. (2002). "Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin- Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development." Cell **111**: 673-685.

Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I. et al. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin." J. Biol. Chem. **273**: 10823-10826.

Kispert, A., Vainio, S., Shen, L., et al. (1996). "Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips." Development **122**: 3627-3637.

Kleinjan, D. A., Seawright, A., Mella, S. et al. (2006). "Long-range downstream enhancers are essential for *Pax6* expression." Dev Biol. **299**: 563-581.

Knobloch J., S., J., J. D. Jr., Rüther, U. (2007). "Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway." FASEB J. **21**: 1410-1421.

Ko, L. J., Prives, C. (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev. **10**: 1054-1072.

Kohn, A. D., Moon, R. T. (2005). "Wnt and calcium signaling: b-catenin independent pathways." Cell Calcium **38**: 439-446.

Kokubu, C., Heinzmann, U., Kokubu, T. et al. (2004). "Skeletal defects in *ringelschwanz* mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. ." Development **131**: 5469-5480.

Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., et al. (2002). "Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopusto the nuclear beta-catenin-TCF complex." Cell **109**: 47-60.

Krishnan, V., Bryant, H.U., Macdougald, O.A. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." J Clin Invest **116**: 1202-1209.

Kubo, F., Takeichi, M., Nakagawa, S. (2003). "*Wnt2b* controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone." Development **130**: 587-598.

Laemmli (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.

Lambda, A., L., ., Karl, M. O., Ware, C. B., Reh, T. A., (2006). "Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 12769-12774.

Lang, R. A. (2004). "Pathways regulating lens induction in the mouse." Int. J. Dev. Biol. **48**: 783-791.

Latres, E., Chiaur, D. S., Pagano, M. (1999). "The human F-box protein beta-Trcp associates with the Cul/Skp1 complex and regulates te stability of beta-catenin." Oncogene **18**: 849-854.

Lee, H. S., Bong, K. B., Moore, K. B. et al. (2006). "Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway." Nat. Cell Biol. **8**: 55-63.

Lettice, L. A., heaney, S.J., Purdie, L.A., et al. (2003). "A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly." Hum Mol Genet **12**: 1725-1735.

Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**: 323-331.

Levine, M., Tjian, R. (2003). "Transcription regulation and animal diversity." Nature **424**: 147-151.

Levinson, R. S., Batourina, E., Choi, C., et al. (2005). "Foxd-1dependent signals conrol cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development." Development **132**: 529-539.

Lewis, S. L., Khoo, P.L., De Young, R.A., Steiner, K., et al. (2008). "Dkk1 and Wnt3 interact to control head morphogenesis in the mouse." Development **135**: 1790-1801.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., et al. (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." Cell **88**: 747-756.

Li, C., Xiao, J., Horm, K. et al. (2002). "Wnt5a participates in distal lung morphogenesis." Dev Biol. **248**: 68-81.

Li, H., Tierney, L., Wen, J. Y. et al. (1997). "A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate." Development **124**: 603-615.

Li, J., Sarosi, I., Cattley, R.C., et al. (2006). "Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia." Bone **39**: 754-766.

Liu, C., Kato, Y., Zhang, Z., Do, V. M., Yanker, B. A., He, X. (1999). "beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 6273-6278.

Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D., Wallace, V.A. (2003). "Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina." Dev Dyn. **227**: 323-334.

Liu, H., Thurig, S., Mohamed, O. et al. (2006). "Mapping canonical Wnt signaling in the developing and adult retina." Invest Ophthalmol Vis Sci. **47**: 5088-5097.

Liu, H., Xu, S., Wang, Mazerolle, C. et al. (2007). "Ciliary margin transdifferentiation from neural retina is controlled by canonical Wnt signaling." Dev Biol. **308**: 154-167.

Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A. (1999). "Requirement for *Wnt3* in vertebrate axis formation." Nat. Genet. **22**: 361-365.

Logan, C. Y., Nusse, R. (2004). "The Wnt Signaling Pathway in Development And Disease." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **20**: 781-810.

Love, J. J., Li, X., Case, D.A., Giese, K., et al. (1995). "Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1." Nature **376**: 791-795.

Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L. et al. (1995). "*BMP*-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning." Genes Dev. **9**: 2808-2820.

MacDonald, B. T., Adamska, M., Meisler, M.H. (2004). "Hypomorphic expression of *Dkk1* in the *doubleridge* mouse: dse dependence and compensatory interactions wit Lrp6." Development **131**: 2543-2552.

Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T.K. et al. (1997). "Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development." Development **124**: 1109-1117.

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., et al. (2002). "Kremens are novel Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." Nature **417**: 664-667.

Mao, B., Wu, W., Li, Y., et al. (2001a). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**: 321-325.

Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D. A. et al. (1995). "Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo." Development **121**: 2537-2547.

Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G et al. (2005). "Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center." Dev Cell **8**: 565-574.

Martinez-Morales, J. R., Dolez, V., Rodrigo, I., et al. (2003). "OTX2 activates the molecular nework underlying retina pigment epithelium differentiation." J Biol Chem. **278**: 21721-21731.

Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K.A., Jamrich, M. (1997). "The *Rx* homeobox gene is essential for vertebrate eye development." Nature **387**: 603-607.

Maurus, C., Heligon, A., Burger-Schwarzler, A. et al. (2005). "Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in Xenopus laevis." EMBO J. **24**: 1181-1191.

Megason, S. G., McMahon, A. P. (2002). "A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS." Development **129**: 2087-2098.

Merrill, B. J., Pasolli, H.A., Polak, L. et al. (2004). "Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo." Development **131**: 263-274.

Mikheev, A. M., Mikheeva, S.A., Liu, B., et al. (2004). "A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation." Carcinogenesis **25**: 47-59.

Miller, L. A., Smith, A.N., Taketo, M.M., Lang, R.A. (2006). "Optic cup and facial patterning defects in ocular ectodermbeta-catenin gain-of-function mice." BMC Dev Biol: 6-14.

Monaghan, A. P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., et al. (1999). "*Dickkopf* genes are co-ordinatelay expressed in mesodermal lineages." Mech Dev **87**: 45-56.

Moon, R. T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., Kaykas, A. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet **5**: 691-701.

Moore, K. B., Mood, K., Daar, I. O., Moody, S. A. (2004). "Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways." Dev Cell **6**: 55-67.

Morvan, F., Boulukos, K., Clement-Lacroix, P., et al. (2006). "Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass." 2006 **6**: 934-945.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Eseban, C., et al. (2001). "*Dickkopf1* is required for head induction and limb morphogenesis in the mouse." Dev Cell **1**: 423-434.

Muller, H., Samanta, R., Wieschaus, E. (1999). "Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the frizled genes." Development **126**: 577-586.

Nakaya, M., Biris, K., Tsukiyama et al. (2005). "Wnt3a links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation." Development **132**: 5425-5436.

Nguyen, M. u. A. (2000). "Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF." Development **127**: 3581-3591.

Niehrs, C. (2004b). "Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer." Nat Rev Genet **5**: 425-434.

Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., et al. (2004). "*DKK1*, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the ß-catenin/TCF pathway." Oncogene **23**: 8520-8526.

Nobrega, M. A., Zhu, Y., Plajzer-Frick, I., et al. (2004). "Megabase deletions of gene deserts results in viable mice." Nature **431**: 988-993.

Nusse, R. (2005). "Wnt signaling in disease and development." Cell Res. **15**: 28-32.

Ogino, Y., Suzuki, K., Haraguchi, R. et al. (2001). "External genitalia formation: role of fibroblast growth factor, retinoic acid signaling, and distal urethral epithelium." Ann NY Acad Sci **948**: 13-31.

Okabayashi, K., Shoji, H., Onuma, Y., et al. (1999). "cDNA cloning and distribution of the *Xenopus* follistatin-related protein." Biochem Biophys Res Commun. **254**: 42-48.

Osborne, N. O., Wood, P. M., Chidlow, G. et al. (1999). "Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know?" Br J Ophthalmol. **83**: 980-986.

Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C. et al. (2007). "BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling." Development **134**: 2359-2368.

Parker, D. S., Jemison, J., Cadigan, K.M. (2002). "Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*." Development **129**: 2565-2576.

Perriton, C. L., Powles, N., Chiang, C. et al. (2002). "Sonic hedgehog signaling from the urethral epithelium conrols external genital development." Dev Biol. **247**: 26-46.

Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M. (1996). "Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**: 589-598.

Picketts, D. J. (2006). "Neuropeptide signaling and hydrocephalus: SCO with the flow." J. Clin. Invest. **116**: 1828-1832.

Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S. et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." Nature **407**: 535-538.

Planque, N., L., Leconte, F. M., Coquelle, P. et al. (2001). "Specific Pax6/Microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins." J Biol Chem. **276**: 29330-29337.

Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev. **14**: 1837-1851.

Politou, M. C., Heath, D.J., Rahemtulla, A., et al. (2006). "Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation." Int J Cancer **119**: 1728-1731.

Potok, M. A., Cha, K. B., Hunt, A. et al. (2008). "WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth." Dev Dyn. **237**: 1006-1020.

Rasmussen, J. T., Deardorff, M.A., Tan, C. et al. (2001). "Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 3861-3866.

Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., et al. (1997). "A family of secreted proteins contains homologyto the cysteine-rich ligand-binding domaiin of frizzled receptors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2859-2863.

Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, P. et al. (1996). "Mutations in the human *Sonic Hedgehog* gene cause holoprosencephaly." Nat Genet. **14**: 357-360.

Roose, J., Huls, G., van Beest, M. et al. (1999). "Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-TCF4 target Tcf1." Science **285**: 1923-1926.

Rubin, J. S., Barshishat-Kupper, M., Feroze- erzoug, F., Xi, Z. F. (2006). "Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con." Front. Biosci. **11**: 2093-2105.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J. et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.

Sakurai, K., Osumi, N. (2008). "The neurogenesis-conrolling factor, *Pax6*, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes." J Neurosci **28**: 4604-4612.

Sambrook, J., Fritsch, T. und Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sariola, H. (2002). "Nephron induction revisited: From caps to condensates." Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **11**: 17-21.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., et al. (1994). "*Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organier-specific homeobox genes." Cell **79**: 779-790.

Sato, A., Kojima, T., Ui-Tei, K., Miyaa, Y., Saigo, K. (1999). "*Dfrizzled*-3, a new *Drosophila* Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in wingless hypomorphic mutants." Development **126**: 4421-4430.

Schier, A. F. (2001). "Axis formation and patterning in zebrafish." Curr Opin Genet Dev. **11**: 393-404.

Semenov, M. V., Tamai, K., Brott, B.K., et al. (2001). "Head inducer *Dickkopf*-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." Curr Biol **11**: 951-961.

Semina, E. V., Brownell, I., Mintz-Hittner, H. A. et al. (2001). "Mutations in the human forkhead transcritpion factor *FOXE3* associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts." Hum Mol Genet **10**: 231-236.

Shaw, G. M., Carmichael, S.L., Yang, W. et al. (2005). "Epidemiologic characteristics of anophthalmia and bilateral microphthalmia among 2.5 million birth in California." Am J Med. Genet. **137**: 36-40.

Shimamura. K., H., D. J., Martinez, S. et al. (121). "Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube." Development **121**: 3923-3933.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D´Amico, M., et al. (1999). "The *cyclin D1* gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 5522-5527.

Siegfried, E., Chou, T.B., Perrimon, N. (1992). "Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate *engrailed* and establish cell fate." Cell **71**: 1167-1179.

Sisodiya, S. M., Free, S.L., Mitchell, T.N., et al. (2001). "*PAX6* haploinsufficiency causes cerebral malformation and plfactoy dysfunction in humans." Nat Genet. **28**: 214-216.

Smith, S. T. u. J., J. B. (1996). "A conserved region of engrailed, shared among all *en*-, gsc-, Nk1-, Nk2-, and msh- class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo." Development **122**: 3141-3150.

Smith, W. C., Harland, R.M. (1992). "Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos." Cell **70**: 829-840.

Solnica-Krezel, L., Driever, W. (2001). "The role of the homeodomain protein Bozozok in *zebrafish* axis formation." Int J Dev Biol. **45**: 299-310.

Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., et al. (2003). "Genetic interaction between *Wnt/beta-catenin* and *BMP* receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb." Genes Dev. **17**: 1963-1968.

Spemann, H. u. M., H. (1924). "Über die Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren." Roux´s Arch. Entw. Mech. **100**: 599-638.

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A.P. (1994). "Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by *Wnt*-4." Nature **372**: 679-683.

Stopper, G. u. W., G. P. (2005). "Of chicken wings and frog legs: A smorgasbord of evolutionary variation in mechanisms of tetrapod limb development." Dev Biol. **2005**: 21-39.

Strigini, M., Cohen, S. M. (2000). "Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing." Curr. Biol. **10**: 293-300.

Strome, S., Wood, W.B. (1983). "Generation of asymmetry and segregation of germ-line granules in *C. elegans* embryos." Cell **35**: 15-25.

Stump, R. J., Ang, S., Chen, Y. et al. (2003). "A role for Wnt/beta-catenin signaling in lens epithelial differentiation." Dev Biol. **259**: 48-61.

Tada, M., Concha, M.L., Heisenberg, C. (2002). "Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements." seminars in Cell & developmental biology **13**: 251-260.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., et al. (2000). "Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein." Genes Dev. **14**: 1741-1749.

Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y.S., Zhang, Y., Carthew, R.W., Moon, R.T. (2003). "Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway." Nature **422**: 905-909.

Takemaru, K. I., Moon, R.T. (2000). "The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression." J. Cell Biol. **149**: 249-254.

Tetsu, O., McCormick, F. (1999). "β-catenin regulates expression of *cyclin D1* in colon carcinoma cells." Nature **398**: 422-426.

Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Musisi, H., Bienz, M. (2002). "A new nuclear component of the Wnt signalling pathway." Nat. Cell Biol. **4**: 367-373.

Tian, E., Zhan, F., Walker, R., et al. (2003). "The role of the Wnt-signaling antagonist *DKK1* in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma." Semin Cell Dev Biol **13**: 251-260.

Towbin, H. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.

Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., et al. (2000). "Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling." J. Biol. Chem. **275**: 4374-4382.

van Raay, T. J., Vetter, M. L. (2004). "Wnt/frizzled signaling during vertebrate retinal development." Dev Neurosci. **26**: 352-358.

Verani, R., Cappuccio, I., Spinsanti, P., et al. (2007). "Expression of the Wnt inhibitor *Dickkopf*-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid." J Neurchem. **100**: 242-250.

Vogelstein, B. a. G., D. (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**(2): 615-619.

Wang, J., Shou, J. und Chen, X. (2000). "*Dickkopf*-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53." Oncogene **19**: 1843-1848.

Wang, S., Krinks, M., Lin, K. (1997). "Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits *Wnt*-8." Cell **88**: 757-766.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature **420**: 520-562.

Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M. et al. (1999). "BMP7 acts in murine lens placode development." Dev Biol. **207**: 176-168.

Weatherbee, S. D., Behringer, R.R., Rasweiler, J.J.4th, Niswander, L.A. (2006). "Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 15103-15107.

Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K. et al. (2000). "*arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." Nature **407**: 527-530.

Wilkinson, D. G., Beiles, et al. (1987). "Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo." Cell **50**: 79-88.

Willert, J., Epping, M., Pollack, J. et al. (2002). "A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells." Dev. Biol. **2**: 8.

Wolpert, L. H. et al. (1999). "Entwicklungsbiologie." Spektrum Verlag

Woolfe, A., Goodson, M., Goode, D.K., et al. (2004). "Highly Conserved- Non-Coding Sequences Are Associated with Vertebrate Development." PLOS biol. **3**: 1.

Yamada, G., Suzuki, K., Haraguchi, R. et al. (2006). "Molecular genetic cascades for external genitalia formation: An emerging organogenesis program." Dev Dyn. **235**: 1738-1752.

Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A.P., et al. (1999). "A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo." Development **126**: 1211-1223.

Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J. S., Matsubayashi, H., Sese, S., et al., (2002). "Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*." EMBO J. **21**: 1733-1742.

Zaki, P. A., Collison, J.M., Toraiwa, J., Simpson, T.I. et al. (2006). "Penetrance of eye defects in mice heterocygous for mutation of *Gli3* is enhanced by heterocygous mutation of *Pax6*." BMC Dev Biol **6**: 46.

Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. (1996). "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient." Cell **87**: 833-844.

Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G. et al. (2000). "A new function of *BMP*: dual role for BMP4 in regulation of *Sonic hedgehog* expression in the mouse tooth germ." Development **127**: 1431-1443.

Zhang, X., Heaney, S., Maas, R.L. (2003). "Cre-loxp fate-mapping of *Pax6* enhancer active retinal and pancreatic progenitors." genesis **35**: 22-30.

Zimmerman, L. B., De Jesus Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996). "The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates *bone morphogenetic protein 4*." Cell **86**: 599-606.

9 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. Ulrich Rüther danke ich für die Überlassung des Themas, die vielen Denkanstöße und die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Jürgen Knobloch danke ich für die ständige Bereitschaft, mit mir telefonisch neue Ideen zu erörtern und die Korrekturarbeit.

Anja Saran, der „*golden princess of potatoe art“* gilt ein ganz besonderer Dank. Sie macht ferne Dinge greifbar! Danke auch an Thea, Jupp, Tobbi und Philli Lieven, die meine persönliche, nicht konservierte Entwicklung fördern.

Danke an die Mitarbeiter des EMT für das angenehme Arbeitsklima. Besonders an Peter Sikorski für Chris Whitley, Captain Beefheart usw.. Danke an Christoph Gerhard für die gemeinsamen Gesangs-duets, Verdauungsberatungen, Problemdiskussionen. Wioletta Hörschgen und Astrid Wies danke ich für die technische Unterstützung.

10 ERKLÄRUNG

Die vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Die Analyse der *Dkk1*-Regulation während der Embryonalentwicklung“ habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24.10.08

(Oliver Lieven)