

Der Verlust von *Fto* in Mäusen führt zu embryonalen und postnatalen Entwicklungsstörungen, sowie zu neonataler Sterblichkeit

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Yvonne Jäger

aus Viersen

Dezember 2012

**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
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Aberle**

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2013

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 DIE ENTWICKLUNGSBIOLOGIE.....	5
1.2 DIE MURINE EMBRYONALENTWICKLUNG	6
1.3 ESSENTIELLE SIGNALMOLEKÜLE FÜR DIE EMBRYONALENTWICKLUNG	7
1.3.1 <i>Die Hedgehog (Hh)-Proteine</i>	7
1.3.1.1 Posttranslationale Modifikation von Shh	8
1.3.1.2 Der Shh-Signalweg.....	9
1.3.2 <i>Bone morphogenic proteins (Bmps)</i>	10
1.3.2.1 Der TGF- β - und BMP-Signalweg	11
1.3.3 <i>Der Wnt-Signalweg in der Embryonalentwicklung</i>	13
1.3.4 <i>Hox-Gene</i>	14
1.4 DIE ENTWICKLUNG AUSGEWÄHLTER GEWEBE UND ORGANE	16
1.4.1 <i>Die Entwicklung des Skeletts</i>	16
1.4.2 <i>Die Gliedmaßenentwicklung</i>	17
1.4.2.1 Die präaxiale Polydaktylie	22
1.4.3 <i>Die Lungenentwicklung</i>	23
1.4.3.1 Signalmoleküle in der Lungenentwicklung	24
1.5 DAS <i>Fto</i> -GEN	26
1.5.1 <i>Die Fto-Mausmutante</i>	27
1.5.2 <i>Die Funktion von FTO</i>	29
1.6 ZIEL DIESER ARBEIT	30
2 MATERIAL & METHODEN	31
2.1 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	31
2.1.1 <i>Isolation von Nukleinsäuren</i>	31
2.1.1.1 DNA-Isolation aus Schwanzspitzen	31
2.1.1.2 Plasmid-Mini-Isolation (aus <i>E.coli</i>).....	32
2.1.1.3 Plasmid-Midi-Isolation (aus <i>E.coli</i>).....	33
2.1.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion	34
2.1.1.5 RNA-Isolation aus embryonalem Mausgewebe.....	35
2.1.1.6 RNA-Isolation aus primären MEFs	36
2.1.2 <i>Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA</i>	36
2.1.3 <i>Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen</i>	37
2.1.4 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	37

2.1.5	<i>Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	38
2.1.6	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	39
2.1.7	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	39
2.1.7.1	Standard-PCR und verwendete Primer.....	40
2.1.7.2	Genotypisierung der Mäuse.....	42
2.1.7.3	Semi-quantitative PCR.....	43
2.1.7.4	Reverse Transkription (RT-PCR).....	44
2.1.7.5	Quantitative Realtime-PCR.....	45
2.2	BAKTERIEN.....	47
2.2.1	<i>Für Bakterien-Arbeiten verwendete Lösungen</i>	47
2.2.2	<i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	47
2.2.3	<i>Transformation durch Hitzeschock</i>	48
2.2.4	<i>Elektro-Transformation</i>	48
2.3	ZELLKULTURARBEITEN.....	49
2.3.1	<i>Herstellung von primären MEFs</i>	49
2.3.2	<i>Kultivierung der MEFs und NIH-3T3 Zellen</i>	50
2.3.3	<i>Transiente Transfektion von NIH-3T3 Zellen</i>	50
2.3.4	<i>Shh-Signalweg-Aktivierung in MEFs</i>	51
2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	52
2.4.1	<i>Proteinisolation aus murinem Embryonalgewebe</i>	52
2.4.2	<i>Proteinisolation aus MEFs</i>	53
2.4.3	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	53
2.4.4	<i>Western-Blot-Analyse</i>	55
2.4.5	<i>Quantifizierung der Proteinexpression</i>	57
2.5	IDENTIFIZIERUNG VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN MITTELS HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEM.....	58
2.5.1	<i>Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems</i>	58
2.5.2	<i>Für Hefe-Arbeiten verwendete Lösungen</i>	60
2.5.3	<i>Hefe-Verpaarung</i>	62
2.5.3.1	Kalkulation der Anzahl an gefilterten Klonen.....	63
2.5.4	<i>Anlegen von Masterplatten</i>	64
2.5.5	<i>β-Galaktosidase (β-Gal) –Test</i>	64
2.5.6	<i>Plasmid-Isolierung aus Hefezellen</i>	65
2.5.7	<i>(Re-)Transformation in Hefezellen</i>	66
2.5.8	<i>DNA-Sequenzierung</i>	67
2.5.9	<i>Klonierung in Säuger-spezifischen Expressionsvektor</i>	67
2.6	METHODEN ZUR BESTÄTIGUNG VON PROTEIN-INTERAKTIONEN.....	67
2.6.1	<i>Co-Immunopräzipitation</i>	67

2.6.2 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung	70
2.7 <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	73
2.7.1 Synthese der RNA-Sonden	73
2.7.2 Whole Mount <i>In situ</i> Hybridisierung	74
2.8 HISTOLOGISCHE TECHNIKEN.....	76
2.8.1 Paraffindünnschnitte.....	76
2.8.2 Hämalaun/Eosin-Färbung	77
2.9 BRDU-ANALYSE	78
2.10 SKELETT-FÄRBUNGEN	79
2.10.1 Knochen-Färbung adulter Mäuse.....	79
2.10.2. Knochen-Knorpel-Färbung neugeborener Mäuse	80
2.11 ARBEITEN MIT MÄUSEN.....	81
2.11.1 Tierhaltung und Verpaarung	81
2.11.2 Präparation der Embryonen	81
2.12 FOTODOKUMENTATION UND STATISTIK.....	82
2.12.1 Fotodokumentation.....	82
2.12.2 Statistik.....	82
3. ERGEBNISSE.....	83
3.1 ÜBERSICHT	83
3.2 GENOTYPENVERTEILUNG UND LETALITÄT DER <i>Fto</i> -MÄUSE.....	83
3.2.1 Analyse der <i>Tg104N</i> -Mauslinie.....	84
3.2.2 Analyse der <i>Tg104</i> Mauslinie	87
3.2.3 Analyse der <i>Tg104BN</i> -Mauslinie	88
3.2.4 Analyse der <i>Tg104N Tg115</i> Mauslinie.....	89
3.3 MORPHOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE ANALYSEN DER <i>Fto</i> -MAUS	91
3.3.1 Präaxiale Polydaktylie an den Hintergliedmaßen der <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse	91
3.3.2 Untersuchung des axialen Skeletts der <i>Tg104N</i> -Mäuse.....	95
3.3.2.1 Anomalien im Bereich der Wirbelsäule	95
3.3.2.2 Anomalien im Bereich des Brustkorbes der <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse	97
3.3.3 Defekte in der Lungenentwicklung der <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse.....	100
3.4 MOLEKULARE ANALYSEN DER <i>Fto</i> -EMBRYONEN.....	105
3.4.1 Untersuchung von Komponenten des <i>Shh</i> -Signalweg.....	106
3.4.2 Die <i>Hoxd13</i> -Expression in den Gliedmaßenknospen der <i>Tg104N</i> -Embryonen.....	113
3.4.3 Untersuchung von Komponenten des <i>Bmp</i> -Signalweg	114
3.4.4 Untersuchung von Komponenten des <i>Wnt</i> -Signalweg.....	117
3.5 DIE IDENTIFIZIERUNG UND ANALYSE POTENTIELLER <i>Fto</i> -INTERAKTIONSPARTNER	119

3.5.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System für <i>Fto</i>	119
3.5.2 Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion in einem unabhängigen System	123
3.5.2.1 Bestätigung der <i>Fto</i> -Dock6-Interaktion	125
3.5.2.2 Bestätigung der <i>Fto</i> -Wnk2-Interaktion	129
3.5.2.3 Bestätigung der <i>Fto</i> -eIF5A-Interaktion	133
3.5.2.4 Keine <i>Fto</i> -Interaktion mit <i>Cc2d1a1</i> , <i>Dmap1</i> , <i>Gatad1</i> , <i>H3f3b</i> und <i>Lmo2</i>	134
4. DISKUSSION	135
4.1 DIE VERÄNDERUNGEN DER WIRBELSÄULE SIND <i>Fto</i> -UNABHÄNGIG	135
4.2 NEONATALE LETALITÄT IN DEN <i>Fto</i> ^{-/-} - MÄUSE	135
4.3 PRÄAXIALE POLYDAKTYLIE: <i>Fto</i> -FUNKTION IN DER ANTERO-POSTERIOREN GLIEDMAßENENTWICKLUNG	136
4.4 <i>Fto</i> ALS NEGATIVER REGULATOR DES SHH-SIGNALWEGS	137
4.5 NEONATALE LETALITÄT AUFGRUND VON ENTWICKLUNGSDEFEKTEN DER LUNGE	140
4.6 DIE URSACHE FÜR DIE ERHÖHTE AKTIVIERUNG DES SHH-SIGNALWEGS	142
4.7 DIE LETALITÄT UND POLYDAKTYLIE DER <i>Fto</i> ^{-/-} -MÄUSEN IST ABHÄNGIG VOM GENETISCHEN HINTERGRUND	143
4.8 IDENTIFIZIERUNG VON <i>Fto</i> -INTERAKTIONSPARTNERN	145
4.8.1 <i>Dock6</i> als potentieller Interaktionspartner von <i>Fto</i>	145
4.8.2 <i>Wnk2</i> als potentieller Interaktionspartner von <i>Fto</i>	146
4.8.3 <i>eIF5A</i> als potentieller Interaktionspartner von <i>Fto</i>	147
4.9 <i>Fto</i> HAT EINE FUNKTION IN DER PROLIFERATION	149
4.10 AUSBLICK	151
5. ZUSAMMENFASSUNG	153
ABSTRACT	154
6. VERZEICHNISSE	155
6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
6.2 LITERATURVERZEICHNIS	159
7. ANHANG	182
8 DANKSAGUNG	185
9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	186

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklungsbiologie

Die Entwicklungsbiologie analysiert die Prozesse, durch die Organismen heranreifen und sich fortlaufend entwickeln. Die Entwicklung eines Organismus beginnt mit der Befruchtung und endet mit dem Tod. Ein großes Teilgebiet der Entwicklungsbiologie ist die Embryologie, die sich mit den Entwicklungsvorgängen von einer einzelnen befruchteten Eizelle bis zur Geburt eines komplexen, multizellulären Organismus befasst. Die genetischen und molekularen Ereignisse, die den zahlreichen Entwicklungsprozessen zu Grunde liegen, können mit Hilfe verschiedener Modellorganismen erforscht werden. Die Verwendung des einzelnen Modellorganismus ist dabei abhängig von der jeweiligen Fragestellung, da jeder Modellorganismus seine eigenen Vorteile besitzt. Aufgrund ihres relativ kleinen Genoms und der Verfügbarkeit vieler Mutanten eignet sich für genetische Studien besonders die Taufliege (*Drosophila melanogaster*). Sie besitzt außerdem eine kurze Generationszeit und ist in der Haltung unkompliziert. Die großen Amphibieneier des glatten Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) sind für experimentelle Eingriffe bestens geeignet. Sie sind äußerst widerstandsfähig und kaum anfällig für Infektionen nach mikrochirurgischen Eingriffen. Zudem ist es durch den Einsatz des menschlichen Hormons Choriongonadotropin einfach an befruchtete Eier heranzukommen, die sich daraufhin in normalem Leitungswasser entwickeln. Weil das Genom der Maus (*Mus musculus*) mit dem des Menschen zu 99% übereinstimmt, wird die Maus häufig als Modellorganismus zur Erforschung von humanen Entwicklungsvorgängen eingesetzt. An der Maus können sowohl klassische genetische Experimente durchgeführt werden, als auch durch genetische Veränderungen bestimmte Mutanten generiert werden. Die Embryonalentwicklung von Vögeln und Säugern ist im Allgemeinen sehr ähnlich. Da die Embryonen des Huhns (*Gallus Gallus*) durch die Verfügbarkeit von Bruteiern leicht zu beschaffen sind und durch die extrauterine Entwicklung mikrochirurgische Eingriffe gut durchgeführt werden können, stellen sie eine wertvolle Ergänzung zu Untersuchungen an Mäuseembryonen dar (Capecchi, 1989 a, b; Wolpert, 1999; Pekarik, 2002; Stern, 2004; Tickle, 2004).

Anhand solcher Modellorganismen wird die genetische Kontrolle, der an der Embryonalentwicklung beteiligten Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Spezifizierung zu verschiedenen Zelltypen und Organen, analysiert. Die Entwicklung ist ein progressiver Prozess und das Schicksal einer jeden Zelle wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung durch die Aktivierung verschiedener Gene determiniert. Eine Zelle verändert während der Entwicklung ihr Genexpressionsmuster, ihre Form, ihre Proliferationsgeschwindigkeit, das Wanderungsverhalten und die Signale, die sie erzeugt und auf die sie reagiert (Wolpert, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige dieser Entwicklungsprozesse in einer ausgewählten Mausmutante analysiert.

1.2 Die murine Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung der Maus dauert von der Befruchtung der Eizelle bis zur Geburt etwa 18 bis 19 Tage. Zu Beginn entsteht bei der Befruchtung eine diploide Zygote. Diese Zygote durchläuft eine Reihe von Furchungsteilungen, wobei durch aufeinanderfolgende Teilungen, ohne Größenzunahme der Zygote, die Zellzahl erhöht wird. Die daraus entstandene Blastozyste, besteht aus einer äußeren Zellgruppe, aus der sich die Plazentaanteile entwickeln (Trophoblast), und der inneren Zellmasse, aus der sich der Embryo entwickeln wird. Am Embryonaltag 6.5 (E6.5) setzt mit der Bildung des Primitivstreifens die Gastrulation ein. Während der Gastrulation entstehen durch das Einwandern von Zellen die drei Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Aus diesen gehen alle zukünftigen Gewebe des sich entwickelnden Embryos hervor. Etwa zeitgleich beginnt durch die Neurulation die Entwicklung des Neuralrohres, die Anlage des späteren Zentralnervensystems. Parallel teilt sich das künftige Somitenmesoderm in block-artige Strukturen auf, die schließlich paarig neben dem Neuralrohr liegen. Die Somiten bestehen aus dem Myotom, aus dem später die Skelettmuskulatur hervorgeht, dem Dermatome, aus dem sich die Dermis entwickelt und dem Sklerotome, aus dem die Wirbelkörper und Rippen entstehen. Neun Tage nach der Befruchtung ist die Gastrulation beendet, der Kopf zeichnet sich deutlich ab, die Vordergliedmaßen beginnen sich zu entwickeln und die Organogenese beginnt (Wolpert et al., 1999).

Dabei ist die induzierende Wechselwirkung und Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen und Geweben ein wichtiger Prozess, der an der Bestimmung des Zellschicksals beteiligt ist (Wolpert, 1999). Es existieren eine Reihe von Signalmolekülen und Transduktionskaskaden, welche die Wachstums- und Musterbildungsprozessen während der Embryonalentwicklung der Maus regulieren.

In den folgenden Abschnitten werden bestimmte Signalmoleküle und deren Signalwege ausführlicher beschrieben. Im Anschluss daran werden anhand der spezifischen Entwicklung des Skeletts, der Gliedmaßen und der Lunge die komplexen Funktionen dieser Signalmoleküle während der Entwicklung verdeutlicht.

1.3 Essentielle Signalmoleküle für die Embryonalentwicklung

Die Wechselwirkungen und Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen und Geweben zur Anlage eines dreidimensionalen Musters im Embryo werden u.a. durch sekretierte Signalproteine reguliert. Es existiert eine Vielzahl an solchen Signalproteinen, die verschiedenen evolutionär konservierten Familien angehören, wie zum Beispiel den *Hedgehogs* (Hhs), den *Fibroblast growth factors* (Fgfs), der Superfamilie der *Transforming growth factors- β* (Tgf- β s), einschließlich der *Bone morphogenic proteins* (Bmps), den Wnt- und den Hox-Proteinen (Dunn et al., 1997). Auf die Art und Weise, wie diese Signalproteine die Embryonalentwicklung regulieren, wird in den nächsten Abschnitten detaillierter eingegangen.

1.3.1 Die Hedgehog (Hh)-Proteine

Sekretionsmoleküle, welche durch die *Hh*-Genfamilie kodiert werden, sind Schlüsselsignale in der Wachstumsregulation und Musterbildung der Embryonalentwicklung von Vertebraten und Invertebraten (Ingham und McMahon, 2001; Lum und Beachy, 2004; Hooper und Scott, 2005). Entdeckt wurde *hedgehog* 1980 bei der Suche nach Segmentpolaritätsgenen in *Drosophila* (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). In den Vertebraten sind drei Homologe des *Drosophila hedgehog* Gens bekannt: *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Desert hedgehog* (*Dhh*) und

Indian hedgehog (Ihh). Das Dhh-Protein wird in den Hoden exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Spermatogenese. Ihh wird im Darm und Knorpelgewebe exprimiert und hat eine Funktion im postnatalen Knochenwachstum (Bitgood und McMahon, 1995; Bitgood et al., 1996). Im Gegensatz dazu, wird das Shh-Protein überwiegend in embryonalen Geweben exprimiert und übernimmt dort eine Vielzahl an Funktionen in der Embryonalentwicklung. Es ist unter anderem verantwortlich für die Musterbildung des Neuralrohrs, der Somiten und der Gliedmaßen (Yamada et al., 1993; Fan und Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994; Johnson und Tabin, 1997; Tickle, 2003). Die Hh-Proteine agieren u.a. als Morphogen, eine Fähigkeit die besonders in der Gliedmaßenentwicklung der Vertebraten deutlich wird in der durch einen Shh-Gradienten die Positionsinformation entlang der antero-posterioren Achse der Gliedmaßenknospe spezifiziert wird (Johnson und Tabin, 1997; Tickle 2003).

1.3.1.1 Posttranslationale Modifikation von Shh

Bevor das Shh-Signalprotein in den diversen Prozessen der Embryonalentwicklung agieren kann, ist eine Aktivierung des Proteins durch Lipid-Modifikationen notwendig (Cooper et al., 1998; Incardona et al., 2000; Lewis et al., 2001; Porter et al., 1996b). Das aktive Shh-Protein ist mit einem Cholesterolest am C-Terminus und einem N-terminalen Palmitat doppelt Lipid-modifiziert (Porter et al., 1996; Pepinsky et al., 1998).

Das Cholesterol wird während einer intramolekularen Spaltungsreaktion, die durch das carboxy-terminale Ende des Shh-Vorläufers katalysiert wird, an den C-Terminus gebunden (Porter et al., 1996b) und ist an der Funktion, der Sekretion und der Rezeptorinteraktion des Shh-Proteins beteiligt. Die Palmitoylierung des Shh-Proteins wird durch Skinny hedgehog (Ski), eine Acetyltransferase, katalysiert (Chamoun et al., 2001; Lee und Treisman, 2001).

Dass diese Modifikationen für die Funktion des Shh-Proteins essentiell sind, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Die Inhibition der Cholesterol-Biosynthese durch chemische Inhibitoren führt zu Störungen des Shh-Signals und anomaler Embryonalentwicklung (Gofflot et al., 2001, 2003). Außerdem weisen Mausembryonen, die ausschließlich Shh mit fehlender Palmitoylierung exprimieren (Shh^{C25S}), eine signifikant reduzierte Musterbildung im Neuralrohr und den Gliedmaßen auf (Chen et al., 2004).

1.3.1.2 Der Shh-Signalweg

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass das aktive Shh-Protein durch die Lipid-Modifikationen fest mit der Zellmembran verbunden ist (Porter et al., 1996b; Bumcrot et al., 1995). Aufgrund der hydrophoben Natur der Cholesterol-Modifikation wird die Funktion des Transmembranproteins Dispatched (Disp) benötigt, um Shh vom Ort der Synthese zu entlassen (Kawakami et al., 2002; Ma et al., 2002; Caspary et al., 2002).

Wenn Shh die Zielzelle erreicht hat, aktiviert es die Signaltransduktion durch die Bindung an den Patched1 (Ptch1)-Rezeptor, ein Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen. Ptch1 ist ein negativer Regulator des Shh-Signalweges, da er in Abwesenheit des Shh-Proteins den Signalweg durch die Inhibition des Membranproteins Smoothened (Smo) unterdrückt. Durch die Bindung des Shh an den Ptch1-Rezeptor wird diese Inhibition unterbrochen und die sogenannten *Gli*-Transkriptionsfaktoren aktiviert. Diese wiederum gelangen daraufhin in den Zellkern und aktivieren die Transkription spezifischer Zielgene (Ingo et al., 2004). In Mensch und Maus sind drei verwandte *GLI* Gene bekannt: *GLI1*, *GLI2* und *GLI3* (Ruppert et al., 1988; Hui et al., 1994). Sie kodieren für Zinkfinger-Proteine, welche signifikante Sequenzhomologien zu dem Segmentpolaritätsgen *cubitus interruptus (ci)* in *Drosophila* aufweisen (Orenic et al., 1990). In *Drosophila* ist *ci* ein bifunktionaler Mediator von extrazellulären hedgehog (hh)-Signalen. In der Abwesenheit des hh-Signals wird *ci* in eine verkürzte Isoform prozessiert, welche die hh-Zielgene reprimiert. Nach der Bindung von hh an seinen Rezeptor *patched (ptc)* wird diese Prozessierung verhindert und die Volllänge-Isoform aktiviert als transkriptioneller Aktivator die hh-Zielgene (Aza-Blanc et al., 1997; Ohlmeyer und Kalderon, 1998; Aza-Blanc und Kornberg, 1999; Wang und Holmgren, 1999). In der Maus wird das Shh-Signal über die Transkriptionsfaktoren *Gli2* und *Gli3* vermittelt, welche wiederum die *Gli1*-Expression aktivieren (Bai et al., 2004, Lei et al., 2004). *Gli1* aktiviert im Zellkern die Transkription von Shh-Zielgenen (Park et al., 2000), wohingegen *Gli2* und *Gli3* als positive oder negative Regulatoren des Shh-Signals fungieren (Sasaki et al., 1999). In der Abwesenheit des Shh-Signals wird das *Gli3*-Protein in eine C-terminal verkürzte Repressorform (*Gli3-R* oder *Gli3-83*) prozessiert. In Anwesenheit von Shh wird diese Prozessierung verhindert und *Gli3* agiert als transkriptioneller Aktivator (*Gli3-FL* oder *Gli3-190*) des Shh-Signals (Abb. 1.1; Wang et al., 2000).

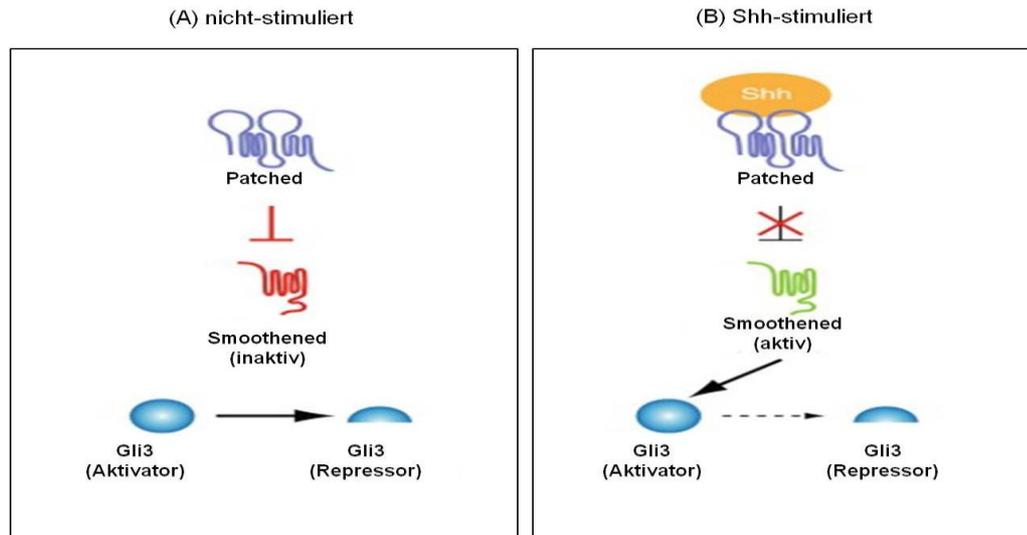


Abb. 1.1: Der Shh-Signalweg in Vertebraten.

Der Shh-Signalweg der Vertebraten in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) des Shh-Signals. (A) In Abwesenheit des Shh unterdrückt der Rezeptor Patched (Ptch1) die Aktivierung von Smoothened (Smo). Dadurch wird Gli3 in die verkürzte Repressor-Isoform prozessiert. (B) Durch die Bindung des Shh-Protein an Ptch1 wird die Inhibition von Smo unterbrochen und Smo aktiviert den Gli3-Aktivator und inhibiert die Produktion des Gli3-Repressors (Abb. ist modifiziert nach Goetz et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass der Shh-Signalweg in Vertebraten an Zilien gekoppelt ist. So resultiert der Verlust der Zilien oder Defekte in der Zilienstruktur in schweren Störungen, bis hin zum Verlust, der Shh-Signalkaskade (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005).

1.3.2 Bone morphogenic proteins (Bmps)

Die Bmp-Proteine sind Mitglieder der Tgf- β (*transforming growth factor- β*) Superfamilie, zu der außerdem die Tgf- β s, die Aktivine und Inhibine, Nodal, Myostatin und das Anti-Müller-Hormon gehören (Miyazawa et al., 2002). Mit mehr als 30 Bmp-ähnlichen Proteinen, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion in verschiedene Gruppen unterteilt werden können, sind die Bmps die größte Untergruppe der Tgf- β Superfamilie. Sie sind wichtige Regulatoren für verschiedenste Entwicklungsprozesse (z.B. im Herz, im Nervensystem, im Knorpel und in den Knochen) und sind an vielen embryonalen Musterbildungs-Prozessen beteiligt (Hogan, 1996; Anderson und Darshan, 2008). Ursprünglich wurden die Bmp-Proteine aus den Knochen aufgereinigt und benannt nach ihrer Fähigkeit, eine ektopische Knochenbildung zu

induzieren, nachdem sie unter die Haut von Nagern implantiert wurden (Urist, 1965; Sampath und Reddi 1981; Wozney et al., 1988). Es konnten jedoch auch Bmp-Homologe in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert werden, ein Organismus der kein Knochenskelett besitzt (Ferguson und Anderson, 1992). Außerdem werden *Bmp-2*, *Bmp-4*, *Bmp-6* und *Bmp-7* während der frühen Mausentwicklung, lange bevor die Bildung des Skeletts einsetzt, in Bereichen exprimiert die nicht Teil des Skeletts werden (Lyons et al., 1989, 1990, 1995). Zusätzlich führt die Inaktivierung von *Bmp-2* oder *Bmp-4* in Mäusen zur frühen embryonalen Letalität, bevor die Skelettbildung überhaupt initiiert wurde (Winnier et al., 1995). So konnte für BMP-2 und BMP-4 auch gezeigt werden, dass sie das Potential besitzen mesenchymale Stammzellen zu nicht skelettalen Zelllinien (z.B. Adipozyten) zu induzieren (Bowers et al., 2006; Bowers und Lane, 2007; Huang et al., 2009). Ähnlich wie das *Drosophila* Homolog *decapentaplegic (dpp)*, das ein Zielgen von hh in der antero-posterioren Musterbildung der Organanlagen der Fliegenanhängsel ist (Ingham and Fietz, 1995), sind die *Bmps* Zielgene von Shh und spielen unter anderem eine Rolle in der Weiterleitung des Shh-Signals in der antero-posterioren Musterbildung der Vertebratengliedmaße (Duprez et al., 1996; Yang et al., 1997).

1.3.2.1 Der TGF- β - und BMP-Signalweg

Die Proteine der Tgf- β Superfamilie binden an Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und übermitteln die Signale durch Smad-abhängige und Smad-unabhängige (ERK-, JNK- und p38 MAP-Kinase-Signalweg) Mechanismen (Derynck et al., 2001; Shi und Massague, 2003).

Die Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, über die auch das Bmp-Signal vermittelt wird, werden in Typ I- und Typ II-Rezeptoren unterteilt. (Liu et al., 1995). Bisher konnten in der Maus vier Typ I-Rezeptoren (Alk-1, Alk-2 (ActR-IA), Alk-3 (BmpR-IA) und Alk-6 (BmpR-IB)) und drei Typ II-Rezeptoren (BmpR-II, ActR-II und ActR-IIB) identifiziert werden (ten Dijke et al., 1994; Beppu et al., 1997; Kirsch et al., 2000 a,b; Greenwald et al., 2003; Sebald und Mueller, 2003). Nach der Bindung des Bmp-Proteins wird der Typ II-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert den Typ I-Rezeptor (Wrana et al., 1992), welcher wiederum intrazelluläre Signalkaskaden, einschließlich der Expression der Smad-Proteine, aktiviert (Kretschmar und Massague, 1998). In Säugetieren wurden acht Smads identifiziert, welche

die primären Signalübermittler der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren sind. Die R(*receptor-regulated*)-Smads (Smad1/5/8) werden durch die Bmp Typ I-Rezeptoren phosphoryliert, während Smad2 und Smad3 durch Aktivin und Tgf- β -Typ I-Rezeptoren aktiviert werden. Nach ihrer Phosphorylierung durch den Typ I-Rezeptor bilden die R-Smads einen Komplex mit Smad4, dem einzigen bekannten Co (*common-partner*)-Smad in Säugetieren, der von dem Bmp- und Tgf- β -Signalwegen geteilt wird. Dieser Komplex wird in den Zellkern verlagert und reguliert durch die Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren die Transkription von Bmp- und Tgf- β -Zielgenen (Heldin et al., 1997). Die dritte Klasse der Smads sind die sogenannten I (*inhibitory*)-Smads (Smad6 und Smad7), die das Signal über die R-Smads und Co-Smads negativ regulieren (Miyazono et al., 2005).

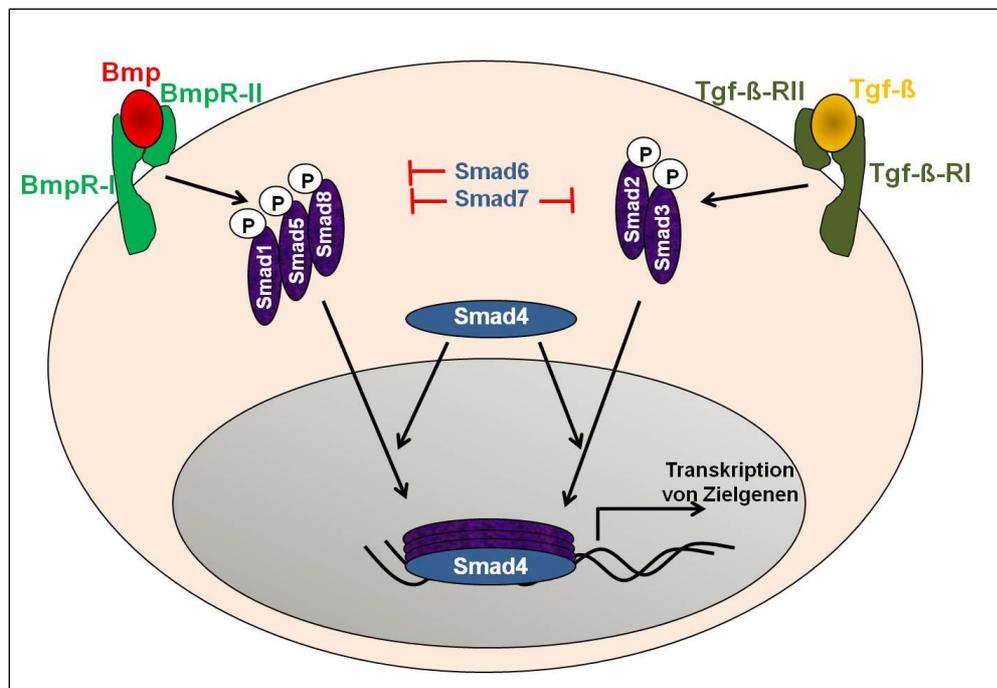


Abb. 1.2: Der Bmp- und Tgf- β -Signalweg.

Bmp-Proteine binden an die Bmp-Rezeptoren (BmpR-I und BmpR-II) und Tgf- β -Liganden an die Tgf- β -Rezeptoren (Tgf- β -RI und Tgf- β -RII). Daraufhin werden Smad-Proteine phosphoryliert und bilden einen Komplex mit Smad4. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern und reguliert die Expression von Bmp- und Tgf- β -Zielgenen. Diese beiden Signalwege können durch die variable Expression der Rezeptoren und inhibitorischen Smads (Smad6/7) reguliert werden (Abb. ist modifiziert nach Internet-Quelle Nr.6).

1.3.3 Der Wnt-Signalweg in der Embryonalentwicklung

Wnt-Gene kodieren für Cystein-reiche Glykoproteine, von denen in den Vertebraten insgesamt 19 identifiziert wurden und die in vielen entwicklungsbiologischen Prozessen als Morphogene fungieren. Der Name *Wnt* ist zusammengesetzt aus dem *Drosophila* Segmentpolaritätsgens *wingless* (*wg*) und dem Homolog der Vertebraten *integrated* (*Int*) (Rijsewijk et al., 1987).

Der Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege während vieler embryonaler Entwicklungsprozesse. Wnt-Signale kontrollieren die Proliferation, das Zellschicksal und die Aufrechterhaltung der Stammzellen-Proliferation und organisieren Zellbewegungen und die Entstehung von Gewebepolaritäten (Croce und McClay, 2008).

Die Wnt-Signalkaskade wird durch die Bindung von Wnt an Vertreter der Frizzled (Fz)-Transmembranrezeptoren oder der Low density Lipoprotein-Related-Rezeptoren (LDLR) induziert. Die Rezeptoren übermitteln daraufhin ein Signal an ein intrazelluläres Dishevelled-Protein (Dsh), wodurch dieses phosphoryliert wird und verschiedene Signalereignisse auslöst. Bei dem Wnt-Signalweg wird zwischen dem kanonischen β -Catenin-abhängigen und dem nicht-kanonischen β -Catenin-unabhängigen Signalweg unterschieden. Der kanonische Wnt-Signalweg ist durch die Stabilisierung und den darauffolgenden Kerntransport von β -Catenin charakterisiert, worauf die Transkription spezifischer Zielgene im Zellkern veranlasst wird. Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg schließt mehrere verschiedene Signalarten ein, die das Zellverhalten regulieren. Dazu gehören der Phospholipase C-vermittelte Anstieg von Kalzium in der Zelle, die Modifizierung des Aktin-Zytoskeletts durch die sogenannten kleinen G-Proteine Rac und Rho und die Regulation der planaren Zell-Polarität (*engl.: planar cell polarity*, PCP) durch PCP-Kern-Proteine (Angers und Moon, 2009; van Amerongen und Nusse, 2009).

Wie bereits erwähnt sind die Wnt-Proteine an vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt. Zum Beispiel spielen Wnt1 und Wnt3a unter anderem eine Rolle in der Entwicklung des Gehirns, Wnt3 in der Spezifizierung der Körperachsen, Wnt4 in der Nierenentwicklung, Wnt5a und Wnt7a in der Gliedmaßenentwicklung und Wnt10b in der Entwicklung der Adipozyten. Die verschiedenen Funktionen der einzelnen Wnt-Proteine konnten unter anderem durch die Generierung von verschiedenen *Wnt*-defizienten Mausmodellen aufgeklärt werden. So besitzen *Wnt3a*-defiziente Mäuse keinen Hippocampus und *Wnt5a*-defiziente Mäuse weisen eine Verkürzung der Gliedmaßen auf (Stark et al., 1994; Ikeya et al., 1997; Liu

et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999; Ross et al., 2000; Adamska et al., 2004). Für *Wnt5a* konnte außerdem gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle während der Lungenentwicklung spielt. Der Verlust von *Wnt5a* führt in den Lungen von Mausembryonen zu einer Überexpression von Fgf10, das die Proliferation des Lungenepithels beeinflusst (Iozzo et al., 1995; Masckauchan et al., 2006).

Nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Inhibierung des Wnt-Signalweges ist für bestimmte Entwicklungsprozesse essentiell. Einer von zahlreichen Wnt-Inhibitoren ist zum Beispiel Dickkopf 1 (Dkk1). Es gehört zu der Familie der Cystein-reichen Dickkopf-Proteine mit vier Mitgliedern (Dkk1-Dkk4), wobei Dkk2 sowohl als Wnt-Inhibitor als auch als Wnt-Aktivator agieren kann (Glinka et al., 1998;). Dkk1 inhibiert den Wnt-Signalweg durch seine Bindung an das LDL-receptor-related protein 6 (Lrp6), wodurch die Bindung von Wnt-Proteinen an die Frizzled-Rezeptoren und die darauffolgende Wnt Signaltransduktion blockiert wird (Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001). Diese Wnt-Inhibition durch Dkk1 ist zum Beispiel in der sich entwickelnden Gliedmaße zu beobachten. Dkk1 wird in der späten Entwicklung in den interdigitalen Regionen der Gliedmaße exprimiert, wo es den programmierten Zelltod reguliert, der zur Separierung der einzelnen Zehen führt (Grotewald et al., 1999). Der Verlust von Dkk1 in Mausembryonen führt zur sogenannten Polysyndaktylie, charakterisiert durch eine vermehrte Zehenanzahl mit zusätzlichen Verwachsungen der Zehen untereinander. Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen hat eine Überexpression von Dkk1 in den Gliedmaßenknospen von Hühnerembryonen eine Verkürzung der Gliedmaßen zur Folge, verursacht durch die ektopische Induktion von programmiertem Zelltod (Grotewald et al., 2002; Adamska et al., 2004). Die Wnt-Inhibition durch Dkk1 spielt auch in vielen weiteren Entwicklungsprozessen eine bedeutende Rolle. So ist Dkk1 unter anderem auch an der Induktion des Kopfes, der Segmentierung der Wirbel und der Entwicklung der Osteoblasten beteiligt (Mukhopadhyay et al., 2001; Morvan et al., 2002; McDonald et al., 2004, Li et al., 2006b).

1.3.4 *Hox*-Gene

Hox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die zu der Familie der homöotischen Gene gehören. Charakteristischer Bestandteil dieser Gene ist die Homöodomäne, die für die sogenannte Homöobox kodiert. Diese besteht in der Regel aus 60 Aminosäuren und besitzt eine DNA-Bindedomäne. *Hox*-Gene sind Homologe der zuerst in *Drosophila* entdeckten homöotischen Selektorgene (*Hom-C*), dessen Funktion die Spezifizierung der

Segmentidentitäten ist (Lewis, 1978; Krumlauf, 1994). Der Hom-C Komplex auf dem *Drosophila* Chromosom 3 besteht aus zwei Gruppen von homöotischen Genen, Antennapedia und Bithorax, die jedoch als eine Einheit angesehen werden können (Casanova et al., 1987). Das Genom der Maus und des Menschen besitzt vier Kopien des *Hox*-Komplexes auf vier verschiedenen Chromosomen (in der Maus: *Hoxa-Hoxd*; im Mensch: *HOXA-HOXD*) (Krumlauf, 1992; Scott, 1992). Die *Hox*-Gene liegen auf dem Chromosom in kollinearer Anordnung. Das heisst die Reihenfolge auf dem Chromosom entspricht ihrer zeitlichen Expression und der Position der von ihnen gesteuerten Körperabschnitte. So werden während der Entwicklung zuerst *Hoxa-1* bis *Hoxd-1* und zuletzt *Hoxa-13* bis *Hoxd-13* exprimiert (Kornak und Mundlos, 2003). Für die *Hoxd*-Gene konnte gezeigt werden, dass sie entlang der antero-posterioren Achse exprimiert werden. So werden *Hoxd* Gene die 3' lokalisiert sind (z.B. *Hoxd-1*) mehr anterior exprimiert als die, welche weiter 5' auf dem Chromosom liegen (z.B. *Hoxd-13*) und mehr posterior exprimiert werden. Auf diese Art und Weise spezifizieren die *Hox*-Gene zum Beispiel die verschiedenen Wirbelsegmente und -strukturen und die antero-posteriore Identität der Gliedmaßen (Nelson et al., 1996). Überexpressions- und Verluststudien zeigten, dass eine Fehlexpression der *Hox*-Gene zu einer sogenannten homöotischen Transformationen führt. Dabei handelt es sich um schwere Missbildungen, bei denen Organe oder Körperanhänge am falschen Ort gebildet werden und sich z.B. die Identität ganzer Segmente im Körper verändern kann (Krumlauf, 1994). So wachsen zum Beispiel bei *Drosophila* Beine anstelle von Antennen am Kopf, wenn das *Antennapedia*-Gen nicht nur im Thorax sondern auch ektopisch im Kopf exprimiert wird. Und durch die Deletion des *Ultrabithorax*-Gens wird in *Drosophila* ein zweites Thorax-Segment anstelle des abdominalen Segment gebildet (Struhl, 1981; Frischer et al., 1986; Schneuwly et al., 1987). In Vertebraten führt die gezielte Zerstörung von verschiedenen *Hoxd*- und *Hoxa*-Genen zu komplexen Gliedmaßenphänotypen, in denen viele Skelettelemente betroffen sind (z.B. Dolle et al., 1993; Small und Potter, 1993; Davis und Capecchi, 1994, 1996; Favier et al., 1995; Fromental-Ramain et al., 1996; Kondo et al., 1996). Zum Beispiel führt die ektopische *Hoxd-11*-Expression im Hühnerembryo zu einer posterioren Transformation (Morgan et al., 1992) und eine *Hoxa-13*-Fehlexpression zu distalen Transformationen (Yokouchi et al., 1995).

1.4 Die Entwicklung ausgewählter Gewebe und Organe

1.4.1 Die Entwicklung des Skeletts

Das Skelett formt und stützt den Körper eines Lebewesens und Störungen in dessen Entwicklung können schwere Missbildungen verursachen. Das Skelett der Vertebraten ist in das axiale, das kraniale und das appendikuläre Skelett gegliedert. Das axiale Skelett besteht aus der Wirbelsäule, den Rippen und dem Brustbein und das kraniale Skelett bezeichnet den Schädel. Die vorderen und hinteren Gliedmaßen, welche über den Schultergürtel und die Beckengürtel mit dem axialen Skelett verbunden sind, bilden das appendikuläre Skelett (Kornak und Mundlos, 2003).

Das Skelett der Vertebraten wird aus drei unterschiedlichen embryonalen Zellgruppen gebildet. Zellen aus der Neuralleiste, die im Embryo vorübergehend leistenartig dem Neuralrohr anliegt, wandern in unterschiedlichste Bereiche des Embryos und bilden neben einer Reihe anderer Strukturen die Knochen des kranialen Skeletts. Dabei unterliegt die Morphogenese des kranialen Skeletts der Kontrolle eines vielschrittigen Wechselspiels zwischen Signalen aus dem Endo- und Ektoderm und den Neuralleistenzellen (Langille und Hall, 1993; Le Douarin et al., 2004).

Die Knochen des appendikulären Skeletts und des Brustbeins werden aus Zellen des lateralen Plattenmesoderms gebildet. Auf die Entstehung der Vertebratengliedmaße und die daran beteiligten Prozesse und Signale wird im Abschnitt 1.4.2 detailliert eingegangen.

Der größte Teil des axialen Skeletts, die Wirbel und Rippen, werden aus Zellen des Sklerotoms, dem ventralen Teil der Somiten, generiert. Das Shh-Signal aus der Chorda dorsalis und der Bodenplatte des Neuralrohrs initiiert und kontrolliert die Bildung des Sklerotoms (Christ und Ordahl, 1995). Eine Störung dieses Prozesses führt zu anomalen Wirbelanlagen und somit zu Missbildungen der Wirbelemente. Eine Anomalie der Rippen und/oder Wirbel ist ein relativ häufiger Befund in humanen Missbildungssyndromen. Solche, die hauptsächlich das axiale Skelett betreffen, werden unter dem Begriff der autosomal-rezessiven spondylokostalen Dysostose (ARSD) zusammengefasst. Die ARSD ist eine seltene, unterschiedlich schwer ausgeprägte Krankheit, mit Segmentierungsdefekten in den Rippen und Wirbeln. Häufige Fehlbildungen sind Wirbel- und Rippenfusionen, die zu

Deformation von Thorax und Wirbelsäule führen und u.a. ein zwergenartiges Aussehen verursachen. Außerdem leiden Patienten aufgrund des kleinen Thorax häufig unter Atemwegsinfektionen und Ateminsuffizienz (Bulman et al. 2000; Kornak und Mundlos, 2003).

Die Knochen des kranialen, axialen und appendikulären Skeletts entstehen durch zwei verschiedene Arten der Knochenentwicklung. Die flachen Knochen des Schädels werden durch intramembranöse Ossifikation gebildet, in der mesenchymale Vorläuferzellen direkt in knochenbildende Osteoblasten differenzieren. Das übrige Skelett wird durch endochondrale Ossifikation gebildet. Dabei differenzieren kondensierte Mesenchymzellen zu Chondrozyten und bilden ein knorpeliges Skelett, das anschließend in ein kalzifiziertes Skelett transformiert wird (Erlebacher et al., 1995; Kornak und Mundlos, 2003).

Der Tgf- β -/Bmp-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Kondensierung und Differenzierung der Vorläuferzellen zu Chondrozyten. Komponenten dieser Signalwege sind an der transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt, die für die Knorpel- und Knochenbildung verantwortlich sind. So führt die Überexpression von *Bmp2* und *Bmp4* in Hühnerembryonen zu einer Zunahme der Größe und Form von Skelettelementen (Kornak und Mundlos, 2003). Ähnliche Effekte konnten nach der Überexpression des konstitutiv aktiven BmpR-IB-Rezeptors beobachtet werden. Dagegen führt die Expression einer dominant negativ verkürzten Form des Rezeptors zum gegenteiligen Effekt (Zou et al. 1997).

Auch Fgf-Signale spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Chondrozytenproliferation und -differenzierung. Außerdem sind sie an der Knochenbildung *in vitro* und *in vivo* beteiligt (Kornak und Mundlos, 2003).

1.4.2 Die Gliedmaßenentwicklung

Die Gliedmaßenentwicklung der Vertebraten ist ein hoch komplexer Prozess, an dem viele verschiedene Signalwege in zeitlichen und räumlichen (Rückkopplungs-) Netzwerken beteiligt sind (Tickle, 2006; Zeller et al., 2009). Sie beginnt mit einer kontinuierlichen, lokalen Proliferation des lateralen Plattenmesoderms an der Stelle des Embryos, an der sich die spätere Gliedmaße befinden wird. Dadurch entsteht dort die sogenannte Gliedmaßenknospe. Die Expression von *Fgf8* und *Fgf10* im intermediären Mesoderm auf

Höhe der sich entwickelnden Gliedmaßen führt sowohl zur Initiation der Gliedmaßenknospung als auch zur Induktion der *Fgf8* Expression in dem darüberliegenden Oberflächenektoderm, welches die AER (apikale Ektodermleiste) bildet (Crossley und Martin, 1995; Crossley et al., 1996; Vogel et al., 1996; Ohuchi et al., 1997). Fgf Signale (*Fgf2*, -4 und -8) aus der AER, an der distalen Spitze der Gliedmaßenknospe, regulieren das Auswachsen und die Musterbildung entlang der proximo-distalen Achse (Hinchliffe und Johnson, 1982; Cohn und Tickle, 1996; Tickle, 2006; Zeller et al., 2009). In Experimenten, in denen die AER entfernt und an dessen Stelle *Fgf4* und *Fgf8* beschichtete Kugeln transplantiert wurden, konnten gezeigt werden, dass diese die Funktion der AER übernehmen können (Niswander et al., 1993; Cohn et al., 1995; Makarenkova und Patel, 1999).

Auch Mitglieder der Bmp-Familie sind an der Kontrolle der Musterbildung, des Wachstums, der Apoptose in den interdigitalen Regionen und der Knochenbildung der Gliedmaßen beteiligt. Zum Beispiel werden *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp7* in der AER exprimiert. Dort kontrollieren sie u.a. das Auswachsen der Gliedmaße durch Proliferation von Mesenchymzellen, mittels Antagonisierung der mitogenen Aktivität der Fgfs (Lyons et al., 1990, 1995; Jones et al., 1991; Niswander und Martin, 1993; Francis et al., 1994; Hogan, 1996).

Die antero-posteriore Musterbildung der Vertebratengliedmaße wird durch die *Shh*-Expression in der ZPA (Zone polarisierender Aktivität), eine Gruppe von Mesenchymzellen am posterioren Rand der Gliedmaßenknospe, kontrolliert (Chiang et al., 1996, 2001; Kraus et al., 2001; Riddle et al., 1993). *Shh* übernimmt dabei eine besonders wichtige Funktion in der Spezifizierung der Anzahl und der Identität der Zehen (Tickle, 2006; Zeller et al., 2009). *Shh* wird in der ZPA exprimiert und diffundiert in einem abnehmenden Gradienten nach anterior. Untersuchungen in Maus- und Hühnerembryonen konnten zeigen, dass die Bildung des ersten, am meisten anterior gelegenen Zehs, unabhängig von *Shh* ist. Wie in der Abbildung 1.3 schematisch dargestellt wird die Bildung des zweiten und teilweise des dritten Zehs auf parakrine Art und Weise durch eine niedrige *Shh*-Konzentration spezifiziert. Zum Teil der dritte, und der vierte und fünfte Zeh entstehen aus Abkömmlingen der Zellen aus der ZPA und sind abhängig vom autokrinen *Shh*-Signal (Harfe et al., 2004; Scherz et al., 2007).

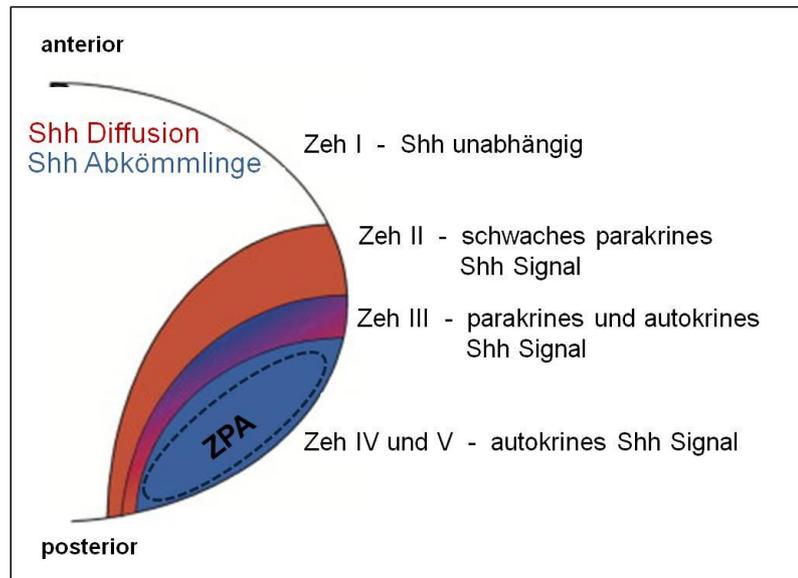


Abb. 1.3: Spezifizierung der Zehenidentitäten.

Ein Shh-Gradient in der Gliedmaßenknospe kontrolliert die Spezifizierung der Zehenidentitäten. Der vierte und fünfte Zeh entstehen im Bereich der ZPA, wo die Shh-Konzentration am höchsten ist, abhängig vom autokrinen Shh-Signal. Die Bildung des dritten Zeh wird zu einem Teil von dem autokrinen und zum anderen Teil von dem parakrinen Shh-Signal reguliert. Der zweite Zeh bildet sich dort, wo ein schwaches parakrines Shh-Signal vorherrscht und die Entwicklung des ersten Zeh ist unabhängig von Shh und entsteht in der anterioren Gliedmaßenknospe, wo kein Shh-Signal mehr vorhanden (Abb. ist modifiziert nach Harfe et al., 2004).

Die ektopische Expression von Shh in der anterioren Gliedmaßenknospe resultiert in einer Zehenduplikation (Riddle et al., 1993; Lopez-Martinez et al., 1995). Im Gegensatz dazu führt der vollständige Verlust der Shh-Aktivität in *Shh*^{-/-}-Mausembryonen zu schweren Entwicklungsdefekten in der gesamten Gliedmaße, einschließlich dem kompletten Zehenverlust, bis auf eine einzelne erste Zehe in den Hintergliedmaßen (Chiang et al., 2001; Litingtung et al., 2002).

Genetische Interaktionsstudien zeigten, dass der Effekt, von Shh auf die Musterbildung der Gliedmaße, durch die Regulation der Gli3-Aktivität ausgeübt wird (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002(b)). Wie in Abschnitt 1.3.1.2 bereits erläutert wird Gli3 in Abwesenheit des Shh-Proteins in die verkürzte Gli3-Repressor-Isoform prozessiert. Bedingt durch die Shh-Expression in der ZPA entsteht in der Gliedmaßenknospe ein Gli3-FL:Gli3-R Gradient mit der höchsten Gli3-R-Konzentration in der anterioren Gliedmaßenknospe und der niedrigsten Konzentration in der posterioren Region (Wang et al., 2000, 2007; Litingtung et al., 2002; Tickle, 2006; Zeller et al., 2009). In den Gliedmaßenknospen von *Shh*^{-/-}-Mäusen ist in der posterioren Region eine ähnliche Gli3-R-Konzentration zu beobachten wie in der anterioren Region. Damit lässt sich der Verlust der Zehen in den *Shh*^{-/-}-Mäusen durch einen Überschuss

an GLI3-R erklären (Litingtung et al., 2002). *Gli3*-defiziente Mäuse und *Gli3^{-/-};Shh^{-/-}*-Doppelmutanten weisen sechs bis acht Zehen ohne klare Identität an allen vier Gliedmaßen auf. Dies verdeutlicht eine der wichtigsten Aufgaben des *Shh* während der Gliedmaßenentwicklung, welche darin besteht die Prozessierung des Gli3-Proteins zu inhibieren (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002).

Neben den *Gli*-Genen sind auch die *Hox*-Gene, besonders die der *Hoxd*-Gruppe, Zielgene des *Shh*-Signals aus der ZPA (Laufer et al., 1994; Masuya et al., 1995; Büscher und Rüther, 1998; Theil et al., 1999). Zudem sind bestimmte *Hoxd*-Gene an der positiven Rückkopplungsreaktion in Verbindung mit dem Fgf-Signal aus der AER, zur Verstärkung des *Shh*-Signals in der ZPA beteiligt. *Shh* ist ein direktes Zielgen von *Hoxd-12* und die Fehlexpression von *Hoxd-12* kann eine ektoische *Shh*-Expression und eine Finger- bzw. Zehen-Duplikationen hervorbringen (Knezevic et al., 1997). Außerdem führt die Transplantation einer ektoischen ZPA zu duplizierten *Hoxd*-Expressionsdomänen und Skelettduplikationen (Izpisua-Belmonte und Duboule, 1992).

Die Musterbildung der dorso-ventralen Achse der Gliedmaßenknospe wird durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Engrailed-1 (En-1)* und dem Glykoprotein *Wnt-7a* reguliert. *En-1* wird im ventralen Mesoderm der Gliedmaßenknospe exprimiert und inhibiert in diesem Bereich die Expression von *Wnt-7a*. Dadurch wird *Wnt7a* ausschließlich im dorsalen Ektoderm exprimiert. Dort induziert es die darunterliegenden Mesenchymzellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Lmx1b*, was die dorsale Polarität der Gliedmaßenknospe bestimmt (Parr und McMahon, 1995; Yang und Niswander, 1995; Riddel et al., 1995; Vogel et al., 1995).

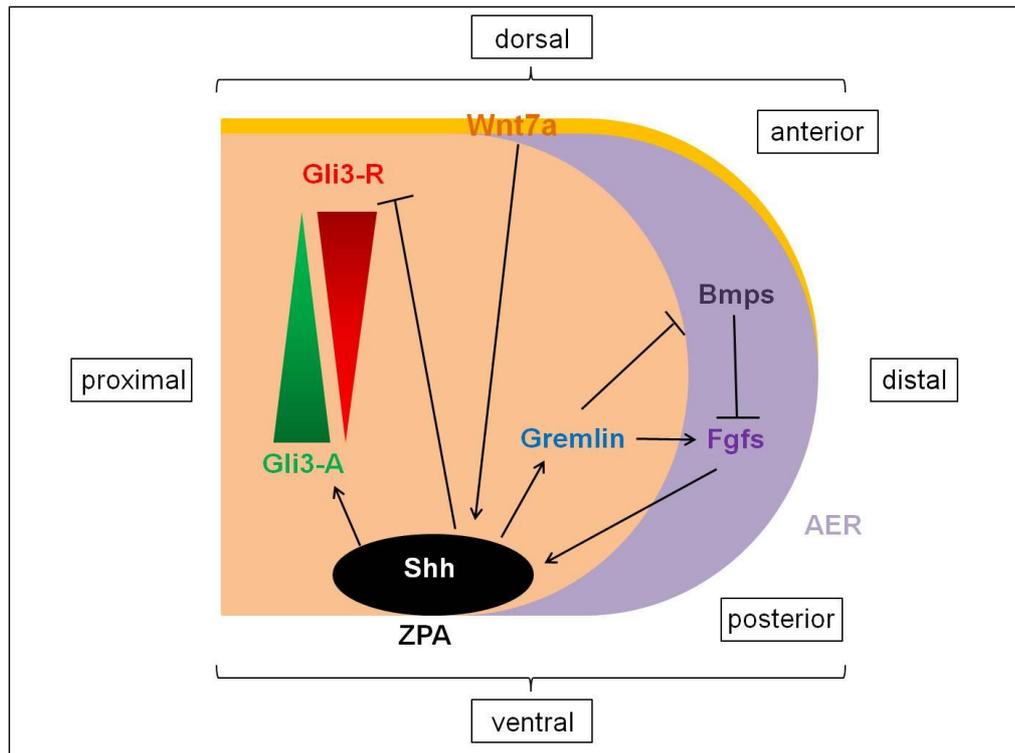


Abb. 1.4: Übersicht der Gliedmaßenentwicklung entlang der verschiedenen Achsen.

Die antero-posteriore Achse wird durch das Shh-Signal aus der ZPA, die proximo-distale Achse durch Fgf-Signale aus der AER und die dorso-ventrale Achse durch das Wnt7a-Signal aus dem dorsalen Ektoderm reguliert. Dabei spielen eine Reihe von positiven Rückkopplungsreaktionen eine wichtige Rolle. Die Etablierung der ZPA (und der Shh-Expression) erfolgt durch Fgf-Signale aus der AER. Die Fgf-Expression in der AER wird wiederum über die Shh-vermittelte Aktivierung von Gremlin induziert. Die Aktivierung von Gremlin resultiert in der Inhibition der Bmp-Signale und Induktion der Fgf-Signale in der AER. Die Wnt7a-Expression ist für die Aufrechterhaltung des Shh-Signals verantwortlich, welches die Prozessierung von Gli3 in die Repressorform verhindert. Dadurch wird ein Gradient von Gli3-A und Gli3-R in der Gliedmaßenknospe erzeugt.

Zusammenfassend wird die Gliedmaßenentwicklung entlang der verschiedenen Achsen durch eine Reihe von Rückkopplungsreaktionen koordiniert (siehe Abb. 1.4). Dazu zählen zum Einen die Etablierung der ZPA (Shh-Expression) durch Fgf-Signale aus der AER und die Induktion der Fgf-Expression in der AER durch das Shh-Signal aus der ZPA. Diese Induktion geschieht durch die Shh-vermittelte Aktivierung von Gremlin, einem Bmp-Antagonisten. Gremlin inhibiert die Bmp-Expression in der AER, wodurch die Fgf-Expression induziert wird. Zum Anderen führt die Wnt7a-Expression im dorsalen Ektoderm zur Aufrechterhaltung der Shh-Expression in der ZPA, welche wiederum die Prozessierung der Gli3-Repressorform verhindert. Dadurch wird ein Gradient von Gli3-Aktivator und Gli3-Repressor in der Gliedmaßenknospe erzeugt (Tickle, 2006; Zeller et al., 2009).

1.4.2.1 Die präaxiale Polydaktylie

Die Polydaktylie, oder Mehrfingrigkeit, resultiert aus einer fehlerhaften Musterbildung der antero-posterioren Achse der sich entwickelnden Gliedmaße. Die Polydaktylie kann als einzelne isolierte Missbildung oder als Teil eines Syndroms auftreten und wird in den meisten Fällen als autosomal dominantes Merkmal vererbt (Biesecker, 2011). Entsprechend der anatomischen Lokalisation, kann die Polydaktylie in die prä- und postaxiale Form unterteilt werden (Zguricasa et al., 1998). Die präaxiale Polydaktylie (PPD), gekennzeichnet durch extra Finger oder Zehen an der anterioren Seite der Hände bzw. Füße, ist eine angeborene Anomalie in der humanen Population und ist in etwa einer von 2000 Lebendgeburten zu beobachten (Hill, 2007). Die PPD kann in vier Typen unterteilt werden. Die präaxiale Polydaktylie Typ I (PPD-I), auch Daumenpolydaktylie genannt, bezeichnet die Duplikation von einem oder mehreren Skelettelementen des biphalangealen ersten Fingers/Zehs. Die präaxiale Polydaktylie Typ II (PPD-II) ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines zusätzlichen triphalangealen Fingers/Zehs. Die präaxiale Polydaktylie Typ III (PPD-III) bezeichnet die Polydaktylie des zweiten Fingers/Zehs und bei der präaxialen Polydaktylie Typ-IV (PPD-IV) handelt es sich um eine Polysyndaktylie, in der es zusätzlich zur Mehrfingrigkeit auch zu Verwachsungen der Finger/Zehen kommt (Temtamy und McKusick, 1978). In der Maus sind Mutationen in verschiedenen Genen bekannt, die in einer PPD resultieren. Ein gemeinsames Merkmal dieser Mutanten ist die Bildung eines anterioren ektopischen Shh-Signalzentrums, das zur Expression von normal posterior begrenzten Genen und dadurch zur Bildung von extra Zehen führt (Hill, 2007). Unter den Genen, dessen Mutation eine PPD ausbildet gehören unter anderem *Gli3* (*Extra-toes*), *Alx4* (*Strong's luxoid*) und *Bmp4*. Heterozygote *Gli3*-Mäuse zeigen eine milde PPD, während die Gliedmaßen der homozygoten *Gli3*-Embryonen eine schwere Polydaktylie mit totalem Verlust der Finger-/Zehenidentitäten aufweisen. Mäuse, die homozygot für die *Alx4* Mutation sind weisen an allen vier Gliedmaßen eine PPD auf, wohingegen der Phänotyp der heterozygoten *Alx4*-Mäuse unauffällig ist. Der vollständige Verlust von *Bmp4* führt in Mäusen zur embryonalen Letalität, schon bevor die Gliedmaßen ausgebildet werden. Etwa ein Viertel der *Bmp4* heterozygoten Mäuse sterben kurz nach der Geburt, jedoch ist bei einem Teil der Überlebenden eine PPD, ausschließlich an der rechten Hintergliedmaße, zu beobachten (Hui und Joyner, 1993; Dunn et al., 1997; Qu et al., 1997).

1.4.3 Die Lungenentwicklung

Obwohl sie letztendlich zwei sehr verschiedene Funktionen ausüben, entsteht das respiratorische System (Luftröhre und Lunge) und das anteriore Verdauungs-System (Speiseröhre und Magen) aus einem gemeinsamen Darmrohr (Warburton et al., 2000; Cardoso und Lu, 2006; Morrisey und Hogan, 2010; Qu et al., 2006). Die Lungenentwicklung in der Maus beginnt am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung und ist erst 30 Tage nach der Geburt (P30) beendet. Wie auch in der Abbildung 1.5 dargestellt, kann sie in fünf verschiedene Phasen unterteilt werden: die embryonale (E9.5-E12.5), die pseudoglanduläre (E12.5-E16.5), die kanalikuläre (E16.5-E17.5), die sakkuläre (E17.5-P5) und die alveoläre (P5-P30) Phase (Perl et al., 2002; Ten Have-Opbroek, 1991; Wert et al., 1993).

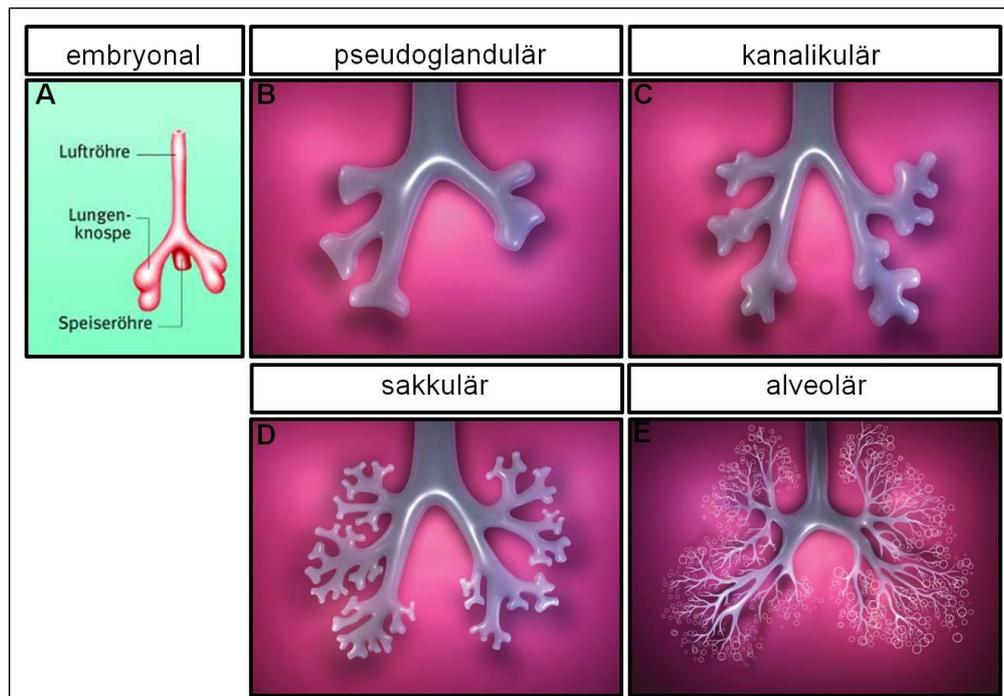


Abb. 1.5: Die Lungenentwicklung der Vertebraten.

Die Lungenentwicklung der Vertebraten ist in fünf Entwicklungsphasen gegliedert. Die embryonale Phase, in der aus dem Endoderm des Darmrohres zwei Lungenknospen auswachsen (A), die pseudoglanduläre Phase, in der das Wachstum von ständig wiederholenden Verzweigungen beginnt und zur Bildung des Lungenbaumes führen (B), die kanalikuläre Phase, in der die Bronchioli respiratorii, die Alveolargänge und primitive Alveolen gebildet werden (C), die sakkuläre Phase, in der die Bildung der Alveolarsäckchen (Sacculi) erfolgt (D) und die alveoläre Phase, in der sich die Alveolen ausbilden (E)(Abb. modifiziert nach Internet-Quellen Nr.2 und Nr.3).

Die Lungenentwicklung beginnt, indem zwei Lungenknospen aus dem Endoderm des Darmrohrs entspringen und sich in das umgebende Mesenchym ausdehnen. Am Tag E10.5 beginnen die Lungenknospen mit einer Serie von ständig wiederholenden Verzweigungen, aus denen letztendlich der sogenannte Lungenbaum hervorgeht. In dieser Phase gibt es noch keine Bronchioli respiratorii oder Alveolen. Während der kanalikulären Phase werden die azinösen Strukturen, wie Bronchioli respiratorii, die Alveolargänge und primitive Alveolen, gebildet. In der sakkulären Phase bilden sich an den Enden des Lungenbaumes aus den Alveolargängen glattwandige Alveolarsäckchen (Sacculi). Wie dem Namen zu entnehmen entstehen in der alveolären und letzten Phase der Lungenentwicklung die Alveolen (Warburton et al., 2000; Zhang et al., 2010; Internet-Quelle Nr.1).

1.4.3.1 Signalmoleküle in der Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung ist ein komplexer Prozess, der die morphogenetische Verzweigung des Epithels, die Vaskulogenese, die zelluläre Differenzierung, die biochemische Reifung und das physikalische Wachstum einschließt. Alle diese Prozesse werden über verschiedenste Signalkaskaden reguliert, an denen Mitglieder der Fgf-, Bmp-, Hedgehog-, Wnt- und Egf-Proteine beteiligt sind (Warburton und Olver, 1997; Hogan, 1999; Warburton et al., 2000; Yu et al., 2004). Die Morphogenese und Musterbildung der Lunge ist abhängig von interaktiven Signalen zwischen dem endodermalen Epithel und dem Mesenchym, das von dem umgebenden Mesoderm gebildet wird. Das Lungenmesenchym bildet viele verschiedene Zelltypen aus, wie zum Beispiel die glatten Muskelzellen der oberen Atemwege, und produziert viele wichtige Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle, wie Mitglieder der Fgf-Familie, die für die morphogenetischen Verzweigungen des Epithels und die Entwicklung der Atemwege notwendig sind (Warburton et al., 2000, 2005; Morrisey und Hogan 2010). Das Epithel wiederum produziert Signalmoleküle, die für die mesenchymale Proliferation und Differenzierung notwendig sind, einschließlich Shh und Bmp4 (Bellusci et al., 1996, 1997a,b; Litingtung et al, 1998; Pepicelli et al., 1998). Die Überexpression von *Bmp4* führt zu Defekten in der morphogenetischen Entwicklung der Lunge, einschließlich der Bildung von Zysten und der Inhibition der epithelialen Proliferation (Bellusci et al., 1996). Im Gegensatz dazu, resultiert die Überexpression des Bmp-Antagonisten Noggin oder des dominant

negativen Bmp-Rezeptors *Bmpr-IB* zu einer Blockade des Bmp-Signals. Die Lungen dieser transgenen Mäuse weisen distal eine reduzierte Anzahl von Epithelzellen auf und proximal eine gesteigerte Anzahl von Zellen (Weaver et al., 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass die Bmp-Rezeptoren ActR-IA, *Bmpr-IA* und *Bmpr-IB* eine essentielle Rolle in der Übermittlung des regulatorischen Bmp-Signals während der pränatalen Lungenentwicklung in Mäusen spielen (Eblaghie et al., 2006; Sun et al., 2008; Xu et al., 2011).

Auch für die Shh-Signalkaskade konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sie eine zentrale Rolle in der Lungenentwicklung der Vertebraten übernimmt (Pepicelli et al., 1998; Miller et al., 2001; Bellusci et al., 1997a). Der Verlust der Shh-Funktion führt zu schweren Lungendefekten, wie Hypoplasie und Verlust der Lungenasymmetrie und der morphogenetischen Verzweigungen (Litingtung et al., 1998; Pepicelli et al., 1998). Hingegen resultiert eine Überexpression von Shh im distalen Lungenepithel zum Verlust von funktionsfähigen Alveolen und der Zunahme von interstitialen Gewebe durch gesteigerte Proliferation von Epithel- und Mesenchymzellen. Die Embryonen sterben meist innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt, vermutlich aufgrund von Atemnot (Bellusci et al., 1997a). Wie auch in der Gliedmaßenentwicklung reguliert Shh während der Lungenentwicklung die Transkription der *Gli*-Gene, insbesondere die von *Gli1* und *Gli3* (Litingtung et al., 1998; Pepicelli et al., 1998; Ruiz, 1999). Alle drei *Gli*-Gene werden während der pseudoglandulären Phase im Mesenchym der Lunge exprimiert und Mutationen in diesen führen zu Lungen- und Darmrohrdefekten (Grindley et al., 1997; van Tuyl und Post, 2000).

Während *Gli1*^{-/-}-Mäuse einen scheinbar unveränderten Phänotypen aufweisen (Park et al., 2000), zeigen die Lungen der *Gli3*^{-/-}-Embryonen Wachstumsdefekte mit ausgeprägter Längenreduktion des linken Flügels (Grindley et al., 1997).

Im Vergleich zu den *Shh*^{-/-}-Lungen sind die Lungen von *Shh*^{-/-};*Gli3*^{-/-}-Doppelmutanten größer, haben mehr Epithelknospen, jedoch mit kleineren Lumen, und ein dichteres Mesenchym. Li und seine Kollegen begründen das damit, dass durch die erhöhte Gli3-Repressor Konzentration in den *Shh*^{-/-} Lungen das Wachstum supprimiert wird. So ist in den Lungen, denen sowohl die Shh- als auch die Gli3-Aktivität fehlt eine gesteigerte Proliferation zu beobachten (Li et al., 2004).

Generell kann die Störung des normalen Prozesses der Lungenentwicklung bei starken Veränderungen zu neonatalen Defekten oder Luftnot führen oder bei mildereren Veränderungen

zu einer erhöhten Anfälligkeit für Lungenerkrankungen im späteren Leben (Warburton et al., 2006).

1.5 Das *Fto*-Gen

Das *Fat mass and obesity associated (Fto)*- Gen wurde in den neunziger Jahren während Forschungsarbeiten an der sogenannten *Fused-toes* Mausmutante (*Ft*) entdeckt. Dieser Name geht aus dem *Ft*/+-Phänotyp hervor, der eine Fusion der Zehen 1-4 aufweist. Mausembryonen, die homozygot für die *Ft*-Mutation sind zeigen kraniofaziale Missbildungen, Defekte in der Rechts-Links-Asymmetrie und sind embryonal letal (~E10.5) (van der Hoeven et al., 1994). Die Ursache ist eine 1,6 Mb umfassende Deletion in der Region D des Mauschromosoms 8. *Fto* konnte als eins der insgesamt sechs von dieser Deletion betroffenen Gene identifiziert werden. Die fünf anderen Gene sind *Fts*, *Ftm*, *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* (Peters et al., 1999, 2002). Mit 250 Kb ist *Fto* das größte dieser sechs Gene. Der kodierende Bereich des *Fto*-Gens besteht aus 1506 Basenpaaren und kodiert für das 58 kDa große *Fto*-Protein. Dieses besitzt eine zweiteilige Zellkernlokalisierungssequenz (NLS) und zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster in Mausembryonen und adulten Mäusen. Das murine *Fto*-Gen ist zu 85% homolog mit dem humanen *FTO*-Gen auf dem Chromosom 16. Es ist unter den Vertebraten und Algen hoch konserviert, aber nicht vorhanden in Invertebraten, Pilzen und Grünpflanzen (Peters et al., 1999, Peters, 2002; Frayling et al., 2007, Gerken et al., 2007, Robbens et al., 2008).

In verschiedenen, unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien (*Genome-Wide Association Studies*; GWAS) konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen Polymorphismen im ersten Intron des humanen *FTO*-Gens und dem Body Mass Index (BMI) identifiziert werden (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Scott et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Individuen, die homozygot für das Risikoallel sind wiegen durchschnittlich 3-4 kg mehr und haben ein 1,67-fach erhöhtes Risiko an Adipositas zu erkranken, verglichen mit Individuen, die das Risikoallel nicht geerbt haben. Durch darauffolgende Studien konnte der Zusammenhang von *FTO*, dem BMI und dem erhöhten Risiko für Übergewicht und Adipositas verfestigt werden. *FTO* Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*; SNPs) konnten mit verschiedenen Merkmalen der Adipositas assoziiert

werden, wie dem Körpergewicht, dem Leptinspiegel, der subkutanen Fettleibigkeit, der Fettmasse und dem Hüft- und Bauchumfang (Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007; Andreasen et al., 2008; Peeters et al., 2008). Der Einfluss von FTO auf den Körperbau und das Risiko von Übergewicht und Adipositas ist bereits im Kindesalter zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Gewicht noch unauffällig, aber bereits zwei Wochen später kann eine Verbindung zwischen den *FTO* SNPs und einem erhöhten Körpergewicht festgestellt werden (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Andreasen et al., 2008; López-Bermejo et al., 2008)

Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription der *Fto*-mRNA abhängig ist vom Futterstatus der Maus. Mit Hilfe von Expressionsstudien in Mäusen wurde gezeigt, dass die *Fto* mRNA im Nucleus arcuatus (ein Kern des Hypothalamus) nach dem Fressen hochreguliert und nach dem Fasten reduziert ist (Gerken et al., 2007; Stratigopoulos et al., 2008). Jedoch wurde in Ratten ein entgegengesetztes Expressionsmuster beobachtet (Fredriksson et al., 2008). Andere Studien zeigten, dass FTO einen Effekt auf die zerebrokortikale Insulinsensitivität hat, weil Individuen, die homozygot für das Risikoallel sind im Gehirn eine reduzierte Insulinantwort aufweisen (Tschritter et al., 2007). Wiederum andere Analysen ließen FTO eine periphere Rolle zukommen, dadurch dass die *FTO* mRNA im Fettgewebe von gesunden Frauen mit dem BMI ansteigt und dass Träger des Risikoallels, unabhängig vom BMI, eine reduzierte Lipolyse-Aktivität zeigen (Wahlen et al., 2007). In Männern mittleren Alters mit dem AA Risikoallel wurde im Zuge von GWAS ein reduzierter Plasma-HDL (*High Density Lipoprotein*)-Cholesterol-Spiegel beobachtet, verglichen mit nicht Risikoallel-Trägern (TT) (Kring et al., 2008). Das HDL wird auch als „gutes Cholesterol“ bezeichnet, da es vor der Entstehung einer Arteriosklerose schützt, im Gegensatz zum LDL (*Low Density Lipoprotein*)-Cholesterol, das die Entstehung einer Arteriosklerose fördert.

1.5.1 Die *Fto*-Mausmutante

Die *Fto*-Mausmutante wurde durch die Inaktivierung des sogenannten *Fat mass and obesity associated* Gens (*Fto*) generiert. Durch das Ersetzen von Exons 2 und 3 des *Fto*-Gens durch eine Neomycinkassette wurde diese Gen-Inaktivierungs-Mutante im Institut für Entwicklungs-

und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert und charakterisiert (Fischer et al., 2009). Mäuse, die homozygot für diese Mutation sind ($Fto^{-/-}$) zeigen ab dem zweiten Tag nach der Geburt eine signifikante Wachstumsretardation. Nach sechs Wochen wiegen die $Fto^{-/-}$ -Mäuse durchschnittlich 30-40% weniger als ihre wildtypischen Geschwister ($Fto^{+/+}$), während die Fto -heterozygot mutanten Mäuse ($Fto^{+/-}$) keine signifikante Veränderung, verglichen mit den $Fto^{+/+}$ -Mäusen aufweisen. Mit Hilfe von MRI (magnetic resonance imaging) Analysen wurde gezeigt, dass die $Fto^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen signifikant weniger Fettmasse besitzen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde in den $Fto^{-/-}$ -Mäusen eine Reduktion des weißen Fettgewebes (*white adipose tissue*; WAT) festgestellt, ein Merkmal, dass sich mit dem Alter immer deutlicher ausprägt. Im Alter von etwa 15 Monaten ist in den $Fto^{-/-}$ -Mäusen kein WAT mehr vorzufinden. Zudem konnte eine Reduktion der Adipozytengröße in den $Fto^{-/-}$ -Mäusen gezeigt werden. Nach einer zwölfwöchigen kalorienreichen Diät (*high fat diet*; HFD) konnte sowohl in den $Fto^{-/-}$ - als auch in den $Fto^{+/-}$ -Männchen im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Männchen eine signifikant reduzierte Gewichtszunahme und signifikant weniger WAT-Anreicherung beobachtet werden. Wie aufgrund der reduzierten Fettmenge zu erwarten, wurde in den $Fto^{-/-}$ -Mäusen eine erniedrigte Serum-Leptin-Konzentration und erhöhte Adiponektin-Konzentration gemessen. Weitere Untersuchungen zur Futteraufnahme ergaben, dass die $Fto^{-/-}$ -Mäuse die gleiche Futtermenge aufnehmen wie ihre wildtypischen Geschwister, aber bezogen auf das Körpergewicht zeigen sie eine Hyperphagie. Durch kalorimetrische Analysen wurde gezeigt, dass die $Fto^{-/-}$ -Mäuse mehr Sauerstoff verbrauchen, mehr Kohlendioxid produzieren und mehr Wärme erzeugen als ihre wildtypischen Geschwister. Daraus wurde geschlossen, dass der schlanke Phänotyp der $Fto^{-/-}$ -Mäuse aus dem erhöhten Energieumsatz resultiert. Allerdings wurde auch eine reduzierte Bewegungsaktivität und signifikant erhöhte Konzentration von zirkulierendem Plasma-Adrenalin und -Noradrenalin gemessen.

Allgemein lässt sich über die Fto -Mausmutante sagen, dass die Inaktivierung des Fto -Gens vor Fettleibigkeit schützt. Die Resultate der Charakterisierung der Fto -Mausmutante lassen darauf schließen, dass Fto eine Rolle in der Wachstumsregulierung und dem Energiehaushalt spielt. Die genaue Funktion von Fto , welche nach Inaktivierung zu dem hier beschriebenen Phänotypen führt, bleibt jedoch unklar.

Es ist beschrieben, dass die $Fto^{-/-}$ -Embryonen im erwarteten Mendel-Verhältnis geboren werden und im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen keinen auffällig veränderten

embryonalen Phänotyp zeigen (Fischer et al., 2009). Jedoch gab es in den letzten Jahren vermehrt Hinweise auf einen embryonal veränderten Phänotypen und eine erhöhte Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse. Dieser Verdacht und aufklärende Analysen werden im Ergebnisteil dieser Arbeit im Detail erläutert.

1.5.2 Die Funktion von FTO

FTO ist ein Mitglied der nicht-Häm Eisen(II)- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase-Superfamilie und katalysiert oxidativ die Demethylierung von m³T (3-Methylthymin) und m³U (3-Methyluracil) in einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA (ssRNA). Die Kristallstruktur des FTO weist eine Schleife auf, die als Basis für seine Priorität für einzelsträngige Nukleinsäuren als Substrat dient. Neueste Studien konnten aufdecken, dass das FTO eine m⁶A (N⁶-Methyladenosin)-RNA-Demethylase ist. Die Reduktion der FTO-Expression in HeLa und 293FT Zellen führt zu einem Anstieg von m⁶A in der RNA, und die Überexpression zu einer Reduktion von m⁶A. Das FTO- Protein ist zum Teil in sogenannten „Kernflecken“ (nuclear speckles) lokalisiert, in denen sich vermutlich auch eine Methyltransferase befindet. Es wird vermutet, dass FTO und die Methyltransferase den dynamischen Methylierungsstatus der mRNA koordinativ regulieren (Gerken et al., 2007; Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007; Jia et al., 2008,2011).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die bisherige Charakterisierung der *Fto*-Mausmutante hat ergeben, dass *Fto* an der Regulation des Wachstums und des Energiehaushaltes beteiligt ist. Zuletzt konnten jedoch auch immer häufiger Beobachtungen gemacht werden, die auf einen veränderten embryonalen Phänotyp der *Fto*^{-/-}-Mäuse hinweisen. Es bestand unter anderem der Verdacht, dass die *Fto*^{-/-}-Mäuse zum Zeitpunkt des Absetzens, im Alter von etwa drei Wochen, unterrepräsentiert sind. Diese Vermutung sollte statistisch analysiert werden und durch Untersuchungen zu verschiedenen embryonalen und postnatalen Stadien der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die *Fto*^{-/-}-Mäuse versterben. Anschließend sollte durch verschiedene morphologische, histologische und molekulare Analysen die Ursache für die Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse untersucht werden. Neben diesen Analysen sollten außerdem, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, Interaktionspartner des *Fto* Proteins identifiziert werden. Die Funktionen und Kenntnisse der dadurch identifizierten Interaktionspartner sollten zur Aufklärung der Funktion von *Fto* beitragen.

2 Material & Methoden

Für die, in dieser Arbeit durchgeführten, Methoden wurden, soweit nicht anders erwähnt, Chemikalien der Firmen Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (NEB) (Schwalbach, Deutschland), Promega (Heidelberg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet. Zu jeder Methode ist eine Liste der verwendeten Lösungen angegeben.

2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.1.1.1 DNA-Isolation aus Schwanzspitzen

Zur Bestimmung der Genotypen wurde den Mäusen ein Stück der Schwanzspitze abgetrennt und aus dieser zunächst die DNA-isoliert. Dafür wurden 750 µl Dottersackpuffer und 35 µl Proteinase K zu der Schwanzspitze gegeben. Zur Zersetzung des Gewebes, wurde dieses Gemisch über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 250 µl gesättigte NaCl-Lösung, kurzem Invertieren und einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415). Anschließend wurden 750 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und für 10 min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und die sedimentierte ausgefällte DNA durch die Zugabe von 500 µl 70 % Ethanol und erneuter Zentrifugation (5 min., 13000 Upm) gewaschen. Abschließend wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und die DNA in 100 µl dH₂O rückgelöst.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in dH ₂ O	
Dotterackpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	
	100 mM EDTA	
	100 mM NaCl	
	1% SDS (w/v)	
Isopropanol	abs.	
NaCl-Lsg. gesättigt	> 6 M	
Proteinase K	10 mg/ml	Roche #100014

2.1.1.2 Plasmid-Mini-Isolation (aus *E.coli*)

Mit autoklavierten Pipettenspitzen wurden auf Selektionsplatten gewachsene Bakterienkolonien gepickt und in jeweils 5 ml Selektionsmedium gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Rundschtüttler bei 37°C. Am folgenden Tag wurden 1,5 ml der angeschüttelten Bakterienkulturen in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 min. bei 6000 Upm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 150 µl eiskaltem Puffer P1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 µl Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren wurden die Bakterien alkalisch lysiert. Die anschließende Neutralisation der Proben erfolgte durch die Zugabe von 175 µl Puffer P3 und starkem schütteln. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min. bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D). Der entstandene klare plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens (350 µl) Isopropanol. Nach erneuter Zentrifugation (10 min., 13000 Upm, Eppendorf Centrifuge 5415D) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, der Niederschlag mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 min., 13000 Upm, Eppendorf Zentrifuge 5415D). Abschließend wurde der Überstand gut abgesaugt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 30-50 µl dH₂O rückgelöst. Zur Kontrolle, ob das gewünschte spezifische Plasmid isoliert wurde, wurde ein restriktionsenzymatischer Verdau (siehe 2.1.3) und eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 2.1.4) durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wurde die Bakterienkultur, von welcher die Mini-Präparation angefertigt worden war, zur Animpfung einer Kultur für anschließende Midi- Präparation (siehe 2.1.1.3) verwendet.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in dH ₂ O	
Isopropanol	abs.	
LB-Medium	1 % (w/v) NaCl	
	1 % (w/v) Trypton	Applichem #A1553
	in dH ₂ O	
	autoklaviert	
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 Kaliumacetat	
	pH 4,8 mit Eisessig	
Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin	Applichem #A0839
	in LB-Medium	

2.1.1.3 Plasmid-Midi-Isolation (aus *E.coli*)

Zur Gewinnung größerer und reinerer Plasmid-DNA-Mengen (bis 100 µg) wurde das Plasmid-Midi-Kit der Qiagen GmbH (#12145) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Plasmid-Midi-Isolation wurde mit etwa 2 ml der Bakteriensuspension der Plasmid-Mini-Isolation eine 100 ml Kultur (Selektionsmedium) angeimpft und über Nacht auf dem Plattformschüttler (170 Upm) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 15 min. bei 6000 Upm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder bei -20°C eingefroren, oder direkt weiterverarbeitet und in 4 ml eiskaltem Puffer P1 mit einer Glaspipette resuspendiert. Nach der Lyse durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren wurde die Probe 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte anschließend durch die Zugabe von 4 ml eiskaltem Puffer P3, starkem Schütteln und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Lösung 30 min. bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R). Währenddessen wurde eine Qiagen-tip-100-Säule durch die Zugabe von 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über einen Faltenfilter in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend langsam auf die äquilibrierte Säule gegeben. Nachdem der gesamte Überstand die Säule passiert hatte, wurde die sich nun in der Säulenmembran befindende DNA 2x mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer auf die Säule erfolgte die Elution der DNA. Das Eluat wurde in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen und für die Präzipitation der Plasmid-DNA wurde das 0,7-fache

Volumen (3,5 ml) Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 6000 Upm und 4°C (Heraeus, Megafuge 1.0R). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 2 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min., 6000 Upm, 4°C) (Heraeus, Megafuge 1.0R) wurde der Überstand gut abgesaugt und das Pellet (Plasmid-DNA) nach dem Lufttrocknen in 30 µl dH₂O rückgelöst. Die Qualität der gewonnenen Plasmid-DNA wurde restriktionsenzymatisch (siehe 2.1.3) und gelelektrophoretisch (siehe 2.1.4) analysiert und deren Konzentration spektralphotometrisch (siehe 2.1.2) bestimmt.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in dH ₂ O	
Isopropanol	abs.	
LB-Medium	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Trypton in dH ₂ O autoklaviert	
Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium	Applichem #A0839

2.1.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in dieser Arbeit, nach einem Restriktionsverdau, zur Fällung des linearisierten Plasmids verwendet. Dafür wurde der 30 µl Ansatz aus dem Restriktionsverdau mit 100 µl dH₂O und 100 µl Phenol/Chloroform zusammen gegeben und gründlich gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend für 7 min. bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D) und die wässrige (obere) Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurde 1 ml 100% EtOH gegeben, gut gemischt und für mindesten 30 min. (kann auch über Nacht oder länger) bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine 7 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm. Der Überstand wurde abgegossen und 50 µl 70% EtOH auf des Pellet gegeben. Nach kurzem Schütteln, wurde erneut zentrifugiert (6 min., 13000 Upm). Abschließend wurde das EtOH abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl dH₂O resuspendiert.

Verwendete Lösungen:

70% EtOH	70% (v/v) EtOH in dH ₂ O
-----------------	-------------------------------------

EtOH	abs.
Phenol/Chloroform	3 Teile Phenol
	1 Teil Chloroform

2.1.1.5 RNA-Isolation aus embryonalem Mausgewebe

Für die RNA-Isolation aus embryonalem Mausgewebe wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet (#74104). Das Gewebe wurde zunächst mit einem RNase freien Plastikstab zerkleinert und das Lysat in 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-Mercaptoethanol auf 1ml RLT-Puffer) homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat 3 min. bei 13000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415D) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem Volumen 70 % Ethanol versetzt. 700 µl der gut durchmischten Probe wurden anschließend auf eine RNeasy spin Säule gegeben und für 15 sec. bei 13000 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415D) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zum Waschen der in der Säulenmembran befindlichen RNA wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 sec. (13000 Upm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. An dieser Stelle folgte als Zwischenschritt ein DNase-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen). Dafür wurde ein Mix aus 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer direkt auf die Membran der Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule für 15 min. bei 25°C inkubiert. Durch die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule und einer Zentrifugation für 15 sec. bei max. Geschwindigkeit wurde der DNase-Verdau beendet. Darauf wurde die RNA, durch die Zugabe von 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation (15 sec., max.), gewaschen. Wiederholt wurde der Durchfluss verworfen und die RNA durch die Zugabe von 500 µl RPE Puffer und einer anschließenden Zentrifugation von 2 min. bei max. Geschwindigkeit ein weiteres Mal gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein neues, sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Für die RNA Elution wurden 30-50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und ein letztes Mal für 1 min. bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA wurde für zeitnahe Analysen auf Eis aufbewahrt oder zur Lagerung in -80°C überführt. Vor der Verwendung der RNA zur Synthese von cDNA (siehe 2.1.7.4) wurde die Konzentration der RNA spektralphotometrisch bestimmt (siehe 2.1.2).

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O	
β-Mercaptoethanol DEPC-H₂O	H ₂ O +0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat autoklaviert	Sigma #M7522 Sigma #D5758

2.1.1.6 RNA-Isolation aus primären MEFs

Für die RNA-Isolation aus embryonalem Mausgewebe wurde das RNeasy Mini Kit verwendet (Qiagen, #74104). Nachdem die Zellen in der gewünschten Dichte auf der Zellkulturschale gewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit Zellkultur-PBS gewaschen. Das PBS wurde bestmöglich entfernt und 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-Mercaptoethanol auf 1ml RLT-Puffer) auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Zelllysates durch eine dünne Kanüle, wurde dieses homogenisiert. Anschließend wurde ein Volumen 70% Ethanol zu dem Homogenisat gegeben. Des Weiteren wurde verfahren wie bei der RNA-Isolation aus embryonalem Mausgewebe (2.1.1.5).

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O	
β-Mercaptoethanol DEPC-H₂O	H ₂ O +0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat autoklaviert	Sigma #M7522 Sigma #D5758
Zellkultur-PBS		Biochrom #L1820

2.1.2 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Sowohl die DNA- als auch die RNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer (Eppendorf, BioPhotometer) gemessen. Es wurde das Programm ds(doppel-strängige)DNA bzw. dsRNA ausgewählt. Als Leerwert-Kontrolle wurde dH₂O verwendet. Die DNA/RNA

wurde nach der Messung der Leerwert-Kontrolle, in der zuvor angegebenen Verdünnung, in eine Küvette gegeben und die Konzentration bestimmt.

2.1.3 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) sind bakteriellen Ursprungs und spalten die DNA-Doppelhelix an spezifischen Stellen, die durch die lokale Nukleotidsequenz definiert werden. Auf diese Weise ist es möglich ein langes, doppelsträngiges DNA-Molekül in Fragmente von genau definierter Länge zu zerlegen. In dieser Arbeit wurde die sequenzspezifische Spaltung von DNA mithilfe verschiedener Restriktionsenzyme nach den vom Hersteller (Roche, NEB) vorgegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Pro μg DNA wurden 1-10 U Enzym in 1x Enzympuffer (vom Hersteller mitgeliefert) verwendet. Die sequenzspezifischen Spaltungen hatten eine Inkubationsdauer von 2 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37°C . Anschließend wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.1.4). Die sequenzspezifischen Spaltungen durch Restriktionsendonukleasen wurden durchgeführt um 1) Plasmide für die Klonierung zu linearisieren, 2) die für die Klonierung erwünschten Fragmente aus anderen Plasmiden zu entfernen, 3) die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide zu ermöglichen und 4) die Richtigkeit bestimmter Vorgänge, z. B. der Plasmid-Mini-Isolation oder der Plasmid-Midi-Isolation, zu kontrollieren.

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarosegel-Elektrophorese erfolgte die Auftrennung von DNA-Fragmenten. Als Gel- und Laufpuffer wurde das TAE-Puffersystem eingesetzt. Die negativ geladene DNA wanderte entsprechend ihrer Größe und Form im elektrischen Feld zur Anode. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde 1g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Lösen der Agarose wurden $5\ \mu\text{l}$ GelRed zugefügt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die doppel-strängige DNA

interkaliert. Dadurch wird der Nachweis der DNA-Banden unter UV-Licht ermöglicht. Nachdem das Gel etwas abgekühlt war, wurde es in einen Gelschlitten gegossen und ein Kamm zur Formung der Geltaschen eingelassen. Nach dem Aushärten des Gels, wurde dieses in eine Gelkammer mit TAE-Ladepuffer überführt und der Kamm vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben und ein Größenstandardmarker (1 Kb-Plus-DNA-Leiter) zum Größenvergleich aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden mithilfe von UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des interkalierten GelReds sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert. Sollten die DNA-Moleküle für eine Ligation (siehe 2.1.6) weiterverwendet werden, wurden die DNA-Banden mit energieärmeren UV-Licht aus einer Hand-UV-Lampe (Konrad Benda) bei 366 nm detektiert, um Brüchen der Nukleotidsequenz vorzubeugen.

Verwendete Lösungen:

1 Kb-Plus-DNA-Leiter	12000; 5000; 2000; 1650; 1000; 850; 650; 500; 400; 300; 200; 100 Bp	Invitrogen #10787-018
5x Ladepuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G	Merck #14277
Agarose	1% in TAE-Puffer	PeqGOLD #35-1020
GelRed	0,05 µl/ml	Biotium #41003
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 2 mM EDTA pH8,2	

2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente konnten durch das interkalierte GelRed unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28704) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

Die aus dem Gel herausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden gewogen und mit dem 3-fachen Volumen (z.B. 0,1 g → 300 µl) QG-Puffer versetzt. Zur Lösung des Gelfragments in dem Puffer, wurde die Probe für 10 min., 50°C und 1000 Upm in einen Thermomixer gestellt. Anschließend wurde die Probe mit dem 1-fachen Volumen Isopropanol versetzt und auf eine

Komponente dieser Methode sind sogenannte hitzestabile DNA-Polymerasen, da sie eine wichtige Rolle in der Replikation spielen. Für PCR-Analysen dieser Arbeit wurde die sogenannte *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Die zwischen den Primern liegende Sequenz wird durch eine wiederholte, zyklische Sequenz von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Sequenzverlängerung (Elongation) amplifiziert. Die Anzahl und die Dauer der Zyklen ist abhängig von der Ausgangskonzentration und der Länge des DNA-Fragments.

2.1.7.1 Standard-PCR und verwendete Primer

Die Standard-PCR-Analyse wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierung von Mäusen (siehe 2.1.7.2) und zur semi-quantitativen Bestimmung bestimmter cDNA (siehe 2.1.7.3) verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen in Eppendorf- (Mastercycle Gradient) oder MWG- (Primus 96) Maschinen durchgeführt. Als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase (im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere nach dem Protokoll von Pluthero et al., 1993 hergestellt) mit dem dazugehörigen Puffersystem (Roche #1146165) verwendet.

Der 20 µl Standard-PCR-Ansatz:

1 µl	DNA-Template	
4 µl	5X PCR-Puffer	
0,5 µl	dNTP-Mix (je 10 mM),	Roche #1969064
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)	
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)	
0,1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	
12,4 µl	H ₂ O (autoklaviert)	

Es wurden folgende Bedingungen für die Standard-PCR-Reaktion festgelegt:

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit
1) Initiale Denaturierung	1x	95	5 min.
2) Denaturierung	25-35x	95	30 sec.
3) Annealing		5°C weniger als Primer-T _m	15 sec.
4) Elongation		72	1 min./Kb
5) Abschließende Elongation	1x	72	5 min.

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretischen aufgetrennt (siehe 2.1.4).

Für diese Arbeit verwendete Primer:

Die komplementären Sequenzen für die verwendeten Primer wurden anhand vorliegender genomischer Sequenzdaten ermittelt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech.

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
Bmp4FOR	GTAACCGAATGCTGATGGTCGT
Bmp4REV	TAGTCTGGTGTCCAGTAGTCGT
Dkk1 for	TTGCGTCCTTCGGAGATGATGG
Dkk1 rev	ACTCCTCATCTTCAGCGCAAGG
Fto-KO-for	ACCCCTCTCCCCATCTAAATCCT
Fto-KO-rev	AAGCCAAGAACAAGTCCATACCTG
mHprt For	GCTGGTGAAAAGGACCTCT
mHprt Rev	CACAGGACTAGAACACCTGC
Msx1FOR	TTTGCCACTCGGTGTCAAAGTG
Msx1REV	GACGGTTCTGGAACCAGATCTT
Msx2FOR	CGACTAAAGGCGGTGACTTGTT
Msx2REV	TTTGACCTGGTCTCTGTAAGG
Neo for	CTGTGCTCGACGTTGTCACTG
Neo rev	GATCCCCTCAGAAGAACTCGT
SYR for	TTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCATGTCAA
SYR rev	CCACTCCTCTGTGACACTTTAGCCCTCCGA
Tg115 for (p163r Glob)	CTACATCCTGGTCATCATCCTG

Tg115 rev (mFto 171)	TTCAGCTGCCACTGCTGATAGA
Wnt5aFOR	GGTGCCATGTCTTCCAAGTTCT
Wnt5aREV	TCATAGGAACCCTTAGCGTGGA

2.1.7.2 Genotypisierung der Mäuse

Nach der Isolation der DNA aus den Schwanzspitzen (siehe 2.1.1.1) der Mäuse, wurden mittels der PCR-Analyse der Genotyp und das Geschlecht der Mäuse bestimmt. Das Geschlecht wurde mit Hilfe der SYR-Primer (siehe 2.1.7.1) analysiert. Diese erkennen eine spezifische Sequenz auf dem Y-Chromosom. Dadurch wurde diese Sequenz in den männlichen Mäusen amplifiziert und konnte anschließend durch die Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Bei den Weibchen fand mit diesen Primern keine Amplifikation statt, da sie kein Y-Chromosom besitzen. Mit Hilfe der *Fto*-KO-Primer (siehe 2.1.7.1) wurde untersucht, ob die Mäuse ein intaktes oder nicht intaktes *Fto*-Gen besaßen. Wenn mit diesen Primern DNA amplifiziert werden konnte, bedeutete dies, dass die Mäuse mindestens eine intakte Kopie des *Fto*-Gens besaßen. Mit den Neo-Primern (siehe 2.1.7.1) wurde analysiert, ob die Mäuse die Neomycinkassette besaßen, die für die Inaktivierung des *Fto*-Gens verwendet wurde. Konnte mit den Neo-Primern DNA amplifiziert werden handelte es sich um homozygot oder heterozygot mutante Mäuse. Ob ein *Fto*-Transgen vorhanden war, wurde mittels der Tg115-Primer (siehe 2.1.7.1) untersucht. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entsprach dem Standard, der im Abschnitt 2.1.7.1 aufgeführt ist.

Das PCR-Programm zur Analyse von Genotyp und Geschlecht:

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit
1) Initiale Denaturierung	1x	94	5 min.
2) Denaturierung	35x	94	30 sec.
3) Annealing		56	30 sec.
4) Elongation		72	30 sec.
5) Abschließende Elongation	1x	72	5 min.

2.1.7.3 Semi-quantitative PCR

Mit Hilfe der semi-quantitativen PCR-Analyse wurde in dieser Arbeit die RNA-Expression bestimmter Gene quantifiziert. Dafür musste die isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben (2.1.7.4) werden. Die verwendeten Primer sind dem Abschnitt 2.1.7.1 zu entnehmen und des PCR-Programm der Tabelle am Ende dieses Abschnitts. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA-Mengen wurde das Haushaltsgen *Hprt* parallel amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden abschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein Foto des Agarosegels gemacht. Die darauf zu erkennenden DNA-Banden wurden, nach dem gleichen Verfahren wie die Quantifizierung der Proteinexpression (2.4.5), quantifiziert.

Das PCR-Programm für die semi-quantitativen Analysen:

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit
1) Initiale Denaturierung	1x	95	5 min.
2) Denaturierung	25x	95	30 sec.
3) Annealing		56	30 sec.
4) Elongation		72	45 sec.
5) Abschließende Elongation	1x	72	5 min.

2.1.7.4 Reverse Transkription (RT-PCR)

Da RNA nicht als Ausgangstemplate für eine PCR-Reaktion verwendet werden kann, wird diese vor einer quantitativen PCR-Analyse zunächst in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Diese reverse Transkription (RT) geschieht mittels der Reversen Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Es wurde das „Expand Reverse Transkriptase“-Kit (Roche # 1785834) verwendet und die reverse Transkription gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Durch die 10 minütige Inkubation des Mastermix 1 in einer PCR-Maschine bei 65°C erfolgte die Anlagerung der Oligonukleotide.

<u>Mastermix 1:</u>	2 µl	Oligo-(dT)
	1 µg	RNA
	add 10,5 µl	DEPC-H ₂ O

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben unverzüglich auf Eis überführt und 9,5 µl des Mastermix 2 hinzugefügt.

<u>Mastermix 2:</u>	4 µl	Transkriptase-Puffer
	2 µl	DTT 100 mM
	2 µl	dNTP-Mix
	0,5 µl	RNase-Block
	1 µl	Reverse Transkriptase

Nach der Zugabe des Mastermix 2 wurde das Gemisch in einer PCR-Maschine für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Die daraus entstandene cDNA wurde entweder sofort für eine semi-quantitative PCR-Analyse (2.1.7.3) oder einer quantitativen Realtime-PCR (2.1.7.5) verwendet oder bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

DEPC-H₂O	H ₂ O +0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat autoklaviert	Sigma #D5758
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGPT 10 mM dTPP	Roche #1969064
DTT (Dithiotreitol)-Lösung	100 mM	Roche #1019777001

Expand-Reverse		
Transkriptase	1 U/ μ l	Roche #11785826001
Oligo(dT)-Mix	10 mM	Qiagen #79237
RNase Block	40 U/ μ l	Stratagene #300151

2.1.7.5 Quantitative Realtime-PCR

Mit der quantitativen Realtime-PCR wird die mRNA-Expression durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Die quantitative Realtime-PCR basiert auf der herkömmlichen PCR (2.1.7), allerdings erfolgt die Quantifizierung in Echtzeit (daher *real time*), während eines PCR-Zyklus. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Die Realtime-PCR-Analysen in dieser Arbeit wurden nach dem Protokoll der „TaqMan® Gene Expression Assays“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden sogenannte TaqMan-Sonden verwendet, die an ihrem 5' Ende einen Quencher und am 3' Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM besitzen. Bei einer intakten Sonde wird die Energieübertragung des Reporterfarbstoffes aufgrund einer Lichtquelle auf den Quencher übertragen, wodurch kein Fluoreszenzsignal abgegeben wird. Die Taq-Polymerase, die neben der Polymerase-Aktivität zusätzlich auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, baut die Sonde, während der Synthese des Gegenstranges, am 5' Ende ab. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und es kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden.

Vor Beginn der quantitativen Realtime-PCR war es erforderlich, die isolierte RNA (2.1.1.4 und 2.1.1.5) in DNA umzuschreiben (2.1.7.4). Die daraus gewonnene cDNA wurde anschließend, wie folgt aufgeführt, in die quantitative Realtime-PCR eingesetzt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden Triplikate angefertigt.

<u>20 μl Standard-Ansatz:</u>	3 μ l cDNA
	6 μ l DEPC-H ₂ O
	10 μ l TapMan Universal PCR Master Mix
	1 μ l TapMan Assay (Gen-spezifische Primer und Sonde)

Zum Abgleich der eingesetzten cDNA-Mengen wurde in den zu untersuchenden Proben ebenfalls die Expression des Haushaltsgens *Gapdh* gemessen.

Die Proben wurden auf eine 48-Loch-Platte (Fast Optical 48-Well Reaction Plate, Applied Biosystems #4375816) aufgetragen, welche anschließend mit einem RNA- und DNase-freien Film (48-Well Optical Adhesive Film, Applied Biosystems #2012062115) abgeklebt wurde. Daraufhin wurde die 48-Loch-Platte zur Vermischung der einzelnen Proben kräftig geschüttelt und durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000 Upm (Heraeus Megafuge 1.0) die Luftblasen beseitigt. Anschließend wurde die 48-Loch-Platte in die Realtime-Maschine („StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block“, Applied Biosystems #4376357) gegeben und der Lauf gestartet.

Da ausschließlich in der exponentiellen Phase der PCR die optimalen Bedingungen herrschen, wurden nach Beendigung des Laufs die Fluoreszenz-Signale der exponentiellen Phase quantifiziert. Dabei wurde zur Berechnung der exponentiellen Phase der C_T -Wert (Schwellenwert-Zyklus) verwendet, bei dem die Gen-spezifische Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

Die Quantifizierung der in der Realtime-Analyse erhaltenen Expressionsdaten wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode realisiert. Dafür wurden die C_t -Werte des Haushalts-Gens von den C_t -Werten der zu untersuchenden Gene subtrahiert. Die daraus erhaltenen C_t -Werte der einzelnen Proben ($Fto^{-/-}$ und $Fto^{+/+}$) wurden erneut voneinander abgezogen, woraus der $\Delta\Delta C_t$ -Wert resultierte. Dieser wurde abschließend in die Gleichung „n-fache Expression ($Fto^{+/+}$ zu $Fto^{-/-}$) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ “ eingesetzt.

Verwendete Primer (TaqMan Assay):

<i>Gapdh</i>	Applied Biosystems #Mm9999915_g1
<i>Gli1</i>	Applied Biosystems #Mm00494645_m1
<i>Msx1</i>	Applied Biosystems #Mm00440330_m1
<i>Ptch1</i>	Applied Biosystems #Mm00970977_m1

Verwendete Lösungen:

DEPC-H ₂ O	H ₂ O +0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat autoklaviert	Sigma #D5758
TapMan Universal PCR Master Mix		Applchem #A1091

2.2 Bakterien

2.2.1 Für Bakterien-Arbeiten verwendete Lösungen

Ampicillin	100 mg/ml	Applichem #A0839
DMSO		Prolab #23500.297
LB-Agar	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium	BD #214010
LB-Ampicillin-Agar	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin	Applichem #A0839
LB-Medium	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt in dH ₂ O, autoklaviert, pH 7,0	Applichem #A1553 Applichem #A1552
SOB-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ autoklaviert, pH 6,7-7	Applichem #A1553 Applichem #A1552
TB-Puffer	10 mM Pipes 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl steril filtriert, pH 6,7 steril filtrieren und bei 4°C lagern	Applichem #A3495

2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue (Inoue et al., 1990). Als bakterieller Wirt wurden die *E.coli* Stämme JM109 und XL1 blue verwendet. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 20 ml Vorkultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde anschließend eine 250 ml Hauptkultur in SOB-Medium angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei Raumtemperatur inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,93 erreicht war. Darauf wurde die Bakteriensuspension für 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend 10 min. bei 2500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R) und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Bakteriensediment wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von DMSO zu einer

Endkonzentration von 7 % (v/v) für 10 min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die Bakterien in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation von Plasmid-DNA mittels Hitzeschock in *E.coli* JM109 wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 20-100 ng Plasmid-DNA zu 100-200 µl der Bakterien gegeben und das Gemisch für 10 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien einem kurzen Hitzeschock (1 min. bei 42°C) ausgesetzt und erneut auf Eis inkubiert (2 min.). Nach der Zugabe von 500 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) wurden die Bakterien für 30-90 min. unter schütteln (1000 Upm) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (3 min., 6000 Upm; Eppendorf Centrifuge 5415D), der Überstand bis auf etwa 100-200 µl entfernt und das Pellet in dem restlichen Überstand resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, welche hauptsächlich der Analyse der Klone und der Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA dienen.

2.2.4 Elektro-Transformation

Für die geringen Mengen an Plasmid-DNA, die aus den Hefezellen isoliert wurden, reichte die übliche Transformation in *E.coli* Zellen mittels Hitzeschock meist nicht aus. Die Transformation durch Elektrostöße ist etwas effektiver und bringt auch kleinste DNA-Mengen in die Bakterien ein. Für die Elektro-Transformation wurden die *E.coli* Zellen XL1 blue verwendet, die zu Beginn der Prozedur auf Eis aufgetaut wurden. Die gesamten aus den Hefezellen isoliert Plasmid-DNA und 100 µl der aufgetauten Bakterien wurden zusammengegeben, in eine eisgekühlte Küvette gefüllt und 10 min. auf Eis inkubiert. Diese wurde in den Elektroporator gestellt und auf Knopfdruck ein kurzer Elektrostoß ausgelöst (1,8 kV Puls, 200 Ω, 25 µF). Anschließend wurde unverzüglich 1 ml LB-Medium zu den Zellen

gegeben und die Zellsuspension in ein Eppendorfgesäß überführt. Darin wurden die Zellen für ½ bis 1 Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min., 6000 Upm; Eppendorf Centrifuge 5415D), der Überstand bis auf etwa 100-200 µl entfernt. Das Bakterien-Pellet wurde in dem restlichen Überstand resuspendiert und auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Mit den gewachsenen Kolonien wurden Flüssigkulturen angeimpft, in denen die Plasmid-DNA vermehrt und anschließend isoliert wurde (siehe 2.1.1.2 und 2.1.1.3).

2.3 Zellkulturarbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit immortalisierten NIH-3T3 Zellen, eine embryonale Fibroblastenzelllinie, und primären mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) aus der Tg104N-Mauslinie gearbeitet. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank von Heraeus (HeraSafe12) durchgeführt und die Kultivierungsmedien vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Verwendete Lösungen:

Kultivierungsmedium	500 ml DMEM 6 ml Streptomycin/Penicillin (30 U/ml) 6 ml L-Glutamin (200 mM) 6 ml NEAA (100 mM) 6 ml Natrium-Pyruvat (100 mM) 50 ml fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert 30 min., 56°C)	GIBCO #41965 GIBCO #15140-114 GIBCO # 25038-024 GIBCO #11140-035 GIBCO #11360-039 PAA Laboratories #A15-080
OPTI-MEM		GIBCO #31985
PolyFect		Qiagen #301107
SAG	Smoothened Agonist	CALBIOCHEM #566661
Trypsin		Invitrogen #25300
Zellkultur-PBS		Biochrom #L1820

2.3.1 Herstellung von primären MEFs

Für die Herstellung der primären MEFs wurden in dieser Arbeit E12.5 Embryonen der Tg104N-Mauslinie verwendet. Nachdem die Embryonen aus dem Uterus des Muttertieres herauspräpariert waren, wurde der Kopf abgetrennt und die inneren Organe entfernt. Der

restliche Teil des Embryos wurde in Zellkultur-PBS gewaschen und in eine Zellkulturschale mit 2 ml Trypsin überführt. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurde der Embryo in dem Trypsin homogenisiert und das Homogenisat anschließend mit einer 200 µl Pipette mehrmals hoch und runter pipettiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Zellhomogenisat erneut mehrmals mit einer Pipette rauf und runter pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 5 min.. Abschließend wurden 10 ml Kultivierungsmedium auf das Zellhomogenisat gegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag waren die MEFs auf dem Boden der Zellkulturschale angewachsen und die übriggebliebenen Zelltrümmer und Verunreinigungen wurden durch einen Mediumwechsel beseitigt.

2.3.2 Kultivierung der MEFs und NIH-3T3 Zellen

Da sich die Zellen in Kultur kontinuierlich teilen und sterben wenn die Kulturschale zu dicht bewachsen ist, müssen die Zellen etwa alle drei Tage passagiert werden. Dafür wird das Kultivierungsmedium abgesaugt und die Zellen mit Zellkultur-PBS gewaschen. Durch die Zugabe von Trypsin (2-3 ml auf/10 cm Schale) und einer 3 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen von dem Boden der Zellkulturschale abgelöst. Das Abstoppen der Trypsinisierung erfolgte durch die Zugabe von Kultivierungsmedium (3-4 fache Volumen). Die entstandene Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min. bei 800 Upm zentrifugiert (Heraeus, Megafuge 1.0R). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und die Zellsuspension in dem gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt.

2.3.3 Transiente Transfektion von NIH-3T3 Zellen

Mit Hilfe der Transfektion ist es möglich Plasmide in die Zellen einzubringen und dadurch für eine begrenzte Zeit eine Überexpression bestimmter Proteine in den Zellen zu erzeugen. Für die Transfektion der NIH-3T3 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit das chemische Transfektionsreagenz PolyFect (Qiagen) verwendet. Die genauen Mengenangaben für den entsprechenden Versuchsumfang können dem PolyFect-Protokoll entnommen werden. Einen Tag vor der Transfektion wurden die im Protokoll angegebene Anzahl an Zellen auf frische

Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA, zusammen mit Optimem und PolyFect, in einem Eppendorfgefäß für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das alte Kultivierungsmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit Zellkultur-PBS gewaschen und die im Protokoll angegebene Menge an frischem Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde eine kleine Menge Kultivierungsmedium zu dem Reaktionsgemisch aus DNA und PolyFect gegeben, kurz gemischt und unverzüglich auf den Zellen verteilt. Nach etwa 24 Stunden Inkubation wurden die transfizierten Zellen lysiert. Die Methode der Lyse war dabei abhängig von dem darauffolgenden experimentellen Vorhaben.

2.3.4 Shh-Signalweg-Aktivierung in MEFs

In primären MEFs von wildtypischen und *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen wurde mittels des Smoothened-Agonisten SAG der Shh-Signalweg aktiviert. Wenn die Zellkulturschalen voll bewachsen waren, wurde das Kultivierungsmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit Zellkultur-PBS gewaschen und Kultivierungsmedium mit nur 0,5 % FCS auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen zunächst 24 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und frisches Kultivierungsmedium, ebenfalls mit nur 0,5 % FCS, und 200 nM SAG auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, einmal mit Zellkultur-PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von RLT-Puffer (siehe RNeasy Mini Kit Protokoll, Qiagen) von der Schale lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Bis zur RNA-Isolation (siehe 2.1.1.6), für eine anschließende quantitative Realtime-PCR Analyse (siehe 2.1.7.5) der Shh-Zielgene *Gli1* und *Ptch1*, wurde das Zelllysate in 600 µl RLT-Puffer bei -80°C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinisolation aus murinem Embryonalgewebe

Die Gewebe, aus denen die Proteine isoliert werden sollten, wurden nach ihrer Präparation zunächst in RNA later (Qiagen #76104) bei -20°C gelagert. Für diese Arbeit wurden Proteinlysate aus den Gliedmaßenknospen, dem Kopf und dem Rumpf (inkl. innere Organe) von E11.5 Mausembryonen und den Lungen von E12.5 Mausembryonen angefertigt. Zu Beginn der Prozedur wurden die Gewebe aus dem RNA later entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß mit RIPA-Puffer überführt. Die verwendete Menge an RIPA-Puffer für das jeweilige Gewebe ist der Tabelle am Ende dieses Abschnittes zu entnehmen. Mit Hilfe einer kurzen Ultraschallbehandlung wurden die Gewebe in dem RIPA-Puffer homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat für 10-15 min. bei 4°C und 13000 Upm (Heraeus, Biofuge 13) zentrifugiert. Der Überstand (das Proteinlysate) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit der entsprechenden Menge 4xSDS-Ladepuffer versetzt. Dieses Gemisch wurde unverzüglich für 5 min. bei 95°C zur Denaturierung aufgeköcht. Anschließend wurde dieses Proteinlysate entweder direkt in eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse (s. 2.4.3 und 2.4.4) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Eingesetzten Mengen an RIPA-Puffer:

Gewebe	Alter	RIPA-Puffer (µl)
Gliedmaßenknospen	E11.5	20
Kopf	E11.5	200
Rumpf (inkl. innere Organe)	E11.5	200
Lunge	E12.5	25

Verwendete Lösungen:

4x SDS-Ladepuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8	Prolab #10315
	8 % SDS	Serva Electrophoresis #20760
	40 % (w/v) Glycerol	CarlRoth #3783.1
	0,4 % Bromphenolblau	Merck #115925
	vor Gebrauch 20 % β-Mercaptoethanol	Sigma #M7522

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	Prolab #10315
	1 % NP-40	
	0,25 % Na-Deoxycholat	
	150 mM NaCl	Prolab #27810.295
	vor Gebrauch Zugabe von	
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Roche #11836153001
	und 10µl/ml PMSF	Fluka #93482

2.4.2 Proteinisolation aus MEFs

Für die Proteinisolation aus den primären MEFs wurde jeweils eine voll bewachsene 10 cm Zellkulturschale verwendet. Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und die Zellen gründlich mit Zellkultur-PBS gewaschen. Für die Lyse wurden 400 µl RIPA-Puffer gut auf den Zellen verteilt und für etwa 10 min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgeschabt und in ein Eppendorfggefäß überführt. Zur verbesserten Homogenisierung wurde das Lysat durch eine dünne Kanüle mehrmals rauf und runter gezogen. Danach wurde das Lysat für 10-15 min. bei 4°C und 13000 Upm (Heraeus, Biofuge 13) zentrifugiert, der Überstand in der entsprechenden Menge 4xSDS-Ladepuffer aufgenommen und die Proteine für 5 min. bei 95°C denaturiert. Abschließend wurde das Proteinlysate entweder direkt in eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse (siehe 2.4.3 und 2.4.4) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

4x SDS-Ladepuffer	s. 2.4.1	
RIPA-Puffer	s. 2.4.1	
Zellkultur-PBS		Biochrom #L1820

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse ermöglicht. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erhalten, wird die Konzentration des Polyacrylamidgels abhängig von dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine eingesetzt. Eine wichtige Voraussetzung der SDS-PAGE ist die vorherige Zugabe von SDS zu den Proteinlysaten (siehe 2.4.1 und 2.4.2). Dieses anionische

Tensid überlagert die Eigenladung der Proteine, was zur gegenseitigen Abstoßung der Proteine, und zusammen mit der Denaturierung durch Aufkochen, zur Linearisierung aller Proteine führt.

Für die Anfertigung des SDS-Gels wurden jeweils zwei Glasplatten mit Spacern und einem Dichtungsgummi mit zwei Klammern zusammengedrückt und in einem Ständer fixiert. Dann wurde zunächst etwa 5 ml Trenngel zwischen diesen beiden Platten gegeben. In dem Trenngel erfolgt die eigentliche Trennung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht. Dabei laufen kleine Proteine in dem angelegten elektrischen Feld schneller als große Proteine. Für die in dieser Arbeit analysierten Proteine wurde ein 10 %-iges Trenngel verwendet. Damit das Gel nicht austrocknet wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und ein 5 %-iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen, in dem die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel fokussiert und konzentriert wurden. Mit Hilfe eines Kamms wurden die Probenaschen geformt. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in der Tabelle am Ende dieses Abschnitts aufgeführt. Nach etwa 45 min. war das Sammelgel auspolymerisiert. Daraufhin wurde das Dichtungsgummi entfernt und das Gel in den Glasplatten an der Gel-Apparatur befestigt. Nachdem die Kammern mit 1xSDS-Laufpuffer befüllt waren, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Proteinlysate und ein Größenstandardmarker vorsichtig mit einer Pipette in die Taschen gefüllt. Anschließend wurde in der Gelapparatur ein elektrisches Feld erzeugt. Die Proteine durchlaufen zunächst das Sammelgel, in dem sie aufgrund des pH-Wertes von 6,8 alle die gleiche Beschleunigung erfahren. Beim Eintritt der Proteine in das Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 fällt der Feldstärkegradient weg und die Proteine werden entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Wenn die Lauffront der Proteine die Unterseite des SDS-Gels verlassen hatte, wurde das elektrische Feld ausgeschaltet und das Gel für die Western-Blot-Analyse weiter verarbeitet (siehe 2.4.4).

Zusammensetzung für jeweils zwei SDS-Gele:

	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
dH₂O	1,9 ml	3,5 ml
1 M Tris-HCl	5,6 ml pH 8,8	0,6 ml pH 6,8
20% SDS	60 µl	25 µl
Acrylamid	3,8 ml	0,8 ml
TEMED	7,5 µl	5 µl
10% APS	60 µl	25 µl

Verwendete Lösungen:

10x SDS-Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS in 1 l dH ₂ O lösen	AppliChem #A1377,1000
10% APS	in dH ₂ O	Serva #13375
20% SDS	in dH ₂ O	
Acrylamid		AppliChem #A0856
Isopropanol	abs.	
SDS-Größenmarker		Sigma #SGS6H2
TEMED		Merck #UN2372

2.4.4 Western-Blot-Analyse

Mit der Western-Blot-Methode werden Proteine von einem SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Carl Roth #T830) übertragen (*engl. blotting*) und können anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Das „blotten“ der Proteine von dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran (9 cm x 6 cm) erfolgt durch Elektrotransfer. Mit Hilfe von Whatman-Filterpapieren (9 cm x 6 cm), die zuvor in Anoden-Puffer (Blotpuffer I und II) oder Katoden-Puffer (Blotpuffer III) getränkt werden, wird senkrecht zu der PVDF-Membran und dem SDS-Gel ein elektrisches Feld angelegt, in dem die Proteine Richtung Anode wandern. Der Aufbau war von unten nach oben wie folgt: sechs Whatman-Filterpapiere getränkt in Blotpuffer I, drei Whatman-Filterpapiere getränkt in Blotpuffer II, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und zu Oberst drei Whatman-Filterpapiere getränkt in Blotpuffer III. Dieser „Stapel“ wurde blasenfrei zwischen eine Blotapparatur gelegt und für etwa 70 min. eine Spannung von 54 mA/Blot angelegt. Nach dem Proteintransfer wurden die Proteine auf

der PVDF-Membran mit einer Ponceau S-Lösung angefärbt. Dadurch konnte die Effektivität des Transfers kontrolliert und die Proteinbanden des Größenmarkers mit einem Kugelschreiber markiert werden. Sollten auf einer Membran verschiedene Proteine detektiert werden, bestand an dieser Stelle ebenfalls die Möglichkeit, die Membran in mehrere Abschnitte zu unterteilen. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindestellen in 5% Magermilchpulver (MP) in PBST (0,1% Tween in PBS) für mind. 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in 5% MP/PBST bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde der Erstantikörper entfernt und die Membran 3x 10 min. bei Raumtemperatur mit PBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper, verdünnt in 5% MP/PBST für 30 min. bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper wurde in dieser Arbeit ein Spezies-spezifischer HRP-Antikörper verwendet. Dabei handelt es sich um eine Meerrettichperoxidase, die die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, welche durch anschließende Chemilumineszenz detektiert werden kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zweitantikörper entfernt und die Membran mind. 6x für etwa 5 min. mit PBST gewaschen. Für die abschließende Detektierung der Proteinbanden wurde eine Entwicklerlösung von GE Healthcare (ECL Plus Western Blotting Detection System #RPN2132) verwendet. 1 ml der Lösung A wurde mit 25 µl der Lösung B gut vermischt und für 2-3 min. auf die Membran gegeben. Nach Entfernung der Entwicklerlösung wurde die Membran zwischen eine transparente Folie gelegt und die Proteinbanden im Fotodetektor LAS 4000 Mini (Futsjiu) detektiert und digitalisiert.

Verwendete Erstantikörper:

Aktin	1:2000	<i>anti-rabbit</i> , Sigma #A2066
cMyc	1:1000	<i>anti-mouse</i> , Santa Cruz #sc-40
eIF5A	1:5000	<i>anti-rabbit</i> , Abcam #ab32443
gpFto	1:2000	<i>anti-guinea-pig</i> , Serum, (EMT, HHU-Düsseldorf)
rFto	1:500	<i>anti-rabbit</i> , affinitätsaufgereingt, (EMT, HHU-Düsseldorf)
Gli3	1:500	<i>anti-goat</i> , R&D #AF3690
HA	1:1000	<i>anti-mouse</i> , Covance #MMS-101P
Hprt	1:1000	<i>anti-rabbit</i> , Abcam #ab10479

Verwendete Zweitantikörper:

gpHRP	1:2000	<i>anti-guinea-pig</i> , Sigma #A5545
Goat-HRP	1:2000	anti-goat, Santa Cruz #sc-2768
mHRP	1:2000	anti-mouse, Dako #P0260
rHRP	1:2000	<i>anti-rabbit</i> , Dako #P0448

Verwendete Lösungen:

Blotpuffer I	300 mM Tris 20% (v/v) Methanol pH 9,5	
Blotpuffer II	25 mM Tris 20% (v/v) Methanol pH 8,5	
Blotpuffer III	25 mM Tris 20% (v/v) Methanol 40 mM Amino-n-Caprinsäure pH 8,0	
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3; autoklaviert	
Ponceau S-Lösung	5% (w/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Ponceau S	
Tween		AppliChem #A1405 AppliChem #A4974

2.4.5 Quantifizierung der Proteinexpression

Mit Hilfe des Softwareprogramms „ImageJ” wurde in dieser Arbeit die Expression von Gli3-83 (Repressor) und Gli3-190 (Aktivator) in den verschiedenen embryonalen Geweben und in primären MEFs quantifiziert (siehe 3.4.1). Zum Abgleich, der in die SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse eingesetzte Proteinmenge, wurden die sogenannten Haushaltsproteine Aktin und Hprt verwendet. Für die Quantifizierung wurden die in der Western-Blot-Analyse detektierten und digitalisierten Proteinbanden benutzt. Das Abbild des Western-Blots wurde in ImageJ geöffnet und die erste zu analysierende Bande mit „*Analyze→Gels→Select First Lane*“ markiert. Danach wurden die Banden, die mit dieser ersten verglichen werden sollten durch „*Analyze→Gels→Select Next Lane*“ markiert. Mit dem Befehl „*Analyze→Gels→Plot Lanes*“ erhielt man anschließend ein graphisches Profil der Bandenintensitäten. Dabei zeigt der Berg (Peak) die Proteinbande an und die Ausläufer den unspezifischen Hintergrund. Die

Peaks wurden markiert und mit dem Befehl „*Analyze*→*Gels*→*Label Peaks*“ erhielt man die berechneten Flächen der markierten Peaks. Die berechneten Werte der wildtypischen Proteinbanden wurden als 100% gesetzt und die Werte der *Fto*-defizienten Proteinbanden relativ dazu berechnet. Auf diese Weise wurde untersucht, ob *Gli3*-Expressionsunterschiede zwischen wildtypischen und homozygot mutanten Mäusen bestanden.

2.5 Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

Von einer Protein-Protein-Interaktion spricht man, wenn mindestens zwei Proteine durch meist nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminosäurereste, miteinander interagieren und einen sogenannten Proteinkomplex bilden. Sie spielen eine wichtige Rolle in nahezu allen biologischen Prozessen, an denen Proteine beteiligt sind. So sind solche Proteinkomplexe essentielle Bestandteile der DNA-Replikation, der Transkription, der Translation, dem Splicing, der Sekretion, der Zellzykluskontrolle, der Signaltransduktion und der verschiedensten Stoffwechselprozesse (Phizicky und Fields, 1995). Da zu Beginn des praktischen Teils dieser Arbeit noch nicht bekannt war, dass *Fto* eine DNA- und RNA-Demethylase ist, war ein Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit die Identifizierung von *Fto*-Interaktionspartnern. Aufgrund der Kenntnisse über die potentiellen Interaktionspartner sollte die Funktion von *Fto* definiert werden.

2.5.1 Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in vivo* Methode in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Untersuchungen werden im Milieu einer Zelle mit in Eukaryoten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen durchgeführt.

Das hier beschriebene Hefe-Zwei-Hybrid-System basiert auf dem „Matchmaker GAL4 two-hybrid assay“ der Firma Clontech. Es kann zur Identifizierung neuer Protein-Interaktionen, zur Bestätigung von potentiellen Interaktionen und zur Bestimmung interagierender Domänen angewendet werden.

Wie in der Abbildung 2.1 schematisch dargestellt basiert das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems auf der Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Köder-Protein und der Gal4-DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und der Expression eines zweiten Fusionsproteins, bestehend aus dem Beute-Protein und der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD). Als Köder-Protein wird ein bestimmtes Protein eingesetzt, für das Interaktionspartner identifiziert oder bestätigt werden sollen (hier: Fto). Das Beute-Protein kann ein bekanntes, ausgewähltes Protein sein, für das die potentielle Interaktion mit dem Köder-Protein untersucht werden soll oder es wird zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern eine cDNA-Bank als „Beute“ eingesetzt (hier: cDNA-Bank, E17.0 Mausembryo). Wenn das Köder- und Beute-Protein miteinander interagieren, werden die Gal4 DNA-BD und AD zusammengebracht und aktivieren die Transkription der drei Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *LacZ* (Fields und Song, 1989; Chien et al., 1991).

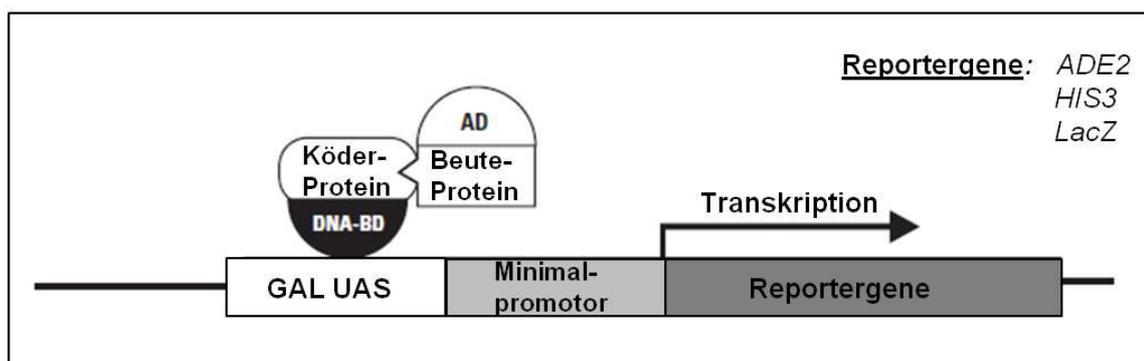


Abb. 2.1: Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (abgewandelt aus dem „Matchmaker Pretransformed Libraries User Manual“, Clontech #PT3183-1)

Das Köder-Protein wird in Fusion mit einer GAL4-DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und das Beute-Protein in Fusion mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Wenn Köder- und Beute-Protein miteinander interagieren wird die Transkription der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *LacZ* aktiviert.

Der verwendete Hefestamm AH109 kann weder die Aminosäure Adenin noch Histidin synthetisieren und daher nicht auf Nährböden wachsen, denen diese beiden essentiellen Aminosäuren fehlen. Wenn Köder- und Beute-Protein interagieren wird die *Ade2* und *His3* Expression induziert und ermöglicht der Hefezelle die Biosynthese von Adenin und Histidin und somit das Wachstum auf Adenin- und Histidin-Mangelnährböden (SD/-Ade/-His). Zudem enthält das Köder-Plasmid die Sequenz der Aminosäure Tryptophan und das Beute-Plasmid für Leucin. So kann die Hefezelle nach Interaktion des Köder- und Beute-Proteins nicht nur auf Adenin- und Histidin-Mangelnährböden, sondern auch auf Mangelnährböden wachsen,

denen zusätzlich Tryptophan und Leucin fehlen (SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu). Das Reporterogen *LacZ* kodiert für die β -Galaktosidase, ein *E.coli* Enzym, das in das AH109 Chromosom eingebaut ist. Wenn Köder- und Beuteprotein interagieren wird die β -Galaktosidase exprimiert, jedoch nicht sekretiert. Erst nach der Zellyse kann die blaue Farbe durch den Einsatz von X-Gal, im sogenannten β -Gal-Test, detektiert werden.

Die Zellen des Hefestammes AH109 können daher nur auf den SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu Mangelnährböden wachsen und eine Blaufärbung im β -Gal-Test aufweisen, wenn es zu einer Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein kommt (Fields und Song, 1989; Chien et al., 1991).

Da die Hefe relativ günstig und robust in der Handhabung ist, können mit dieser Methode Screenings im großen Maßstab durchgeführt werden

2.5.2 Für Hefe-Arbeiten verwendete Lösungen

Stammlösungen: Alle Stammlösungen wurden vor dem ersten Gebrauch autoklaviert und waren anschließend bei einer Lagerung von 4°C etwa ein Jahr haltbar.

10x droup out	0,3 g L-Isoleucin 1,5 g L-Valin 0,2 g L-Argenin HCl 0,3 g L-Lysin HCl 0,2 g L-Methionin 0,5 g L-Phenylalanin 2 g L-Threonin 0,3 g L-Thyrosin 0,2 g L-Uracil auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen
100x L-Histidin HCl	0,2 g auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen
100x L-Tryptophan	0,2 g auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen
100x L-Leucin	1 g auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen
100x L-Adeninhemisulfat	0,2 g auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen

Sonstige Lösungen: Alle Lösungen wurden vor dem ersten Gebrauch autoklaviert

Glucose	40 % in dH ₂ O	
Kanamycin		
Lithiumacetat	1 M in dH ₂ O, pH 7,5	
PEG 4000	50 % (w/v) in dH ₂ O	
X-Gal	50 mg/ml in DMFA (Dimethylformamid)	Fermentas #R0401

Z-Puffer 10,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 5,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 0,75 g KCl
 0,246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 mit dH_2O auf 1 l, pH 7,0

Flüssigmedien:

SD-Medium	3,35 g Yeast Nitrogen auf 425 ml mit dH_2O , pH 5,8	BD #291940
SD/- Trp Medium	425 ml SD-Medium 50 ml 10x drop out 25 ml 40% Glucose 5 ml 100x L-Leucin 5 ml 100x L-Adeninhemisulfat 5 ml 100x L-Histidin HCl	
SD/- Leu Medium	425 ml SD-Medium 50 ml 10x drop out 25 ml 40% Glucose 5 ml 100x Tryptophan 5 ml 100x L-Adeninhemisulfat 5 ml 100x L-Histidin HCl	
2x YPD-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt auf 250 ml mit dH_2O , pH 5,8	BD #212750
YPD-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt auf 500 ml mit dH_2O , pH 5,8	BD #212750
2x YPDA-Medium	44 ml 2x YPDA-Medium 5 ml 40% Glucose 1 ml 100x L-Adeninhemisulfat	

Agarplatten:

Der feste Agar wurde bis zum Gießen der Platten bei 4°C gelagert. Vor der Herstellung der Platten wurde der Agar in der Mikrowelle bei niedriger Stufe langsam verflüssigt. Anschließend wurden die restlichen Zutaten beigefügt und der flüssige, warme Agar auf 10 cm Petrischalen aufgeteilt. Nachdem der Agar fest geworden war wurden die Platten bei 4°C gelagert

SD-Agar	3,35 g Yeast Nitrogen 10 g Agar auf 425 mit dH_2O , pH 5,8	BD #291940 BD #214010
-TLHA Platten	500 ml SD-Agar 50 ml 10x droup out 25 ml 40 % Glucose	
-TL Platten	500 ml SD-Agar 50 ml 10x droup out 25 ml 40 % Glucose 5 ml 100x L-Histidin HCl 5 ml 100x L-Adeninhemisulfat	
-T Platten	500 ml SD-Agar 50 ml 10x droup out 25 ml 40 % Glucose 5 ml 100x L-Histidin HCl 5 ml 100x L-Adeninhemisulfat	

-L Platten	5 ml 100x L-Leucin 500 ml SD-Agar 50 ml 10x drop out 25 ml 40 % Glucose 5 ml 100x L-Histidin HCl 5 ml 100x L-Adeninhemisulfat 5 ml 100x L-Tryptophan
-------------------	--

2.5.3. Hefe-Verpaarung

Die Hefe-Verpaarung ist der Hauptteil des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. In der hier angefertigten Arbeit wurde in diesem Teil der „Fto-Köder-Vektor“ pGBKT7-Fto in dem Hefestamm AH109 und die „Beute-cDNA Bank“ (Mausembryo E17.0, im pACT2 Vektor, Clontech #MY4013AH) in dem Hefestamm Y187 zusammengebracht. Auf diese Weise sollten Interaktionspartner von Fto identifiziert werden.

Zu Beginn wurde eine Übernacht-Kultur vom Köderstamm (AH109-pGBKT7-Fto) hergestellt. Dafür wurde von einer zuvor durch Hefe-Transformation (siehe 2.5.7) angefertigte SD-Platte (-T) eine 2-3 mm große Kolonie AH109-pGBKT7 gepickt und in 50 ml SD/-Trp Medium überführt. Diese Kultur wurde unter Schütteln (~250 Upm) bei 30°C inkubiert bis nach etwa 16-20 Stunden eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde die Kultur in ein 50 ml Röhrchen umgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min. bei 1000 Upm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Hefe-Pellet in 5 ml SD/-Trp Medium resuspendiert. Dann folgte die Verpaarung der Köder-Stamm-Kultur mit der Beute-Stamm-Kultur. Dafür wurde zunächst 1 ml der Beute-Stamm-Kultur bei Raumtemperatur aufgetaut und ein 10 µl Aliquot für eine Wachstumskontrolle auf SD (-L) Platten in verschiedenen Verdünnungen (1/10, 1/100 und 1/1000) entnommen. In allen Verdünnungen konnte nach wenigen Tagen ein Wachstum beobachtet werden. Nach dem Auftauen und der Entnahme des Aliquots wurde der 1 ml Beute-Stamm-Kultur zusammen mit den 5 ml Köder-Stamm-Kultur in einen sterilen 2 l Kolben gegeben und 45 ml 2x YPDA-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) hinzugefügt. Das Aufbewahrungsgefäß der Beute-Stamm-Kultur wurde dabei 2x mit 1 ml 2x YPDA-Medium ausgespült und ebenfalls in den 2 l Kolben gegeben. Es folgte eine 20.-24 stündige Inkubation auf einem Schüttler (30-50 Upm) bei 30°C. Nach 20 Stunden wurde ein Tropfen der Verpaarungs-Kultur entnommen und unter dem Mikroskop betrachtet. Waren

Zygoten zu sehen wurde fortgefahren, wenn nicht wurden weitere 4 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Kultur in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 10 min. bei 1000 Upm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der 2 l Kolben wurde 2x mit 0,5x YPDA/Kanamycin(50 µg/ml)-Medium ausgespült, was ebenfalls zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden verworfen und das gesamte Zellpellet in 5 ml 0,5x YPDA/Kanamycin(50 µg/ml)-Medium resuspendiert. Für die spätere Kalkulation der Zahl der gefilterten Klone (siehe 2.5.3.1) wurde das totale Volumen von Zellen und Medium gemessen. Das Resuspensionsvolumen betrug 6,9 ml. Von dieser Suspension wurden 100 µl für eine Verdünnungsreihe (1/10, 1/100, 1/1000 und 1/10000) auf jeweils SD(-T), SD(-L) und SD(-TL) Platten (10 cm Durchmesser) entnommen. Auf allen Platten konnte nach 3-5 Tagen in allen Verdünnungen ein Wachstum von Hefekolonien beobachtet werden. Das stellte sicher, dass sowohl das Köder-, als auch die Beute-Proteine in der Hefe exprimiert wurden. Die übrigen 6,8 ml der Suspension wurden auf SD(-TLHA) Platten ausgestrichen (100 µl/15 cm Schale) und für 3-8 Tage bei 30°C inkubiert.

2.5.3.1 Kalkulation der Anzahl an gefilterten Klonen

Resuspensionsvolumen (s. 2.5.3):	6,9 ml
Volumen/15 cm Schale.:	100 µl
gewachsene Kolonien auf 1/1000 SD(-TL) Platte:	80

$$\begin{aligned} \text{kalkulierte Anzahl der gefilterten Klone} &= 80 \times 6,9 \times 10 \times 1000 \\ &= 5,52 \times 10^6 \end{aligned}$$

Herstellerangaben zur Anzahl der unabhängigen Klone (cDNA-Bank):	$3,5 \times 10^6$
--	-------------------

Diese Berechnung zeigt, dass etwa $5,52 \times 10^6$ Klone gefiltert wurden. Da die cDNA-Bank aus etwa $3,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen bestand, kann davon ausgegangen werden, dass jeder unabhängige Klon mindestens 1x gefiltert wurde.

2.5.4 Anlegen von Masterplatten

Zur besseren Handhabung und Übersicht empfiehlt es sich, potentiell positive Klone aus der Hefe-Verpaarung (siehe 2.5.3) auf sogenannte Masterplatten zu überstreichen. Es wurden Schalen mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet auf die jeweils 50 Klone ausgestrichen und mit einem Buchstaben- und Zahlen-Code (Schale 1: A1 bis A50, Schale 2: B1 bis B50, etc.) versehen wurden. Neben dem Mangel der vier Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin war der SD-Agar der Masterplatten zudem durch eine 30mM Konzentration von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) charakterisiert. Durch die Zugabe von 3-AT erfolgte ein erster Selektionsschritt von falsch positiven Interaktionen aus der Hefe-Verpaarung. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des HIS3 Proteins und verstärkt dadurch die Histidin Auxotrophie auf den Masterplatten. Die Masterplatten wurden für 5-7 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend mit Parafilm abgedichtet bei 4°C gelagert. Für weitere Untersuchungen, wie den β -Gal-Test, wurden die Hefeklone auf neue Platten überstrichen.

2.5.5 β -Galaktosidase (β -Gal) –Test

Für den β -Gal-Test wurde pro Platte ein Filterpapier (rund, 10 cm Durchmesser) in 2-2,5 ml frisch angesetzter Z-Puffer/X-Gal Lösung eingeweicht. Ein zweites trockenes Filterpapier wurde auf die Platte mit den zu untersuchenden Hefekolonien gelegt und leicht angedrückt. Das nun durch die Hefe leicht feuchte Filterpapier wurde mit einer Pinzette vorsichtig angehoben und zum Aufschluss der Hefezellen für ca. 10 sec. in flüssigen Stickstoff gehalten. Nachdem das Filterpapier mit den Hefezellen bei Raumtemperatur kurz aufgetaut war, wurde es mit der Seite auf dem sich die Hefezellen befanden nach oben, auf das in Z-Puffer/X-Gal eingeweichte Filterpapier gelegt. Bestand eine Interaktion zwischen dem Köder- und Beute-Protein konnte in den nächsten sechs Stunden eine Blaufärbung der Hefezellen beobachtet werden. Färbungen die nach diesen sechs Stunden auftraten waren unspezifisch.

Verwendete Lösungen:

Z-Puffer/X-Gal Lösung

10 ml Z-Puffer
167 μ l X-Gal
27 μ l β -Mercaptoethanol

Sigma #M7522

2.5.6 Plasmid-Isolierung aus Hefezellen

Um die Plasmid-DNA der unbekannt potentiellen Interaktionspartner von Fto zu isolieren wurde zuvor ein Abstrich einer bestimmten Kolonie von der Masterplatte in 5 ml SD/-Leu Medium übertragen. Unter dem Mangel von Leucin, sind die AH109 Hefezellen nicht in der Lage das Köder-Plasmid zu transkribieren. So erhält man eine selektive Vermehrung von Hefezellen, die ausschließlich das Beute-Plasmid besitzen. Nach einer etwa 36 stündigen Inkubationszeit unter Schütteln bei 30°C wurde die Kultur in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 15 min bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende Isolierung der Beute-Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen #27104) verwendet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert. Da Hefezellen schwer aufzuschließen sind wurden etwa 0,5 ml Glasperlen zu der Suspension gegeben und das Ganze für 10 min kräftig geschüttelt. Anschließend wurde 0,3 ml Puffer P2 zugegeben, das Gemisch invertiert und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,3 ml Puffer P3 wurde erneut invertiert und 5 min. auf Eis inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Gemisch für 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen Tip 20 Säule mit 1 ml QBT Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand auf die Säule gegeben und vollständig durchgelaufen lassen. Der Durchfluss wurde verworfen und zum Waschen der Plasmid-DNA 2x 2 ml QC-Puffer auf die Säule gegeben. Durch die Zugabe von 0,8 ml QF-Puffer wurde die DNA von der Säule eluiert und in einem frischen 2 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Es wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugefügt und gut gemischt. Anschließend wurde das Eluat bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 1 ml 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 min. gewaschen. Abschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und die Plasmid-DNA ca. 20 µl dH₂O rückgelöst. Weil aus Hefezellen in der Regel nur sehr geringe Mengen an DNA isoliert werden kann, wurde die DNA anschließend mittels Elektro-Transformation (siehe 2.2.4) in Bakterien eingebracht, vermehrt und aus diesen isoliert (siehe 2.1.1.2).

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in dH ₂ O
Isopropanol	abs.

2.5.7 (Re-)Transformation in Hefezellen

Die Hefe-Transformation startet mit der Herstellung einer Übernacht-Kultur. Dafür wurden etwa 100 µl einer bei 4°C ruhenden AH109 Hefekultur in 10 ml frisches YPDA-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler bei 200 Upm inkubiert. Am folgenden Morgen wurde mit dieser Übernachtkultur eine 50 ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Anschließend wurde diese Hauptkultur bei 30°C und 200 Upm so lange inkubiert (3-5 Stunden), bis die Hefe eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht hatte. Daraufhin wurde die Hefekultur in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) die Hefezellen herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Hefe-Pellet mit 25 ml dH₂O gewaschen. Es folgte eine wiederholte 5 minütige Zentrifugation bei 1000 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) und Raumtemperatur. Anschließend wurde das Wasser so gut wie möglich entfernt und das Hefe-Pellet in 3-5 ml 50% (w/v) PEG 4000 resuspendiert. Die Zellen waren nun kompetent und konnten innerhalb einer Stunde zur Transformation verwendet werden. Für die Transformation wurden in einem Eppendorfgefäß 0,1 µg Köder-Plasmid-DNA (pGBKT7 Fto) und 0,1 µg Beute-Plasmid-DNA (pACT2 XYZ) vorgelegt und ein Gemisch aus 360 µl der Hefezellsuspension, 54 µl 1 M Lithiumacetat und 68 µl dH₂O dazugegeben. Alles wurde gut gemischt und für 30 min. bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 min. und eine anschließende Abkühlung für 5 min. auf Eis. Dieser Transformationsansatz wurde bei 2500 Upm (Eppendorf Centrifuge 5415D) für 3 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 75-100 ml dH₂O aufgenommen. Die eine Hälfte dieses Ansatzes wurde auf einer SD-Agarplatte –TL und die andere auf einer SD-Agarplatte –TLHA ausgestrichen und für 2-8 Tage bei 30°C inkubiert. War die Transformation der beiden Plasmide in die Hefezellen erfolgreich wuchsen auf der SD-Agar Platte –TL Hefekolonien. Ein Wachstum der Hefezellen auf der –TLHA Platte war nur zu sehen, wenn eine Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein bestand.

2.5.8 DNA-Sequenzierung

Um den mit dem Beute-Protein interagierenden Partner zu identifizieren, wurde die Plasmid-DNA dieses Partners sequenziert. Die durch eine Plasmid-Midi-Isolation (siehe 2.1.13) erhaltene DNA wurde zur Sequenzierung an das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität weitergeleitet.

2.5.9 Klonierung in Säuger-spezifischen Expressionsvektor

Ein Teil der potentiellen Interaktionspartner wurde für weitere Untersuchungen aus dem Hefe-Vektor in den Säuger-spezifischen pCMV-Myc-Expressionsvektor kloniert. Zunächst wurden das Plasmid des jeweiligen Interaktionspartners und das pCMV-Myc-Plasmid mittels der Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI enzymatisch verdaut (siehe 2.1.3). Dadurch wurde die DNA-Sequenz des potentiellen Interaktionspartners aus dem Hefe-Vektor herausgeschnitten und der pCMV-Myc-Vektor im Bereich des Polylinkers geöffnet. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe 2.1.4) und Gelextraktion (siehe 2.1.5) dieser DNA-Fragmente, wurde der pCMV-Myc-Vektor mit der DNA-Sequenz des jeweiligen potentiellen Interaktionspartners ligiert (siehe 2.1.6).

2.6 Methoden zur Bestätigung von Protein-Interaktionen

2.6.1 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist die Immunopräzipitation von stabilen Proteinkomplexen. Sie ist eine *in vitro* Methode, die unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen durchgeführt werden kann. Die Co-IP ist eine der am häufigsten angewendeten Methoden zur Identifizierung und/oder Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen.

Bei der Co-IP wird ein bestimmtes Protein, für das Interaktionen identifiziert oder bestätigt werden sollen, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus einem Zell- oder Gewebelysat präzipitiert. Der Antikörper ist dabei an Protein A- oder G-Sepharosekügelchen gekoppelt,

durch die die Isolation des gewünschten Proteinkomplexes aus dem gesamt Proteingemisch erleichtert wird. Potentiellen Interaktionspartner, die an das bestimmte Protein gebunden sind, werden co-präzipitiert und können anschließend mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden.

Wenn spezifische Antikörper für die zu untersuchenden Proteine vorhanden sind, ist es mit der Co-IP mögliche, Interaktionen endogen zu bestätigen. Da nicht für alle, in dieser Arbeit analysierten Proteine, spezifische Antikörper zur Verfügung standen, wurden diese zuvor in einen Myc-getaggen Expressionsvektor kloniert (siehe 2.5.9). Diese Plasmid-DNA wurde daraufhin einen Tag vor Beginn der Co-IP in die NIH-3T3 Zellen transfiziert (siehe 2.3.3), wodurch eine Expression des Myc-Fusionsproteins in den Zellen erzielt wurde.

Zu Beginn der Co-IP wurden die Protein-G-Agarose-Kugeln (Millipore #16-266) vorbereitet. Pro Co-IP-Ansatz wurden jeweils 20 µl Protein-G-Agarose-Kugeln für das *Preclearing*, die Negativkontrolle und den eigentlichen Co-IP-Ansatz in drei 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Daraufhin wurden die Protein-G-Agarose-Kugeln 2x mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Dafür wurde das PBS zu den Kugeln gegeben, gut invertiert und für 10 min. bei 4°C und 7000 Upm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge 13). Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Abschließend folgte ein Waschschrift mit 1 ml kaltem RIPA-Puffer. Es wurde ebenso verfahren, wie in den Waschschriften mit PBS. Die Protein-G-Agarose-Kugeln waren nun für den Einsatz in der Co-IP bereit.

Somit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wurde möglichst gut abgesaugt und 800 µl/10 cm Schale kalter RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben. Diese wurden daraufhin für mind. 10 min. im Kühlschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch mehrmaliges Rauf- und Runterziehen der Zellsuspension durch eine dünne Kanüle, wurde das Lysat homogenisiert. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm, zur Beseitigung der Zelltrümmer. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen, wurden dem Proteinlysat, die für das *Preclearing* vorbereiteten Protein-G-Agarose-Kugeln, zugefügt. Dieses Gemisch wurde bei mäßiger Geschwindigkeit über Nacht bei 4°C rotiert. Zu den Kugeln, die für die eigentliche Co-IP vorgesehen waren, wurde die entsprechende Menge (siehe Tabelle unterhalb dieses Abschnitts) des Antikörpers gegeben, durch den die IP erfolgen sollte. Zu den Kugeln für die Negativkontrolle wurde statt des

Antikörpers, die gleiche Menge RIPA-Puffer gegeben. Für eine verbesserte Liquidität wurden zusätzlich etwa 400 μ l RIPA-Puffer hinzugefügt. Diese Proben wurden ebenfalls über Nacht bei 4°C und mäßiger Geschwindigkeit rotiert.

Am darauf folgenden Tag wurde das Preclearing-Proteinlysate für 7 min. und 4000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit kaltem RIPA-Puffer auf etwa 1,1 ml aufgefüllt. Diese 1,1 ml wurden anschließend auf drei Eppendorfgefäße aufgeteilt. 100 μ l dienten als Input-Kontrolle und wurden bis zur Durchführung der Western-Blot-Analyse bei 4°C gelagert (1-2 Tage). Der restliche ml wurde halbiert und etwa 5 Stunden bei 4°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Protein-G-Agarose-Kugeln, die über Nacht mit bzw. ohne Antikörper inkubiert wurden für 5 min. und 3000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der zur Liquidisierung zugefügte RIPA-Puffer wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und die Kugeln mit 1 ml kaltem RIPA-Puffer gewaschen. Dafür wurde 1 ml Puffer zu den Kugeln gegeben, vorsichtig invertiert und erneut für 5 min. bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der 1 ml RIPA-Puffer verworfen und die mit dem Antikörper inkubierten Protein-G-Agarose-Kugeln zu der einen Hälfte des Proteinlysates gegeben. Zu der anderen Hälfte wurden die Kugeln, welche ohne Antikörper inkubiert wurden, hinzugefügt (Negativkontrolle). Diese Ansätze wurden über Nacht bei geringer Rotation und 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min. bei 4°C und 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protein-G-Agarose-Kugeln, an denen die spezifischen Proteine anhefteten, durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer und erneuter Zentrifugation gewaschen. Abschließend wurde der RIPA-Puffer entfernt, 20 μ l 4x SDS-Ladepuffer auf die Kugeln gegeben und das Ganze für 5 min. bei 95°C, zur Denaturierung der Proteine, aufgeköcht. Zu den am Vortag angefertigten Input-Kontrollen wurde ebenfalls 4x SDS-Ladepuffer (35 μ l) und die Proben aufgeköcht. Alle Proben wurden daraufhin entweder zeitnah auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Für die IP verwendete Antikörper:

cMyc	10 µl auf 20 µl Protein-G-Agarose-Kugeln	<i>anti-mouse, monoclonal</i> Santa Cruz #sc-40
eIF5A	1 µl auf 20 µl Protein-G-Agarose-Kugeln	<i>anti-rabbit, monoclonal,</i> Abcam #ab32443
gpFto	7 µl auf 20 µl Protein-G-Agarose-Kugeln	<i>anti-guinea-pig, Serum</i> (EMT, HHU-Düsseldorf)
rFto	7 µl auf 20 µl Protein-G-Agarose-Kugeln	<i>anti-rabbit, affinitätsaufgereingt</i> (EMT, HHU-Düsseldorf)

Verwendete Lösungen:

4x SDS-Ladepuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS 40 % (w/v) Glycerin 0,4 % Bromphenolblau vor Gebrauch 20 % β-Mercaptoethanol	Merck #115925 Sigma #M7522
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3; autoklaviert	
Protein-G-Agarose RIPA-Puffer	50% <i>slurry</i> 50 mM Tris-HCl, pH7,4 1% NP-40 0,25% Natrium-Deoxycholat 150 mM NaCl vor Gebrauch Protease-Inhibitor und PMSF (10 µl/ml)	Millipore #16-266 Roche #11836153001 Fluka #93482

2.6.2 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Die Methode der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (*Tandem Affinity Purification*, TAP) kann sowohl zur Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen, als auch, in Kombination mit anschließender Massenspektrometrie, zur Identifizierung neuer Interaktionspartner eingesetzt werden. Die TAP-Analyse erlaubt, genau wie die Co-Immunopräzipitation, die Aufreinigung der Proteinkomplexe unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen. Außerdem ist die TAP-Methode durch zwei aufeinanderfolgenden Aufreinigungs-Schritte höchst spezifisch und schließt einen starken Hintergrund an unspezifischen Bindungen aus.

Voraussetzung für die TAP-Methode ist die Fusion des Zielproteins mit einem doppelten Tag. Für die in dieser Arbeit durchgeführten TAP-Analysen wurde der Doppeltag-Vektor pDT3-HA Fto verwendet. Dieser besitzt neben der *Fto*-cDNA ein 3x Flag- und ein Strep (Streptavidin)-Tag, welche für die zwei Aufreinigungsschritte essentiell sind. Außerdem enthält dieser Vektor ein HA-Tag, zur abschließenden Detektion des Fto-Fusionsproteins in der Western-Blot-Analyse. Zu Beginn der Analyse wurde der pDT3-HA Fto-Vektor in NIH-3T3 Zellen transfiziert. Pro TAP-Ansatz wurden zehn konfluente 10 cm Zellkulturschalen benötigt. Etwa 24 Stunden nach der Transfektion wurden das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit Zellkultur-PBS gewaschen. Nachdem das PBS gut abgesaugt war, wurde pro 10 cm Schale 1 ml RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen aller zehn Schalen abgeschat und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Zur Homogenisierung des Lysate, wurde dieses mehrmals durch eine dünne Kanüle gezogen. Durch eine Zentrifugation (15 min., 4°C, 6000 Upm; Heraeus Megafuge 1.0R) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und ein 50 µl Aliquot, für die Input-Kontrolle entnommen. Danach folgte die erste Aufreinigung über M2-Agarose-Flag-Kügelchen (Sigma #A2220). 200 µl dieser Kügelchen wurden zu dem Proteinlysate gegeben und dieses Gemisch für 2 Stunden bei 4°C und 350 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Nach Beendigung dieser Inkubation wurde eine Bio-Spin Chromatographie Säule (BIO-RAD # 732-6402) mit 1 ml RIPA-Puffer rehydriert und anschließend das Proteinlysate (inkl. der Kügelchen) in 1 ml Schritten auf die Säule gegeben. Der Durchfluss (die nicht interagierenden Proteine) wurde verworfen. Die sich nun auf der Säule befindenden Kügelchen, inkl. des getaggten Fto-Proteins und dessen interagierende Proteine, wurden durch die Zugabe von 2x 1 ml TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proteine durch die Zugabe von 4x 250 µl Flag-Peptid (300 µg/ml in TBS) von den Kügelchen eluiert. Das Eluat wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und ein 20 µl Aliquot für die spätere Western-Blot-Analyse entnommen. Es folgte die zweite Aufreinigung. Dafür wurde zunächst eine Micro-Spin Chromatographie Säule (BIO-RAD # 732-6402) mit 1 ml Strep-Puffer rehydriert. Anschließend wurden 200 µl Sepharose-Streptactin-Kügelchen (IBA #2-1201-010) auf die Säule gegeben. Sobald die Flüssigkeit, in der die Kügelchen gelagert waren, durch die Säule getropft war, wurde das Eluat aus der ersten Aufreinigung in 250 µl Schritten auf die Säule gegeben. Nachdem das Eluat vollständig über die Säule gelaufen war, wurden die Kügelchen (inkl. der gebundenen

Proteine) durch die Zugabe von 2x 1 ml Strep-Puffer gewaschen. Durch die Zugabe von 4x 250 µl Biotin (2,5 mM/ml in Strep-Puffer) wurden die Proteine von den Kügelchen eluiert und in einem 2 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Für die spätere Western-Blot-Analyse wurde ein 20 µl Aliquot entnommen. Abschließend wurde das Eluat der zweiten Aufreinigung konzentriert. Dafür wurden zunächst 5 µl StrataClean-Kügelchen (Stratagene #400714-61) zu dem Eluat gegeben. Während der Inkubation dieses Gemisches bei 4°C rotierend über Nacht, wurden die gesamten Proteine an die Kügelchen gebunden. Am folgenden Tag wurde das Gemisch für 5 min. bei 4°C und 3000 Upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13) und der Überstand verworfen. Durch die Zugabe der entsprechenden Menge 4x SDS-Ladepuffer und einer Inkubation für 5 min. bei 95°C wurden die Proteine von den Kügelchen gelöst und denaturiert. Auch zu den, während der Durchführung entnommenen Aliquots, wurde die entsprechende Menge 4x SDS-Ladepuffer gegeben und die Proteine zur Denaturierung aufgeköcht. Die Proben wurden nun entweder direkt auf ein SDS-Gel (siehe 2.4.3) aufgetragen und mittels Western-Blot-Analyse (siehe 2.4.4) untersucht, oder bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

4x SDS-Ladepuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 8 % SDS 40 % (w/v) Glycerin 0,4 % Bromphenolblau vor Gebrauch 20 % β-Mercaptoethanol	Merck #115925 Sigma #M7522 Sigma #B4501
Biotin Flag-Peptid	(N) Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp- Gly- Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile- Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (C)	BMFZ (HHU-Düsseldorf)
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH7,4 1% NP-40 0,25% Natrium-Deoxycholat 150 mM NaCl vor Gebrauch Protease-Inhibitor und PMSF (10 µl/ml)	Roche #11836153001 Fluka #93482
Strep-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA add 100 ml mit dH ₂ O auffüllen, pH 8,0	
TBS-Puffer	150 mM NaCl 3 mM KCl 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 add 100 ml mit dH ₂ O auffüllen, pH 7,4	
Zellkultur-PBS		Biochrom #L1820

2.7 *In situ* Hybridisierung

Die *In situ* Hybridisierung erlaubt die Detektion von Transkripten an ihrem Synthesort im Gewebe. Dabei erfolgt die Hybridisierung durch eine markierte, komplementäre RNA-Sonde. Abschließend wird diese Sonde mittels spezifischer, Enzym-gekoppelter Antikörper und einer nachfolgenden Farbreaktion nachgewiesen.

2.7.1 Synthese der RNA-Sonden

Vor Beginn der Sondensynthese wurde zunächst das gewünschte Plasmid linearisiert (siehe 2.1.3) und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.1.1.4) aus dem Ansatz des Restriktionsverdau gefällt. Für die eigentliche Sondensynthese wurde anschließend der folgende Ansatz zusammengegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert:

3 µl	linearisiertes Plasmid	
2 µl	10x Transkriptions-Puffer	Roche #1465384
2 µl	10x DIG RNA Labeling Mix	Roche #11277073910
2 µl	T7-RNA-Polymerase	Roche #10881767001
1 µl	RNAse Block	Stratagene #300152-51
10 µl	DEPC-H ₂ O	

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde dem Ansatz der Sondensynthese, zur Fällung der Sonde,

	2,5µl	4 M LiCl,
	2 µl	0,5 M EDTA,
und	75 µl	100% EtOH

zugefügt und dieses Gemisch für 30 min. bei -20°C inkubiert. Darauf folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm (Heraeus Biofuge 13). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch die Zugabe von 75 µl 70% EtOH und wiederholter Zentrifugation (10 min., 4°C, 13000Upm) gewaschen. Der Überstand wurde gut abgenommen und das Pellet auf Eis luftgetrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 60 µl 50% Formamid resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

50% Formamid	50% (v/v) Formamid	
	50% (v/v) DEPC-H ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in DEPC-H ₂ O	
EtOH	abs.	
DEPC-H₂O	H ₂ O	
	+0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat	Sigma #D5758
	autoklaviert	

2.7.2 Whole Mount *In situ* Hybridisierung

Die Whole Mount *In situ* Hybridisierung (WISH) ermöglicht die Detektion und Darstellung von Gen-spezifischer RNA im gesamten Embryo. Die, für die WISH, verwendeten Embryonen wurden nach der Präparation über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert. Am folgenden Tag wurde das PFA entfernt und die Embryonen 3x für 5 min. in PBT leicht wippend gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen wie folgt dehydriert:

- 5 min. in 25% MeOH
- 5 min. in 50% MeOH
- 5 min. in 75% MeOH
- 5 min. in 100% MeOH.

Nach dieser Methanolreihe wurden die Embryonen in neues 100% Methanol überführt und mindestens über Nacht bei -20°C inkubiert. Vor der Weiterverarbeitung wurden mit einer Stecknadel die Hirnbläschen zerstoßen. Dann folgte die Rehydrierung der Embryonen:

- 5 min. 75% MeOH
- 5 min. 50% MeOH
- 5 min. 25% MeOH
- 3x 5 min. PBT.

Anschließend wurden die Embryonen für 15 min. bei 37°C in 10 µg/ml Proteinase K in PBT inkubiert. Es folgte ein Waschschriff für 5 min. ohne Wippen und bei Raumtemperatur in Glycin (2 mg/ml in PBT). Durch eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 4% PFA + 0,2% Glutaraldehyd (verdünnt in PBT) wurden die Embryonen nachfixiert. Nach dem Waschen (3x 5 min.) in PBT folgte die Hybridisierung. Zunächst wurden die Embryonen für mind. 1 Stunde in Hybridisierungs-Puffer prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die Sonde in frischen Hybridisierungs-Puffer gegeben und für 10 min. bei 80°C denaturiert. Nach der Prähybridisierung wurden die Embryonen in den Hybridisierungs-Puffer mit der Sonde überführt und über Nacht bei 70°C hybridisiert. Am nächsten Tag folgten mehrere

Posthybridisierungswaschschritte. Dafür wurden die Wasch-Puffer zuvor bei 70°C vorgewärmt und die Embryonen 2x für 30 min. bei 70°C in Wasch-Puffer I inkubiert und 2x für 30 min. bei 65°C in Wasch-Puffer II. Nach dem Waschen folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen und die Inkubation mit dem Antikörper. Die Embryonen wurden 2x für 5 min. in TBST-Levamisol gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Block-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen bei Raumtemperatur für 2 Stunden in α -Dig-Antikörper (1/2000 in 2% Schaf-Serum/TBST-Levamisol) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Embryonen mindestens 6x für 30 min. mit TBST-Levamisol gewaschen, wobei der letzte Waschschrift über Nacht erfolgte. Am dritten und letzten Tag der WISH erfolgte die Färbung. Es wurde mit der Präinkubation für 2x 15 min. in NTMT-Levamisol begonnen. Anschließend wurden die Embryonen im Dunkeln so lange in der Färbelösung inkubiert, bis die Färbung stark genug war. Wenn die gelbe Farbe der Lösung ins lila umschlug, wurde die Färbelösung gewechselt. Durch mehrmaliges Waschen der Embryonen mit PBT wurde die Färbereaktion abgestoppt. Die Lagerung der Embryonen erfolgte in 0,4% PFA bei 4°C.

Verwendete Lösungen:

4% PFA	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS	
25% MeOH	25% Methanol (v/v) in PBT	
50% MeOH	50% Methanol (v/v) in PBT	
75% MeOH	75% Methanol (v/v) in PBT	
100% MeOH	abs.	
α-Dig-Antikörper	Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche #11093274910
Block-Puffer	10% Schaf-Serum in TBST-Levamisol	
Färbelösung	8 μ l NBT/BCIP Lösung in 1 ml NTMT-Levamisol	Roche # 1681451
Glutaraldehyd		Sigma #G6257-10ML
Glycin		AppliChem #A1377,1000
Hybridisierungs-Puffer	50% deionisiertes Formamid 5x SSC (pH 5,0) 50 μ g/ml Hefe-RNA 1% SDS 50 μ g/ml Heparin	AppliChem #A2156,0500 Roche #10109525001
Levamisol		Sigma #H3393-25 Sigma #L9756-10G
NTM	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ in dH ₂ O	
NTMT-Levamisol	10% Tween20 0,5 mg/ml Levamisol in NTM	
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	

	16 mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	
	150 mM NaCl	
PBT	0,1% (v/v) Tween20 in PBS	
Proteinase K	10 mg/ml	Roche #1000144
TBS (10x)	8 g NaCl	
	0,2 g KCl	
	25 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5	
	add 100 ml mit dH ₂ O	
TBST-Levamisol	10% Tween20	
	0,5 mg/ml Levamisol	
	in TBS	
Tween20		AppliChem #A4974
Wasch-Puffer I	50% deionisiertes Formamid	AppliChem #A2156,0500
	5x SSC (pH 5,0)	
	1% SDS	
Wasch-Puffer II	50% deionisiertes Formamid	AppliChem #A2156,0500
	5x SSC (pH 5,0)	

2.8 Histologische Techniken

2.8.1 Paraffindünnschnitte

Für die Anfertigung von Paraffin-Schnitten, wurden die Embryonen nach der Präparation (siehe 2.11.2) aus dem Mutterleib in 4% PFA bei 4°C über Nacht fixiert. Waren die Embryonen im Alter E18.5 oder älter, mussten sie vor der Fixierung vorsichtig gehäutet werden. Durch eine Ethanolreihe am folgenden Tag, wurden die Embryonen bei leichtem Wippen entwässert.

Ethanolreihe:	2 Stunden	70% EtOH
	2 Stunden	80% EtOH
	2 Stunden	90% EtOH
	2 Stunden	100% EtOH

Nach der Ethanolreihe wurden die Embryonen in n-Butanol überführt und über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Wippen inkubiert. Das n-Butanol wurde bestmöglich entfernt und die Embryonen in flüssiges Paraplast (Paraplast Plus, Roth #X881.2) überführt. Dort wurden sie für mindestens 4 Stunden inkubiert, bis für zwei weitere Stunden ein Vakuum im Inkubationsbehälter erzeugt wurde. Anschließend wurden die Embryonen in gewünschter Ausrichtung in Paraplast eingebettet, welches zunächst noch flüssig war und über Nacht aushärten musste. Daraufhin wurden 12 µm dicke Paraffinschnitte der Embryonen an einem Mikrotom (Leica RM 2035) hergestellt. Die Schnitte wurden zur Streckung in ein 50°C

warmes Wasserbad (GFL 1052) gelegt und mit einem Objektträger (SuperFrost Grün, Roth #2109) aufgenommen. Die Objektträger wurden zur Trocknung der Schnitte auf eine 50°C warme Heizplatte (OMNILAB Jürgens) gelegt. Bis zur weiteren Verwendung (HE-Färbung, siehe 2.8.2 oder BrdU-Analyse, siehe 2.9) wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gelagert.

Verwendete Lösungen:

4% PFA	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in dH ₂ O
80% EtOH	80% (v/v) EtOH in dH ₂ O
90% EtOH	90% (v/v) EtOH in dH ₂ O
100% EtOH	abs.
n-Butanol	

2.8.2 Hämalaun/Eosin-Färbung

Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der negativ geladene Strukturen, wie die Zellkerne, blau anfärbt. Dagegen ist Eosin ein negativ geladener Farbstoff, der alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rottönen anfärbt. So erscheint das Zytoplasma blass rot, kollagenartige Bindegewebsfasern rot, elastische Bindegewebsfasern blass rosa-rot, Muskelgewebe rot und Erythrozyten rot-orange.

Für die Hämalaun/Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden zuvor angefertigte Paraffindünnschnitte (siehe 2.8.1) verwendet. Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger zunächst 2x 5 min. in Xylol und 3 min. in 100% EtOH inkubiert. Anschließend wurden sie jeweils 2 min. in 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH und dH₂O gegeben. Es folgte die Färbung mit Hämalaun für 2 min. und ein 10 minütiger Waschschrift unter fließendem Leitungswasser. Darauf wurden die Schnitte für 20 sec. in Eosin gefärbt und kurz in dH₂O gewaschen. Die anschließende Entwässerung der Schnitte erfolgte durch jeweils 2 min. in 70% EtOH, 90% EtOH, und 100% EtOH. Abschließend wurden die Schnitte für 5 min. in Xylol inkubiert und in Entellan eingedeckelt (Deckgläschen 24x60mm; Menzel-Gläser #1). Die Objektträger wurden über Nacht zum Trocknen auf einen ebenen Untergrund gelegt und abschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Verwendete Lösungen:

50% EtOH	50% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
90% EtOH	90% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
Entellan		Merck #1.07961.0500
Eosin	96% (v/v) Ethanol 2% (w/v) Eosin G 1% (v/v) Essigsäure nach dem Lösen filtriert	Merck #1.15935.0100
EtOH	abs.	
Hämalaun	50 ml Mayers Hämalaun Lösung 150 ml dH ₂ O	Merck #1.09249.2500
Xylol		

2.9 BrdU-Analyse

Die BrdU-Analyse ist eine Methode, mit der DNA-Synthese immunohistochemisch nachgewiesen werden kann. BrdU (Bromodeoxyuridin) ist ein chemisches Analog des Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut und kann anschließend durch spezifische Antikörper detektiert werden.

Zu Beginn der Analyse wurde einer trächtigen Maus 1 ml BrdU pro 100g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. 2 Stunden nach dieser Injektion wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen dem Uterus entnommen (siehe 2.11.2). Die Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und am Mikrotom Paraffindünnschnitte angefertigt (siehe 2.8.1).

Für die BrdU-Färbung wurden die Paraffinschnitte auf dem Objektträger zunächst mit einem Fettstift umrandet. Es folgte die Entparaffinierung der Schnitte in 3x min. Xylol, 2x 2min. 100% EtOH, jeweils 2 min. in 90% EtOH, 70% EtOH und 50% EtOH und abschließend 5 min. in PBT. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min. bei 37°C in vorgewärmter 2 N Salzsäure inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte für 2x 5min. in 0,1 M Na₂B₄O₇ und 2x 5 min. in PBT gewaschen. Zum Demaskieren der versteckten Antigene wurden die Schnitte für 15 min. bei 37°C in Prot-K Lösung inkubiert und anschließend 2x für 5 min. in PBT gewaschen. Daraufhin folgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen für 1 Stunde in 10% Schafsserum/PBT und die Inkubation der Schnitte mit dem BrdU-Antikörper über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 2x 20 min. in PBT gewaschen und anschließend

für 4 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte 2x 5 min. in PBT gewaschen (Dunkel!) und in Aquatex eingedeckelt. Dieses härtete über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln aus. Gelagert wurden die Objektträger bei -20°C.

Verwendete Lösungen:

50% EtOH	50% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
90% EtOH	90% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
anti-BrdU (Primärantikörper)		Invitrogen #B35128
Aquatex		
BrdU labeling reagent		Invitrogen #000103
Dylight 488 (Sekundärantikörper)		Dianova #715-485-151
EtOH	abs.	
HCl	2 N	
Na₂B₄O₇	0,1 M, pH 8,5	
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 150 mM NaCl autoklaviert	
PBT	0,1% Triton in PBS	
Prot-K Lsg.	20 µg/ml Proteinase K in PBS	Roche #1000144
Schafsserum		
Triton		AppliChem #A4975,0500
Xylol		

2.10 Skelett-Färbungen

2.10.1 Knochen-Färbung adulter Mäuse

Bei der Knochenfärbung wird das Calcium der Knochen durch Alizarin Rot angefärbt. Das restliche Gewebe wird so bearbeitet, dass nur noch die Proteinmatrix übrig bleibt, die Maus transparent erscheint und die angefärbten Knochen gut sichtbar werden.

Zu Beginn wurde die Haut, das Gewebe und die Organe bestmöglich entfernt und die Maus für 1 Tag in 96% EtOH fixiert. Zur Säuberung des übriggebliebenen Gewebes wurde die Maus 1-3 Tage in KOH-Lösung leicht geschwenkt. Dabei wurde die KOH-Lösung 5-8x gewechselt. Darauf folgte die Färbung der Knochen in Alizarin-Färbelösung für 2-3 Tage. Auch hier wurde die Lösung mindestens 3x gewechselt. Abschließend folgte eine

Glycerinreihe von 30%, 60% und 100% Glycerin für jeweils 2 Tage. Währenddessen wurde die Glycerinlösung 2-3x gewechselt. Gelagert wurde das Mausskelett in 100% Glycerin bei Raumtemperatur.

Verwendete Lösungen:

30% Glycerin	30% (v/v) Glycerin in dH ₂ O	
60% Glycerin	60% (v/v) Glycerin in dH ₂ O	
96% EtOH	technischer EtOH	
Alizarin-Färbelsg.	0,5 ml Alizarin Rot S (Stocklsg.)	
	100 ml 1% KOH	
Alizarin Rot S (Stocklsg.)	0,1% (w/v) Alizarin Rot S	Sigma #A5533
KOH-Lsg.	2% KOH	
	in dH ₂ O	
Glycerin		

2.10.2. Knochen-Knorpel-Färbung neugeborener Mäuse

Zur Anfärbung der Knochen(rot)- und Knorpel(blau)-Elemente wurden neugeborene Mäuse zunächst sorgfältig gehäutet (vorsichtig an den Gliedmaßen) und die Organe entnommen. Zur Fixierung und Dehydrierung wurden die Embryonen anschließend bei Raumtemperatur über Nacht in 96% EtOH inkubiert. Es folgte eine weitere Fixierung in Aceton für 1-3 Tage. Anfärbt wurde das Skelett der Mäuse durch die Inkubation in der Färbelösung unter leichtem Schütteln über Nacht bei 37°C. Nach der Färbung wurden die Embryonen für etwa 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in 96% EtOH gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen unter leichtem Schwenken bei 37°C so lange in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Skelettelemente gut sichtbar waren. Durch eine nachfolgende Glycerinreihe (50%-80%-100%; leicht schwenken) wurde die Entfärbereaktion abgestoppt und das, die Knochen umgebende, Gewebe etwas transparenter. Gelagert wurden die Embryonen bei Raumtemperatur in 100% Glycerin

Verwendete Lösungen:

50% Glycerin	50% (v/v) Glycerin in dH ₂ O	
70% EtOH	70% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
80% Glycerin	80% (v/v) Glycerin in dH ₂ O	
95% EtOH	95% (v/v) EtOH in dH ₂ O	
96% EtOH	technischer EtOH	
Aceton	technisch	
Alizarin Rot S (Stocklsg.)	0,1% (w/v) Alizarin Rot S	Sigma #A5533

Alzian Blau 8GX (Stocklsg.)	in 95% EtOH 0,3% 8(w/v) Alzian Blau 8GX	Sigma #A5268
Entfärbelsg.	in 70% EtOH 1% KOH 20% (v/v) Glycerin in dH ₂ O	
Essigsäure Färbelösung	konz. 170 ml 70% EtOH 10 ml konz. Essigsäure 10 ml Alizarin Rot S (Stocklsg.) 10 ml Alzian Blau 8GX (Stocklsg.)	
Glycerin		

2.11 Arbeiten mit Mäusen

2.11.1 Tierhaltung und Verpaarung

Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Um alle Genotypen zu erhalten wurden *Fto*^{+/-}-Weibchen mit *Fto*^{+/-}-Männchen verpaart. Wenn Embryonen zu einem definierten Embryonalstadium entnommen werden sollten, wurden die Weibchen täglich am Morgen nach Vaginalpfropfen untersucht. Dadurch konnte das Datum der Befruchtung, die in der Regel über Nacht stattfindet, festgelegt werden.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der *Fto*-Mutation in verschiedenen Mauslinien untersucht. Zum Einen wurden *Fto*-Mäusen mit NMRI Hintergrund (Tg104N) oder mit C57BL/6 Hintergrund (Tg104) analysiert. Zum Anderen wurden die *Fto*-Mäuse der F1-Generation aus NMRI und C57BL/6 (Tg104BN) und *Fto*-Mäuse mit NMRI Hintergrund und einem *Fto*-Transgen (Tg104N Tg115) untersucht.

2.11.2 Präparation der Embryonen

Zum Zeitpunkt des gewünschten Embryonalstadiums der Embryonen wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen dem Uterus entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Neugeborene Mäuse wurden durch das Abtrennen des Kopfes mit einer scharfen Schere getötet. Die Dottersackmembran wurde gegebenenfalls entfernt und für die Bestimmung des Genotyps (siehe 2.1.7.2) ein Stück Gewebe (in der Regel die

Schwanzspitze) entnommen. Sollten weiterführend RNA- oder Protein-Analysen von den Embryonen durchgeführt werden, wurde diese entweder sofort weiterverarbeitet oder in RNA later aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 150 mM NaCl autoklaviert	
RNA later		Qiagen #76104

2.12 Fotodokumentation und Statistik

2.12.1 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation wurde an einem Durchlichtmikroskop (Axioskop2, Zeiss) mit aufgesetzter Kamera (AxioCam HRc und AxioCam MRm, Zeiss) oder an einem Stereomikroskop (SteREO Discovery V8, Zeiss) mit aufgesetzter Kamera (AxioCam MRc, Zeiss) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.12.2 Statistik

Für die Daten ist jeweils der Mittelwert \pm des Standardfehlers des Mittelwertes angegeben. Die Prüfung der Signifikanz der Genotypen- und Geschlechtsverteilung sowie der Überlebensraten wurde anhand des Chi-Quadrattests vollzogen. Die Signifikanz für die Länge der Brustbeine und die Expressionsdaten aus den Realtime- und Western-Blot-Analysen wurde mit Hilfe der studentischen t-Verteilung ermittelt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant (*), ein p-Wert von $<0,01$ als statistisch hoch signifikant (**) und ein p-Wert von $<0,001$ als statistisch höchst signifikant (***) angesehen. Der Chi-Quadrattest wurde mit Hilfe des Free-Software Programmes „R“ durchgeführt und alle übrigen statistischen Daten wurden mit Excel behoben.

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht

Laut den Mendelschen Regeln werden bei einer $Fto^{+/-} \times Fto^{+/-}$ Verpaarung 50% $Fto^{+/-}$ - und jeweils 25% $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Nachkommen erwartet. In der letzten Zeit entstand jedoch der Eindruck, dass zum Zeitpunkt des Absetzens, im Alter von ca. drei Wochen (P21), nur sehr wenige $Fto^{-/-}$ -Mäuse unter den Nachkommen waren. Dies legte den Verdacht nahe, dass die $Fto^{-/-}$ -Tiere einen oder mehrere Entwicklungsdefekte aufweisen, die während der Embryonalentwicklung oder in den ersten drei Wochen nach der Geburt zum Tod dieser Mäuse führen.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Genotypenverteilung der Fto -Mäuse zu verschiedenen prä- und postnatalen Zeitpunkten bestimmt und der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem ein Teil der $Fto^{-/-}$ -Mäuse zu sterben scheint.

3.2 Genotypenverteilung und Letalität der Fto -Mäuse

Um den Verdacht der teilweisen Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse statistisch belegen zu können und den voraussichtlichen Todeszeitpunkt zu ermitteln, wurde in den folgenden Abschnitten die Genotypenverteilung der Fto -Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung analysiert.

Da ebenfalls der Verdacht bestand, dass sich die Fto -Mutation in verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich stark ausprägt, wurden in den folgenden Untersuchungen verschiedene Mausstämme mit jeweils der gleichen Fto -Mutation analysiert. Die meisten Hinweise auf einen defekten embryonalen Phänotyp konnten in den Fto -Mäusen mit NMRI Hintergrund (Tg104N) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren die $Fto^{-/-}$ -Embryonen mit C57BL/6 Hintergrund (Tg104) unauffällig. Zusätzlich wurden die Fto -Mäuse der F1-Generation aus NMRI und C57BL/6 (Tg104BN) und Fto -Mäuse mit NMRI Hintergrund und einem Fto -Transgen (Tg104N Tg115) untersucht.

3.2.1 Analyse der Tg104N-Mauslinie

Zu Beginn wurde die Genotypenverteilung der *Fto*-Mäuse mit NMRI Hintergrund (Tg104N) zu verschiedenen pränatalen Entwicklungsstadien (E11.5, E12.5, E15.5, E16.5, E17.5 und E18.5) analysiert. Dafür wurden die *Fto*^{+/-}-Muttertiere zum jeweiligen Trächtigkeitzeitpunkt getötet, die Embryonen aus dem Uterus der Mutter präpariert und genotypisiert. Das prozentuale Verhältnis der Genotypen in den sechs analysierten Embryonalstadien ist in der Tabelle 3.1 aufgeführt. Es zeigt sich, dass in allen Embryonalstadien der Tg104N-Mäuse keine Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung besteht. Eine Letalität der *Fto*^{-/-}-Embryonen während der Embryonalentwicklung kann somit ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.1: Die Genotypenverteilung der Tg104N-Mäuse in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Genotypenverteilung der Tg104N-Mäuse wurde in sechs verschiedenen Embryonalstadien (E11.5, E12.5, E15.5, E16.5, E17.5 und E18.5) zum Zeitpunkt der Geburt (P0) und im Alter von drei Wochen (P21) statistisch analysiert. Zum Zeitpunkt P0 konnten 25 der insgesamt 768 Mäuse nicht genotypisiert werden, da sie von den Elterntieren aufgefressen wurden. In der letzten Spalte der Tabelle ist das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests (χ^2 -Test) aufgeführt. In keiner der Embryonalstadien besteht eine Abweichung von dem nach Mendel erwarteten Genotypenverhältnis, jedoch kann zum Zeitpunkt P0 und P21 eine signifikante bzw. höchst signifikante Abweichung festgestellt werden.

	n	<i>Fto</i> ^{+/+}	<i>Fto</i> ^{+/-}	<i>Fto</i> ^{-/-}	χ^2 -Test
erwartet (nach Mendelschen Regeln)		25%	50%	25%	
E11.5	113	18,60%	51,30%	30,10%	p=0,4453
E12.5	43	30,20%	46,50%	23,30%	p=0,8631
E15.5	97	18,50%	54,60%	26,80%	p=0,5529
E16.5	48	16,70%	56,30%	27,10%	p=0,6016
E17.5	21	38,10%	42,90%	19%	p=0,6521
E18.5	61	24,60%	55,70%	19,70%	p=0,7484
P0	768 (25)	23,60%	53,80%	19,50%	p=0,0369 (*)
P21	554	27,30%	65,90%	7%	p=1,6x10 ⁻¹⁵ (***)

Die Bestimmung der Genotypenverteilung der *Fto*-Mäuse drei Wochen nach der Geburt (P21) bestätigte jedoch deutlich den Verdacht, dass die *Fto*^{-/-}-Mäuse zum Zeitpunkt des Absetzens

unterrepräsentiert sind. Mit nur 7%, statt der nach Mendel erwarteten 25%, haben höchst signifikant ($p=1,6 \times 10^{-15}$) weniger $Fto^{-/-}$ -Mäuse bis P21 überlebt (Tabelle 3.1 und Abb. 3.1). Sowohl die $Fto^{+/+}$ -, als auch die $Fto^{+/-}$ -Geschwister traten in dem erwarteten Genotypenverhältnis auf. Den bisherigen Ergebnissen zur Folge stirbt ein Großteil der $Fto^{-/-}$ -Mäuse zwischen der Geburt (neonatal) und P21.

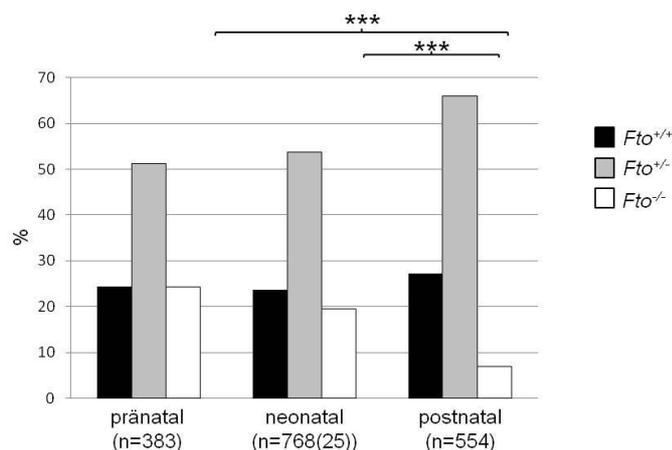


Abb. 3.1: Die prä-, neo- und postnatale Genotypenverteilung der Tg104N-Mäuse.

Pränatal= die Embryonalstadien E11.5, E12.5, E15.5, E16.5, E17.5, E18.5 zusammengefasst; neonatal=P0; postnatal=P21. 25 der insgesamt 768 neonatalen Mäuse konnten nicht genotypisiert werden, da sie von den Elterntieren aufgefressen wurden. Der Anteil der $Fto^{-/-}$ -Mäuse ist postnatal, verglichen mit dem prä- und neonatalen $Fto^{-/-}$ -Anteil, höchst signifikant reduziert ($p=1,6 \times 10^{-8}$ bzw. $4,0 \times 10^{-7}$). Für die $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Mäuse sind keine signifikanten Veränderungen zu beobachten.

Um den genauen Todeszeitpunkt der $Fto^{-/-}$ -Mäuse zu ermitteln, wurden die Zuchtpaare und ihre Nachkommen täglich kontrolliert und sterbliche Überreste der Embryonen für eine Genotypisierung gesammelt. Bereits zum Zeitpunkt P0 ist für die Tg104N-Mäuse eine signifikante Abweichung ($p=0,0369$) der Genotypenverteilung von der nach Mendel erwarteten Verteilung zu beobachten (Tabelle 3.1). Jedoch konnte für 25 der insgesamt 768 Mäuse zum Zeitpunkt P0 keine Genotypisierung durchgeführt werden, da die verstorbenen Embryonen vor dem Auffinden von den Elterntieren vollständig aufgefressen wurden. Bei gesonderter Betrachtung der $Fto^{-/-}$ -Mäuse zum pränatalen (die sechs Embryonalstadien zusammengefasst), neonatalen und postnatalen (P21) Zeitpunkt kann keine signifikante Veränderung im Anteil der $Fto^{-/-}$ -Mäuse zwischen pränatal und neonatal festgestellt werden. Allerdings wird postnatal, im Vergleich zu pränatal und neonatal, eine höchst signifikante Reduktion ($p=1,6 \times 10^{-8}$ bzw. $4,0 \times 10^{-7}$) des Anteils an $Fto^{-/-}$ -Mäusen gezeigt (s. Abb. 3.1). Für

die $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Geschwister ist zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Veränderung im Genotypenanteil festzustellen.

Weitere Berechnungen ergeben, dass nur knapp 25% der $Fto^{-/-}$ -Mäuse die ersten drei Wochen nach der Geburt überlebten. Damit ist, im Vergleich zu der 10%-igen Letalität der $Fto^{+/+}$ -Mäuse und den 13% bei den $Fto^{+/-}$ -Mäusen, die Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit 75% höchst signifikant ($p=4,8 \times 10^{-10}$ bzw. $2,6 \times 10^{-11}$) erhöht (Abb. 3.2).

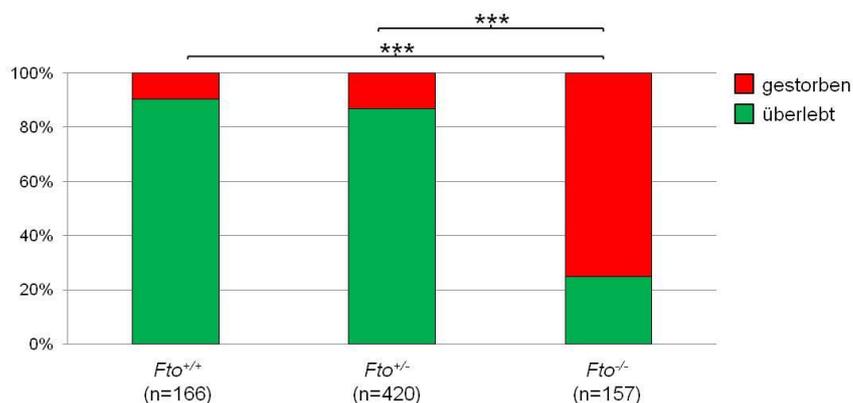


Abb. 3.2: Die Überlebensrate der Tg104N-Mäuse zum Zeitpunkt P21.

Die Überlebensrate der $Fto^{-/-}$ -Mäuse ist verglichen mit der Überlebensrate der $Fto^{+/+}$ - bzw. $Fto^{+/-}$ -Mäuse höchst signifikant reduziert ($p=4,8 \times 10^{-10}$ bzw. $2,6 \times 10^{-11}$). Nur 25% der $Fto^{-/-}$ -Mäuse überleben die ersten drei Wochen nach der Geburt. Im Gegensatz dazu überleben 90% der $Fto^{+/+}$ - und 87% der $Fto^{+/-}$ -Geschwister.

Um den Todeszeitpunkt zwischen der Geburt und P21 weiter einzuschränken, wurde dieser Zeitraum in drei Zeitabschnitte unterteilt (P0-P1, P2-P10 und P10-P20) und ausgewertet in welchen dieser Zeiträume die sterblichen Überreste jeweils gefunden wurden. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zeigt sich, dass nahe zu alle gestorbenen $Fto^{-/-}$ -Mäuse innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt sterben.

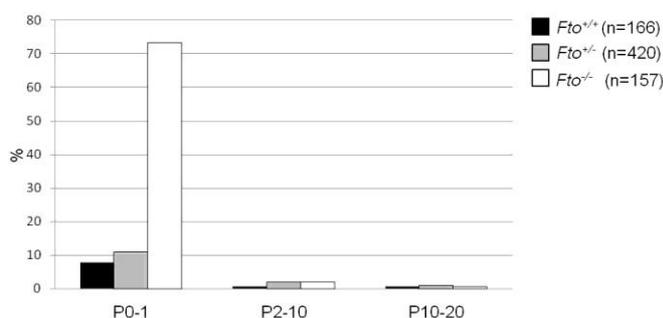


Abb. 3.3: Todeszeitpunkt der Tg104N-Mäuse.

Am häufigsten sterben die Mäuse aller drei Genotypen in den ersten 48 Stunden nach der Geburt. 73% der insgesamt 75% gestorbenen $Fto^{-/-}$ -Mäuse sind in diesem Zeitfenster verstorben.

Da nicht alle $Fto^{-/-}$ -Tg104N-Mäuse sterben, wurde zum Abschluss dieser ersten Analysen untersucht, ob die Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse geschlechtsabhängig ist. Dafür wurde mit Hilfe der PCR-Analyse das Geschlecht der gestorbenen Tg104N-Mäuse bestimmt. Weil die Anzahl der gestorbenen $Fto^{+/-}$ - und $Fto^{+/+}$ -Mäuse im Vergleich zu den $Fto^{-/-}$ -Mäusen sehr gering ist, und in den vorangegangenen Analysen keine signifikanten Unterschiede im Phänotyp der $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Mäuse beobachtet werden konnten, wurden diese beiden Genotypen in der statistischen Analyse zur Geschlechtsverteilung zusammengefasst. Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, besteht kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse. Es sterben zwar 20% mehr $Fto^{-/-}$ -Weibchen als Männchen, jedoch ist diese Differenz mit einem p-Wert von 0,15 nicht signifikant.

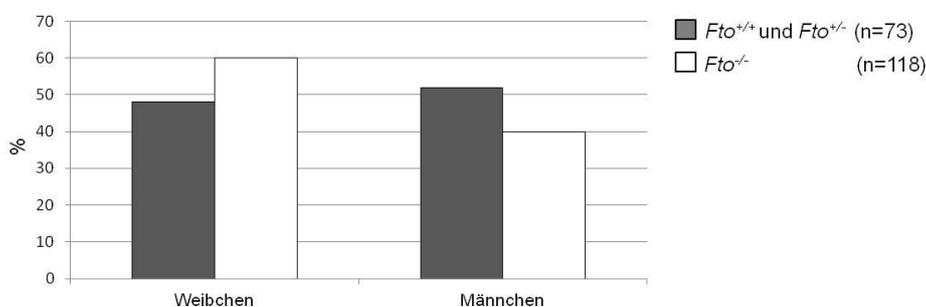


Abb. 3.4: Geschlechtsverteilung der neonatal verstorbenen Tg104N-Mäuse.

Aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs (n) und des in den vorherigen Analysen unauffälligen Phänotyps wurden die gestorbenen $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Mäuse in der statistischen Analyse der Geschlechtsverteilung zusammengefasst. Es besteht in keinem der Genotypen eine signifikante Abweichung von der erwarteten Geschlechtsverteilung.

3.2.2 Analyse der Tg104 Mauslinie

Für die $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI Hintergrund (Tg104N) konnte der Verdacht der hohen Letalität mit Hilfe von statistischen Analysen bestätigt werden (3.2.1). Wie bereits erwähnt galt dieser Verdacht jedoch nicht den $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund (Tg104). Diese Vermutung sollte mittels statistischer Analysen bestätigt werden.

Da schon bei den Tg104N-Mäusen keine Abweichungen von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung in den verschiedenen Embryonalstadien auftraten, wurde bei den Tg104-Mäusen auf die Analyse der Embryonalstadien verzichtet. So wurde die Genotypenverteilung der Tg104-Mäuse nur zum Zeitpunkt der Geburt (P0) und des Absetzens

(P21) analysiert. Wie in Abbildung 3.5 (A) grafisch dargestellt kann keine Abweichung in der Genotypenverteilung festgestellt werden (P0, $p=0,3651$; P21, $p=0,4279$). Ebenfalls sind keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate zum Zeitpunkt P21 zwischen den verschiedenen Genotypen zu beobachten (s. Abb. 3.5 (B)). Über 90% der Mäuse, aller Genotypen, überleben die ersten drei Wochen nach der Geburt.

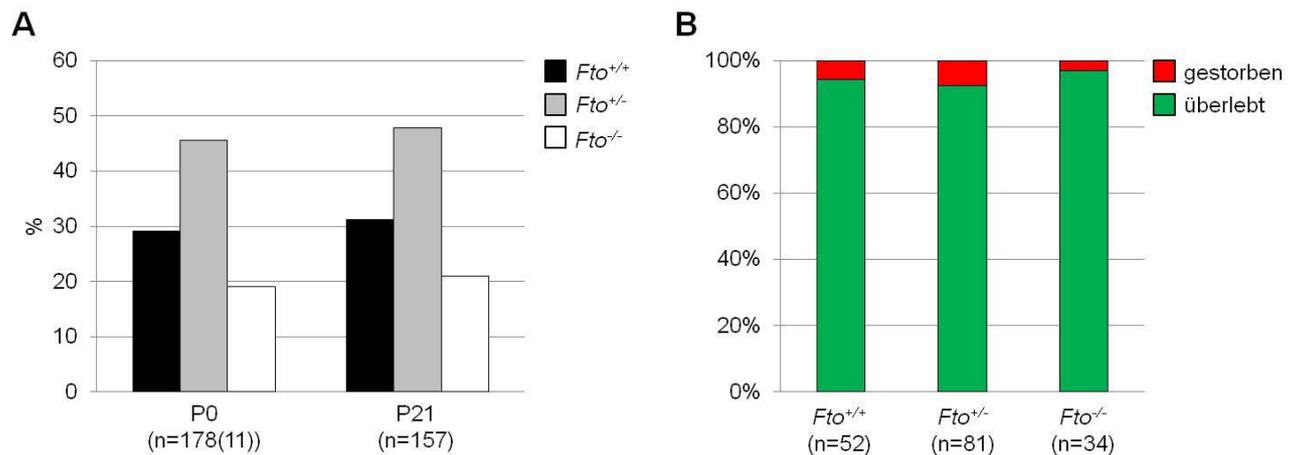


Abb. 3.5: Genotypenverteilung (A) und Überlebensrate (B) der Tg104-Mäuse.

(A) Weder zum Zeitpunkt der Geburt (P0), noch drei Wochen später (P21) besteht eine signifikante Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung ($p=0,3651$ bzw. $0,4279$). Elf der insgesamt 178 Mäuse zum Zeitpunkt P0 konnten nicht genotypisiert werden, da sie von den Elterntieren aufgefressen wurden.

(B) Ebenfalls sind keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate bei P21 zwischen den verschiedenen Genotypen zu beobachten.

3.2.3 Analyse der Tg104BN-Mauslinie

Interessant waren nun die Auswirkungen der *Fto*-Mutation auf die Mäuse der F1-Generation aus C57BL/6 und NMRI (Tg104BN). Auf die gleiche Art und Weise wie bei den Tg104N- und Tg104-Mäusen wurde die Genotypenverteilung in der Tg104BN Mauslinie zum Zeitpunkt P0 und P21 bestimmt. Obwohl zum Zeitpunkt P0 neun der insgesamt 489 Mäuse nicht genotypisiert werden konnten, weil die sterblichen Überreste vor dem Auffinden von den Elterntieren aufgefressen wurden, entspricht die Genotypenverteilung den Erwartungen nach Mendel. Dagegen kann, wie auch in Abbildung 3.6 (A) zu sehen, zum Zeitpunkt P21 eine signifikante Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung gezeigt werden ($p=0,0549$). In der Abbildung 3.6 (B) ist die Überlebensrate der Tg104BN-Mäuse

grafisch dargestellt. Obwohl zum Zeitpunkt P21, im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Tg104BN-Mäusen, fast neun Mal so viele $Fto^{-/-}$ -Mäuse sterben, ist für die $Fto^{-/-}$ -Mäuse keine signifikant reduzierte Überlebensrate zu beobachten ($p=0,5716$).

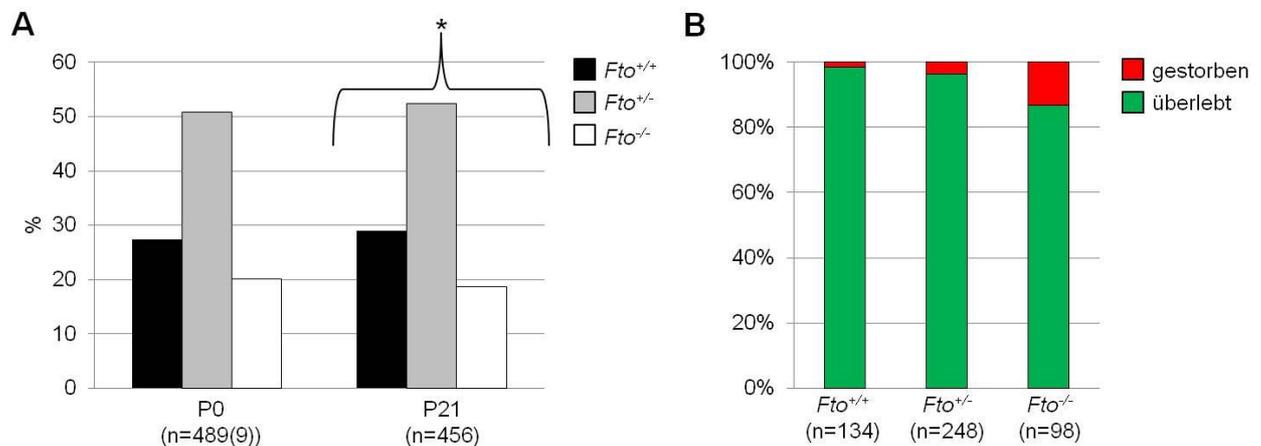


Abb. 3.6: Genotypenverteilung (A) und Überlebensrate (B) der Tg104BN-Mäuse.

(A) Zum Zeitpunkt P0 besteht keine signifikante Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung ($p=0,207$), jedoch weicht die Genotypenverteilung drei Wochen nach der Geburt signifikant von den Erwartungen ab ($p=0,0549$). 9 der insgesamt 489 Mäuse zum Zeitpunkt P0 konnten nicht genotypisiert werden, da sie von den Elterntieren aufgefressen wurden.

(B) In der Überlebensrate, zum Zeitpunkt P21, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu beobachten.

3.2.4 Analyse der Tg104N Tg115 Mauslinie

Zuletzt wurde die Genotypenverteilung in der Tg104N Tg115-Mauslinie statistisch analysiert. Die Mäuse dieser Linie besitzen den NMRI Hintergrund und zum Teil zusätzlich ein Fto -Transgen (Tg115). Anhand dieser Mauslinie sollte ursprünglich untersucht werden, ob die Auswirkungen des Verlustes von Fto in den homozygot mutanten Mäusen durch das Einbringen eines Fto -Transgens zurückgesetzt werden. So stellte sich ebenfalls die Frage, ob die hohe neonatale Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI Hintergrund durch die Anwesenheit des Fto -Transgens reduziert wird. In der Tg104N Tg115-Mauslinie existieren sechs verschiedene Genotypen: $Fto^{+/+}$, $Fto^{+/-}$ und $Fto^{-/-}$, jeweils mit und ohne Tg115. Nach den Mendelschen Regeln wird die folgende Genotypenverteilung erwartet: jeweils 25% $Fto^{+/-}$ -Mäuse mit und ohne Tg115 und je 12,5% $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit und ohne Tg115. Die Genotypenverteilung der Tg104N Tg115-Mäuse zum Zeitpunkt P0 und P21 ist in der

Abbildung 3.7 grafisch dargestellt. Es besteht zu keinem der beiden Zeitpunkte eine Abweichung von der erwarteten Genotypenverteilung (P0, $p=0,8638$; P21, $p=0,3592$).

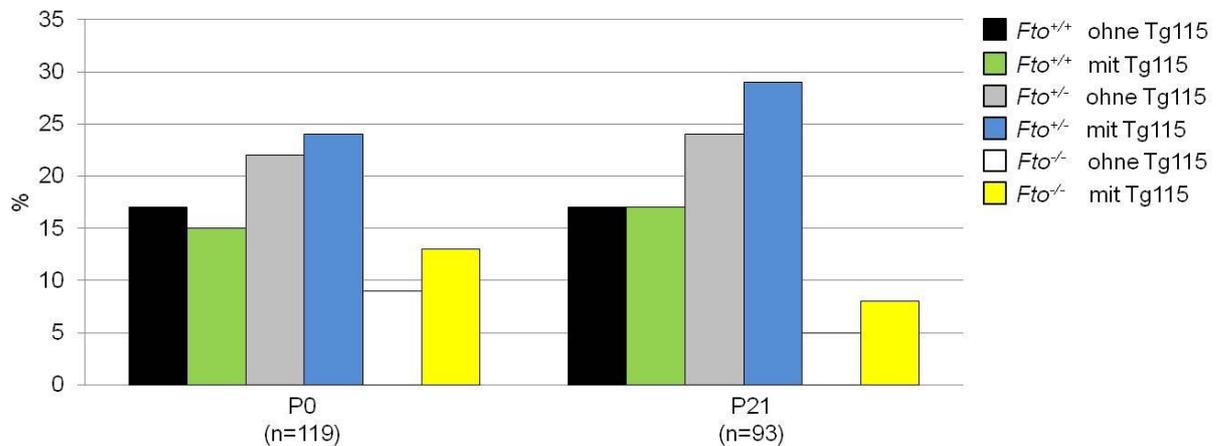


Abb. 3.7: Genotypenverteilung der Tg104N Tg115-Mäuse.

Weder zum Zeitpunkt P0, noch P21 besteht eine signifikante Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung ($p=0,8638$ bzw. $0,3592$).

Obwohl etwa die Hälfte der $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit und ohne Tg115 die ersten drei Wochen nach der Geburt nicht überleben, sind auch in der Überlebensrate der Tg104N Tg115-Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu beobachten (Abb. 3.8). Die neonatale Letalität der $Fto^{-/-}$ -Mäuse scheint jedoch nicht durch die Anwesenheit des Fto -Transgens gerettet zu werden.

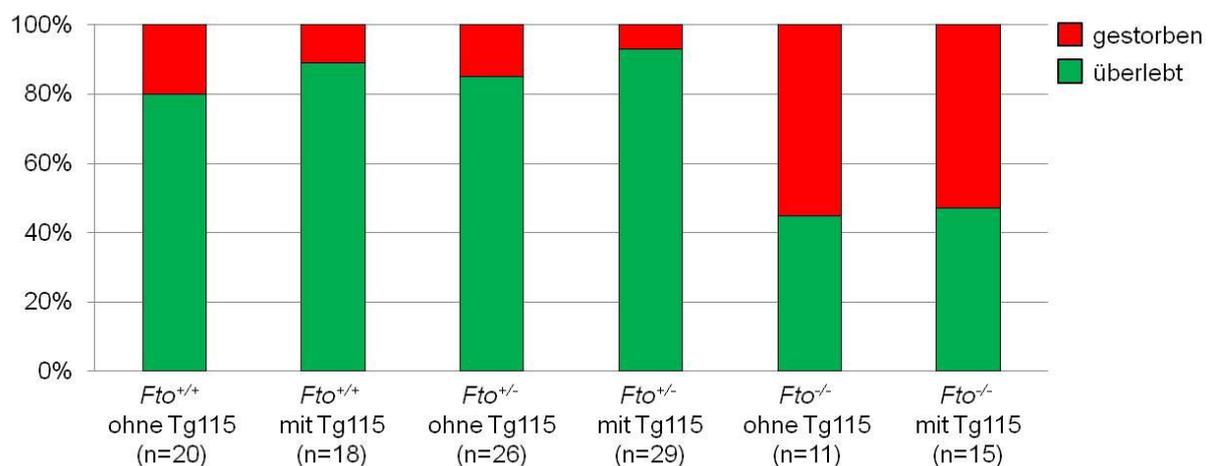


Abb. 3.8: Überlebensrate der Tg104N Tg115-Mäuse.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate zum Zeitpunkt P21 zwischen den verschiedenen Genotypen.

3.3 Morphologische und histologische Analysen der *Fto*-Maus

Durch unterschiedliche morphologische und histologische Untersuchungen sollte die Ursache der hohen neonatalen Sterblichkeit der *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund analysiert werden.

3.3.1 Präaxiale Polydaktylie an den Hintergliedmaßen der *Fto*^{-/-}-Mäuse

Begonnen wurde mit der Untersuchung auf äußerliche Merkmale der Tg104N-Mäuse. Dabei wurde beobachtet, dass ein Teil der Mäuse eine Polydaktylie an den Hinterpfoten aufweist. Dieser Phänotyp wurde daraufhin genauer analysiert.

Die statistische Auswertung ergibt, dass 25% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse eine Polydaktylie an den Hinterpfoten aufweisen. Davon besitzen 95% einen und 5% zwei zusätzliche Zehen. Des Weiteren wird gezeigt, dass die Polydaktylie ausschließlich an den Hintergliedmaßen und präaxial, d.h. an der anterioren Seite der Pfote, auftritt. In 60% der Fälle tritt die präaxiale Polydaktylie (PPD) an der rechten Hinterpfote auf, in 20% an der Linken und ebenfalls in 20% der Fälle an beiden Hinterpfoten. Bilder dieses PPD-Phänotyps der Neugeborenen Tg104N-Mäuse sind in Abbildung 3.10 (A) zu sehen.

Auffällig ist, dass nahe zu alle Tg104N-Mäuse mit PPD innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt sterben. Nur eine einzige Maus (*Fto*^{-/-}) mit PPD hat überlebt. Die statistische Auswertung aller neonatal gestorbener Tg104N-Mäuse in Hinblick auf den PPD-Phänotyp ergibt, dass 0% der gestorbenen *Fto*^{+/+}-Mäuse, 2% der *Fto*^{+/-}-Mäuse und 35% der *Fto*^{-/-}-Mäuse eine PPD an den Hintergliedmaßen besitzen (Abb. 3.9).

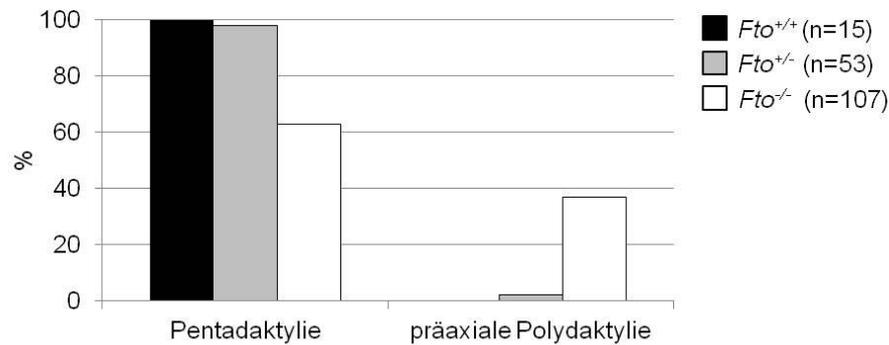


Abb. 3.9: Präaxiale Polydaktylie in den neonatal gestorbenen Tg104N Mäuse.

35% der neonatal gestorbenen *Fto*^{-/-}-Mäusen weisen eine präaxiale Polydaktylie an den Hintergliedmaßen auf. Dieser Phänotyp ist nie in den *Fto*^{+/+}- und in nur 2% der *Fto*^{+/-}-Mäuse zu beobachten.

Die Hintergliedmaßen von insgesamt 27 neonatal gestorbenen Mäusen mit PPD wurden zur weiteren Untersuchung einer Knochen-Knorpel-Färbung unterzogen. Drei der vier dabei beobachteten Varianten der PPD sind in Abbildung 3.10 (B) dargestellt. 78% der PPD der Tg104N-Mäuse zählen zu dem präaxialen Polydaktylie Typ I (PPD I), auch Daumenpolydaktylie genannt (1.3.2.1). Der zusätzliche Zeh hat einen gemeinsamen Mittelfußknochen mit der Großzehe. Dabei besteht der zusätzliche Zeh in 82% der Fälle aus drei Phalangen (triphalangeal) (Abb. 3.10 (B) b) und in 18% aus zwei Phalangen (biphalangeal). 18% der gefärbten Hintergliedmaßen weisen anterior einen vollständigen triphalangealen zusätzlichen Zeh auf, mit eigenem Mittelfußknochen (Abb. 3.10 (B) c). Diese Variante wird auch als präaxiale Polydaktylie Typ II (PPD II) bezeichnet (1.3.2.1). Bei den restlichen 4% handelt es sich um Hintergliedmaßen mit sieben Zehen. Diese Variante kann ebenfalls der PPD I zugeordnet werden, jedoch mit einem zweiten zusätzlichen Zeh, der aus einem einzelnen langen, dünnen Knochen besteht (Abb. 3.10 (B) d).

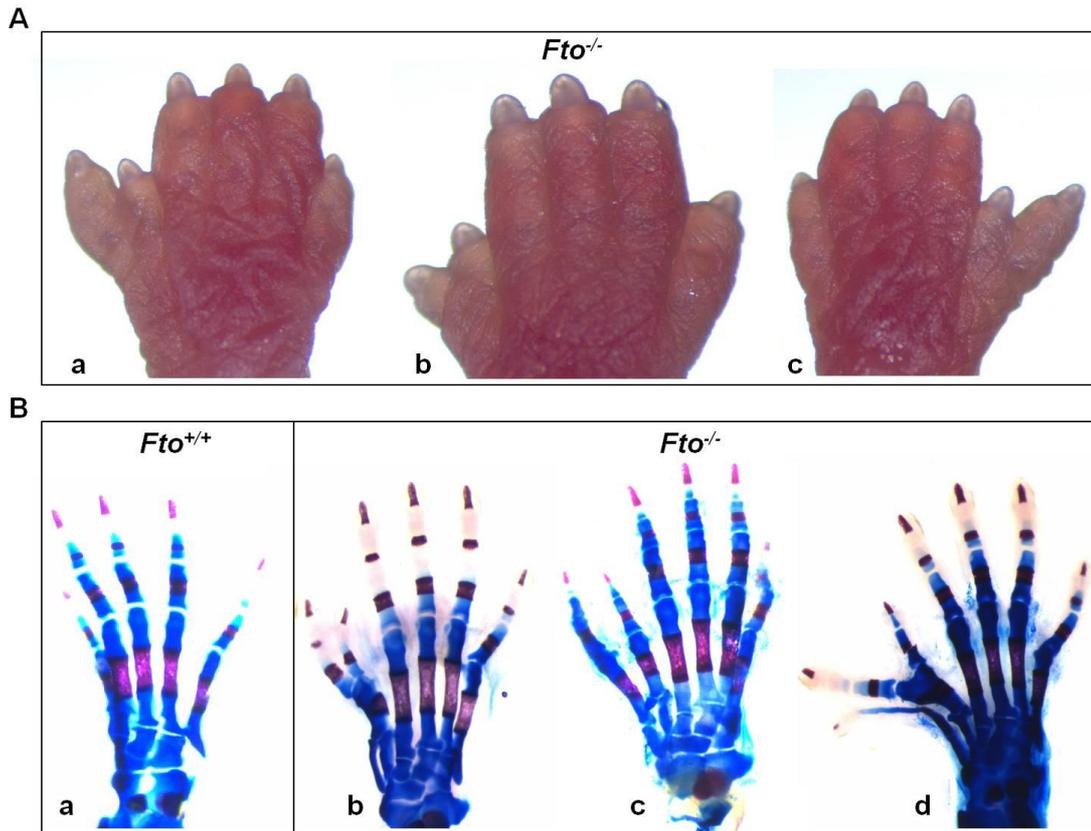


Abb. 3.10: Präaxiale Polydaktylie-Phänotypen der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse.

(A) Fotos von Hinterpfoten von neonatal gestorbenen *Fto*^{-/-}-Mäusen. Ein langer zusätzlicher präaxialer Zeh an der rechten Hinterpfote (a), ein kurzer zusätzlicher präaxialer Zeh an der rechten Hinterpfote (b) und ein langer zusätzlicher präaxialer Zeh an der linken Hinterpfote (c).

(B) Knochen-Knorpel-Färbungen von einer *Fto*^{+/+} rechten Hinterpfote (a) und drei verschiedenen Varianten der präaxialen Polydaktylie von neonatal gestorbenen *Fto*^{-/-}-Mäusen (b-d). Zu sehen sind ein gemeinsamer Mittelfußknochen und triphalangealer extra Zeh (b), ein kompletter triphalangealer extra Zeh (c) und eine Hinterpfote mit 7 Zehen, mit einer ähnlichen Variante wie in b, aber mit einem zweiten zusätzlichen langen, dünnen Zeh (d).

In der Tg104BN-Mauslinie wird bei einer von insgesamt 76 *Fto*^{-/-}-Mäusen eine PPD an der rechten Hinterpfote beobachtet. Im Gegensatz zu den Tg104N-Mäusen mit PPD, ist diese Maus jedoch nicht verstorben. In den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Tg104BN-Mäusen tritt keine PPD auf.

In den Tg104-Mäusen ist in keinem der drei Genotypen eine PPD zu sehen.

Dagegen kann in der Tg104N Tg115-Mauslinie häufiger eine PPD an den Hintergliedmaßen der Mäuse beobachtet werden. Unter den neonatal gestorbenen haben eine von fünf *Fto*^{-/-}-Mäusen ohne Tg115, drei von acht *Fto*^{-/-}-Mäusen mit Tg115 und eine von zwei *Fto*^{+/-}-Mäusen

mit Tg115 eine PPD an den Hintergliedmaßen. Auffällig ist allerdings, dass die PPD auch in den adulten Tg104N Tg115-Mäusen zu beobachten ist. Höchst interessant ist dabei die Tatsache, dass die PPD in den adulten Mäusen ausschließlich in *Fto*^{-/-}-Mäusen mit *Fto*-Transgen auftritt. 55,5% der adulten *Fto*^{-/-}-Mäuse mit Tg115 weisen eine PPD an den Hintergliedmaßen auf. In Abbildung 3.11 sind Ausdrücke und Knochenfärbungen von adulten Hinterpfoten der Tg104N Tg115-Mäuse, mit und ohne PPD, gezeigt.

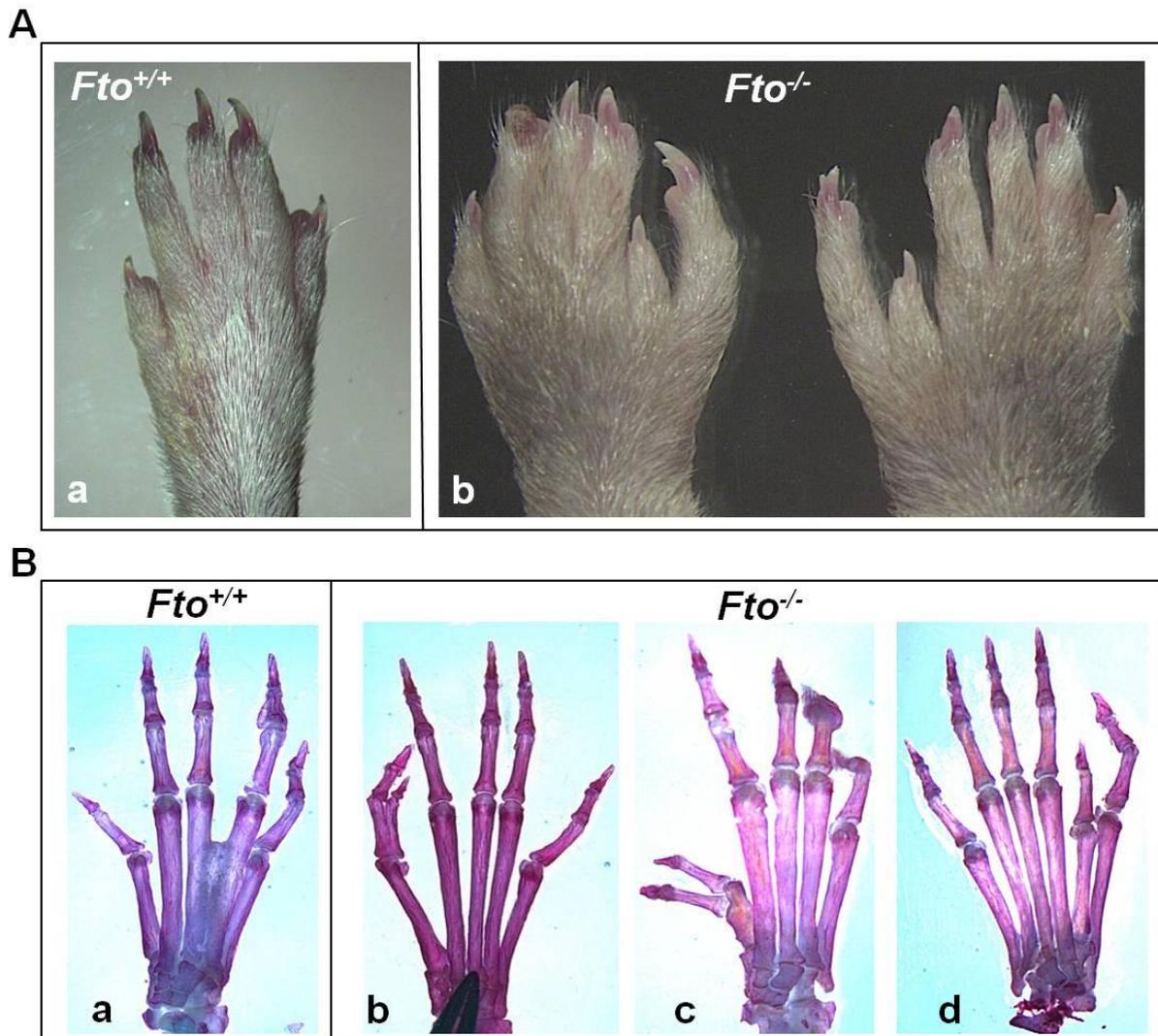


Abb.3.11: Präaxiale Polydaktylie adulter Tg104N Tg115-Mäuse.

(A) Fotos einer wildtypischen rechten Hinterpfote (a) und der Hinterpfoten einer *Fto*^{-/-}-Maus mit Tg115, mit PPD an beiden Pfoten (b).

(B) Knochenfärbungen einer wildtypischen rechten Hinterpfote (a) und drei verschiedenen Varianten der PPD in *Fto*^{-/-}-Mäuse mit Tg115 (b-d). Zu sehen sind ein gemeinsamer Mittelfußknochen und triphalangealer zusätzlicher Zeh (b), ein gemeinsamer Mittelfußknochen und biphalarer zusätzlicher Zeh(c) und ein kompletter triphalangealer zusätzlicher Zeh (d).

Wie anhand der in Abbildung 3.11 (B) exemplarisch gezeigten Knochenfärbungen zu sehen ist, treten in den adulten Tg104N Tg115-Mäusen dieselben Varianten des Polydaktylie-Phänotyp auf, wie bereits in den neonatal gestorbenen Tg104N-Mäusen vorgestellt. Die präaxiale Polydaktylie tritt in der rechten, der linken oder in beiden Hintergliedmaßen auf. Der zusätzliche anteriore bi- oder triphalangeale Zeh hat entweder einen gemeinsamen Mittelfußknochen mit der Großzehe oder existiert als vollständiger extra Zeh mit drei Phalangen.

3.3.2 Untersuchung des axialen Skeletts der Tg104N-Mäuse

Die präaxiale Polydaktylie tritt häufig in Verbindung mit Veränderungen im axialen Skelett auf. So zeigen z.B. Mäuse mit einer hypermorphen Mutation im *Fgfr1* Gen neben der präaxialen Polydaktylie in den Hintergliedmaßen auch homöotische Transformationen im Bereich der Wirbelsäule und Defekte in den Rippen und dem Brustbein (Hajihosseini et al., 2004). Auch *Bmp-7*-defiziente Mäuse weisen neben der präaxialen Polydaktylie Defekte in den Rippen und dem Brustbein auf (Luo et al., 1995). Ebenso führt die Überexpression von *Hoxd-12* (Knezevic et al., 1997) und der Verlust von *Ift25* (Keady et al., 2012) neben der präaxialen Polydaktylie zu verschiedenen Defekten im axialen Skelett. Um zu untersuchen, ob auch die *Fto*^{-/-}-Mäuse Veränderungen im axialen Skelett aufweisen, wurden mit Hilfe der Knochen-Knorpel-Färbung das axiale Skelette der gestorbenen Tg104N-Mäuse analysiert.

3.3.2.1 Anomalien im Bereich der Wirbelsäule

Die wildtypische Maus besitzt sieben Halswirbel (C1-C7), 13 Brustwirbel (T1-T13), sechs Lendenwirbel (L1-L6) und je nach Mausstamm 22 bis 25 Schwanzwirbel (Ca1-Ca(n)). 18% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse weichen von dieser Norm ab (Tabelle 3.2). Drei von 28 Mäusen besitzen nur fünf statt sechs Lendenwirbel und zwei Mäuse zeigen neben nur fünf Lendenwirbeln zusätzlich 14 statt 13 Brustwirbel. Diese Phänotypen können jedoch auch in den *Fto*^{+/-}- und *Fto*^{+/+}-Tg104N-Mäusen beobachtet werden (Tabelle 3.2). Eine von vier *Fto*^{+/-}

-und drei von acht $Fto^{+/+}$ -Mäusen weisen nur fünf Lendenwirbel auf und eine $Fto^{+/+}$ -Maus besitzt fünf Lenden- und 14 Brustwirbel.

Tabelle 3.2: Anomale Anzahl an Brust- und Lendenwirbeln und homöotische Transformation im Sakralwirbelbereich der Tg104N-Mäuse.

In allen drei Genotypen der Tg104N-Mäuse kann sowohl eine veränderte Anzahl an Brust- und Lendenwirbeln als auch eine homöotische Transformation im Bereich der Sakralwirbel beobachtet werden.

	anomale Anzahl an Brust- und/oder Lendenwirbeln	in %	homöo- tische Trans- formation (Sakralwirbel)	in %
$Fto^{+/+}$	4/8	50	5/8	63
$Fto^{+/-}$	1/4	25	2/4	50
$Fto^{-/-}$	5/28	18	18/28	64

Die ersten fünf Schwanzwirbel werden auch Sakralwirbel (S1-S5) genannt und bilden das sogenannte Kreuzbein. Dieses entwickelte sich durch die Verschmelzung der ursprünglich einzelnen, aber im Laufe der Evolution zusammengewachsenen Sakralwirbel. Die Anzahl der verwachsenen Wirbel variiert innerhalb der Säugetiere. Zum Beispiel sind beim Menschen alle fünf Sakralwirbel miteinander verwachsen und bei der Maus nur drei. In Abbildung 3.12 (A) ist das Kreuzbein der Maus, am Tag der Geburt, gezeigt.

Bei den neonatal gestorbenen Tg104N-Mäusen konnte eine homöotische Transformation im Bereich der Sakralwirbel beobachtet werden. Dabei besitzt einer der Sakralwirbel eine mehr anteriorer Identität, wie normal. Dieser Phänotyp ist daran zu erkennen, dass nicht drei, sondern vier der Sakralwirbel miteinander verwachsen sind. In dem Fall der Tg104N-Mäuse kann nicht eindeutig unterschieden werden, ob der 2. Sakralwirbel (S2) einer Transformation in eine S1-Morphologie unterliegt oder ob der 4. Sakralwirbel zur Morphologie des 3. Sakralwirbels transformiert ist (Abb. 3.12 (B)). 64% der für $Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen diese homöotische Transformation im Bereich des Kreuzbeins auf. Allerdings ist sie ebenfalls in 50% der $Fto^{+/-}$ - und in 63% der $Fto^{+/+}$ -Tg104N-Mäuse zu beobachten (Tabelle 3.2).

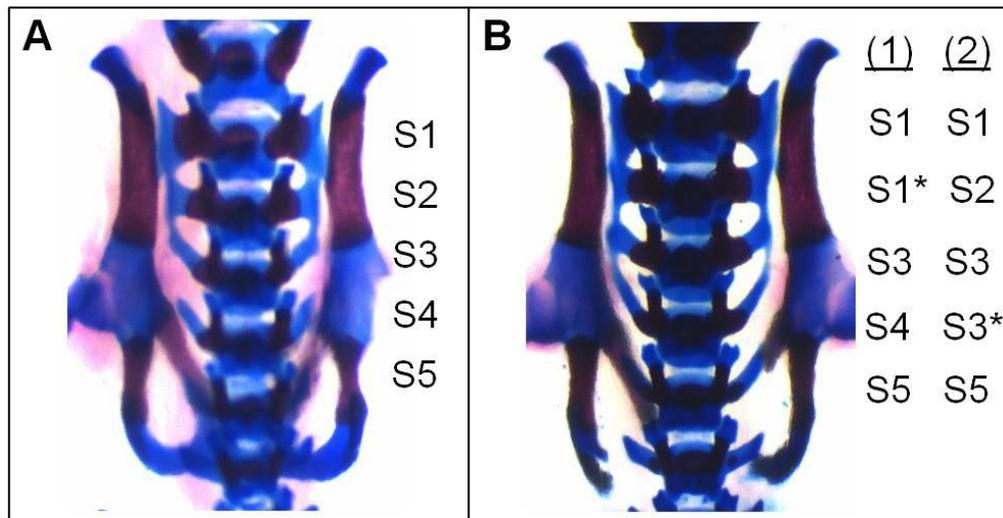


Abb. 3.12: Homöotische Transformation im Bereich des Kreuzbeins der Tg104N-Mäuse.

(A) Das wildtypische Kreuzbein mit drei verwachsenen Sakralwirbeln.

(B) Die homöotische Transformation im Bereich des Kreuzbeins, zu erkennen an den vier verwachsenen Sakralwirbeln. Es ist nicht zu unterscheiden, ob S2 zu S1 oder S4 zu S3 transformiert ist (* markiert den homöotisch transformierten Sakralwirbel(S)).

Es kann davon ausgegangen werden, dass die hier aufgeführten Veränderungen im axialen Skelett der Tg104N-Mäuse unabhängig von der *Fto*-Expression sind, da sie in den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Mäusen mit ähnlicher Frequenz vorkommen, wie in den *Fto*^{-/-}-Mäusen.

3.3.2.2 Anomalien im Bereich des Brustkorbes der *Fto*^{-/-}-Mäuse

Neben der Wirbelsäule wurde auch der Brustkorb der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse im Detail betrachtet. Die einzelnen untersuchten Phänotypen und deren prozentuales Auftreten in den drei verschiedenen Genotypen sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt. Eine detaillierte Auflistung der untersuchten Mäuse und deren Phänotypen ist im Anhang (Tabelle 7.1) zu finden.

Tabelle 3.3: Rippen- und Brustbein-Phänotypen der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse.

	n	Phänotyp						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Fto</i> ^{+/+}	8	13%	13%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fto</i> ^{+/-}	4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Fto</i> ^{-/-}	28	21%	14%	18%	61%	68%	32%	100%

1= 14 statt 13 Rippen (uni- oder bilateral)

2= Rippenpaare am Brustbein versetzt angeordnet

3= verwachsene Rippen

4= Brustbein ab dem 2. oder 3. Rippenpaar gespalten

5= Verknöcherung des Brustbeins reduziert und teilweise zusätzlich versetzt

6= gespaltenen Schwertfortsatz

7= keine oder reduzierte Verknöcherung am Schwertfortsatz

Zunächst ist auffällig, dass ein Teil der Mäuse auf einer (unilateral) oder beiden Seiten (bilateral) 14 statt 13 Rippen besitzt (1). Dieser Phänotyp tritt in 21% der *Fto*^{-/-}-Mäuse auf, jedoch auch in 13% der *Fto*^{+/+}-Tg104N-Mäuse. Das Gleiche ist in Bezug auf die Anordnung der Rippenpaare am Brustbein zu beobachten. In 14% der *Fto*^{-/-}-Mäuse und in 13% der *Fto*^{+/+}-Mäuse sind die Rippen am Brustbein versetzt angeordnet (2) (Abb. 3.13 (A) c). Die *Fto*^{+/-}-Mäuse zeigten diese beiden Phänotypen nicht, allerdings ist der Stichprobenumfang von nur vier Mäusen sehr gering.

Die fünf folgenden Phänotypen (3-7) können ausschließlich in den *Fto*^{-/-}-Mäusen beobachtet werden. Bei 18% sind, wie in Abbildung 3.13 (A) c zu sehen, die Rippen verwachsen (3) und in 61% das Brustbein mittig entlang der Längsachse ab dem 2. oder 3. Rippenpaar gespalten (4) (Abbildung 3.13 (A) b und d). Das Brustbein der *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Tg104N-Mäuse ist gar nicht oder maximal ab dem 4. Rippenpaar gespalten (Tabelle 7.1 im Anhang). Außerdem ist in 68% der *Fto*^{-/-}-Mäuse die Verknöcherung im Brustbein reduziert und teilweise zusätzlich versetzt (5). Dieser Phänotyp ist in Abbildung 3.13 (A) in allen drei *Fto*^{-/-}-Brustbeinen gut zu erkennen.

Die letzten beiden Phänotypen (6 und 7) beziehen sich auf den Schwertfortsatz, die untere Verlängerung des Brustbeins. In 32% der *Fto*^{-/-}-Mäuse ist der Schwertfortsatz gespalten (6) und in allen *Fto*^{-/-}-Mäusen ist die Verknöcherung am Schwertfortsatz reduziert oder gar nicht

vorhanden (7) (Abb. 3.13 (A) b-d). Diese beiden Phänotypen treten ebenfalls nicht in den $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Mäusen auf (Tabelle 7.1 im Anhang).

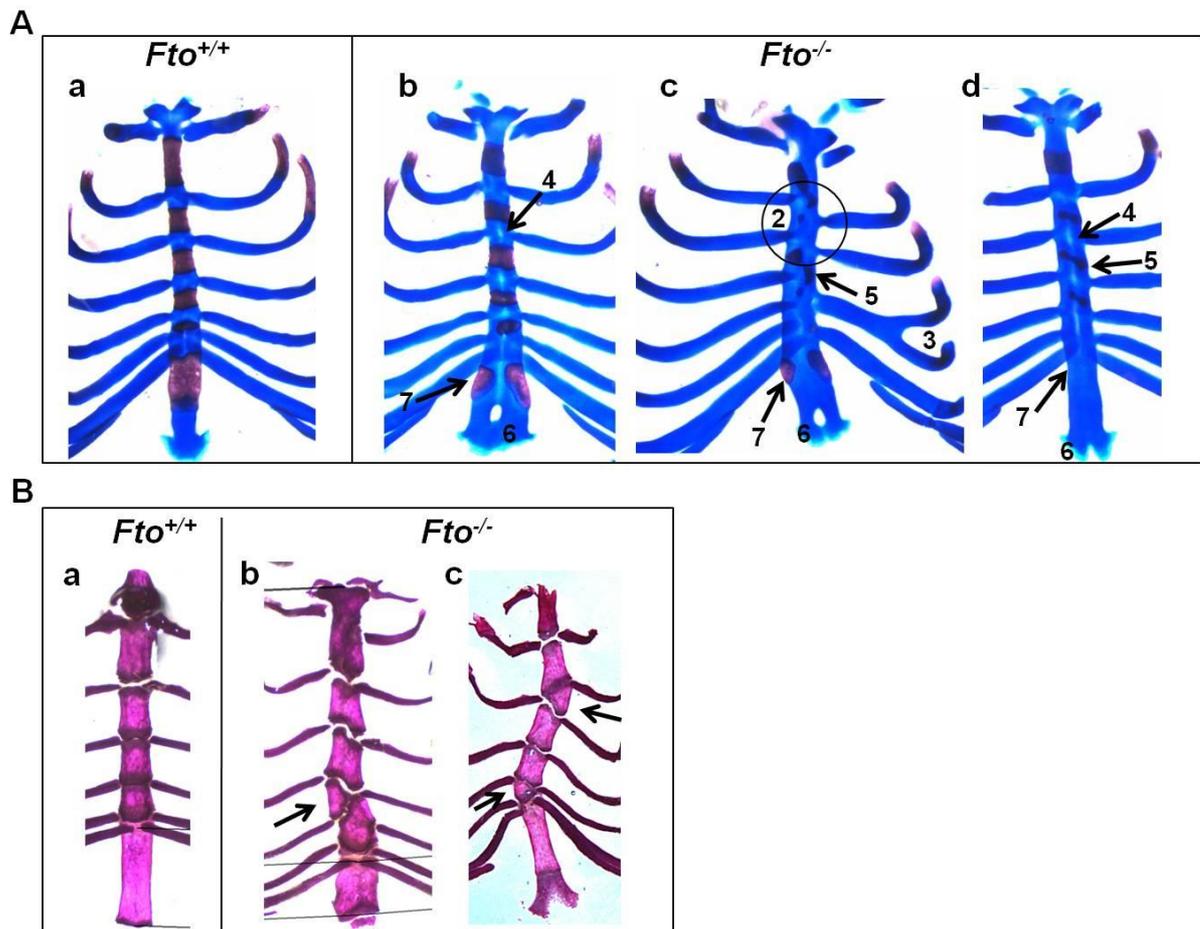


Abb. 3.13: Rippen- und Brustbein-Phänotypen der Tg104N-Mäuse.

(A) Knochen-Knorpel-Färbungen des Brustkorbes von neonatal gestorbenen $Fto^{+/+}$ - (a) und $Fto^{-/-}$ - (b-d) Tg104N-Mäusen. Die Zahlen 2-7 markieren die verschiedenen Phänotypen (s. Tabelle 3.3).

(B) Knochenfärbungen der Brustbeine vier Wochen alter Tg104BN-Mäusen (a+b) und einer 30 Wochen alten Tg104N Tg115-Maus (c). Auch in den überlebenden, adulten $Fto^{-/-}$ -Mäusen treten Defekte in der Verknöcherung des Brustbeins auf, welche zu einer Krümmung und der versetzten Anordnung der Rippen am Brustbein führen.

Wie in Abbildung 3.13 (B) zu sehen, tritt eine fehlerhafte Verknöcherung des Brustbeins auch in den überlebenden, adulten $Fto^{-/-}$ -Mäusen der Tg104BN- und Tg104N Tg115-Mauslinie auf. Die fehlerhafte Verknöcherung führt zu einer versetzten Anordnung der Rippenpaare am Brustbein und einer Brustbeinverkrümmung.

Diese Ergebnisse in den adulten *Fto*^{-/-}-Mäusen zeigen, dass die hier aufgeführten Defekte im Bereich des Brustkorbes mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die Ursache für die neonatale Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse sind.

Abschließend wurde die Länge des Brustbeins der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse gemessen. Wie in dem Diagramm der Abbildung 3.14 zu sehen ist die Brustbeinlänge der *Fto*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu der Brustbeinlänge der *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Mäuse höchst signifikant reduziert ($p=1,1 \times 10^{-9}$ bzw. $p=3,0 \times 10^{-9}$).

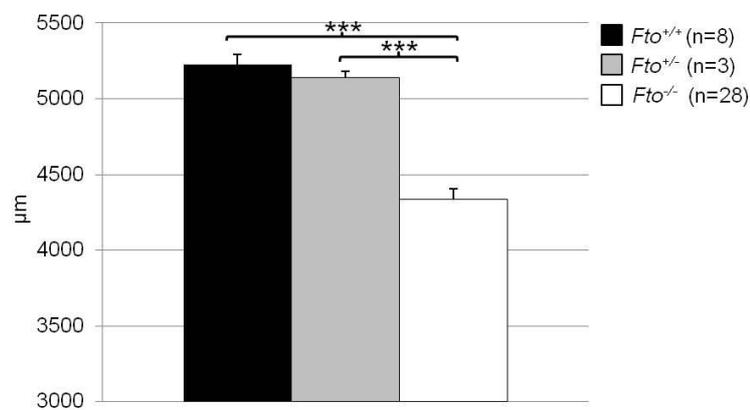


Abb. 3.14: Länge des Brustbeins der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse.

Die Brustbeinlänge (in µm) der *Fto*^{-/-}-Mäuse ist verglichen mit den Brustbeinen der *Fto*^{+/+}- und der *Fto*^{+/-}-Mäusen höchst signifikant verkürzt ($p=1,1 \times 10^{-9}$ bzw. $3,0 \times 10^{-9}$).

Eine Gegenüberstellung der beobachteten Phänotypen der neonatal gestorbenen *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse (die präaxiale Polydaktylie und die Missbildungen im Bereich der Rippen, des Brustbeins und des Schwertfortsatzes) lässt auf keinen ersichtlichen Zusammenhang dieser Phänotypen schließen. Es ist kein definiertes Muster im Auftreten der verschiedenen Phänotypen in den einzelnen Mäusen zu erkennen (Tabelle 7.2 im Anhang).

3.3.3 Defekte in der Lungenentwicklung der *Fto*^{-/-}-Mäuse

Die Lunge ist eines der wichtigsten Organe im Körper. Ab dem Zeitpunkt der Geburt ist sie für die Atmung verantwortlich und versorgt den Körper mit Sauerstoff. Genetische oder durch die Umwelt bedingte Störungen während der embryonalen Lungenentwicklung können

schwere Schäden zur Folge haben. So kann z.B. eine Fehl- oder Unterentwicklung der Lunge ab dem Zeitpunkt der Geburt schwere Atmungsstörungen verursachen, die im schlimmsten Fall zum frühen Tod der Neugeborenen führen (Warburton et al., 2006).

Da über 70% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse kurze Zeit nach der Geburt sterben, wurde in Betracht gezogen, dass der Verlust von *Fto* die Lungenentwicklung beeinflussen könnte. So könnte eine Fehl- oder Unterentwicklung der Lunge nach der Geburt zur Atemnot und der beobachteten hohen neonatalen Sterblichkeit der *Fto*^{-/-}-Mäuse führen.

Zu Beginn wurde die Morphologie der Lungen der neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse untersucht. Weil sich die Struktur der Lunge nach dem Tod des Organismus schnell verändert und oft nicht bekannt war, wie viele Stunden die neugeborenen Mäuse vor dem Auffinden bereits tot waren, wurden zusätzlich die Lungen von Tg104N-Mäusen untersucht, die kurz nach der Geburt durch das Abtrennen des Kopfes getötet wurden. Von den gestorbenen und getöteten Neugeborenen wurden transversale oder sagittale Paraffinschnitte angefertigt und diese mit Hämalaun und Eosin (HE) angefärbt. Weder in den gestorbenen, noch in den getöteten Neugeborenen konnten auffällige Veränderungen in der Form der Lunge beobachtet werden. Alle fünf Lungenlappen waren in der richtigen Anordnung vorhanden (Abb. 3.15). Allerdings war der sogenannte Pleuralspalt an einigen Stellen in den *Fto*^{-/-}-Mäusen stark reduziert (siehe gelbe Pfeile in Abb. 3.15). Der Pleuralspalt bezeichnet den Raum zwischen dem Lungenfell, das die Lungen bedeckt und dem Rippenfell, das die Oberseite des Zwerchfells und den Herzbeutel bedeckt und den Brustkorb von innen auskleidet. Dieser Phänotyp zeigte sich in sechs (drei gestorbene und drei getötete) von sieben *Fto*^{-/-}-Mäusen und nie bei den *Fto*^{+/+}-Geschwistern. Die *Fto*^{+/-}-Mäuse wurden in Hinblick auf die Lunge nicht analysiert.

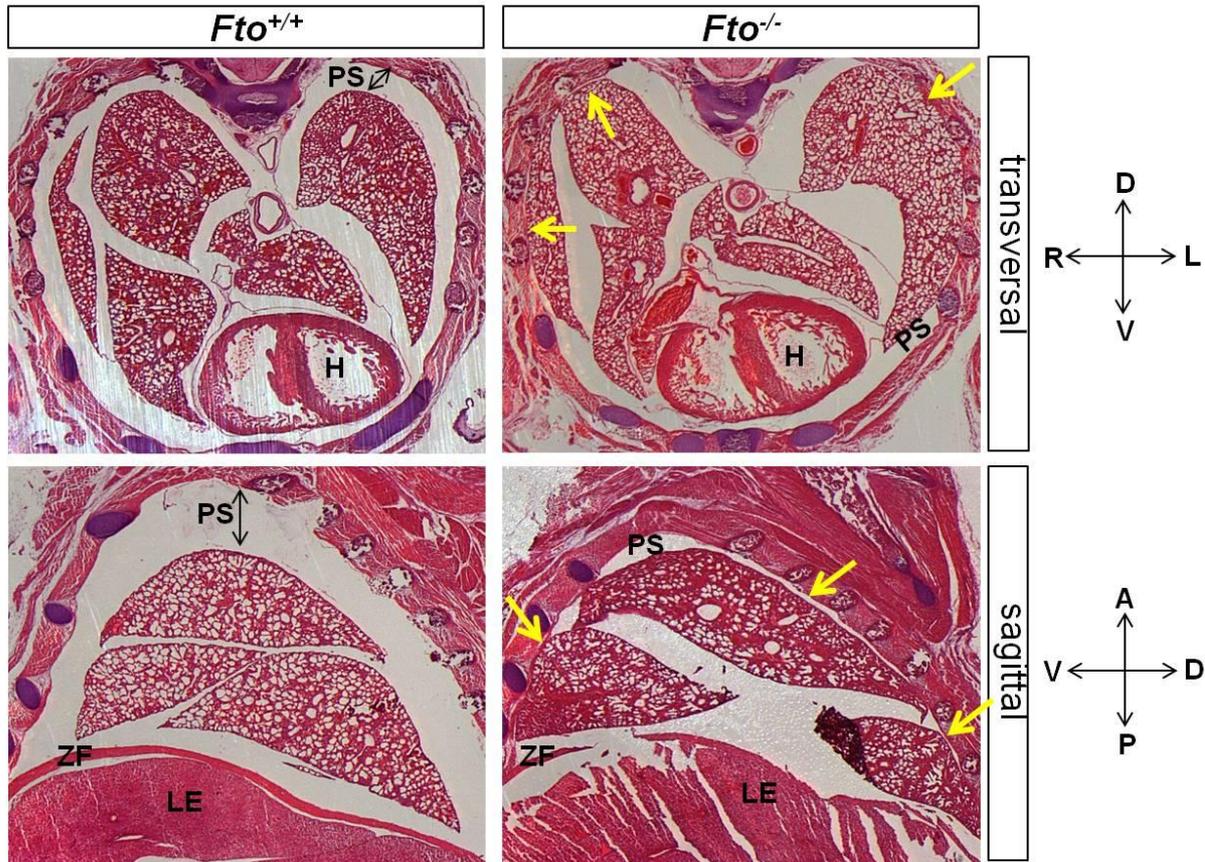


Abb. 3.15: Morphologie der Lungen von neugeborenen Tg104N-Mäusen.

Gezeigt sind HE gefärbte Paraffinschnitte (transversal und sagittal) im Bereich der Lunge von jeweils zwei *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen, die kurz nach der Geburt getötet wurden. Die Anzahl und Anordnung der Lungenlappen ist in den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen identisch. Jedoch ist der Pleuralspalt in den *Fto*^{-/-}-Mäusen stellenweise stark reduziert (gelbe Pfeile). PS, Pleuralspalt; H, Herz; LE, Leber; ZF, Zwerchfell; A, anterior; D, dorsal; L, links; P, posterior; R, rechts V, ventral.

Als nächstes wurde anhand der angefertigten Paraffinschnitte die Histologie der Lungen im Detail analysiert. Da sich, wie bereits erwähnt, die Struktur der Lungen nach dem Tod schnell verändert, wurden für die weiteren histologischen Analysen nur die Lungen der getöteten Neugeborenen verwendet. Wie in Abbildung 3.16 zu sehen besitzen die Lungen der zwei analysierten wildtypischen Neugeborenen große, klare alveoläre Strukturen, die durch dünnwandiges Mesenchym septiert sind (s. Abb. 3.16 A,C,E). Dagegen zeigen zwei der drei getöteten *Fto*^{-/-}-Neugeborenen verkleinerte Lumen der präalveolären Strukturen und deutlich dichteres, dickwandiges Mesenchym (s. Abb. 3.16 B, D, F).

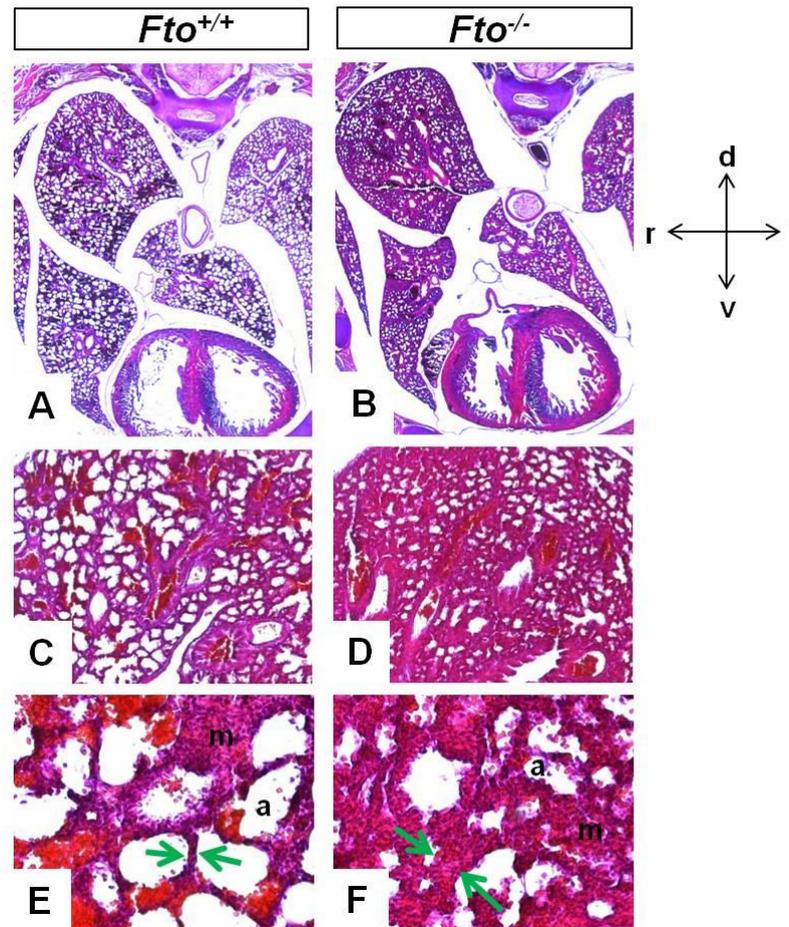


Abb. 3.16 : Histologie der Lungen von neugeborenen Tg104N-Mäusen.

Gezeigt sind HE gefärbte, transversale Paraffinschnitte im Bereich der Lunge von einer *Fto*^{+/+}- (A, C, E) und einer *Fto*^{-/-}- (B, D, F) Tg104N-Maus, die kurz nach der Geburt getötet wurden, in drei verschiedenen Vergrößerungen: 25x (A, B), 100x (C, D) und 400x (E, F). Die Lungen der *Fto*^{+/+}-Neugeborener besitzen große, klare alveoläre Strukturen, septiert durch dünnwandiges Mesenchym (grüne Pfeile in E). Dagegen sind in den *Fto*^{-/-}-Lungen kleinere Lumen der alveolären Strukturen und dichteres, dickwandiges Mesenchym (grüne Pfeile in F) zu beobachten. a, alveoläre Strukturen; m, Mesenchym; d, dorsal; v, ventral; l, links; r, rechts.

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob die hier beobachteten Lungen-Phänotypen in den Neugeborenen *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen bereits in der Embryonalentwicklung auftreten. Dafür wurden HE Färbungen auf Paraffinschnitten von Embryonen am Entwicklungstag 16.5 (E16.5) angefertigt. In Abbildung 3.17 sind Ausschnitte von HE gefärbten Paraffinschnitten im Bereich der Lunge von jeweils zwei *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Embryonen gezeigt. Bei beide *Fto*^{-/-}-Embryonen deren Lungen hier gezeigt sind, konnte eine präaxiale Polydaktylie an den Hintergliedmaßen beobachtet werden. Das bedeutet, dass davon ausgegangen werden kann, dass diese beiden Embryonen mit hoher Wahrscheinlichkeit neonatal verstorben wären. Wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen der caudalen und transversalen Ausschnitte zu

erkennen (Abb. 3.17), ist das Mesenchym in den Lungen der *Fto*^{-/-}-Embryonen bereits zum Zeitpunkt E16.5 dichter als in denen der *Fto*^{+/+}-Geschwister. Allerdings konnte in keinem der fünf analysierten *Fto*^{-/-}-Embryonen eine Reduktion des Pleuralspalts beobachtet werden.

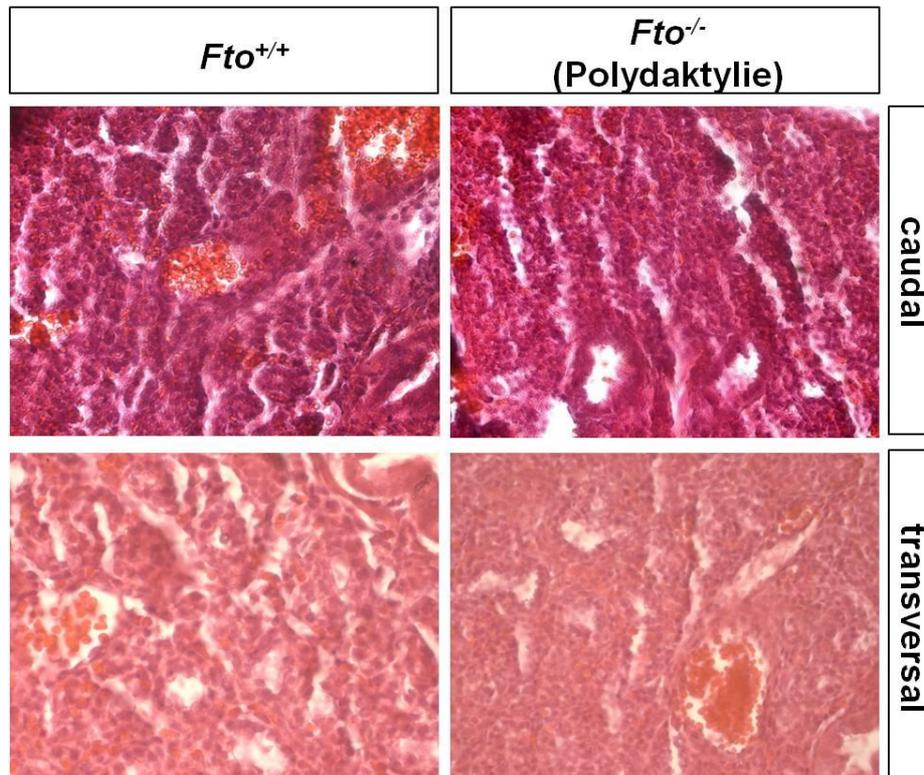


Abb. 3.17: Histologie der Lungen von E16.5 Tg104N-Embryonen.

Gezeigt sind HE gefärbte Paraffinschnitte (caudal oder transversal) im Bereich der Lunge von zwei *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen im Alter E16.5, in 400-facher Vergrößerung. Bei beiden *Fto*^{-/-}-Embryonen wurde zuvor eine präaxiale Polydaktylie festgestellt. Verglichen mit den *Fto*^{+/+}-Lungen ist das Mesenchym in den Lungen der *Fto*^{-/-}-Embryonen erkennbar dichter.

Die Ursache für die Verdichtung des mesenchymalen Gewebes in den Lungen der *Fto*^{-/-}-Embryonen und Neugeborenen könnte eine gesteigerte Proliferationsrate der Mesenchymzellen in der Lunge sein. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von BrdU untersucht, welches proliferierende Zellen in vitalen Geweben markiert. Es wurden zwei *Fto*^{+/+}-Embryonen, zwei *Fto*^{-/-}-Embryonen mit präaxialer Polydaktylie an den Hintergliedmaßen und ein *Fto*^{-/-}-Embryo mit normal entwickelten Gliedmaßen analysiert. Wie auch in Abbildung 3.18 zu sehen, besteht in den E18.5 Embryonen kein sichtbarer Unterschied zwischen den *Fto*^{+/+}- und den *Fto*^{-/-}-Lungen in der Menge der BrdU aufweisenden Mesenchymzellen. Aufgrund weniger Analysen konnte jedoch keine quantitative Auswertung vollzogen werden.

Allerdings ist auch in diesen lichtmikroskopischen Aufnahmen die höhere Dichte des Mesenchyms der *Fto*^{-/-}-Embryonen zu erkennen.

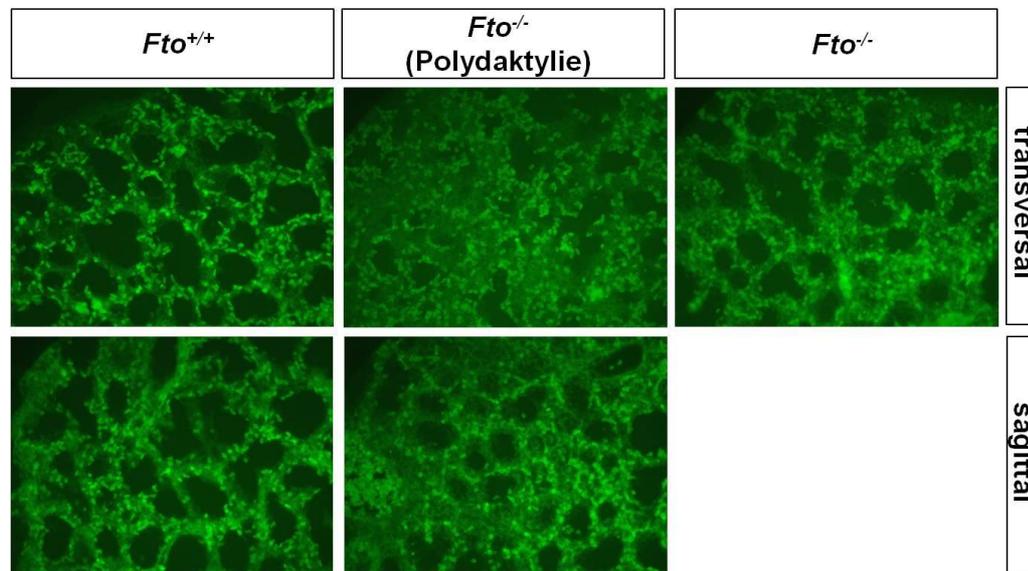


Abb. 3.18: Proliferation in den Lungen von E18.5 Tg104N-Embryonen.

Analysiert wurde die Proliferation in den E18.5 Lungen von zwei *Fto*^{+/+}-Embryonen, zwei *Fto*^{-/-}-Embryonen mit und einem ohne präaxiale Polydaktylie. Die proliferierenden Zellen wurden mit BrdU markiert und mittels spezifischer Antikörper und Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Es sind keine Unterschiede in der Proliferation der Lungen von *Fto*^{-/-}-Embryonen und deren *Fto*^{+/+}-Geschwister zu erkennen. Lediglich die höhere Dichte des Mesenchyms der *Fto*^{-/-}-Embryonen ist in den lichtmikroskopischen Aufnahmen zu sehen.

3.4 Molekulare Analysen der *Fto*-Embryonen

Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Untersuchungen sollte in diesem Teil der Arbeit die molekulare Ursache für die hohe neonatale Sterblichkeit und die morphologischen, sowie histologischen Veränderungen der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse analysiert werden. Es existiert eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die ähnliche morphologische und histologische Beobachtungen in Mäusen beschreiben. Die auf diese Beobachtungen aufbauenden molekularen Analysen erfassen ein breites Spektrum, das Fehlregulationen in verschiedenen Signalwegen beinhaltet. Daher wurden in den folgenden Abschnitten Komponenten der verschiedenen Signalwege in den Tg104N-Mäuse analysiert.

3.4.1 Untersuchung von Komponenten des Shh-Signalweg

Begonnen wurde mit der Analyse von Komponenten des Shh-Signalweges. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. Fehlfunktionen innerhalb der Signalkaskade können zu einer Vielzahl von Entwicklungsdefekten führen, wie z.B. die präaxiale Polydaktylie. Die antero-posteriore Musterbildung der Vertebratengliedmaßen wird durch die Expression von Shh in der ZPA kontrolliert (Chiang et al., 1996, 2001; Kraus et al., 2001; Riddle et al., 1993). Das Shh-Signal wird in erster Linie über die Transkriptionsfaktoren *Gli2* und *Gli3* vermittelt, die daraufhin die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* und anderer Zielgene aktivieren (Bai et al., 2004; Lei et al., 2004). Dieser befindet sich demnach am unteren Ende der Shh-Signaltransduktionskaskade.

Veränderungen in der *Gli1*-Expression würden darauf hindeuten, dass eine Fehlregulation innerhalb der Shh-Signaltransduktionskaskade vorliegt. Aus diesem Grund wurde zunächst die mRNA-Expression von *Gli1* in den Tg104N-Embryonen quantifiziert. Embryonen im Alter von E11.5 wurden in Gliedmaßenknospen, Kopf und Rumpf (inklusive der inneren Organe) geteilt und die *Gli1*-Expression in diesen Geweben mittels quantitativer Realtime-PCR-Analyse ermittelt. Wie in Abbildung 3.19 grafisch dargestellt ist liegt in den *Fto*^{-/-}-Embryonen keine signifikant veränderte *Gli1*-Expression im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Embryonen vor.

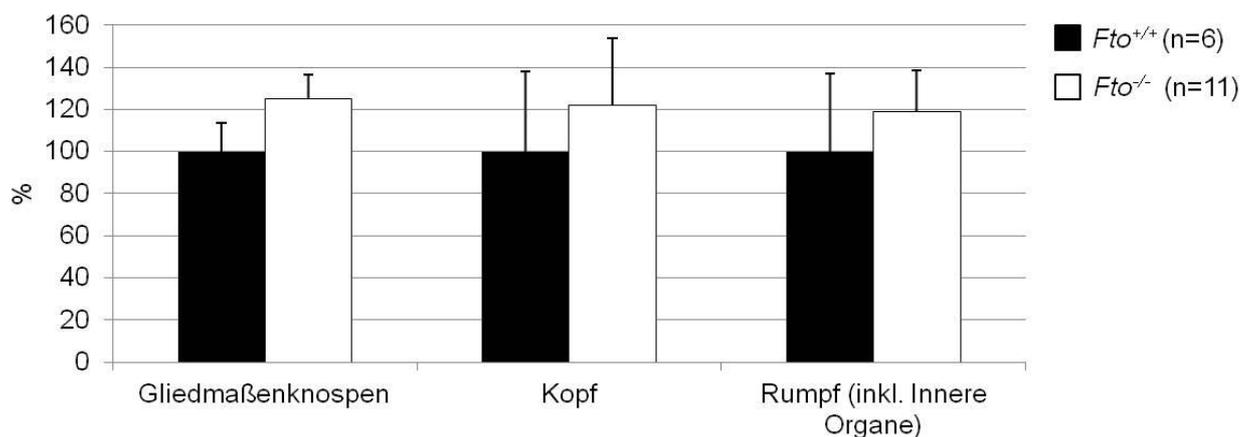


Abb. 3.19: *Gli1*-Expression in Tg104N-Embryonen (E11.5).

Die mRNA-Expression von *Gli1* wurde mittels quantitativer Realtime-PCR-Analyse in den Gliedmaßenknospen, dem Kopf und dem Rumpf (inkl. innere Organe) von E11.5 Tg104N-Embryonen ermittelt. In keinem der untersuchten Gewebe bestehen signifikanten Expressionsunterschiede zwischen *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Embryonen ($p=0,1849/0,6655/0,6627$).

Durch Analysen verschiedener *Gli*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass ausschließlich *Gli3*, und nicht *Gli1* und *Gli2*, eine signifikante Rolle in der Musterbildung der Mausgliedmaße spielt (Hui und Joyner, 1993; Bai et al, 2002; Park et al., 2000). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Shh Einfluss auf die Gliedmaßenentwicklung hat, indem es die Gli3-Aktivität reguliert (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002). Aufgrund dessen wurde die Gli3-83- und Gli3-190-Expression in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen im Alter E11.5 analysiert. Eine Abbildung der Western-Blot-Analyse und die grafisch dargestellte quantitative Auswertung sind in Abbildung 3.20 zu sehen. Die Detektion des Hprt (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase)-Proteins diente als Abgleich für die eingesetzte Proteinmenge. Die Gli3-190 Proteinmenge kann aufgrund zu schwacher Proteinbanden quantitativ nicht ausgewertet werden (Abb 3.20 A). Für Gli3-83 kann kein signifikanter Expressions-Unterschied zwischen den Gliedmaßenknospen der *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Embryonen festgestellt werden ($p=0,3064$) (Abb. 3.20 B)

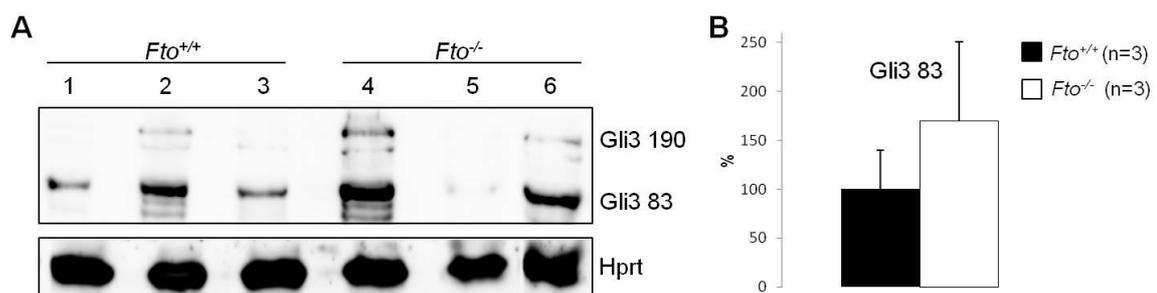


Abb. 3.20: Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen (E11.5).

(A) Der Immunoblot zeigt die Expression des Gli3-83- und Gli3-190-Proteins in den Gliedmaßenknospen von drei *Fto*^{+/+}- (Spalten 1-3) und drei *Fto*^{-/-}- (Spalten 4-6) Embryonen im Alter E11.5. Für den Abgleich der Proteinmenge wurde das Hprt-Protein detektiert.

(B) Die quantitative Auswertung des Gli3-83-Protein. Die Expression in den *Fto*^{-/-}-Embryonen ist verglichen mit den *Fto*^{+/+}-Embryonen nicht signifikant verändert ($p=0,3064$).

Da Gli3 nicht ausschließlich an der Entwicklung der Gliedmaßen beteiligt ist, sondern z.B. auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung der Lunge (Li et al., 2004) und dem Gehirn (Wilson et al., 2012) übernimmt, wurde die Expression von Gli3-83 und Gli3-190 ebenfalls im Kopf (Abb. 3.21) und dem Rumpf (inkl. innere Organe) (Abb. 3.22) der Embryonen im Alter E11.5 untersucht. Es wurden Proteinlysate der selben sechs Tiere verwendet, wie für die Gli3-Western-Blot-Analyse der Gliedmaßenknospen.

Wie der Grafik in Abbildung 3.21 (B) zu entnehmen liegen in den Köpfen keine signifikanten Unterschiede in der Gli3-83- und Gli3-190-Expression zwischen den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Embryonen vor (p=0,2289 bzw. 0,3417).

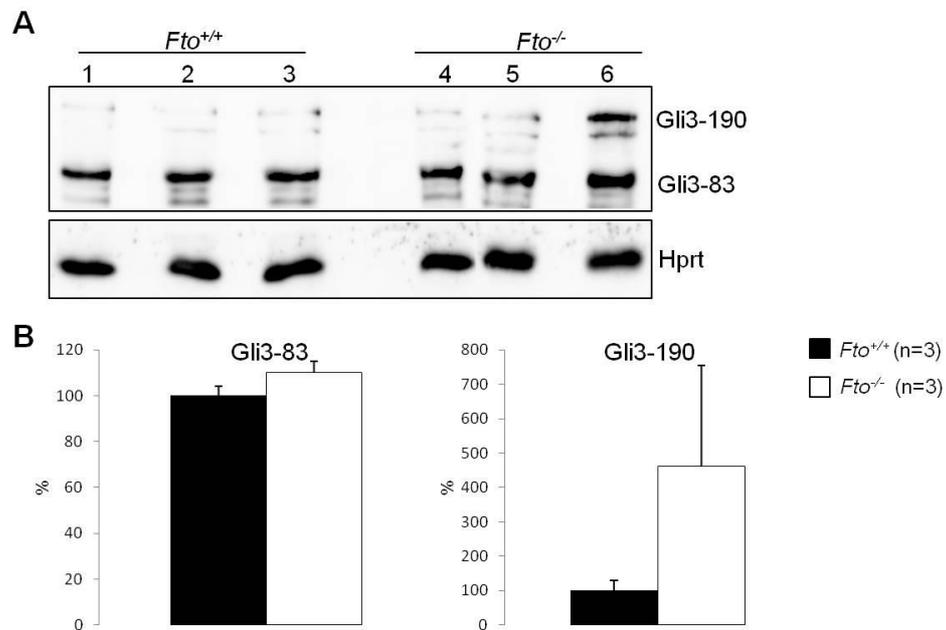


Abb. 3.21: Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in den Köpfen von Tg104N-Embryonen (E11.5)

(A) Der Immunoblot zeigt die Expression des Gli3-83- und Gli3-190-Proteins in den Köpfen von drei *Fto*^{+/+}- (Spalten 1-3) und drei *Fto*^{-/-}- (Spalten 4-6) Embryonen im Alter E11.5. Für den Abgleich der Proteinmenge wurde das Hprt Protein detektiert.

(B) Die quantitative Auswertung des Gli3-83- und Gli3-190-Protein. Es sind keine signifikanten Expression-Unterschiede von Gli3-83 und Gli3-190 in den Köpfen von *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Embryonen zu beobachten (p=0,2289 bzw. 0,3417)

Wie in Abbildung 3.22 zu sehen ist in den Rumpfen (inkl. innerer Organe) der *Fto*^{-/-}-Embryonen eine signifikante Reduktion der Gli3-83-Expression zu beobachten (p=0,0384). Allerdings kann kein signifikanter Unterschied in der Gli3-190-Expression zwischen den Rumpfen der *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Embryonen gezeigt werden (p=0,2565).

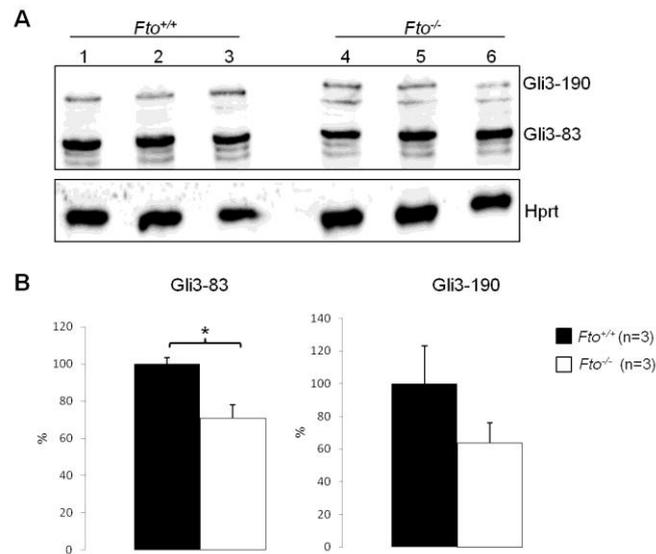


Abb. 3.22: Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in den Rumpfen (inkl. innere Organe) von Tg104N-Embryonen (E11.5)

(A) Der Immunoblot zeigt die Expression des Gli3-83- und Gli3-190-Proteins in den Rumpfen (inkl. innerer Organe) von drei *Fto*^{+/+}- (Spalten 1-3) und drei *Fto*^{-/-}- (Spalten 4-6) Embryonen im Alter E11.5. Für den Abgleich der Proteinmenge wurde das Hprt Protein detektiert.

(B) Die quantitative Auswertung des Gli3-83- und Gli3-190-Protein. Die Expression von Gli3-83 in den E11.5 Rumpfen (inkl. innerer Organe) ist in den *Fto*^{-/-}- Embryonen, im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Geschwistern, signifikant reduziert ($p=0,0384$). Dagegen ist die Expression von Gli3-190 in den *Fto*^{-/-}- Rumpfen, verglichen mit der Expression in den Rumpfen von *Fto*^{+/+}-Embryonen unverändert ($p=0,2565$).

In einer vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Shh-vermittelte Gli3-Prozessierung auch in der Lunge stattfindet (Li et al., 2004). Li und seine Kollegen stellten ebenfalls den Lungenphänotypen von *Shh*^{-/-};*Gli3*^{-/-} Doppelmutanten vor, der mit kleineren Luft einschlüssen und einem dichteren Mesenchym den in dieser Arbeit beobachteten Lungenphänotyp der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse ähnelt. Aufgrund dieser Kenntnisse wurde die Gli3-Expression in den Lungen von Tg104N-Embryonen im Alter E12.5 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. In vier der sechs *Fto*^{-/-}-Embryonen, deren Lungen analysiert wurden (Abb. 3.23, Spalte 11-14) war die Ausildung einer präaxialen Polydaktylie zu erkennen. Der Immunoblot und das Ergebnis der Quantifizierung der Gli3-83- und Gli3-190-Protein Expression ist in Abbildung 3.23 dargestellt. In dieser Western-Blot-Analyse wurde zum Abgleich der Proteinmenge das Aktin-Protein verwendet. Für die Gli3-83-Expression in den Lungen der E12.5 Embryonen kann kein signifikanter Unterschied zwischen den *Fto*^{-/-}- und den *Fto*^{+/+}-Mäusen festgestellt werden ($p=0,1466$). Allerdings ist die Gli3-190-Expression in den Lungen der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen, verglichen mit den Lungen der *Fto*^{+/+}-Embryonen signifikant reduziert ($p=0,0504$) (Abb. 3.23 B).

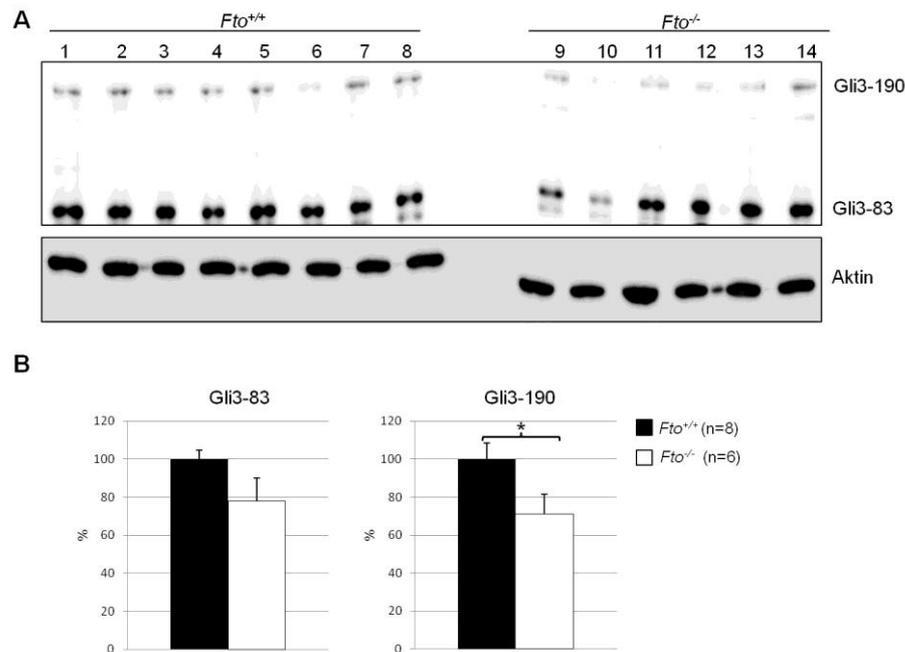


Abb. 3.23: Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in den Lungen von Tg104N-Embryonen (E12.5)
(A) Der Immunoblot zeigt die Expression des Gli3-83- und Gli3-190-Proteins in den Lungen von acht $Fto^{+/+}$ - (Spalten 1-8) und sechs $Fto^{-/-}$ - (Spalten 9-14) Embryonen im Alter E12.5. Für den Abgleich der Proteinmengen wurde das Aktin-Protein detektiert.
(B) Die quantitative Auswertung des Gli3-83- und Gli-190-Protein. Die Expression von Gli3-190 ist in den E12.5 Lungen der $Fto^{-/-}$ - Embryonen, im Vergleich zu den Lungen der $Fto^{+/+}$ - Geschwistern, signifikant reduziert ($p=0,0504$). Die Expression von Gli3-83 ist in den $Fto^{-/-}$ - Lungen, verglichen mit den $Fto^{+/+}$ -Lungen unverändert ($p=0,1466$).

Neben den *in vivo* Untersuchungen in Bezug auf Komponenten des Shh-Signalweges, wurden zusätzlich *in vitro* Analysen in primären embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) durchgeführt. Für die Herstellung der MEFs wurden E12.5 Embryonen der Mauslinie Tg104N verwendet. Zunächst wurde die Protein-Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in $Fto^{-/-}$ - und $Fto^{+/+}$ -Mefs analysiert. In Abbildung 3.24 (A) ist der Immunoblot der MEF-Lysate von sechs $Fto^{+/+}$ - und sechs $Fto^{-/-}$ -Embryonen gezeigt. Als Abgleich für die Proteinmenge wurde das Aktin-Protein verwendet. Für die in der Abbildung 3.24 (B) grafisch dargestellten Quantifizierung des Gli3-83 und Gli3-190 Proteins wurden nur drei der sechs $Fto^{+/+}$ -MEFs genutzt (Spalten 4-6), da für die ersten drei Proben (Spalten 1-3) der Aktinabgleich nicht auswertbar ist. Für die Gli3-83 Expression besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den $Fto^{-/-}$ - und den $Fto^{+/+}$ -MEFs ($p=0,7109$). Jedoch ist die Expression von Gli3-190 in den $Fto^{-/-}$ -MEFs, im Vergleich zu der Expression in den $Fto^{+/+}$ -MEFs signifikant reduziert ($p=0,0482$).

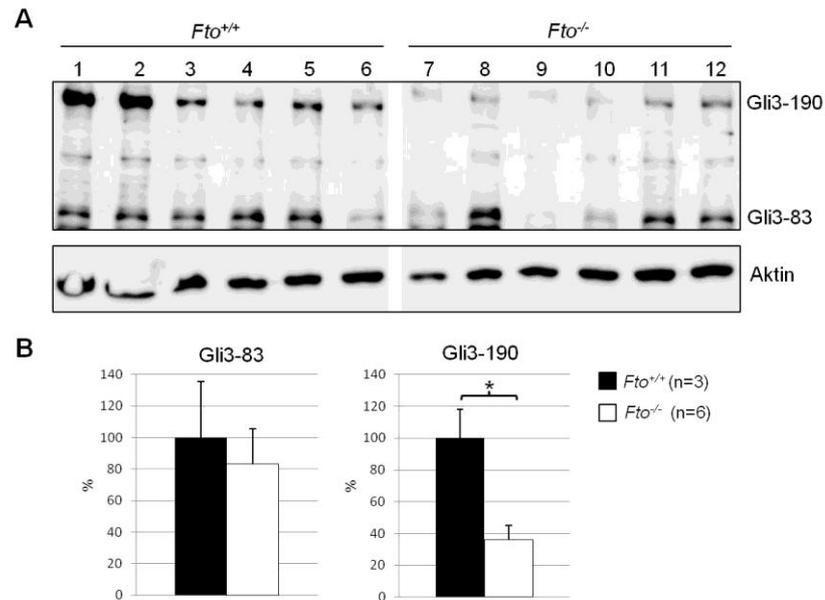


Abb. 3.24: Expression von Gli3-83 und Gli3-190 in den MEFs von Tg104N-Embryonen (E11.5)

(A) Der Immunoblot zeigt die Expression des Gli3-83- und Gli3-190-Proteins in den MEFs von sechs *Fto*^{+/+}- (Spalten 1-6) und sechs *Fto*^{-/-}- (Spalten 7-12) Embryonen im Alter E12.5. Für den Abgleich der Proteinmenge wurde das Aktin-Protein detektiert.

(B) Die quantitative Auswertung des Gli3-83- und Gli3-190-Protein. Die *Fto*^{+/+}-MEFs der Spalten 1-3 (siehe A) wurden aufgrund des nicht auswertbaren Aktinabgleichs nicht in die quantitative Auswertung mit einbezogen. Die Expression von Gli3-190 in den *Fto*^{-/-}-MEFs ist im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-MEFs signifikant reduziert (p=0,0482). Bei der Expression von Gli3-83 besteht kein signifikanter Unterschied (p=0,7109).

Zu Beginn diesen Jahres wurde eine Studie veröffentlicht, in der die sogenannte *Neol*-Maus charakterisiert wurde (Hong et al., 2012). *Neol* kodiert für Neogenin, ein Zelloberflächenprotein, welches in diversen Entwicklungszusammenhängen als Transduktionssignal für verschiedenste Liganden dient. Homozygot mutante *Neol*-Mäuse (*Neo*^{Gt/Gt}) weisen eine hohe neonatale Sterblichkeit (~80%) auf und etwa 15% der Überlebenden besitzen eine präaxiale Polydaktylie an der rechten Hinterpfote. Sehr ähnliche Phänotypen sind auch in den, in dieser Arbeit analysierten, *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse zu beobachten. Hong et al. konnten zeigen, dass MEFs von *Neo*^{Gt/Gt}-Embryonen in Bezug auf die Aktivierung des Shh-Signalweges sensibler sind als MEFs ihrer *Neo*^{+/+}-Geschwister. Das Gleiche kann für die MEFs der *Fto*^{-/-}-Embryonen gezeigt werden. Die MEFs von sechs *Fto*^{+/+}- und sechs *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen wurden mit dem Smoothed Agonisten SAG behandelt und nach 24 Stunden die Induktion der endogenen *Gli1*-mRNA mittels quantitativer Realtime-PCR-Analyse ermittelt. Als Kontrolle wurde zusätzlich die *Gli1*-Induktion in MEFs gemessen, die ebenfalls 24 Stunden dem Induktionsmedium, aber ohne SAG-Zugabe (-SAG), ausgesetzt waren. Wie in Abbildung 3.25 grafisch dargestellt kommt es

in den $Fto^{+/+}$ -MEFs nach der Behandlung mit SAG zu einer 63-fachen Induktion der $Gli1$ -Expression. Diese Induktion ist in den $Fto^{-/-}$ -MEFs fast doppelt so hoch. Dieses Ergebnis ist mit einem p-Wert von 0,1810 allerdings nicht signifikant. Jedoch spiegelt sich diese sensitivere Wirkung von SAG auf die $Fto^{-/-}$ -MEFs auch in der Induktion der $Ptch1$ -Expression wieder. Zwar besteht auch hier keine Signifikanz ($p=0,3472$), aber die durchschnittliche $Ptch1$ -Induktion ist in den $Fto^{-/-}$ -MEFs sechs mal höher als in den $Fto^{+/+}$ -MEFs.

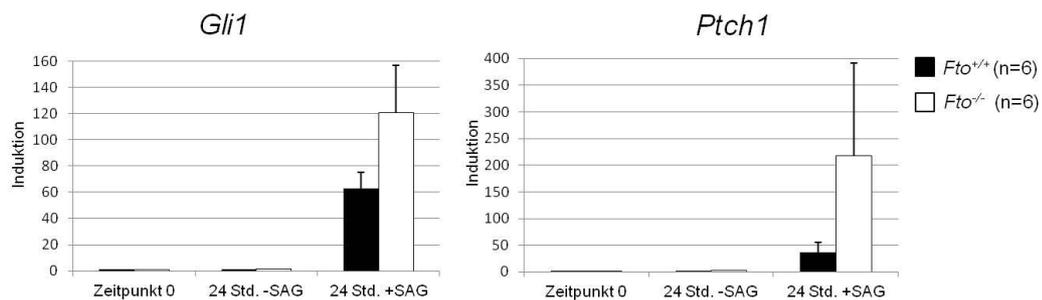


Abb. 3.25: $Fto^{-/-}$ -MEFs reagieren sensibler auf die SAG vermittelte $Gli1$ - und $Ptch1$ -Induktion. Quantitative Realtime-PCR-Analysen der $Gli1$ - (links) und $Ptch1$ - (rechts) mRNA-Induktion in $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -MEFs mit und ohne SAG Stimulation. Die $Gli1$ - und $Ptch1$ -Expression wurde unmittelbar vor der SAG-Behandlung (Zeitpunkt 0) und 24 Stunden nach der SAG Zugabe (24 Std.+SAG) gemessen. Als Kontrolle wurde zusätzlich die $Gli1$ - und $Ptch1$ -Induktion in MEFs gemessen, die ebenfalls 24 Stunden dem Induktionsmedium, jedoch ohne SAG Zugabe, ausgesetzt waren (24 Std.-SAG). Jeweils sechs unabhängige Zellisolate von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -MEFs wurden in Triplikaten analysiert. Die Daten wurden normalisiert zu der Expression von Hprt. Obwohl die $Gli1$ -Induktion in den $Fto^{-/-}$ -Mefs doppelt so hoch ist, wie in den $Fto^{+/+}$ -MEFs und die $Ptch1$ -Induktion sogar sechs mal so hoch, sind keine signifikanten Unterschiede in der $Gli1$ - ($p=0,1810$) und $Ptch1$ - ($p=0,3472$) Induktion zwischen den $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -MEFs festzustellen.

Zusammenfassend ergeben die Analysen der Tg104N-Embryonen in Bezug auf den Shh-Signalweg, dass keine signifikanten Veränderungen in der $Gli1$ -Expression auf mRNA Ebene am Tag der Embryonalentwicklung 11.5 existieren (Abb. 3.19). Auch ist in der Gli3-Proteinexpression der Gliedmaßenknospen und der Köpfe von Embryonen im Alter E11.5 kein signifikanter Unterschied zwischen den $Fto^{+/+}$ - und den $Fto^{-/-}$ -Embryonen festzustellen (Abb 3.20 und 3.21). Jedoch ist die Expression des Gli3-83-Protein in den Rumpfen (inkl.innere Organe) der $Fto^{-/-}$ -Embryonen (E11.5) signifikant reduziert (Abb. 3.22). Auch die Expression des Gli3-190-Proteins ist sowohl in den Lungen (E12.5), als auch in den MEFs von $Fto^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zu den $Fto^{+/+}$ -Geschwistern signifikant reduziert (Abb 3.23 und 3.24). Zudem tendieren die $Fto^{-/-}$ -MEFs nach Behandlung des Smoothened Agonisten SAG zu einer sensitiveren Induktion von $Gli1$ - und $Ptch1$ -mRNA als die $Fto^{+/+}$ -MEFs (Abb. 3.25).

3.4.2 Die *Hoxd13*-Expression in den Gliedmaßenknospen der Tg104N-Embryonen

Die *Hox*-Gene werden entlang der antero-posterioren Achse exprimiert und sind verantwortlich für die Spezifizierung der Segmentidentitäten der Wirbelstrukturen (Krumlauf, 1994). Die ektopische Expression von *Hox*-Genen führt zu Veränderungen in der Musterbildung des axialen Skeletts und der Gliedmaßen. So konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass die *Hoxd*-Gene in der frühen und späten Musterbildung der Gliedmaßenknospe eine wichtige Rolle spielen (Zakany et al., 2004). Zum Beispiel sind *Hoxd12* und *Hoxd13* für die Musterbildung des Autopod (Hand/Fuß) essentiell (Zakany und Duboule, 1999). *Hoxd13* ist das am meisten posterior begrenzte *Hoxd*-Familienmitglied und wird durch das Shh-Signal reguliert (Pearce und Tabin, 1998; Zakany und Duboule, 1999). Aufgrund dieser Kenntnisse über die *Hox*-Gene, wurde mittels Whole Mount *In situ* Hybridisierung die Expression von *Hoxd13* in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen an den Tagen E11.5 und E12.5 untersucht. Der Fokus wurde in dieser Analyse auf die hinteren Gliedmaßenknospen gelegt, da die präaxiale Polydaktylie der Tg104N-Mäuse ausschließlich an den Hintergliedmaßen auftritt. In Abbildung 3.26 (A) ist die *Hoxd13*-Expression in den linken und rechten Hintergliedmaßenknospen der Embryonen am Tag E11.5 dargestellt. Da für dieses Alter keine *Fto*^{+/+}-Embryonen vorhanden waren und eine präaxiale Polydaktylie in den *Fto*^{+/-}-Mäusen laut Statistik (3.3.1) nur in 2% der Fälle vorkommt, werden die Gliedmaßenknospen von vier *Fto*^{-/-}-Embryonen mit drei Gliedmaßenknospen von *Fto*^{+/-}-Embryonen verglichen. Wie in den *Fto*^{+/-}-Gliedmaßenknospen der E11.5 Embryonen zu sehen, ist die Expression von *Hoxd13* in der posterioren Region am stärksten. In den *Fto*^{-/-}-Gliedmaßenknospen ist ebenfalls dieses Expressionsmuster zu sehen. Allerdings ist in einer der linken und in drei der rechten Hintergliedmaßenknospen anterior eine ektopische *Hoxd13*-Expressionsdomäne zu erkennen (rote Pfeile in Abb. 3.26 (A)). In Abbildung 3.26 (B) ist die *Hoxd13*-Expression in den rechten Hintergliedmaßenknospen von acht *Fto*^{+/+}- und sechs *Fto*^{-/-}-Embryonen im Alter E12.5 gezeigt. Die *Hoxd13*-Expression ist in den *Fto*^{+/+}-Gliedmaßenknospen von posterior nach anterior in der gesamten distalen Region zu erkennen. Die Gliedmaßenknospen der *Fto*^{-/-}-Embryonen weisen das gleiche *Hoxd13*-Expressionsmuster auf. Allerdings ist in diesem Alter an der Form der Gliedmaßenknospe bereits gut zu erkennen, ob sich eine präaxiale Polydaktylie entwickelt. In mindestens vier, der hier analysierten Gliedmaßenknospen, ist

bereits eine präaxiale Polydaktylie zu erkennen (Abb. 3.26 (B) mit roten Pfeilen markiert). Außerdem ist in diesen zusätzlichen Zehen eine ektopische *Hoxd13*-Expression zu sehen.

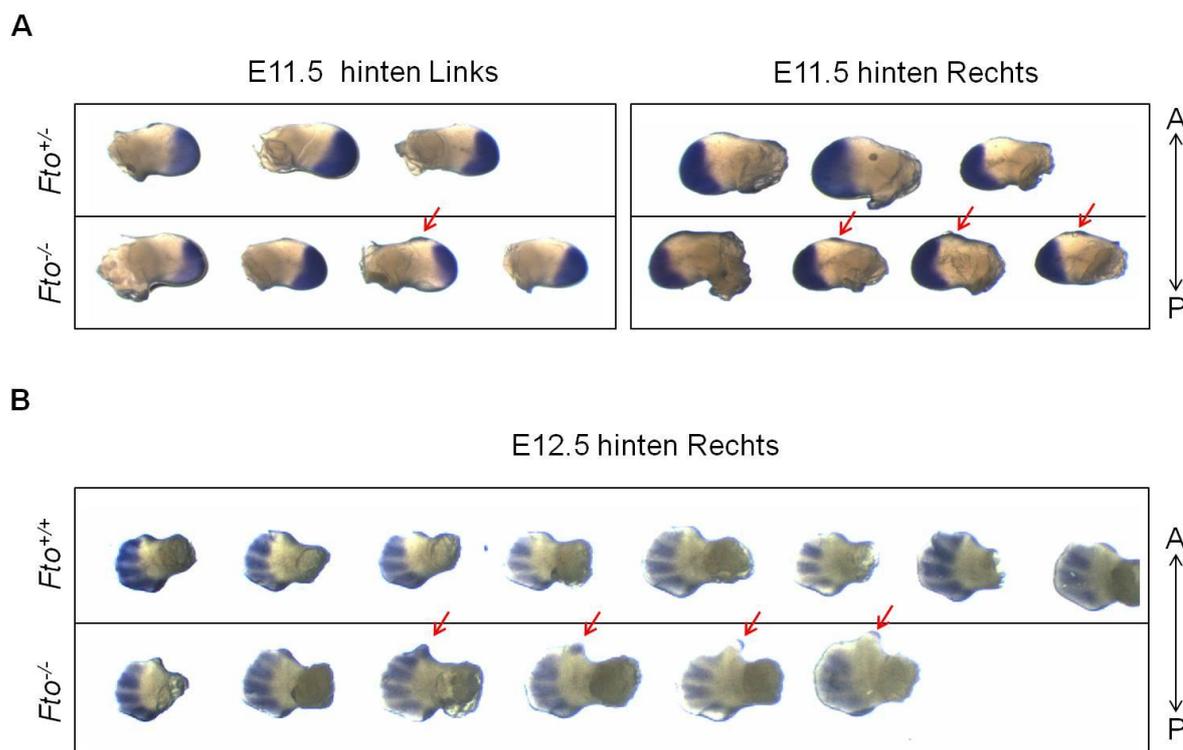


Abb. 3.26: *Hoxd13*-Expression in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen.

(A) Whole Mount *In situ* Hybridisierung (WISH) für *Hoxd13* in den rechten und linken Hintergliedmaßenknospen von drei *Fto*^{+/-}- und vier *Fto*^{-/-}-Embryonen im Alter E11.5. Die roten Pfeile markieren ektopische anteriore *Hoxd13*-Expressionsdomänen.

(B) WISH für *Hoxd13* in den rechten Hintergliedmaßenknospen von acht *Fto*^{+/+}- und sechs *Fto*^{-/-}-Embryonen. Die roten Pfeile zeigen auf einen zusätzlichen Zeh mit ektopischer *Hoxd13*-Expressionsdomän.

(A, anterior; P, posterior)

3.4.3 Untersuchung von Komponenten des Bmp-Signalweg

Mitglieder der Bmp (*bone morphogenetic proteins*)-Familie spielen in vielen Prozessen der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. So sind die Bmps zum Beispiel während der Gliedmaßenentwicklung an der Kontrolle der antero-posterioren Musterbildung, der Verknöcherung und der Apoptose beteiligt. Die Funktion der Bmp-Proteine wird über verschiedene Bmp-Rezeptoren (BmpR) vermittelt. Transgene Mäuse mit einer Überexpression des konstitutiv aktiven *Bmp-receptor-1B* (*caBmpr-1B*) entwickeln u.a. an den Hintergliedmaßen eine präaxiale Polydaktylie und eine posteriore Transformation der anterioren Zehe. Außerdem zeigen diese Mäuse verschiedene Fehlbildungen im Bereich

der Rippen, des Brustbeins und des Schwertfortsatzes. Alle diese Phänotypen sind denen der *Fto*^{-/-}-Mäuse sehr ähnlich (Zhang et al., 2000). Auch *Bmp7*-defiziente Mäuse weisen neben einigen weiteren Defekten (z.B. in der Niere und im Schädel) eine Größenretardation, Missbildungen im Bereich des Brustkorbes und eine präaxiale Polydaktylie an den Hintergliedmaßen auf. Außerdem sind alle Mäuse, die morphologische Veränderungen aufweisen innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt gestorben (Luo et al., 1995). Auch in *Bmp4* heterozygot mutante Mäuse konnte eine neonatale Sterblichkeit und eine präaxiale Polydaktylie an der rechten Hinterpfote beobachtet werden (Dunn et al., 1997). Zudem kann verschiedenen Komponenten des Bmp-Signalweges eine Rolle in der Lungenentwicklung zugeschrieben werden (Shi et al., 2001; Weaver et al., 1999). Alle diese mutanten Phänotypen zeigen große Ähnlichkeiten zu den, in dieser Arbeit untersuchten, *Fto*^{-/-}-Mäusen. Daher lag die Vermutung nahe, dass die *Fto*^{-/-}-Mäuse Veränderungen im Bmp-Signalweg aufweisen könnten. Daraufhin wurde die mRNA-Expression verschiedener Bmp-Signalweg-Komponenten untersucht.

Begonnen wurde mit der semi-quantitativen PCR-Analyse von *Bmp4*, und der Bmp-Zielgene *Msx1* und *Msx2*. Es wurde die mRNA-Expression dieser drei Gene in den Gliedmaßenknospen von sechs *Fto*^{+/+}- und elf *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen am Tag E11.5 analysiert. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde das Haushaltsgen *Hprt* benutzt. In Abbildung 3.27 ist sowohl ein Foto des Agarosegels (A), als auch die Auswertung der Quantifizierung (B) gezeigt. Für *Bmp4* ist kein Foto des Agarosegels gezeigt, da für die Quantifizierung die Mittelwerte von drei unabhängigen Analysen verwendet wurden. Wie in Abbildung 3.27 zu sehen liegen für *Bmp4*, *Msx1* und *Msx2* keine signifikanten Expressionsveränderungen in den Gliedmaßenknospen der *Fto*^{-/-}-Embryonen, verglichen mit den *Fto*^{+/+}-Embryonen, vor (p=0,0870/0,3818/0,4959). Allerdings ist für *Bmp4* mit einem p-Wert von 0,0870 eine Tendenz zur signifikanten Expressionssteigerung festzustellen.

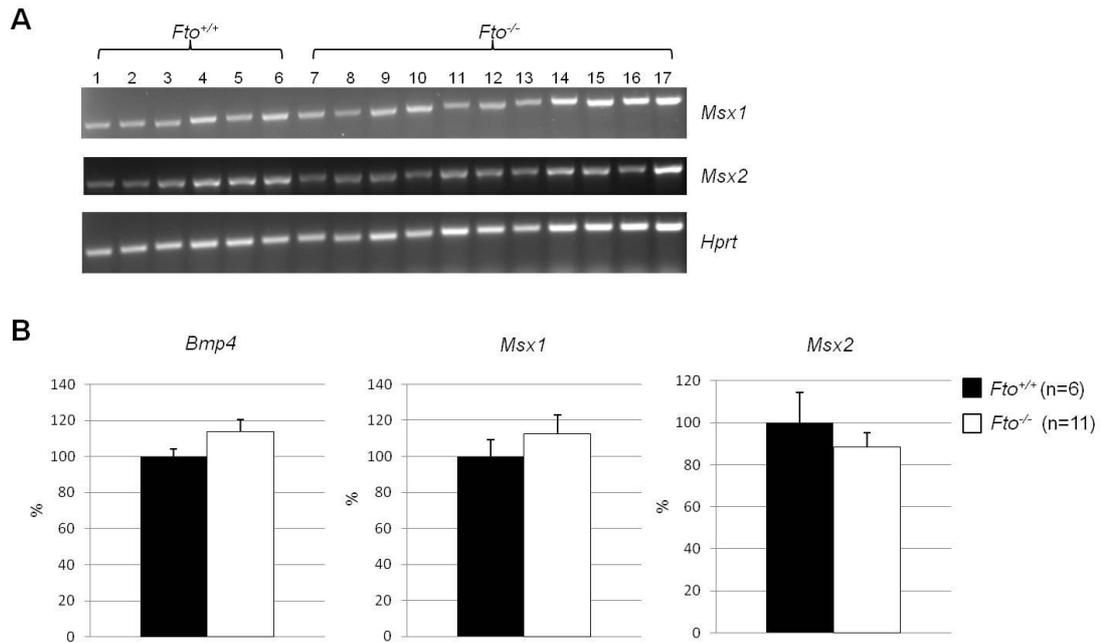


Abb. 3.27 mRNA Expression von *Bmp4*, *Msx1* und *Msx2* in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen (E11.5).

(A) Das Foto des Agarosegels der semi-quantitativen PCR-Analyse von *Msx1* und *Msx2* in den Gliedmaßenknospen von sechs *Fto*^{+/+}- (Spalte 1-6) und elf *Fto*^{-/-}- (Spalte 7-17) Tg104N-Embryonen im Alter E11.5. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde das Haushaltsgen *Hprt* benutzt. Für *Bmp4* ist kein Gelfoto gezeigt, da für die statistische Auswertung der Mittelwert von drei unabhängigen Analysen verwendet wurde.

(B) Die grafische Darstellung der Quantifizierung der *Bmp4*-, *Msx1*- und *Msx2*-Expression. Es besteht in keinem Fall ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Gliedmaßenknospen ($p=0,0870/0,3818/0,4959$).

Da die Methode der semi-quantitativen PCR-Analyse nicht immer fehlerfrei ist, wurde zur Absicherung der Daten zusätzlich eine quantitative Realtime-PCR-Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurde das *Msx1* ausgewählt, da dieses eines der sensitivsten Bmp-Zielgene ist. Es wurde die *Msx1*-Expression in den Gliedmaßen, im Kopf und im Rumpf (inkl. innere Organe) von sechs *Fto*^{+/+}- und elf *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen (E11.5) analysiert (Abb. 3.28). Auch mit dieser sensitiveren PCR-Methode sind keine signifikanten Unterschiede in der *Msx1*-Expression in den drei verschiedenen Geweben der Tg104N-Embryonen zu beobachten ($p=0,7034/0,5227/0,2676$).

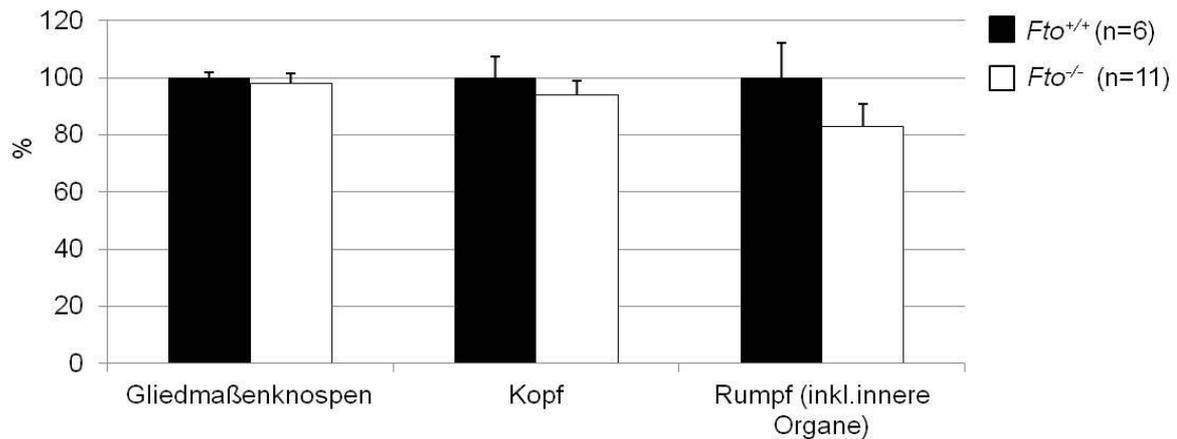


Abb. 3.28: mRNA-Expression von *Msx1* in den Gliedmaßenknospen, dem Kopf und dem Rumpf von Tg104N-Embryonen (E11.5).

Die grafische Darstellung der quantitativen Realtime-PCR-Analyse von *Msx1* in den Gliedmaßenknospen, dem Kopf und dem Rumpf (inkl. innere Organe) von sechs *Fto*^{+/+}- und elf *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen im Alter E11.5. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde das Haushaltsgen *Hprt* benutzt. Es besteht in keinem Fall ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Embryonen ($p=0,7034/0,5227/0,2676$).

Zusammenfassend ist für die Analysen der Tg104N-Embryonen bezüglich des Bmp-Signalweges zu sagen, dass für die hier untersuchten Komponenten des Bmp-Signalweges (*Bmp4*, *Msx1* und *Msx2*) keine signifikanten Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene in den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen bestehen.

3.4.4 Untersuchung von Komponenten des Wnt-Signalweg

Im Jahr 2004 stellten Hajihosseini et al. ein Mausmodell mit einer hypermorphen Mutation im *Fgfr1* Gen vor. Diese Mutanten weisen neben Defekten im Schädel und Transformationen der Wirbelkörper auch Missbildungen im Bereich des Brustbeins und des Schwertfortsatzes auf, welche den Missbildungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse sehr ähnlich sind. Außerdem entwickeln sie eine uni- oder bilaterale präaxiale Polydaktylie an den Hinterpfoten. Durch Whole Mount *In situ* Hybridisierungen konnten Hajihosseini et al. Veränderungen im Expressionsmuster von Mitgliedern drei verschiedener Signalwege detektieren: der *Hox*-Gen-Signalweg, in Form des *Hoxd13*; der kalzium-abhängige Wnt-Signalweg, in Form des Liganden *Wnt5a*; und der kanonische β -Catenin Wnt-Signalweg, in Form von *Dickkopf* (*Dkk1*).

Da die Expression des *Hoxd13* in den *Fto*^{-/-}-Mäusen in Abschnitt 3.4.2 bereits untersucht wurde, wurde in diesem Teil der Arbeit die Expression von *Wnt5a* und *Dkk1* in den Tg104N-

Embryonen analysiert. Mittels der semi-quantitativen PCR-Analyse wurde die mRNA-Expression von *Wnt5a* und *Dkk1* in den Gliedmaßenknospen von sechs *Fto*^{+/+}- und elf *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen am Tag E11.5 quantifiziert. In Abbildung 3.29 ist das Ergebnis der Quantifizierung grafisch dargestellt. Wie der Grafik zu entnehmen, ist die Expression von *Wnt5a* in den Gliedmaßenknospen der *Fto*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Embryonen signifikant um 21% erhöht ($p=0,0299$). Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten der Analysen der hypermorphen *Fgfr1*-Mutante, in der ebenfalls ein Anstieg der *Wnt5a*-Expression im Vergleich zu den Wildtypen gezeigt werden konnte. Jedoch kann keine signifikante Veränderung in der Expression von *Dkk1* in den *Fto*^{-/-}-Embryonen beobachtet werden ($p=0,4858$).

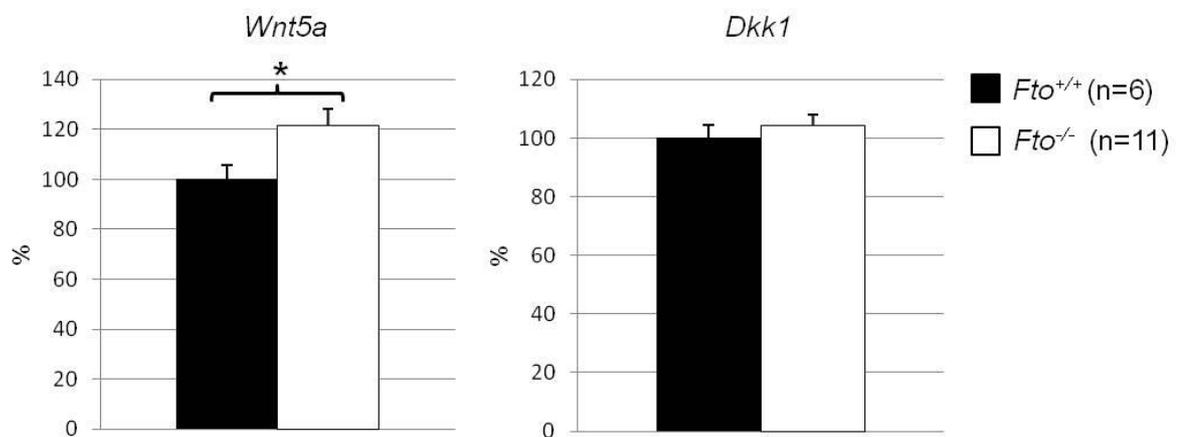


Abb. 3.30: mRNA Expression von *Wnt5a* und *Dkk1* in den Gliedmaßenknospen von Tg104N-Embryonen (E11.5).

Die grafische Darstellung der Quantifizierung der semi-quantitativen PCR-Analyse von *Wnt5a* (links) und *Dkk1* (rechts) in den Gliedmaßenknospen von von sechs *Fto*^{+/+}- und elf *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen im Alter E11.5. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurde das Haushaltsgen *Hprt* benutzt. Die Expression von *Wnt5a* ist in den *Fto*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Embryonen signifikant um 21% erhöht ($p= 0,0299$). Für *Dkk1* kann kein signifikanter Expressionsunterschied beobachtet werden ($p= 0,4858$).

3.5 Die Identifizierung und Analyse potentieller Fto-Interaktionspartner

Zu Beginn der Untersuchungen dieser Arbeit war nicht viel über die Funktion von Fto bekannt. Die Identifizierung von Fto-Interaktionspartnern mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-System (1.5.1), sollte Hinweise auf die Fto-Funktion liefern.

3.5.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System für Fto

Für die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde nach dem Matchmaker Pretransformed Libraries Protokoll von Clontech vorgegangen. Als Köder-Konstrukt wurde das *Fto* in dem pGBKT7 Vektor (pGBKT7-Fto) mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne (DNA-BD) benutzt. Als Beute-Konstrukt wurde eine cDNA Bank eines 17 Tage alten Mausembryos (#MY4013AH, Clontech) in dem pACT2 Vektor, der eine Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) besitzt, ausgewählt. Vor der Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems war es zwingend notwendig das Köder-Konstrukt auf Autoaktivität zu überprüfen. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass Fto selbstständig, in Abwesenheit der Beute-Proteine, die Reportergene in der Hefe aktiviert. Ebenfalls musste zuvor ausgeschlossen werden, dass das Fto-Protein toxisch ist, wenn es in Hefe exprimiert wird. Die Tests auf Autoaktivität und Toxizität wurden bereits vor der Anfertigung dieser Arbeit von Dr. J. Fischer (EMT) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das Fto-Protein weder autoaktive noch toxische Eigenschaften in der Hefe besitzt (mündliche Mitteilung von Dr. J. Fischer). So konnte mit der Paarung des Hefestammes AH109, inkl. des Köder-Konstruktes, und des Hefestammes Y187, inkl. des Beute-Konstruktes, begonnen werden. Laut der Angabe der Firma Clontech bestand die cDNA Bank aus $3,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen. Etwa $5,52 \times 10^6$ Klone wurden in dem hier vorgestellten Ansatz gefiltert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass jeder unabhängige Klon mindestens ein Mal gefiltert wurde. Nach der Verpaarung waren 508 Hefeklonen gewachsen, in denen somit jeweils eine Interaktion zwischen Fto und einem potentiellen Interaktionspartner bestand. Da das Hefe-Zwei-Hybrid-System eine relativ hohe

Anzahl an falsch positiven Interaktionen hervorbringt, mussten anschließend, wie in Abbildung 3.30 schematisch dargestellt, mehrere Selektionsschritte durchlaufen werden.

Begonnen wurde mit der Übertragung der 508 Hefeklone von den Selektionsplatten auf sogenannte Masterplatten. Den Nährböden dieser Platten wurde zusätzlich 3-Aminotriazol-1,2,4-Triazo (3-AT) zugefügt. Dadurch wurde die Histidin-Auxotrophie der Masterplatten verstärkt (Kishore und Shah, 1988; Fields et al., 1989). Nach diesem ersten Selektionsschritt waren nur noch 459 der 508 Hefeklone angewachsen.

Der nächste Selektionsschritt war der β -Galaktosidase (β -Gal)-Test. Nur wenn das Köder- und Beutefusionsprotein interagieren, werden die Gal4-DNA-BD und die Gal4-AD zusammengebracht und die Transkription des *LacZ* Reportergens aktiviert. Aufgrund eines negativen Ergebnisses in diesem Test konnten über die Hälfte der Klone aussortiert werden. Nach diesem zweiten Selektionsschritt waren somit nur noch 203 Hefeklone übrig, die als richtig positive in Frage kamen.

Aus 162 der 203 Hefeklone wurde die jeweilige Beute-Plasmid-DNA isoliert und in den nächsten Selektionsschritt, die Re-Transformation, eingesetzt. Die in der Re-Transformation gewachsenen Hefezellen wurden erneut einem β -Gal-Test unterzogen. Für 60 der 162 Klone konnte ein eindeutig positives Ergebnis erzielt werden.

Daraufhin wurde die jeweilige Beute-Plasmide-DNA zur DNA-Sequenzierung an das BMFZ (Biologisch Medizinisches Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weitergeleitet. Am Ende all dieser Selektionsschritte konnten 34 verschiedene potentielle Fto-Interaktionspartner identifiziert werden. Elf konnten nach der Sequenzierung aufgrund von z.B. reversen Sequenzen oder 3`UTRs (3`untranslatierter Bereich) als falsch positive Interaktionen ausgeschlossen werden und 15 kamen mehr als einmal vor.

Eine Auflistung der mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten 34 potentiellen Interaktionspartnern ist in der Tabelle 3.4 zu sehen.

Tabelle 3.4: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten potentiellen Interaktionspartner von Fto.

Mit den potentiellen Interaktionspartnern, die in dieser Tabelle grün hinterlegt sind, wurden weitere unabhängige Analysen, zur Bestätigung der Interaktion mit Fto, in Säugetierzellen durchgeführt.

	Klon-Nr.	Gen-Symbol	Accession-Nr.	Gen-Name
1)	D18	<i>Acad11</i>	MN_175324.3	<i>Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11</i>
2)	E23	<i>Acpp</i>	NM_207668.2	<i>Acid phosphatase, prostate</i>
3)	G27	<i>Ak3l1</i>	NM_009647.3	<i>Adenylate kinase 3 alpha-like 1</i>
4)	A7, A9, D1, D2	<i>Armxc3</i>	NM_027870.1	<i>Armadillo repeat containing, X-linked 3</i>
5)	G16	<i>Aspscr1 (TUG)</i>	NM_026877.1	<i>Alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1</i>
6)	B31, E3	<i>Atp5d</i>	NM_027862.1	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d</i>
7)	D44	<i>Cc2d1a1</i>	NM_145970.1	<i>Coiled-coil and C2 domain containing 1A</i>
8)	A37, C15	<i>Dmap1</i>	NM_023178.2	<i>DNA methyltransferase 1-associated protein 1</i>
9)	E5	<i>Dock6</i>	NM_177030.3	<i>Dedicator of cytokinesis 6</i>
10)	C8	<i>E130012A19Rik</i>	NM_175332.3	
11)	J8	<i>eIF5A</i>	NM_181582.4	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A</i>
12)	E19	<i>Eif5b</i>	NM_198303.2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5B</i>
13)	G40	<i>Eps8l2</i>	NM_133191	<i>Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2</i>
14)	A36, E40	<i>Fiz1</i>	NM_001110328.1	<i>Ft3 interacting zinc finger protein 1</i>
15)	A24, E44	<i>Gatad1</i>	NM_026033.2	<i>GATA zinc finger domain containing 1</i>
16)	G46	<i>H3f3b</i>	NM_008211.3	<i>H3 histone, family 3B</i>
17)	A10	<i>Hba-a1</i>	NM_008218.1	<i>Hemoglobin alpha, adult chain 1</i>
18)	C20, E45	<i>Kpna6</i>	NM_008468.3	<i>Karyopherin (importin) alpha 6</i>
19)	D39	<i>Lman2</i>	NM_025828	<i>Lectin, mannose-binding 2</i>
20)	D45, H10	<i>Lmo2</i>	NM_008505.3	<i>LIM domain only 2</i>
21)	E15	<i>Lor</i>	NM_008508	<i>Loricrin</i>
22)	F21	<i>Mrpl19</i>	NM_026490.2	<i>Mitochondrial ribosomal protein L19</i>
23)	D47	<i>Nudt21</i>	NM_026623.3	<i>Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21</i>
24)	B43	<i>Nxf1</i>	NM_016813.2	<i>Nuclear RNA export factor 1 homolog</i>
25)	E16	<i>Pabpc4</i>	NM_130881.2	<i>Poly(a) binding protein cytoplasmic 4</i>
26)	C6	<i>Papss1</i>	NM_011863.2	<i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1</i>
27)	H36	<i>Pstk</i>	NM_001039534.1	<i>Phosphoseryl-tRNA kinase</i>
28)	C46	<i>Tcf19</i>	NM_025674.2	<i>Transcription factor 19</i>
29)	G43	<i>Tip1</i>	NM_145513.4	<i>TIP41, TOR signalling pathway regulator-like</i>
30)	D48	<i>Tmem65</i>	NM_175212.4	<i>Transmembrane protein 65</i>
31)	C41	<i>Tnni3</i>	NM_009406.3	<i>Troponin I, cardiac 3</i>
32)	B45, C32	<i>Wdfy2</i>	NM_175546.3	<i>WD repeat and FYVE domain containing 2</i>
33)	A16, A27, B3, C37, C43, E38	<i>Wnk2</i>	NM_029361.2	<i>WNK lysine deficient protein kinase 2</i>
34)	E10	<i>Zfp281</i>	NM_177643.3	<i>Zinc finger protein 281</i>

3.5.2 Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion in einem unabhängigen System

Der nächste wichtige Schritt war die Bestätigung dieser potentiellen Fto-Interaktionspartner in einem unabhängigen säugetier-spezifischen System. Dafür wurde sowohl die Methode der Co-Immunoprecipitation (Co-IP) als auch die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP) ausgewählt.

Die Vorarbeiten, bis der jeweilige potentielle Interaktionspartner in mindestens einer dieser Analysen eingesetzt werden kann, sind relativ zeitaufwendig. Daher sollten die in Bezug auf das Fto-Protein interessantesten Interaktionspartner herausgesucht werden. Aufgrund der bereits bestehenden theoretischen Kenntnisse über die potentiellen Interaktionspartner konnte in keinem Fall eine offensichtliche Verbindung zum Fto-Protein hergestellt werden. Daher mussten andere Auswahlkriterien festgelegt werden.

Zum Einen wurden die potentiellen Interaktionspartner nach ihrer Lokalisation in der Zelle aufgeteilt. Da bekannt ist, dass Fto hauptsächlich im Zellkern exprimiert wird (Peters et al., 2002), kommen in erster Linie nur die Proteine als Fto-Interaktionspartner in Frage, welche ebenfalls im Zellkern exprimiert werden. Wie in der Tabelle 3.5 zu sehen werden 13 der 34 potentiellen Interaktionspartner im Zellkern exprimiert.

Zum Anderen wurde vor einiger Zeit von Dr. J. Fischer (EMT) in Zusammenarbeit mit dem BMFZ (HHU-Düsseldorf) eine Microarray-Analyse für *Fto* im epigonadalen Fettgewebe von sechs Wochen alten Mäusen durchgeführt. Diese Daten wurden mit denen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems verglichen. Dabei wurde nach Kandidaten gesucht, die sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als potentieller Interaktionspartner identifiziert wurden, als auch in der Microarray-Analyse durch eine veränderte Expression in den *Fto*^{-/-}-Mäusen auffällig waren. In der Tabelle 3.6 sind die sieben potentiellen Fto-Interaktionspartner *Acpp*, *Dock6*, *Eps8l2*, *Lor*, *Tcf19*, *Wnk2* und *Wdfy2* aufgelistet, die in der Microarray-Analyse eine veränderte mRNA-Expression aufweisen. Zu sechs der Kandidaten ist beschrieben, ob die Expression in den *Fto*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Mäusen erhöht oder erniedrigt ist, und in welchem Maße die Expressionsveränderung vorliegt. Für *Dock6* konnte in dem epigonadalen Fett der *Fto*^{+/+}-Mäuse keine Expression detektiert werden, wohingegen im epigonadalen Fett der *Fto*^{-/-}-Mäuse *Dock6*-mRNA vorhanden war.

Tabelle 3.5: Lokalisation der potentiellen Fto-Interaktionspartnern in der Zelle.

Mit den potentiellen Interaktionspartnern, die in dieser Abbildung in grüner Schriftfarbe dargestellt sind, wurden weitere unabhängige Analysen zur Bestätigung der Interaktion mit Fto in Säugetierzellen durchgeführt.

<u>zelluläre Lokalisation:</u>				
<u>Zellkern</u>	<u>Zytoplasma</u>		<u>Membran</u>	<u>Mitochondrium</u>
Cc2d1a1	Acad11	Lman2	Acpp	Ak311
Dmap1	Ak311	Mrpl19	Armex3	Atph5
Dock6	Aspscr1	Nxf1	Aspscr1	Hba-a1
eIF5A	Cc2d1a1	Pabpc4	Atph5	Mrpl19
Fiz1	eIF5A	Papss1	Kpna6	Pstk
Gatad1	eIF5B	Pstk	Lman2	
H3f3b	Eps8l2	Tipr1	Lor	
Kpna6	Fiz1	Tnni3	Nxf1	
Lmo2	Hba-a1	Wdfy2	Tmem65	
Nudt21	Kpna6	Wnk2		
Nxf1				
Tcf19				
Zfp281				

Tabelle 3.6: Microarraydaten von sieben potentiellen Interaktionspartnern.

Die hier aufgeführten sieben Kandidaten Acpp, Dock6, Eps8l2, Lor, Tcf19, Wnk2 und Wdfy2 wurden sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentielle Interaktionspartner von Fto identifiziert, als auch durch veränderte mRNA-Expression auffällig in der Microarray-Analyse im epigonadalen Fett von sechs Wochen alten *Fto*^{-/-}-Mäusen.. Es ist beschrieben inwiefern die mRNA-Expression im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Mäusen verändert ist und wie hoch die Expressionsveränderung ist (x-fach). Die Microarray-Analyse wurde von Dr.J.Fischer (EMT) in Zusammenarbeit mit dem BMFZ (HHU-Düsseldorf) durchgeführt.

Gen-Symbol	Veränderung (x-fach)	Veränderungs- richtung
<i>Acpp</i>	1,80	erhöht
<i>Eps8l2</i>	2,14	erhöht
<i>Lor</i>	1,70	erniedrigt
<i>Tcf19</i>	1,74	erniedrigt
<i>Wnk2</i>	2,26	erhöht
<i>Wdfy2</i>	1,93	erhöht
<i>Dock6</i>	abwesend in <i>Fto</i> ^{+/+}	anwesend in <i>Fto</i> ^{-/-}

Aufgrund dieser beiden Auswahlkriterien wurden acht (Cc2d1a1, Dmap1, Dock6, eIF5A, Gatad1, H3f3b, Lmo2 und Wnk2) der 34 im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten potentiellen Interaktionspartner in der Co-IP und/oder der TAP- auf die Echtheit der Interaktion mit Fto überprüft.

Vor der Durchführung dieser Analysen wurde die jeweilige cDNA-Sequenz dieser acht potentiellen Interaktionspartner aus dem Hefevektor pACT2 in den säugetier-spezifischen Expressionsvektor pCMV-Myc kloniert. So konnten diese Kandidaten, in die für die folgenden Analysen verwendeten NIH-3T3 Zellen, transfiziert und aufgrund des N-terminalen Myc-Fusionsproteins in der anschließenden Westernblot-Analyse durch einen Myc-Antikörper detektiert werden.

3.5.2.1 Bestätigung der Fto-Dock6-Interaktion

Begonnen wurde mit der Bestätigung der direkten Interaktion zwischen Fto und Dock6 (*Dedicator of cytokinesis 6*). Das Dock6-Protein wurde als interessanter potentieller Fto-Interaktionspartner ausgewählt, weil *Dock6* in der Microarray-Analyse starke Expressionsunterschiede zwischen den *Fto*^{-/-} und *Fto*^{+/+}-Mäusen zeigt (siehe 3.5.2). Außerdem ist das Dock6-Protein im Zellkern lokalisiert.

Zunächst wurde eine Co-IP durchgeführt. Der Immunoblot zur Darstellung der Co-IP Ergebnisse ist in Abbildung 3.31 gezeigt. Durch die Transfektion der Expressionsvektoren pNTAP-B Fto und pCMV-Myc Dock6 wurde sowohl eine Überexpression des Fto-Proteins, als auch des Myc-fusionierten Dock6-Proteins (Dock6-Myc) in den NIH-3T3 Zellen bewirkt. In der Inputkontrolle (Abb 3.31, Spalte 2) kann mit dem c-Myc-Antikörper das transfizierte Dock6-Protein und mit einem spezifischen Fto-Antikörper, sowohl das transfizierte, als auch das endogene Fto-Protein detektiert werden. Als Transfektions-Kontrolle wurde ein unbehandeltes NIH-3T3-Proteinlysate aufgetragen, indem ausschließlich das endogene Fto-Protein detektiert wird (Abb. 3.31, Spalte 1). Die Präzipitation erfolgte durch Protein-A-Agarose-Kugeln, die zuvor mit dem c-Myc-Antikörper inkubiert wurden. In der Spalte 4 des Immunoblots ist die Präzipitation des Dock6-Myc-Fusionsproteins deutlich zu erkennen. Außerdem ist zu sehen, dass Fto co-präzipitiert wird. Für das transfizierte Fto ist ein deutliches Signal zu sehen, aber auch das endogene Fto-Proteine konnte in geringen Mengen co-präzipitiert werden. Das bedeutet, dass eine Interaktion zwischen Fto und Dock6 besteht.

Zur Kontrolle wurde eine Hälfte des Lysates mit Protein-A-Agarose-Kugeln behandelt, die ohne den c-Myc-Antikörper inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen der Proteine an die Agarose-Kugeln auszuschließen. Das Ergebnis ist in der Spalte 3 des Immunoblots zu sehen. Es kann weder transfiziertes noch endogenes Fto-Protein detektiert werden. Für das transfizierte Dock6-Myc-Fusionsprotein ist eine schwache Bande zu erkennen, die jedoch aufgrund der hohen Intensitätssteigerung zu der Bande nach der Präzipitation mit den c-Myc-inkubierten Agarose-Kugeln, außer Acht gelassen werden kann.

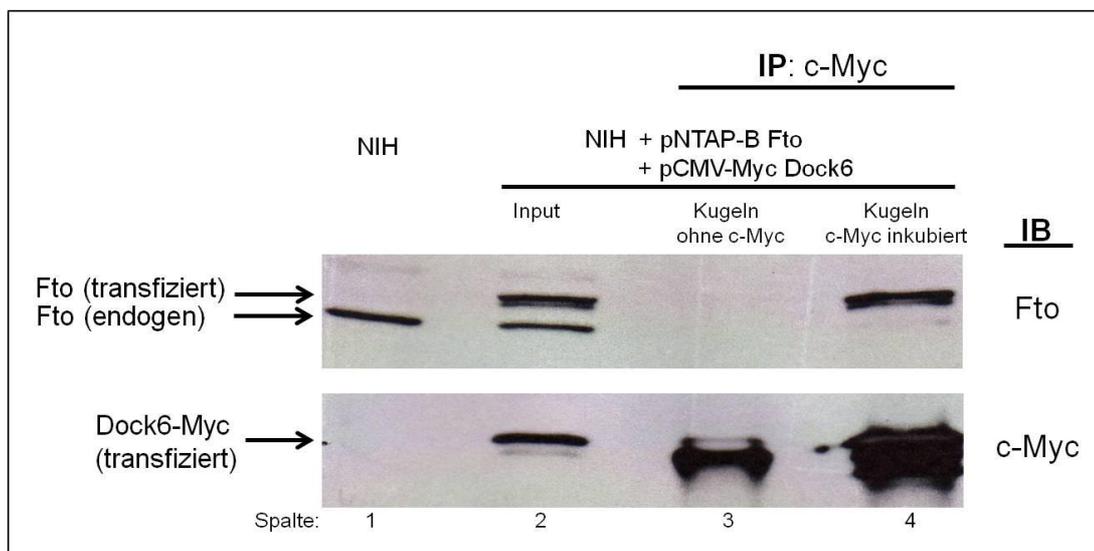


Abb. 3.31: Bestätigung der Interaktion von Fto und Dock6 durch Co-Immunopräzipitation.

Durch die Transfektion des Fto- (pNTAP-B Fto) und des Dock6-Myc-(pCMV-Myc Dock6) Vektors in NIH-3T3 Zellen wurde eine Überexpression dieser beiden Fusions-Proteine erzeugt. Das Proteinlysate dieser Zellen wurde für die Co-IP eingesetzt. Spalte 1: unbehandeltes NIH-3T3-Proteinlysate; nur das endogene Fto-Protein wird detektiert. Spalte 2: Inputkontrolle; sowohl das transfizierte Fto als auch das transfizierte Dock6-Myc werden neben dem endogenen Fto in den Zellen exprimiert. Spalte 3: als Kontrolle wurde zu der Hälfte des Zelllysates statt des c-Myc-Antikörper nur die Protein-A-Agarose-Kugeln zugegeben. Spalte 4: die Präzipitation des transfizierten Dock6-Myc ist erfolgreich und sowohl das transfizierte Fto, als auch eine geringe Menge des endogenen Fto-Proteins werden co-präzipitiert (IP: für die Immunopräzipitation verwendete Antikörper; IB: für den Immunoblot verwendete Antikörper).

Diese Proteininteraktion zwischen Fto und Dock6 in Säugetierzellen kann durch die TAP-Methode ebenfalls bestätigt werden. Die TAP-Methode ist im Vergleich zu der Co-IP noch sensitiver, da durch die Aufreinigung in zwei Schritten unspezifische Interaktionspartner besser ausgeschlossen werden.

Für die TAP-Methode wurde zu Beginn der Doppeltag-Vektor inklusive der Fto-cDNA (pDT3-HA Fto) in NIH-3T3 Zellen transfiziert. Dieser Vektor enthält neben einem HA-Tag,

dass zur Detektion des Fto-Fusionsproteins im Immunoblot dient, auch ein 3x Flag- und ein Strep (Streptavidin)-Tag. Diese beiden Protein-Tags sind in der TAP-Methode notwendig für die Aufreinigung des Fto-Proteins und dessen interagierender Proteine. Wie bereits erwähnt läuft die TAP-Analyse über zwei Aufreinigungsschritte. In dem ersten Schritt wird das Fto-Protein inkl. der interagierenden Proteine über Flag-Kügelchen aufgereinigt. Das Flag-Tag des Fto-Fusionsprotein bindet an diese Kügelchen, wird dadurch festgehalten. Alle unspezifischen Proteine, die nicht an das Fto gebunden sind werden gewaschen. Der zweite Aufreinigungsschritt ist vom Prinzip her gleich, nur das anstelle von Flag-Kügelchen Strep-Kügelchen eingesetzt wurden, die das Strep-Tag des Fto-Fusionsproteins binden. Abschließend wurden die Eluate der TAP-Analyse mit Hilfe der Westernblot-Analyse ausgewertet. Der Immunoblot zur Bestätigung der Interaktion von Fto und Dock6 ist in Abbildung 3.32 gezeigt. Da es durch das Nichtvorhandensein eines Dock6-Antikörpers nicht möglich ist das endogene Dock6-Protein zu detektieren, wurde für die TAP-Analyse nicht nur der oben genannte pDT3-HA Fto Vektor in die NIH-3T3 Zellen transfiziert, sondern auch der bereits in der Co-IP verwendete pCMV-Myc Dock6 Vektor.

Wie in der Spalte 1 des Immunoblots zu sehen ist diese Transfektion erfolgreich und beide Fusions-Proteine (Fto und Dock6) werden in den NIH-3T3 Zellen exprimiert. In der Spalte 2 des Immunoblots wurde ein Aliquot des Eluates nach dem ersten Aufreinigungsschritt und in der Spalte 3 ein Aliquot des Eluates nach dem zweiten Aufreinigungsschritt aufgetragen. Da das Volumen des zweiten Eluates relativ hoch war, wurde das Proteinlysate abschließend konzentriert. Das Ergebnis ist in der Spalte 4 des Immunoblots zu sehen. Nach der spezifischen Aufreinigung des Fto-Fusionsproteins kann ebenfalls das Dock6-Fusionsprotein detektiert werden.

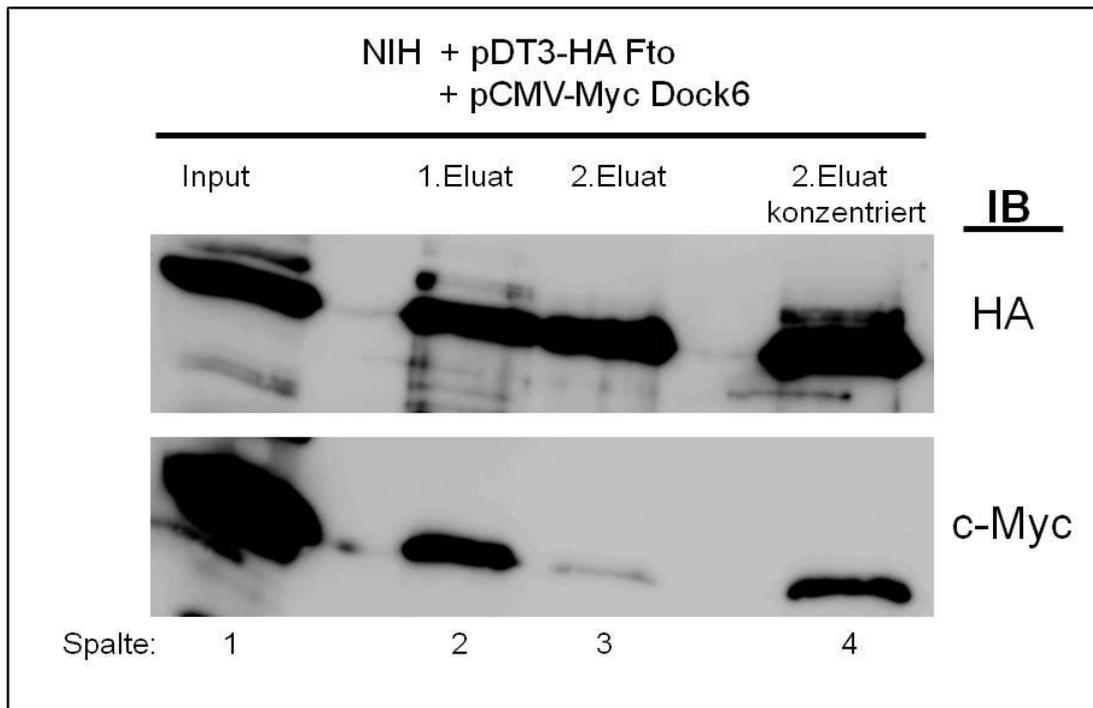


Abb. 3.32: Bestätigung der Interaktion von Fto und Dock6 durch die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung.

Durch die Transfektion des Doppeltag-Vektors inkl. Fto (pDT3-HA Fto) und des pCMV-Myc Dock6 Vektors in NIH-3T3 Zellen wurde eine Überexpression der beiden Fusions-Proteine erzeugt. Das Proteinlysate dieser Zellen wurde in die TAP-Analyse eingesetzt. Spalte 1: Transfektionskontrolle; sowohl das HA-getaggte Fto-Fusionsprotein, als auch das Myc-getaggte Dock6-Fusionsprotein werden in den NIH-3T3 Zellen exprimiert. Spalte 2: Aliquot des Eluates nach dem ersten Aufreinigungsschritt über das Flag-Tag des Fto-Fusionsproteins. Spalte 3: Aliquot des Eluates nach dem zweiten Aufreinigungsschritt über das Strep-Tag des Fto-Fusionsproteins. Spalte 4: das konzentrierte Protein-Eluat nach der zweiten Aufreinigung; durch eine Interaktion von Dock6 und Fto wurde das Dock6 nicht mit den übrigen unspezifischen Proteinen gewegewaschen, sondern konnte über die Aufreinigung von Fto mit aufgereinigt werden. Dies bestätigt die Protein-Protein-Interaktion zwischen Fto und Dock6 (IB: für den Immunoblot verwendete Antikörper).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Interaktion zwischen dem Fto- und dem Dock6-Protein sowohl anhand der Co-IP (Abb. 3.31), als auch der TAP-Methode (Abb. 3.32) bestätigt werden kann. Jedoch ist für das Dock6-Protein kein Antikörper vorhanden, so dass keine endogenen Analysen durchgeführt werden können. Hingegen kann in der Co-IP-Analyse, durch die Präzipitation des Dock6-Myc-Fusionsproteins, eine geringe Menge an endogenem Fto-Protein co-präzipitiert werden (Abb. 3.31, Spalte 4).

3.5.2.2 Bestätigung der Fto-Wnk2-Interaktion

Ein weiterer potentieller Fto-Interaktionspartner, der in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert wurde, war das Wnk2 (*WNK lysine deficient protein kinase 2*)-Protein. Wnk2 wird zwar nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma, exprimiert, aber die mRNA Expression von *Wnk2* war im epigonadalen Fettgewebe von *Fto*^{-/-}-Mäusen, im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}-Mäusen, um das 2,26-fache reduziert (3.5.2, Tabelle 3.6).

Auch hier wurde zunächst eine Co-IP durchgeführt. Es wurde ähnlich vorgegangen wie in der Co-IP des Dock6 (siehe 3.5.2.1). Zu Beginn wurden das Fto-Protein und das Myc-fusionierte Wnk2-Protein in NIH-3T3 Zellen überexprimiert. Der Unterschied zu der vorangegangenen Co-IP ist, dass parallel zwei Ansätzen durchgeführt wurden. In einen Ansatz wurde mit dem c-Myc-Antikörper präzipitiert und in dem zweiten Ansatz mit dem gpFto-Antikörper. In beiden Ansätzen kann eine Co-Präzipitation des jeweils anderen Proteins gezeigt werden (Abb. 3.33). In dem Ansatz, der mit dem gpFto-Antikörper präzipitiert wurde, wurde zum Nachweis des Fto-Proteins auf dem Immunoblot der rFto-Antikörper verwendet. Der gpFto-Antikörper würde durch die zuvor durchgeführte Präzipitation mit demselben Antikörper, einen zu starken Hintergrund verursachen. In der Spalte 2 der in Abbildung 3.33 gezeigten Immunoblots ist die Input-Kontrolle des Wnk2-Myc-Fusionsproteins für beide Ansätze zu sehen. Als Transfektions-Kontrolle wurde in Spalte 1 ein unbehandeltes NIH-3T3 Proteinlysate aufgetragen, indem wie erwartet kein Wnk2-Myc detektiert werden kann. Die Input-Kontrolle für das Fto-Protein ist in der Spalte 7 zu sehen. In beiden Ansätzen kann sowohl das transfizierte Fto-Protein, als auch das etwas kleinere endogene Fto-Protein detektiert werden. In beiden Ansätzen ist die Immunopräzipitation (IP) mit dem jeweiligen Antikörper erfolgreich. In der Spalte 3 des oberen Immunoblots ist die IP des Wnk2-Myc mit dem c-Myc-Antikörper gezeigt und in Spalte 6 des unteren Immunoblots die IP des Fto-Proteins mit dem gpFto-Antikörper.

Wie bereits erwähnt kann in beiden Ansätzen eine Co-Präzipitation des jeweils anderen Proteins gezeigt werden. In der Spalte 3 des unteren Immunoblots kann deutlich, das nach der IP mit gpFto, co-präzipitierte Wnk2-Myc-Fusionsprotein detektiert werden. In der Spalte 6 des oberen Immunoblots ist das nach IP mit dem c-Myc Antikörper co-präzipitierte Fto zu sehen. Das transfizierte Fto-Protein ist deutlich zu erkennen, aber auch das endogene Fto-Protein kann in geringen Mengen co-präzipitiert werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils

Auch die Proteininteraktion zwischen Fto und Wnk2 kann in Säugetierzellen durch die TAP-Methode bestätigt werden. Zur Durchführung dieser Analyse wurde verfahren, wie in der TAP-Analyse zur Bestätigung der Interaktion zwischen Fto und Dock6 im Abschnitt 3.5.2.1. Der Doppeltag-Vektor inklusive der Fto-cDNA (pDT3-HA Fto) und der pCMV-Myc Wnk2 Vektor wurden in NIH-3T3 Zellen transfiziert. 24 Stunden später wurden diese NIH-3T3-Zellen lysiert und das Zelllysat den beiden Aufreinigungsschritten, über das Flag- und das Strep-Tag, unterzogen. Abschließend wurden die Eluate der TAP-Analyse mit Hilfe der Westernblot-Analyse ausgewertet. Der Immunoblot der TAP-Analyse zur Bestätigung der Interaktion zwischen Fto und Wnk2 ist in Abbildung 3.34 gezeigt. In der Spalte 1 des oberen Blots ist die Input-Kontrolle des Fto-Fusionsproteins zu sehen. Außerdem ist das endogene Fto zu sehen (untere Bande). In der Spalte 2 des unteren Blots ist in der Input-Kontrolle die erfolgreiche Transfektion des Wnk2-Myc-Fusionsproteins gezeigt. In der Spalte 5 des oberen Blots und der Spalte 1 des unteren Blots wurde ein Aliquot des Eluates nach dem ersten Aufreinigungsschritt aufgetragen. Ein Aliquot des Eluates nach dem zweiten Aufreinigungsschritt wurde in der Spalte 8 des oberen und unteren Blots aufgetragen. Jeweils die Hälfte des konzentrierten Eluates nach der zweiten Aufreinigung wurde in der Spalte 10 des oberen und unteren Blots aufgetragen. Es ist zu sehen, dass mit der spezifischen Aufreinigung des Fto-Fusionsproteins, ebenfalls das Wnk2-Myc detektiert werden kann. Wie bereits erwähnt kann anhand dieser TAP-Analyse die Interaktion von Fto und Wnk2 bestätigt werden. In den restlichen Spalten (z.B. 3,4,6,7 und 9) wurde der Proteinmarker (M) und Aliquots der Durchflüsse (Df1 und Df2), Waschritte (W1) und Flag(FK)- und Strep(SK)-Kügelchen aufgetragen. Diese sind für das hier beobachtete Resultat jedoch nicht relevant, und werden daher nicht im Detail beschrieben.

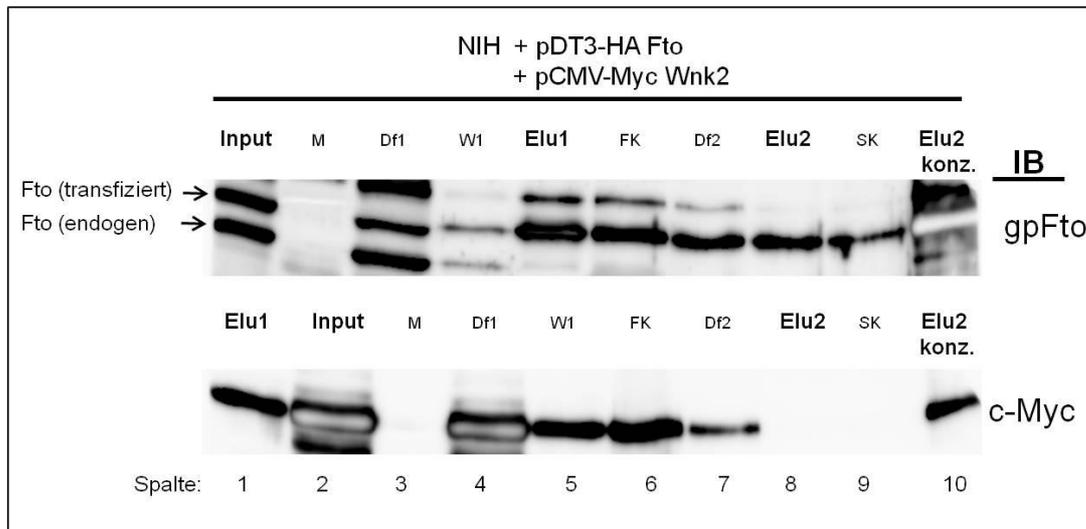


Abb. 3.34: Bestätigung der Interaktion von Fto und Wnk2 durch die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung.

Durch die Transfektion des Doppeltag-Vektors inkl. Fto (pDT3-HA Fto) und des pCMV-Myc Wnk2 Vektors in NIH-3T3 Zellen wurde eine Überexpression der beiden Fusions-Proteine erzeugt. Das Proteinlysate dieser Zellen wurde in die TAP-Analyse eingesetzt. Spalte 1 oben: Fto-Transfektionskontrolle; sowohl das transfizierte Fto-Fusionsprotein (obere Bande), als auch das endogene Fto (untere Bande) wurden in den NIH-3T3 Zellen exprimiert. Spalte 2 unten: positive Wnk2-Myc-Transfektionskontrolle. Spalte 5 oben und Spalte 1 unten: Aliquot des Eluates nach dem ersten Aufreinigungsschritt über das Flag-Tag des Fto-Fusionsproteins. Spalte 8 oben und unten: Aliquot des Eluates nach dem zweiten Aufreinigungsschritt über das Strep-Tag des Fto-Fusionsproteins. Spalte 10 oben und unten: konzentrierte Protein-Eluat nach der zweiten Aufreinigung; durch eine Interaktion von Wnk2 und Fto wurde das Wnk2 nicht mit den anderen unspezifischen Proteinen gewaschen, sondern konnte über die Aufreinigung von Fto mit aufgereinigt werden. Dies bestätigt die Protein-Protein-Interaktion zwischen Fto und Wnk2. In den restlichen Spalten wurde der Proteinmarker (M) und Aliquots der Durchflüsse (Df1 und Df2), Waschritte (W1) und Flag(FK)- und Strep(SK)-Kügelchen aufgetragen (IB: für den Immunoblot verwendete Antikörper).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Interaktion zwischen dem Fto-Protein und dem Wnk2-Protein, sowohl anhand der Co-IP (Abb 3.33), als auch der TAP-Analyse (Abb 3.34) bestätigen lässt. Auch für das Wnk2-Protein ist kein Antikörper vorhanden, so dass keine endogenen Analysen durchgeführt werden können. Allerdings kann in der Co-IP-Analyse durch die Präzipitation des Wnk2-Myc-Fusionsproteins, eine geringe Menge an endogenem Fto-Protein co-präzipitiert werden (Abb. 3.33).

3.5.2.3 Bestätigung der Fto-eIF5A-Interaktion

Als dritter potentieller Interaktionspartner von Fto wurde das eIF5A (*Eukaryotic translation initiation factor 5A*)-Protein untersucht, das im Zellkern und Zytoplasma exprimiert wird.

Da für das eIF5A-Protein ein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht, konnte die Co-IP zur Bestätigung der Fto-eIF5A-Interaktion auf endogener Ebene durchgeführt werden.

Das heißt, dass das Lysat von unbehandelten, nicht transfizierten NIH-3T3 Zellen in die Co-IP eingesetzt wurde. Für das restliche Protokoll wurde verfahren wie in den zuvor angefertigten Co-IPs (siehe 3.5.2.1 und 3.5.2.2). Es wurde sowohl eine IP mit dem rFto-Antikörper, als auch mit dem eIF5A-Antikörper durchgeführt. In beiden Fällen kann das jeweils andere endogene Protein co-präzipitiert werden und somit die Interaktion zwischen Fto und eIF5A bestätigt werden.

Die Immunoblots der abschließenden Westernblot-Analyse sind in Abbildung 3.35 gezeigt. In den Spalten 1 und 6 sind jeweils die Input-Kontrollen der zwei verschiedenen Ansätze zu sehen. Sowohl das endogene Fto-Protein, als auch das endogene eIF5A-Protein können detektiert werden. In dem oberen Blot der Spalte 2 ist das, durch die IP mit dem rFto-Antikörper, präzipitierte endogene Fto-Protein zu sehen, und in dem unteren Blot das co-präzipitierte endogene eIF5A-Protein. Das durch die IP mit dem eIF5A-Antikörper präzipitierte endogene eIF5A-Protein ist in dem unteren Blot der Spalte 5 zu sehen. In dem oberen Blot der Spalte 5 ist das co-präzipitierte endogene Fto-Protein zu sehen. Die Negativkontrolle mit den Protein-A-Agarose-Kugeln ohne rFto- bzw. eIF5A-Antikörper wurde in den Spalten 3 und 4 aufgetragen. Da weder Fto-Protein noch eIF5A-Protein in diesen Kontrollen zu sehen ist, ist eine unspezifische Bindung des Fto- oder des eIF5A-Proteins an die Protein-A-Agarose-Kugeln ausgeschlossen.

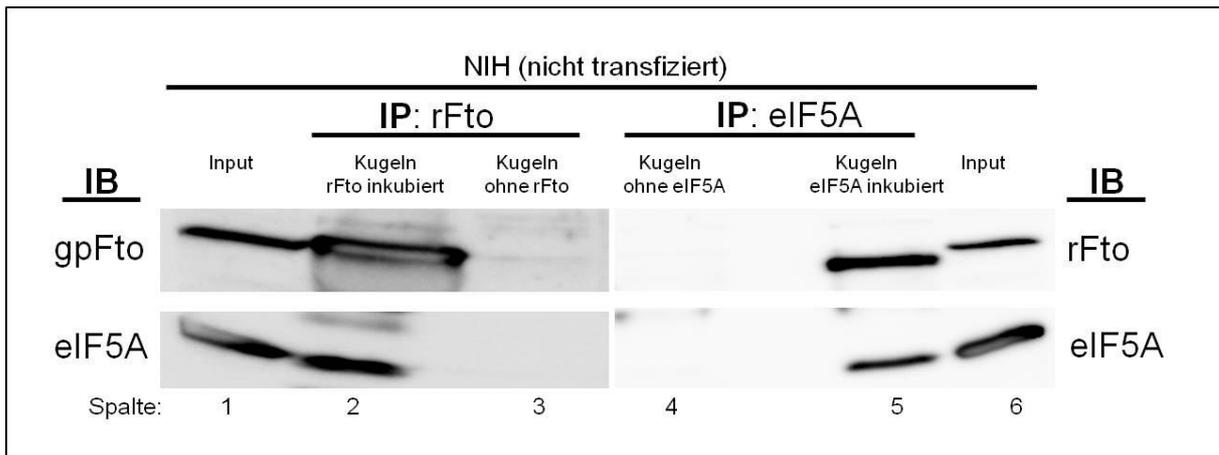


Abb. 3.35: Bestätigung der Interaktion von Fto und eIF5A durch Co-Immunopräzipitation.

Es wurden Proteinlysate unbehandelter, nicht transfizierter NIH-3T3 Zellen verwendet. Spalte 1 und 7: Inputkontrolle; sowohl das endogene Fto-Protein, als auch das endogene eIF5A-Protein werden in den Zellen exprimiert. Spalte 2: das durch die IP mit rFto präzipitierte endogene Fto (oben) und co-präzipitierte endogene eIF5A (unten). Spalte 3 und 4: als Kontrolle wurde zu der Hälfte des Zelllysates statt des rFto- bzw. eIF5A-Antikörper nur die Protein-A-Agarose-Kugeln zugegeben. Spalte 5: das durch die IP mit eIF5A präzipitierte endogene eIF5A (unten) und co-präzipitierte endogene Fto (oben) (IP: für die Immunopräzipitation verwendete Antikörper; IB: für den Immunoblot verwendete Antikörper).

Die in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Protein-Protein-Interaktion zwischen Fto und eIF5A kann somit in der Co-IP in Säugerzellen auf endogener Ebene bestätigt werden.

3.5.2.4 Keine Fto-Interaktion mit Cc2d1a1, Dmap1, Gatad1, H3f3b und Lmo2

Außerdem wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System die Kernproteine Cc2d1a1, Dmap1, Gatad1, H3f3b und Lmo2 als potentielle Fto-Interaktionspartner identifiziert. Diese Interaktionen können jedoch weder in der Co-IP, noch in der TAP-Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1 Die Veränderungen der Wirbelsäule sind *Fto*-unabhängig

In den neonatal gestorbenen Tg104N-Mäusen wurde zum Teil eine veränderte Anzahl an Lenden- und/oder Brustwirbeln und eine homöotische Transformation im Bereich der Sakralwirbel beobachtet (siehe 3.3.2.1). Diese Merkmale traten in den wildtypischen (*Fto*^{+/+}) und heterozygot mutanten (*Fto*^{+/-}) Mäuse jedoch in etwa der gleichen Häufigkeit auf, wie in den *Fto*-defizienten (*Fto*^{-/-}) Mäusen. Das lässt darauf schließen, dass diese Veränderungen im Bereich der Wirbelsäule der Tg104N-Mäuse unabhängig von *Fto* sind. Es ist bekannt, dass Veränderungen der Wirbelsäule sporadische Erscheinungen sind, die in einigen Mausstämmen als natürliche Variante vorkommen (Kessel und Gruss, 1991; Wolfer et al., 2002).

4.2 Neonatale Letalität in den *Fto*^{-/-} - Mäuse

Der zu Beginn dieser Arbeit bestehende Verdacht, dass die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse zum Zeitpunkt des Absetzens unterrepräsentiert sind, konnte durch statistische Analysen belegt werden. Ebenfalls war es möglich, den Zeitpunkt der Letalität zu bestimmen. Über 70% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse starben innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt (siehe 3.2.1). Es war zwar bereits zum Zeitpunkt der Geburt eine signifikante Abweichung von der nach Mendel zu erwartenden Genotypenverteilung zu beobachten (siehe Tabelle 3.1), jedoch konnten 25 der insgesamt 768 Mäuse nicht genotypisiert werden. Sie wurden vor dem Auffinden von den Elterntieren aufgefressen. Aufgrund der hohen neonatalen Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse kann allerdings davon ausgegangen werden, dass ein Großteil dieser 25 verstorbenen Mäuse homozygot mutant für *Fto* war. Wird die statistische Auswertung unter der Annahme vollzogen, dass alle diese 25 Mäuse *Fto*^{-/-} waren, ändert sich der p-Wert von 0,0369 auf 0,152. Damit würde keine signifikante Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung zum Zeitpunkt der Geburt bestehen. Diese Hypothese wird

von der Tatsache unterstützt, dass zwischen den Embryonalstadien und dem Zeitpunkt der Geburt keine signifikante Reduktion im Anteil der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse zu beobachten war (siehe Abb. 3.1). Dagegen war die Anzahl der *Fto*^{-/-}-Mäuse zum Zeitpunkt des Absetzens (P21) verglichen zu der Anzahl der *Fto*^{-/-}-Mäuse in den Embryonalstadien und zum Zeitpunkt der Geburt höchst signifikant reduziert. Auch in den Tg104BN-Mäusen war mit einem leicht reduzierten Anteil an *Fto*^{-/-}-Mäusen, zum Zeitpunkt des Absetzens, eine signifikante Abweichung von der nach Mendel zu erwartenden Genotypenverteilung zu beobachten (siehe Abb. 3.6).

4.3 Präaxiale Polydaktylie: *Fto*-Funktion in der antero-posterioren Gliedmaßenentwicklung

Neben einer hohen neonatalen Letalitätsrate wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass 25% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse eine Polydaktylie an den Hintergliedmaßen aufweisen. Die zusätzlichen Zehen wurden ausschließlich an der anterioren Seite der Gliedmaße gebildet (siehe 3.3.1). Dieses Vorkommen der sogenannten präaxialen Polydaktylie (PPD) in den *Fto*^{-/-}-Mäusen weist darauf hin, dass *Fto* an der antero-posterioren Musterbildung der murinen Gliedmaße beteiligt ist. Das Auftreten einer Polydaktylie wird in der Regel von Veränderungen im Expressionsmuster bestimmter Gene begleitet. Dazu zählen besonders die Gene der Shh-, Bmp- und Fgf-Signalwege, welche die Musterbildung der Gliedmaße entlang der drei Achsen regulieren (siehe 1.3.2). Es wird angenommen, dass für die Spezifizierung der antero-posterioren Achse der Gliedmaße, das Shh-Signal aus der ZPA (Zone polarisierender Aktivität) verantwortlich ist, die in der posterioren Region der Gliedmaßenknospe lokalisiert ist (Riddle et al., 1993). Mäuse, die eine PPD aufweisen besitzen in der Regel neben dem Shh-Signal aus der ZPA, eine ektopische Shh-Expressionsdomäne in der anterioren Region der Gliedmaßenknospe. Dadurch wird die Prozessierung des Gli3-Proteins in seine verkürzte Repressorform in der anterioren Gliedmaßenknospe unterdrückt und es kommt zur Entstehung von zusätzlichen Zehen (Hill, 2007). Die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen zeigten jedoch im Vergleich zu den *Fto*^{+/-}-Geschwistern keinen signifikanten Unterschied in der Expression des Gli3-Repressors (Gli3-83) in den Gliedmaßenknospen (siehe Abb. 3.20). Jedoch war in den Rümpfen (inkl. innerer

Organe) derselben Mäuse eine signifikante Reduktion von Gli3-83 zu beobachten (siehe Abb. 3.22). Da nur 25% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse eine PPD aufwiesen, ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass keiner der drei analysierten *Fto*^{-/-}-Embryonen eine PPD ausgebildet hätte. Die verwendeten Proteinlysate der Gliedmaßenknospen wurden von Embryonen des Embryonalstadiums E11.5 isoliert, wo noch nicht zu erkennen war, ob eine PPD ausgebildet wird.

Warum die PPD ausschließlich in den Hintergliedmaßen der Tg104N-Mäuse ausgebildet wird, kann mit den Resultaten dieser Arbeit nicht erläutert werden. Jedoch ist selbst in wildtypischen Mäusen wenig über die Prozesse bekannt, welche die anatomischen Unterschiede (z.B. Finger oder Zeh) in den Vorder- und Hintergliedmaßen hervorbringen (Logan, 2003).

4.4 *Fto* als negativer Regulator des Shh-Signalwegs

Die Interaktion zwischen dem Shh-Signal aus der ZPA und dem Fgf-Signal aus der AER (apikale Ektodermalleiste), wird als positive Rückkopplungsreaktion bezeichnet und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Zehenanzahl (Talamillo et al., 2005). Wie bereits erwähnt, ist das Auftreten einer PPD ein Indiz für eine ektopische Shh-Expression. Somit wäre zu erwarten, dass dies ebenfalls in einer erhöhten Induktion des Fgf-Signals resultiert. Frühere Studien in der Gliedmaßenknospe von Mäusen belegen, dass der Effekt der Fgf-Signale aus der AER, auf das angrenzende Mesenchym, über den Fgf-Rezeptor 1 (*Fgfr1*) vermittelt wird (Peters et al., 1992; Partanen et al., 1998; Eswarakumar et al., 2002). Transgene Mäuse, die eine hypermorphie Mutation im *Fgfr1*-Gen besitzen, weisen wie auch die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse eine PPD in den Hintergliedmaßen auf, mit der höchsten Frequenz an der rechten Seite (Hajihosseini et al., 2004). Auch die Arten der PPD entsprechen exakt der Beobachtungen in den *Fto*^{-/-}-Mäusen (siehe 3.3.1). Mittels einer Whole Mount *In situ* Hybridisierung (WISH) konnten Hajihosseini und seine Kollegen zeigen, dass in den Gliedmaßen von hypermorphen *Fgfr1*-Mäusen eine erhöhte Expression von *Hoxd13* und *Wnt5a* besteht. In den Hintergliedmaßen von *Fto*^{-/-}-Mäusen war mittels WISH ebenfalls eine ektopische Expression von *Hoxd13* zu beobachten (siehe Abb. 3.26). Außerdem konnte durch eine semi-quantitative PCR-Analyse eine gesteigerte Expression von *Wnt5a* in den

Gliedmaßenknospen der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.29). Neben der Missbildung in den Gliedmaßen war sowohl in den hypermorphen *Fgfr1*-Mäusen, als auch in einem Teil der *Fto*^{-/-}-Mäuse (siehe Tabelle 3.3 und Abb. 3.13) ein gespaltener Schwertfortsatz zu sehen. Diese beiden Mausmutanten sind sich somit sehr ähnlich. Das unterstützt die Hypothese, dass in den *Fto*^{-/-}-Mäusen ein ektopisches Shh-Signal vorliegt, dass wiederum zu einer erhöhten Induktion des Fgf-Signals führt.

Die Shh-vermittelte Induktion der Fgf-Signale in der AER läuft über die Aktivierung des Bmp-Antagonisten Gremlin. Gremlin inhibiert daraufhin die Bmp-Signale, wodurch die Induktion der Fgf-Signale erfolgt (siehe Abb. 1.4). Somit wäre aufgrund einer ektopischen Shh-Expression nicht nur eine gesteigerte Induktion der Fgf-Signale zu erwarten, sondern ebenfalls eine verstärkte Inhibierung der Bmp-Signale.

Auch in verschiedenen Mutanten, die Komponenten des Bmp-Signalwegs betreffen, gibt es Ähnlichkeiten zu dem Phänotyp der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse. So konnte in *Bmp4*^{tm1/+}-Mäusen, die heterozygot für eine Mutation im *Bmp4*-Gen sind, neben einer PPD in den Hintergliedmaßen auch eine neonatale Letalität beobachtet werden (Dunn et al., 1997). Mausmutanten, die homozygot für eine Mutation im *Bmp7*-Gen sind (*Bmp7*^{m1/Bmp7}^{m1}), sind versterben neonatal und weisen in den meisten Fällen eine PPD in den Hintergliedmaßen auf (Luo et al., 1995). Weitere Skelettanomalien waren u.a. im Brustkorb zu sehen. So zeigten *Bmp7*^{m1/Bmp7}^{m1}-Mäuse, ebenso wie einige der *Fto*^{-/-}-Mäuse, eine asymmetrische Anordnung der Rippen am Brustbein, die Fusion von Rippen und eine Fehlbildung des Schwertfortsatzes (siehe Abb. 3.13). Diese Beobachtungen stärken die Hypothese, dass durch den Verlust von *Fto* eine ektopische Shh-Expression induziert wird, welche wiederum zu einer verstärkten Inhibierung der Bmp-Signale führt.

Allerdings wurden in den *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen keine direkten molekularen Hinweise dafür gefunden, dass Störungen im Bmp-Signalweg vorliegen. Es konnten keine signifikanten Expressions-Veränderungen von *Bmp4* und den Bmp-Zielgenen *Msx1* und *Msx2* in den *Fto*^{-/-}-Tg104N-Embryonen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.27 und 3.28). Ein Grund dafür könnte das nicht konsequente Auftreten der verschiedenen Phänotypen in den *Fto*^{-/-}-Mäusen sein.

Von der hier aufgestellten Hypothese abweichend, zeigten auch Mäuse, die eine Überexpression des Bmp-Rezeptors *Bmpr-IB* aufweisen, einige Gemeinsamkeiten mit den *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen. *Bmpr-IB* ist ein endogener Rezeptor, der die Funktion der Bmp-

Proteine in der Musterbildung der Gliedmaßen, der Verknöcherung und der Apoptose vermittelt. Die Überexpression dieses Rezeptors führt in Mäusen u.a. zur Ausbildung einer PPD in den Hintergliedmaßen (Zhang et al., 2000). Ferner weisen sowohl die transgenen *caBmpr-IB*-Mäuse als auch die *Fto*^{-/-}-Mäuse Anomalien im Bereich des Brustkorbes auf, einschließlich eines gespaltenen Schwertfortsatzes und Brustbeins und einer asymmetrischen Anordnung der Rippen am Brustbein (siehe Abb. 3.13). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Mausmutanten ist die posteriore Transformation der am meisten anterior gelegenen Zehe. Der anteriore Zeh ist normalerweise durch den biphalangealen Aufbau charakterisiert. Dagegen bestehen die posterioren Zehen (zwei bis fünf) aus drei Phalangen. Der zusätzliche Zeh in den *Fto*^{-/-}- und transgenen *caBmpr-IB*-Mäusen mit PPD war in den meisten Fällen triphalangeal. Diese posteriore Transformation des anterioren zusätzlichen Zehs wurde höchst wahrscheinlich durch die ektopische Expression von *Hoxd13* verursacht, die im anterioren Bereich der Gliedmaßenknospe beider Mutanten zu beobachten war (siehe Abb. 3.26 und Zhang et al., 2000). Vorangegangenen Studien belegen, dass posteriore Transformationen der Zehen häufig dann auftreten, wenn Mitglieder der 5' *Hoxd*-Gene im anterioren Bereich der Gliedmaßenknospe ektopisch exprimiert werden (Morgan et al., 1992; Goff und Tabin, 1997; Knezevic et al., 1997). Ebenfalls ähnliche Defekte in den Rippen, dem Brustbein und den Gliedmaßen, wie in den *Fto*^{-/-}- und *caBmpr-IB*-transgenen-Mäusen, wurden auch in *Hoxd12*-transgenen-Mäusen beobachtet (Knezevic et al., 1997). Es ist bekannt, dass *Hoxd*-Gene in der Gliedmaßenentwicklung Zielgene des Bmp-Signalweges sind (Duprez et al., 1996; Laufer et al., 1994; Zhang et al., 2000). Daher wird vermutet, dass der Effekt von *caBmpr-IB* auf die Bildung der Rippen und des Brustbeins über die ektopische Expression von *Hoxd*-Genen vermittelt wird. Die *Hoxd*-Gene sind ebenfalls Zielgene des Shh-Signalweges (Knezevic et al., 1997). Daher ist es möglich, dass auch der Shh-vermittelte Effekt der *Fto*-Defizienz auf die diversen Missbildungen in den Gliedmaßen und dem Brustkorb, über die ektopische Expression von *Hoxd*-Genen vermittelt wird.

Neogenin ist ebenfalls eines der Proteine, denen eine negative Regulation des Shh-Signalwegs zugesprochen wird. Wie auch die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse, versterben 80% der *Neo*^{Gt/Gt}-Mäuse, die homozygot für eine Mutation in dem Neogenin codierenden *Neo1*-Gen sind, kurz nach der Geburt (Hong et al., 2012). Zusätzlich konnte eine PPD in der rechten Hintergliedmaße beobachtet werden. In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass sowohl *Neo*^{Gt/Gt}-MEFs, als auch *Fto*^{-/-}-MEFs (siehe Abb. 3.25), nach Stimulierung, eine erhöhte Induktion des Shh-

Signalweges aufweisen, im Vergleich zu den MEFs die aus ihren wildtypischen Geschwistern isoliert wurden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass *Fto*, wie Neogenin, auch ein negativer Regulator des Shh-Signalweges ist und der Verlust von *Fto* zur ektopischen Expression von Shh führt.

4.5 Neonatale Letalität aufgrund von Entwicklungsdefekten der Lunge

Störungen in der Entwicklung der Lunge äußern sich meist erst nach der Geburt. Im Embryo hat die Lunge noch keine Funktion, jedoch ist sie ab dem Zeitpunkt der Geburt für die Atmung verantwortlich und somit lebenswichtig für den Organismus. Daher kann die neonatale Letalität häufig mit Entwicklungsstörungen der Lunge in Verbindung gebracht werden. Weil über 70% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse neonatal versterben, wurden die Lungen dieser Mäuse analysiert (siehe 3.3.3). Es konnte ein deutlich verdichtetes Mesenchym mit Alveolen, die sowohl in ihrer Anzahl, als auch ihrer Größe reduziert waren, beobachtet werden (siehe Abb. 3.16 und 3.17). Außerdem war auffällig, dass die Lungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse an manchen Stellen direkt an den Brustkorb angrenzten, ohne den normalerweise dazwischenliegenden Pleuralspalt (siehe Abb. 3.15).

Die in den *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen beobachteten Lungendefekte verdichten die Hypothese, dass *Fto* als negativer Regulator des Shh-Signals agiert. Ab dem Tag 16.5 der Embryonalentwicklung (E16.5) konnte in transgenen Mäusen, in denen *Shh* im distalen Epithel der Lungen überexprimiert wurde, eine Verdichtung des mesenchymalen Lungengewebes beobachtet werden (Bellusci et al., 1997a). In den *Fto*^{-/-}-Mäusen wurde diese Beobachtung ebenfalls zum Zeitpunkt E16.5 und kurz nach der Geburt (P0) gemacht. Mit Hilfe von BrdU wurde in den Lungen von E16.5 und E17.5 transgenen *Shh*-Mäusen eine doppelte so hohe Proliferation gezeigt, als in den wildtypischen Geschwistern. Auch in den Tg104N-Mäusen wurde die Proliferation in den Lungen untersucht. Nach ersten Analysen bestand kein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen den Lungen der *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Mäuse. Allerdings wurde nur die BrdU-Färbung von E18.5 Lungen betrachtet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine stark erhöhte Proliferation auch bei den *Fto*^{-/-}-Mäusen in den

Stadien vor E18.5 auftritt, da kurz vor und nach der Geburt bereits eine offensichtlich stark erhöhte Zellzahl in den Lungen vorhanden ist. In den Lungen der transgenen *Shh*-Mäuse, konnten im Alter von E19.0 keine Veränderungen in der *Gli3* mRNA-Expression beobachtet werden (Grindley et al., 1997). Die Expression von Gli3 wurde in den *Fto*^{-/-}-Mäusen zwar nicht auf mRNA Ebene analysiert, jedoch wurde die Proteinmenge von Gli3-83 (Repressor) und Gli3-190 (Aktivator) gemessen. In beiden Fällen war eine Reduktion der Proteinmenge im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern zu beobachten. Allerdings war mit einem p-Wert von 0,0504 nur die Reduktion von Gli3-190 signifikant. Zudem wurden die Proteinlysate von Lungen im Alter von E12.5 verwendet und können deshalb nicht direkt mit den Ergebnissen der E19.0 Lungen der transgenen *Shh*-Mäuse verglichen werden. Letztendlich wiesen die transgenen *Shh*-Mäuse, genau wie die *Fto*^{-/-}-Mäuse, eine neonatale Letalität auf (Bellusci et al., 1997a). Es wird vermutet, dass die transgenen *Shh*-Mäuse aufgrund von Atemnot gestorben sind, die durch den Mangel an funktionsfähigen Alveolen ausgelöst wurde. Wie bereits erwähnt entsprachen auch die Alveolen der neugeborenen *Fto*^{-/-}-Mäuse nicht der Charakteristik der wildtypischen Alveolen. Daher besteht der Verdacht, dass die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse ebenfalls aufgrund nicht funktionsfähiger Alveolen kurz nach der Geburt unter Atemnot leiden und innerhalb weniger Stunden versterben. Somit entspricht der Lungen-Phänotyp der *Fto*^{-/-}-Mäuse sehr dem Lungenphänotyp der transgenen *Shh*-Mäuse, was die Hypothese der negativen Shh-Signalweg-Regulation durch Fto erneut verstärkt.

Wie zu Beginn dieses Abschnitts bereits erwähnt, war in den *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen zusätzlich zu sehen, dass die Lungen an einigen Stellen, ohne den normalerweise dazwischenliegenden Pleuralspalt, direkt auf den Brustkorb auftrafen (siehe Abb. 3.15). Der Grund dafür kann zum Einem eine vergrößerte Lunge (z.B. aufgrund gesteigerter Proliferation) und zum Anderen ein verkleinerter Brustkorb sein. In den *Fto*^{-/-}-Mäusen wurde jedoch weder die Größe der Lunge noch des Brustkorbes gemessen. Allerdings war die Länge des Brustbeins in den neonatal gestorbenen *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen, im Vergleich zu den neonatal *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Mäusen, höchst signifikant reduziert (siehe Abb. 3.14). Die Länge des Brustbeins konnte zwar nicht auf die Gesamtlänge der Maus bezogen werden, da ihr Skelett zu dem Zeitpunkt bereits in mehrere Teile zerlegt war, aber es besteht die Vermutung, dass der Brustkorb der *Fto*^{-/-}-Mäuse im Verhältnis zur Gesamtgröße reduziert ist. Die *Fto*^{-/-}-Mäuse waren bei der Geburt augenscheinlich nicht auffällig kleiner als ihre Geschwister und in vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine Größenretardation der *Fto*^{-/-}-Mäuse erst ab

dem zweiten Tag nach der Geburt eintritt (Fischer et al., 2009). Es sind Studien bekannt, in denen Patienten aufgrund eines verkleinerten Brustkorbes unter Ateminsuffizienz leiden (Bulman et al. 2000; Kornak und Mundlos, 2003).

4.6 Die Ursache für die erhöhte Aktivierung des Shh-Signalwegs

Bevor Shh in den verschiedenen Prozessen der Embryonalentwicklung agieren kann, ist u.a. eine Cholesterol-Modifikation zur Aktivierung des Shh-Proteins notwendig (siehe 1.2.1.1).

Es sind Studien bekannt, in denen gezeigt wird, dass diese Cholesterol-Modifikation für die Eingrenzung des Shh-Signals verantwortlich ist. So führt der Verlust dieser Modifikation zu einer ektopischen Signalweg-Aktivierung in der anterioren Gliedmaßenknospe und zur Ausbildung zusätzlicher Zehen (Porter et al., 1996; Burke et al., 1999; Li et al., 2006). Wie in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert, wird vermutet, dass die in den *Fto*^{-/-}-Mäusen beobachteten Defekte, wie die präaxiale Polydaktylie, Anomalien im Bereich des Brustkorbs und Entwicklungsstörungen der Lunge, ebenfalls durch eine gesteigerte Aktivierung des Shh-Signalweges ausgelöst wurden. Somit entstand der Verdacht, dass in den *Fto*^{-/-}-Mäusen eine Störung in der Cholesterol-Modifikation des Shh-Proteins vorliegt, möglicherweise verursacht durch eine reduzierte Menge an Cholesterol.

Außerdem ist bekannt, dass eine Akkumulation von Cholesterol in arteriosklerotischen Plaques vorzufinden ist (Yu et al., 2004). In *ApoE*^{-/-};*Fto*^{-/-}-Mutanten konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Fto* vor der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques schützt (unveröffentlichte Daten, Dr. S. Seehaus, EMT). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die *Fto*^{-/-}-Mäuse weniger Cholesterol besitzen.

Allerdings konnte in ersten Studien von sechs Wochen alten *Fto*^{-/-}-Mäusen weder ein reduzierter, noch ein erhöhter Cholesterolspiegel festgestellt werden (unveröffentlichte Daten, Dr. J. Fischer, EMT). Daher kann ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Störung der Cholesterol-Modifikation des Shh-Proteins durch einen Mangel an Cholesterol verursacht wird.

Eine weitere mögliche Ursache für Veränderungen im Shh-Signalweg in den *Fto*^{-/-}-Mäusen könnte sein, dass durch die Inaktivierung des *Fto*-Gens die Aktivität des benachbarter *Ftm*-Gens beeinflusst wird, welches ebenfalls eine Rolle im Shh-Signalweg spielt. *Fto* und *Ftm*

liegen auf dem murinen Chromosom in entgegengesetzter Richtung dicht nebeneinander. So liegen deren 5' Enden der kodierenden Bereiche nur 303 Bp auseinander und es kommt zu einer Überlappung der Promotorbereiche. *Ftm*^{-/-}-Embryonen ähneln Mutanten, in denen der Shh-Signalweg gestört ist, einschließlich des Auftretens von Polydaktylie, Leber- bzw. Lungendefekten und dem Verlust der Links-Rechts-Asymmetrie. Zudem ist der Shh-Signalweg in Vertebraten Zilien-abhängig und es konnte gezeigt werden, dass die Störungen der *Ftm*^{-/-}-Embryonen auf Ziliendefekten beruhen (Vierkotten et al., 2007). Kürzlich wurde durch Analysen von *Fto*^{+/-};*Ftm*^{+/-} kombiniert-heterozygoten Mäusen gezeigt, dass die Inaktivierung von *Fto* in einigen Organen adulter Mäuse in einer erhöhten *Ftm*-mRNA-Expression resultiert (Auchter, 2012). Dies könnte eine mögliche Ursache für die erhöhte Shh-Signalweg-Aktivierung in den *Fto*^{-/-}-Mäusen sein.

4.7 Die Letalität und Polydaktylie der *Fto*^{-/-}-Mäusen ist abhängig vom genetischen Hintergrund

Es ist bekannt, dass manche Mutationen auf verschiedenen genetischen Hintergründen zu unterschiedlichen Phänotypen führen (Wolfer et al., 2002; Jackson Laboratory). Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit ist sowohl die neonatale Letalität, als auch die Ausbildung der PPD in den Hintergliedmaßen der *Fto*^{-/-}-Mäuse abhängig von dem genetischen Hintergrund des jeweiligen Mausstammes.

Die Überlebens- bzw. Sterberate der *Fto*^{-/-}-Mäuse wurde auf zwei verschiedenen genetischen Hintergründen statistisch ausgewertet. In den *Fto*^{-/-}-Mäusen auf dem NMRI Hintergrund (Tg104N) war, verglichen mit ihren *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Geschwistern, mit 75% eine höchst signifikant erhöhte Sterberate zu beobachten (siehe Abb. 3.2). Dagegen war die Sterberate der *Fto*^{-/-}-Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund (Tg104) sogar niedriger als die der *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Geschwister (siehe Abb. 3.5). Bei der F1-Generation aus NMRI und C57BL/6 (Tg104BN) war die Sterberate der *Fto*^{-/-}-Mäuse mit 13%, im Vergleich zu der 1%-igen Sterblichkeit in den *Fto*^{+/+}-Mäusen und 4% in den *Fto*^{+/-}-Mäusen also leicht erhöht (siehe Abb. 3.6). Außerdem wurden die sogenannten Tg104N Tg115-Mäuse analysiert, die sich auf dem NMRI Hintergrund befinden und zum Teil (50%) ein *Fto*-Transgen (Tg115) tragen. Sowohl die *Fto*^{-/-}-Mäuse mit Tg115, als auch ohne Tg115 wiesen eine Sterberate von über

50% auf (siehe Abb. 3.8). Die statistische Auswertung ergab jedoch keine Signifikanz. Der Grund dafür ist vermutlich der relativ kleine Stichprobenumfang von insgesamt 119 Mäusen, verteilt auf die sechs verschiedenen Genotypen. In den anderen drei Mauslinien umfasste der Stichprobenumfang 178 bis 768 Mäuse, verteilt auf nur drei Genotypen. Wird der Stichprobenumfang der Tg104N Tg115-Mäuse bei gleichbleibender Genotypenverteilung theoretisch von 119 auf 500 Mäuse erhöht, ergeben die statistischen Auswertungen hoch signifikante ($p=0,0026$) Abweichungen in der Überlebensrate der verschiedenen Genotypen. Die neonatale Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse tritt demnach nur auf dem NMRI Hintergrund auf. Auch die, in den *Fto*^{-/-}-Mäusen beobachtete, PPD in den Hintergliedmaßen ist abhängig von dem genetischen Hintergrund der verschiedenen Mausstämmen. Eine PPD in den Hintergliedmaßen war bei 25% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse, einer einzigen von insgesamt 76 Tg104BN-Mäusen und in keiner der Tg104-Mäuse zu beobachten (siehe 3.3.1). 97,4% der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse mit PPD waren neonatal gestorben. Auch die Tg104N Tg115-Mäuse wiesen eine PPD in den Hintergliedmaßen auf. In dieser Mauslinie war auffällig, dass 31% der verstorbenen *Fto*^{-/-}-Mäuse mit und ohne Tg115 eine PPD zeigten, jedoch auch 55,5% der überlebenden *Fto*^{-/-}-Mäuse, ausschließlich mit Tg115. Es konnte keine überlebende *Fto*^{-/-}-Maus mit PPD ohne Transgen beobachtet werden. Diese Resultate belegen, dass der Verlust von *Fto* an der Ursache der neonatalen Letalität beteiligt ist. Ist bei einer neugeborenen Maus auf dem NMRI Hintergrund eine PPD zu sehen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese homozygot mutant für *Fto* ist und innerhalb der nächsten Stunden verstirbt nahe zu 100%. Besitzen die *Fto*^{-/-}-Mäuse mit PPD jedoch das *Fto*-Transgen, haben sie eine 50%-ige Überlebenschance.

Der C57BL/6 Mausstamm ist der in der Forschung meist verwendete Inzuchtstamm. Inzuchtstämme leiten sich aus Bruder-Schwester-Verpaarungen über mindestens 20 Generationen ab und sind abgesehen vom Geschlecht genetisch identisch (Festing und Wolff, 1995). Bei den NMRI Mäusen handelt es sich dagegen um einen Auszuchtstamm. Durch die Verpaarung mit nicht verwandten heterozygoten Partnern bleibt in diesen Tieren eine gewisse genetische Variabilität erhalten. Dadurch sind diese Mäuse robuster, aber auch variabler. Diese Variabilität innerhalb der NMRI-Mäuse könnte eine Erklärung für das nicht konsequente Auftreten der verschiedenen Phänotypen in den *Fto*^{-/-}-Mäusen sein.

4.8 Identifizierung von Fto-Interaktionspartnern

Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-System konnten im Rahmen dieser Arbeit 34 potentielle Interaktionspartner von Fto identifiziert werden (siehe 3.5.1). Da bekannt ist, dass mit dieser Methode häufig viele falsch positive Interaktionen identifiziert werden, war es zwingend notwendig die positiven Interaktionen, die aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System hervorgegangen sind, mittels mindestens einer weiteren unabhängigen Methode zu bestätigen (Phizicky und Fields, 1995; Xu et al., 2010). Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und die Methode der Tandem Affinitäts-Aufreinigung (TAP) gewählt. Diese beiden *in vitro* Methoden erlauben die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion unter nativen, *in vivo*-ähnlichen Bedingungen, d.h. in diesem Fall die Durchführung der Experimente in murinen Zellen. Es wurden acht der potentiellen Fto-Interaktionspartner ausgewählt (siehe 3.5.2), für die die Interaktion mit Fto mittels der Co-IP und/oder der TAP-Methode bestätigt werden sollte. Für Cc2d1a1, Dmap1, Gatad1, H3f3b und Lmo2 konnte die Interaktion mit Fto mittels Co-IP und TAP nicht bestätigt werden. Dagegen konnte die Interaktion von Dock6, Wnk2 und eIF5A mit Fto mit mindestens einer der beiden Methoden bestätigt werden (siehe folgende Abschnitte).

4.8.1 Dock6 als potentieller Interaktionspartner von Fto

Das Dock6 (*dedicator of cytokinesis 6*)-Protein, auch bekannt als Zir1, wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner von Fto identifiziert (siehe 3.5.1). Die Interaktion zwischen Fto und Dock6 konnte sowohl in der Co-IP als auch der TAP Methode bestätigt werden (siehe 3.5.2.1). Allerdings wurde, aufgrund des Nichtvorhandenseins eines spezifischen Antikörpers für Dock6, in beiden Fällen eine Überexpression eines Dock6-Myc Fusionsproteins erzeugt. Jedoch konnten auch in einer, bereits vor dieser Arbeit durchgeführten, Microarray-Analyse eine veränderte *Dock6* Expression im epigonadalen Fettgewebe von *Fto*^{-/-}-Mäusen, verglichen mit *Fto*^{+/+}-Mäusen, beobachtet werden (siehe 3.5.2).

Das kernständige, 236 kDa große Dock6-Protein ist eines von insgesamt elf Mitgliedern (Dock1-Dock11) der Dock-Familie, die als GTP-Austauschfaktoren (engl. *guanine nucleotide*

exchange factors, GEFs), sogenannten zytosolische kleine Guaninnukleotid-bindenden-Proteine (G-Proteine) aktivieren (Miyamoto et al., 2006). Die Dock-Proteine besitzen eine evolutionär hoch konservierte DHR-1 (*Dock Homology Region-1*)-Domäne, die in anderen Proteinen für die Bindung von Phospholipiden bekannt ist, und eine DHR-2 (Dock Homology Region-1)-Domäne, über welche die GEF-Aktivität vermittelt wird (Côté et al., 2005; Côté und Vuori, 2006). Basierend auf der Sequenzähnlichkeit der DHR-2 Domäne, ist die Familie der Dock-Proteine in vier Unterfamilien unterteilt (Dock-A bis Dock-D). Es wurde gezeigt, dass Proteine der Dock-A- und Dock-B-Unterfamilie spezifische GEFs für das G-Protein Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) sind (Fukui et al., 2001; Namekata et al., 2004; Chen et al., 2005). Dagegen wurde Dock9, ein Mitglied der Dock-D-Unterfamilie, als spezifischer GEF für das G-Protein Cdc42 (*cell division cycle 42*) identifiziert (Meller et al., 2002, 2005). Dock6 gehört zu der Dock-C-Unterfamilie und unterscheidet sich von den übrigen Dock-Proteinen darin, dass es sowohl ein GEF für Rac1, als auch für Cdc42 ist. Die Transfektion der DHR2-Domäne von Dock6 in N1E-115 Neuroblastoma-Zellen fördert das Rac1- und Cdc42-abhängige Auswachsen von Neuriten. Und umgekehrt führt eine, durch siRNA (*small interference RNA*) bedingte Herunterregulierung des endogenen Dock6 zu einer verringerten Aktivierung von Rac1 und Cdc42 und einem reduzierten Auswachsen von Neuriten (Miyamoto et al., 2006). Für die *Fto*^{-/-}-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Myelinisierung der Neuriten reduziert ist (mündliche Mitteilung, Nina Kardas, EMT). Jedoch wurde bisher noch nicht untersucht, ob Veränderungen im Auswachsen der Neuriten vorliegen. So kann aufgrund der bisherigen Kenntnisse über Dock6 und Fto keine direkte Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen hergestellt werden.

4.8.2 Wnk2 als potentieller Interaktionspartner von Fto

Auch Wnk2 (*WNK lysine deficient protein kinase 2*) wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner von Fto identifiziert. Wnk2 wird zwar nicht, wie Fto, im Zellkern exprimiert, aber die mRNA Expression von *Wnk2* war im zuvor durchgeführten Microarray, verglichen mit den Wildtypen um das 2,26-fache reduziert (siehe 3.5.2). Die Interaktion zwischen Fto und Wnk2 konnte, nach der Überexpression beider Proteine in NIH-

3T3 Zellen, sowohl mit der Co-IP, als auch mit der TAP-Methode bestätigt werden (siehe 3.5.2.2).

Das Wnk2-Protein ist ein Mitglied der WNK (*with-no-lysine (K)*)-Unterfamilie der Proteinkinasen (Verissimo und Jordan, 2001; Manning et al., 2002) und wird überwiegend im Gehirn, im Herzmuskel, im Dünn- und Dickdarm exprimiert. Es konnte wiederholt bewiesen werden, dass *Wnk2* als spezifisches Tumorsuppressorgen agiert. In humanen Gehirntumoren konnte ein epigenetisches Gen-*Silencing* durch Promotor-Methylierung von *WNK2* gezeigt werden (Hong et al., 2007; Jun et al., 2009). Es wird vermutet, dass WNK2 durch die negative Regulation der MEK1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) 1/2 Aktivierung die Proliferation inhibiert (Moniz et al., 2007). Durch Funktionsstudien in Epithelzelllinien konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass eine Reduktion der *WNK2*-Expression zu einer gesteigerten GTP-Beladung des Rac1-Protein und einer gleichzeitigen Stimulierung der Rac1-Effektorkinase PAK1 (*p21-activated kinase*) führt. Die aktivierte PAK1 phosphoryliert daraufhin MEK1, wodurch es zu einer Effizienzsteigerung kommt, mit der MEK1 nach der Stimulierung durch Wachstumsfaktoren die ERK1/2 aktiviert (Moniz et al., 2008). Basierend auf den Kenntnissen über *Fto* und *Wnk2* ist eine Interaktion dieser beiden Proteine auch auf theoretischer Ebene vorstellbar. So ist die mesenchymale Proliferation abhängig von Erk1/2 (Dalvin et al., 2004) und in den Lungen von *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäusen konnte deutlich verdichtetes mesenchymales Gewebe gezeigt werden (siehe 3.3.3). Laut der Microarray-Analyse (siehe Tabelle 3.6) führt der Verlust von *Fto* ebenfalls zu einer deutlich geminderten *Wnk2*-Expression, was die Ursache für eine erhöhte Erk1/2-vermittelte Proliferation sein könnte.

4.8.3 eIF5A als potentieller Interaktionspartner von Fto

Das eIF5A (*eukaryotic translation initiation factor 5A*)-Protein ist der dritte Kandidat, der im Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner von *Fto* identifiziert wurde. Die Interaktion von eIF5A mit *Fto* konnte in der Co-IP endogen bestätigt werden. Durch die Präzipitation des endogenen *Fto* mittels eines spezifischen *Fto*-Antikörpers wurde endogenes eIF5A co-präzipitiert, und umgekehrt (siehe Abb. 3.35).

Das eIF5A ist ein kleines (ca. 17kDa), in den Eukaryoten hoch konserviert Protein das sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma von nahezu allen Geweben exprimiert wird (Ruhl et al., 1993; Shi et al., 1996). Zum ersten Mal beschrieben wurde es 1978 als Ribosomen-assoziiierter Translations-Initiationsfaktor, der aus Retikulozyten von Kaninchen aufgereinigt wurde (Benne und Hershey, 1978). Seitdem konnte eIF5A, neben der Translations-Initiation (Zanelli et al., 2006; Dias et al., 2008), mit vielen weiteren zellulären Funktionen in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen u.a. die Zellzyklus-Progression (Jansson et al., 2000; Chatterjee et al., 2006), das Zellüberleben (Chattopadhyay et al., 2008; Hopkins et al., 2008), die retrovirale Infektion (Steinkasserer et al., 1995) und die Translations-Elongation (Gregio et al., 2009; Saini et al., 2009). eIF5A ist das einzige bekannte Protein, das die seltene Aminosäure Hypusin besitzt, die für die Aktivität des eIF5A essentiell ist. Die Synthese des Hypusins erfolgt in zwei posttranslationalen Modifikationsschritten, die über die Deoxyhypusin Synthase (DHS) und die Deoxyhypusin Hydroxylase (DOHH) katalysiert werden (Park, 2006; Park et al., 2010). Die Behandlung von Säugetierzellen mit DHS- oder DOHH-Inhibitoren führt zu starken antiproliferativen Effekten und lässt darauf schließen, dass eIF5A in den Prozess der Proliferation involviert ist (Park et al., 1994; Hanauske-Abel et al., 1994; Clement et al., 2002; Nishimura et al., 2005).

Einige weitere Studien belegen, dass eIF5A ein nukleozytoplasmatisches Transportprotein ist und mit den Kernexport-Rezeptoren exportin1/CRM1 und exportin4 interagiert (Elfgang et al., 1999; Rosorius et al., 1999; Lipowsky et al., 2000). Unter anderem wurde gezeigt, dass eIF5A für den HIV-Rev Protein-vermittelten viralen RNA-Export und für den CD83 mRNA-Export in dendritischen Zellen notwendig ist (Bevec et al., 1996; Kruse et al., 2000; Hofman et al., 2001). Proteine, die aus dem Zellkern hinaus transportiert werden, enthalten eine Zellkernexportsequenz (NES, engl. *nuclear export sequence*). Es gibt Hinweise darauf, dass Fto eine solche NES besitzt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fto nicht ausschließlich im Zellkern exprimiert wird, sondern auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Emmerling, 2007). Aufgrund dieser Kenntnisse und der in dieser Arbeit identifizierten Interaktion von Fto und eIF5A besteht die Möglichkeit, dass ein nukleozytoplasmatischer Transport von Fto existiert, an dem eIF5A beteiligt ist.

2010 konnten Maier und seine Kollegen zeigen, dass durch Hypusin-Modifikation aktiviertes eIF5A, über die direkte posttranskriptionelle Regulation der iNOS kodierenden mRNA, die Cytokin-vermittelte β -Zellen-Fehlfunktion aktiviert. Die Abgabe von proinflammatorischen

Cytokinen löst bei Typ 1 und Typ 2 Diabetes die Signalwege aus, welche die β -Zellen-Fehlfunktion initiieren und zum Tod des Organismus führen können. In Genomweiten Assoziationsstudien konnte über den Effekt des BMI (Body Mass Index) ein Zusammenhang zwischen der Veranlagung zu Typ 2 Diabetes und Polymorphismen im *FTO*-Gen identifiziert werden (Frayling et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Reduktion von eIF5A oder die Inhibition der Hypusinierung in Diabetes-Mausmodellen vor der Entstehung einer Glukoseintoleranz schützt (Maier et al., 2010). Auch in *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass sie eine leicht verbesserte Insulinsensitivität und damit eine verbesserte Glukosetoleranz aufweisen (Fischer et al., 2009). Diese Tatsachen bekräftigen die in dieser Arbeit identifizierten Protein-Protein-Interaktion zwischen *Fto* und eIF5A.

4.9 *Fto* hat eine Funktion in der Proliferation

Bisher ist nicht viel über die direkte Funktion von *Fto* bekannt. Jedoch konnte in neuesten Studien gezeigt werden, dass das FTO-Protein eine N⁶-Methyladenosin (m⁶A) RNA Demethylase ist (Jia et al., 2008, 2011). Allerdings ist keine direkte Verbindung zwischen dieser RNA-Demethylase-Aktivität von *Fto* und den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zu erkennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass *Fto* eine Funktion in der Proliferation besitzt. So weisen die *Fto*^{-/-}-Mäuse sowohl eine erhöhte mesenchymale Proliferation in den Lungen (siehe 3.3.3), als auch einen zusätzlichen Zeh an den Hintergliedmaßen (siehe 3.3.1) auf. Außerdem spielen alle drei, in dieser Arbeit identifizierten, potentiellen *Fto*-Interaktionspartner (*Dock6*, eIF5A und *Wnk2*) eine Rolle in der Proliferation bzw. dem Zellzyklus. Zudem konnten in einem zuvor durchgeführten Microarray, im Muskel und im Hypothalamus von *Fto*^{-/-}-Mäusen, eine Anreicherung von veränderten mRNA-Expressionen beobachtet werden, welche in die Kategorie Zellzyklus bzw. mitotischer Zellzyklus fallen (unveröffentlichte Daten, Dr. J. Fischer, EMT). Auch Zhang und seine Kollegen konnten in jüngsten Studien eine Verbindung zwischen FTO und der Proliferation beobachten (Zhang et al., 2012). Sie zeigten, dass eine durch Östrogen induzierte gesteigerte *FTO*-Expression über die Aktivierung der PI3K/AKT- und MAPK-Signalwege zu einer verstärkten Proliferation

beiträgt. Auch in vorangegangenen Studien wurde bereits beobachtet, dass der Verlust von FTO zu einer geminderten Proliferation und einer beschleunigten Seneszenz in Hautzellen führt (Boissel et al., 2009).

4.10 Ausblick

Die meisten Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse eine ektopische Shh-Expression aufweisen. Jedoch wurden ausschließlich Komponenten des Shh Signalweges analysiert. Zur Bestätigung der hier aufgestellten Hypothese ist es erforderlich, die Shh-Expression in den Tg104N-Mäusen auf mRNA- und Protein-Ebene zu untersuchen. Zudem besteht der Verdacht, dass die gesteigerte Aktivierung des Shh-Signalweges in den *Fto*^{-/-}-Mäusen durch quantitative Veränderungen in der Cholesterol-Modifikation des Shh verursacht wird. In weiterführenden Analysen soll geklärt werden, ob die Cholesterol-Modifikation während der Embryonalentwicklung beeinflusst ist.

Da eine PPD ausschließlich in den Hintergliedmaßen von *Fto*^{-/-}-Mäusen auftritt, wäre es interessant die Expression von Gli3-83 und Gli3-190 getrennt von einander in der anterioren und posterioren Hintergliedmaßenknospe zu analysieren. Falls eine ektopische Shh-Expressionsdomäne in der anterioren Gliedmaßenknospe existiert, sollte in diesem Bereich ebenfalls eine reduzierte Prozessierung des Gli3-Proteins in die Gli3-83-Isoform vorliegen.

Die neonatale Letalität der *Fto*^{-/-}-Mäuse ist höchst wahrscheinlich bedingt durch Entwicklungsdefekte der Lunge. Um den Zeitpunkt der Geburt ist eine augenscheinliche Zunahme des mesenchymalen Lungengewebes zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch keine proliferativen Unterschiede zu beobachten. Da eine gesteigerte Proliferation bereits in frühen Entwicklungsstadien vermutet wird, ist es notwendig diese zusätzlich zu analysieren. Da für *Fto* eine Funktion in der Proliferation vermutet wird, ist es von großem Interesse, die Proliferation auch in anderen Geweben bzw. Organen der *Fto*^{-/-}-Mäuse zu analysieren. Außerdem soll die Größe der Lungen untersucht werden. Da beobachtet werden konnte, dass die Lungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse direkt auf den Brustkorb auftreffen, besteht die Möglichkeit, dass die Lungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse vergrößert sind. Die andere Möglichkeit ist ein verkleinerter Brustkorb. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits ein höchst signifikant verkürztes Brustbein nachgewiesen werden, jedoch nicht in Relation zur Gesamtkörpergröße, da das Skelett bereits in mehrere Teile zerlegt war.

Generell belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die neonatale Sterblichkeit und die PPD der *Fto*^{-/-}-Mäuse von dem genetischen Hintergrund abhängig sind. Die Anomalien im Bereich des Brustkorbes und die Lungendefekte wurde jedoch nur in Mäusen auf dem NMRI

Hintergrund analysiert. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob alle in dieser Arbeit beobachteten *Fto*^{-/-}-Phänotypen ausschließlich auf dem NMRI Hintergrund auftreten, müssen auch die Brustkörbe und Lungen der Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund untersucht werden.

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden u.a. Dock6 und Wnk2 als potentielle Interaktionspartner von Fto indentifiziert und in Überexpressionsstudien bestätigt. Um die Echtheit dieser Interaktionen zu bestätigen, wäre ein weiteres Ziel die Bestätigung dieser Interaktionen auf endogener Ebene. Die Interaktion zwischen Fto und eIF5A konnte in dieser Arbeit bereits auf endogener Ebene bestätigt werden. Weiterführend wäre hier interessant zu untersuchen, ob und in wie weit die Expression von eIF5A in den *Fto*^{-/-}-Mäusen verändert ist.

5. Zusammenfassung

Der Verdacht, dass die *Fto*^{-/-} (*fat mass and obesity associated*)-Mäuse auf dem NMRI Hintergrund (Tg104N) zum Zeitpunkt des Absetzens im Vergleich zu den *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{+/-}-Geschwistern unterrepräsentiert sind, konnte mit Hilfe von statistische Analysen bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass über 70% der *Fto*^{-/-}-Mäuse neonatal verstarben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese neonatale Sterblichkeit der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse durch Entwicklungsstörungen der Lunge ausgelöst wird. In den Lungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse war unter anderem eine deutliche Zunahme an mesenchyalem Gewebe und eine Reduktion in Anzahl und Volumen der Alveolen zu beobachten.

Neben den Lungendefekten konnten verschiedene Missbildungen im Skelett der *Fto*^{-/-}-Tg104N-Mäuse gezeigt werden. Dazu zählen eine präaxiale Polydaktylie (PPD) in den Hintergliedmaßen und Fehlbildungen im Bereich der Rippen, des Brustbeins und des Schwertfortsatzes. Die Ausbildung einer PPD deutet darauf hin, dass *Fto* in die Spezifizierung der antero-posterioren Gliedmaßenentwicklung involviert ist. Eine PPD ist in der Regel begleitet durch eine ektopische Sonic hedgehog (*Shh*)-Expressionsdomäne in der anterioren Gliedmaßenknospe. Auch die Missbildungen im Bereich des Brustkorbes und die durchgeführten molekularen Analysen unterstützen die Hypothese, dass in den *Fto*^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Aktivierung des *Shh*-Signalweges vorliegt.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, ist sowohl die neonatale Letalität, als auch die Ausbildung der PPD der *Fto*^{-/-}-Mäuse abhängig von dem genetischen Hintergrund des jeweiligen Mausstammes. Diese beiden Phänotypen konnten ausschließlich auf dem reinen NMRI Hintergrund oder in der F1-Generation von NMRI und C57BL/6 beobachtet werden.

Abschließend konnten mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems 34 potentielle Interaktionspartner von *Fto* identifiziert werden. Die Interaktion von *Dock6* (*Dedicator of cytokinesis 6*), *Wnk2* (*WNK lysine deficient protein kinase 2*) und *eIF5A* (*Eukaryotic translation initiation factor 5A*) mit *Fto* konnte in anschließenden unabhängigen Analysen bestätigt werden. Die beobachteten Phänotypen, die identifizierten potentiellen *Fto*-Interaktionspartner und zuvor unabhängig durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass *Fto* eine Funktion in der Proliferation besitzt.

Abstract

The suspicion that the *Fto*^{-/-} (fat mass and obesity associated) mice are underrepresented in the NMRI background (Tg104N) at weaning compared to their *Fto*^{+/+} and *Fto*^{+/-} littermates was confirmed by means of statistical analysis. It has been shown that about 70% of the *Fto*^{-/-} mice are died neonatally. It is very likely that this neonatal lethality of *Fto*^{-/-} Tg104N mice is caused by developmental abnormalities of the lung. In the lungs, amongst other things the *Fto*^{-/-} mice showed a distinct increase in mesenchymal tissue and a reduction in the number and volume of the alveoli.

In addition to these lung defects also various deformations in the skeleton of the *Fto*^{-/-} Tg104N mice were shown. These include preaxial polydactyly (PPD) in the hind limbs and malformations of ribs, the sternum and the xiphoid process. The formation of a PPD suggests that *Fto* is involved in the specification of the anteroposterior limb development. A PPD is usually accompanied by an ectopic Sonic hedgehog (Shh) expression domain in the anterior limb bud. The abnormalities in the chest and accomplished molecular analyzes support the hypothesis that an elevated Shh signaling pathway activation exists in the *Fto*^{-/-} mice.

Based on the results of this study, both the neonatal lethality, as well as the appearance of the PPD of *Fto*^{-/-} mice depends on the genetic background of the mouse strain. These two phenotypes were observed only in the pure NMRI background or the F1 generation of NMRI and C57BL/6.

Finally, using a yeast two hybrid screen 34 potential interaction partners of *Fto* were identified. The interactions of Dock6 (Dedicator of cytokinesis 6), Wnk2 (WNK lysine deficient protein kinase 2) and eIF5A (Eukaryotic translation initiation factor 5A) with the *Fto* protein were confirmed in subsequent independent analysis.

The observed phenotypes, the identified potential *Fto* interaction partners and previous independently studies suggest that *Fto* has a function in proliferation.

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Ω	Ohm
3-AT	3-Aminotriazol
A	Adenin
A/P	antero-posterior
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AER	apikale Ektodermalleiste
Ade	Adenin
AH109	Hefestamm AH109
Amp	Ampicillin
BMFZ	Biologisch Medizinisches Forschungszentrum
Bmp	<i>Bone morphogenic protein</i>
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
χ^2	Chi-Quadrat
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl_2	Caliumchlorid
cDNA	complementary DNA
ci	cubitus interruptus
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Desoxyguanosintriphosphat
dGTP	Diethylpyrocarbonat
dH_2O	demineralisiertes Wasser
d.h.	das heißt
dH_2O	deionisiertes Wasser

dhh	desert hedgehog
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
et al.	et alteri, und andere
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
Fgf	<i>Fibroblast growth factor</i>
Fto	Fat mass and obesity associated
G	Guanin
Gli	Glioma-associated oncogene homolog
Gli1	Gli-Krüppel family member 1
Gli2	Gli-Krüppel family member 2
Gli3	Gli-Krüppel family member 3
Gli3-A	Gli3-Aktivator-Isoform
Gli3-FL	Gli3-Vollängen-Isoform
Gli3-R	Gli3-Repressorisoform
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun/Eosin
Hh	Hedgehog
HHU	Heinrich-Heine-Universität
His	Histidin
Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
Ihh	Indian hedgehog
inkl.	inklusive
<i>Irx</i>	<i>Iroquois</i> -Gen in Vertebraten
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
Leu	Leucin
LiCl	Lithiumchlorid
Lsg.	Lösung
μ F	Mikro-Farad
μ l	Mikroliter

M	Molar
max.	maximal
MEFs	embryonale Mausfibroblasten
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II) Chlorid
mRNA	messenger-RNA
n	Stichprobenumfang
Na ₂ B ₄ O ₇	Natriumborat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NIH-3T3	Fibroblastenzelllinie der Maus
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	postnatal
p	p-Wert
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPD	präaxiale Polydaktylie
Ptch1	Patched 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s.	siehe
SAG	Smoothened-Agonist
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
Shh	Sonic hedgehog

Smo	Smoothened
SSC	Salin-Natriumcitrat
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAP	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung
Tg115	<i>Fto</i> -Transgen
Tgf	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
Trp	Tryptophan
U	Unit
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultra violett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
Wnt	<i>wingless-related protein</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-b-D-Galaktosid
Y187	Hefestamm Y187
z.B.	zum Beispiel
ZPA	Zone polarisierender Aktivität

6.2 Literaturverzeichnis

Quellen aus dem Internet:

- 1) <http://flexikon.doccheck.com/de/Lungenentwicklung>
- 2) <http://www.docs4you.at/Content.Node/Spezialbereiche/Infektiologie/RSV/Lungenentwicklung-Poster.php>
- 3) <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/lungenreifefoerderung/>
- 4) Jackson Laboratory: <http://jaxmice.jax.org/genetichealth/background.html>
- 5) www.netzwerk-lunge.org/tags/pleuralspalt
- 6) <http://www.ous-research.no/ebsmeland/?k=ebsmeland%252FMain+Research+projects&aid=5480>

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

Anderson, G.J. und Darshan, D. (2008) Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat. Chem. Biol.* 4:15-16

Andreasen, C.H., Stender-Petersen, K.L., Mogensen, M.S., Torekov, S.S., Wegner, L., Andersen, G. et al. (2008) Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57:264–268

Angers, S. und Moon, R.T. (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:468–477

Auchter, J. (2012) Phänotypische und molekularbiologische Analysen von *Fto*^{+/-}; *Ftm*^{+/-} kombiniert-heterozygoten Mäusen. *Masterarbeit, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., Kornberg, T.B., (1997) Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043–1053

Aza-Blanc, P., Kornberg, T.B. (1999) Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet.* 15:458–462

- Bai, C.B., Auerbach, W., Lee, J.S., Stephen, D., Joyner, A.L.** (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 129:4753–4761
- Bai, C.B., Stephen, D., Joyner, A.L.** (2004) All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev. Cell* 6:103–115
- Bellusci, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., Hogan, B.L.** (1996) Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* 122:1693–1702
- Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M.G., Henderson, R., Winnier, G., Hogan, B.L.** (1997a) Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124:53-63
- Bellusci, S., Grindley, J., Emoto, H., Itoh, N., Hogan, B.L.** (1997b) Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124(23):4867–78
- Benne, R. und Hershey, J.W.** (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253(9):3078–3087
- Beppu, H., Minowa, O., Miyazono, K. and Kawabata, M.** (1997) cDNA cloning and genomic organization of the mouse BMP type II receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:499-504
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wöhl, T., Himmelspach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettnitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F. and Hauber, J.** (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* 271:1858-1860
- Biesecker, L.G.** (2011) Polydactyly: How Many Disorders and How Many Genes? 2010 Update. *Dev. Dynamics* 240:931-942
- Bitgood, M.J. und McMahon, A.P.** (1995) *Hedgehog* und *BMP* genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172:126-158
- Bitgood, M.J., Shen, L., McMahon, A.P.** (1996) Sertoli cell signaling by desert hedgehog regulates the male germline. *Curr.Biol.* 6:298-304
- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., et al.** (2009) Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding *FTO* gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 85(1):106-11
- Bowers, R.R., Kim, J.W., Otto, T.C., Lane, M.D.** (2006) Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:13022-13027

- Bowers**, R.R. und Lane, M.D. (2007) A role for bone morphogenic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle* 6:385-389
- Bulman**, M.P., Kusumi, K., Frayling, T.M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E.S., Krumlauf, R., Hattersley, A.T., Ellard, S., Turnpenny, P.D. (2000) Mutations in the human *Delta* homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* 24:438-441
- Bumcrot**, D.A., Takada, R., McMahon, A.P. (1995) Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol.* 15(4):2294-303
- Burke**, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K. (1999) Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99:803-815
- Buscher**, D., Rüther, U. (1998) Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev. Dynamics* 211:88-96
- Capecchi**, M.R. (1989a). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292
- Capecchi**, M.R. (1989b). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5:70-76
- Cardoso**, W.V. (2000) Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas. *Dev. Dynamics* 219(2):121-30
- Cardoso**, W.V. und Lü, J. (2006) Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 133(9):1611-24
- Casanova**, J., Sánchez-Herrero, E., Busturia, A., Morata, G. (1987) Double and triple mutant combination of the bithorax complex of *Drosophila*. *EMBO J.* 6:3103-3109
- Caspary**, T., Garcia-Garcia, M.J., Huangfu, D., Eggenschwiler, J.T., Wyler, M.R., Rakeman, A.S., Alcorn, H.L., Anderson, K.V. (2002) Mouse Dispatched homolog1 is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Curr. Biol.* 12:1628-1632
- Chamoun**, Z., Mann, R.K., Nellen, D., von Kessler, D.P., Bellotto, M., Beachy, P.A., Basler, K. (2001) Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 293(5537):2080-4
- Chatterjee**, I., Gross, S.R., Kinzy, T.G., Chen, K.Y. (2006) Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol Genet Genomics* 275(3):264-276
- Chattopadhyay**, M.K., Park, M.H., Tabor, H. (2008) Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105(18):6554-6559

- Chen, M.H., Li, Y.J., Kawakami, T., Xu, S.M., Chuang, P.T.** (2004) Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* 18(6):641-59.
- Chen, Q., Chen, T.J., Letourneau, P.C., Costa, L.F., Schubert, D.** (2005) Modifier of cell adhesion regulates N-cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurite outgrowth. *J Neurosci.* 25(2):281-90
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A.** (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M.P., Simandl, B.K., Li, Y., Beachy, B.A., Fallon, J.F.** (2001) Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev. Biol.* 236:421-435
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S.** (1991) The Two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582
- Christ, B. and Ordahl, C.** (1995) Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.* 191:381-396
- Clement, P.M., Hanauske-Abel, H.M., Wolff, E.C., Kleinman, H.K., Park, M.H.** (2002) The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 100:491-498
- Cohn, M.J., Izpisua-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K., Tickle, C.** (1995) Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80:739-746
- Cohn, M. J. und Tickle, C.** (1996) Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet.* 12:253-257
- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A.** (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280:1603-1607
- Côté, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., Vuori, K.** (2005) A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signaling. *Nat. Cell Biol.* 7(8):797-807
- Côté, J.F. und Vuori, K.** (2006) In vitro guanine nucleotide exchange activity of DHR-2/DOCKER/CZH2 domains. *Meth. Enzymol.* 406:41-57
- Croce, J.C. und McClay, D.R.** (2008) Evolution of the Wnt pathways. *Methods Mol. Biol.* 469:3-18

- Crossley, P. H.** und **Martin, G. R.** (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439–451
- Crossley, P. H.**, **Minowada, G.**, **MacArthur, C. A.**, and **Martin, G. R.** (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation and maintenance of chick limb development. *Cell* 84:127–136
- Dalvin, S.**, **Komatsuzaki, K.**, **Anselmo, M.A.**, **Kling, D.E.**, **Schnitzer, J.J.**, **Kinane, T.B.** (2004) Retinoic acid decreases fetal lung mesenchymal cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. *Dev Growth Differ* 46:275–282
- Davis, A. P.**, **Witte, D. P.**, **Hsieh-Li, H. M.**, **Potter, S. S.** and **Capecchi, M. R.** (1995) Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375:791-795
- Davis, A. P.** und **Capecchi, M. R.** (1996) A mutational analysis of the 5' *HoxD* genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development* 122:1175-1185
- Derynck, R.**, **Akhurst, R.J.**, **Balmain, A.** (2001) TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29:117-29
- Dias, C.A.**, **Cano, V.S.**, **Rangel, S.M.**, **Apponi, L.H.**, **Frigieri, M.C.**, et al. (2008) Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *FEBS journal* 275(8):1874–1888
- Dina, C.**, **Meyre, D.**, **Gallina, S.**, **Durand, E.**, **Korner, A.** (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724–726
- Dolle, P.**, **Dierich, A.**, **LeMeur, M.**, **Schimmang, T.**, **Schuhbauer, B.**, **Chambon, P.** and **Duboule, D.** (1993) Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75:431-441
- Dunn, N.R.**, **Winnier, G.E.**, **Hargett, L.K.**, **Schrick, J.J.**, **Fogo, A.B.**, **Hogan, B.L.** (1997) Haploinsufficient phenotypes in *Bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *Gli3* and *Alx4*. *Dev. Biol.* 188(2):235-47.
- Duprez, D. M.**, **Kostakopoulou, K.**, **Francis-West, P. H.**, and **Tickle, C.** (1996) Activation of *Fgf-4* and *HoxD* gene expression by *Bmp-2* expressing cells in the developing limb. *Development* 122:1821–1828
- Eblaghie, M. C.**, **Reedy, M.**, **Oliver, T.**, **Mishina, Y.** and **Hogan, B. L.** (2006) Evidence that autocrine signaling through *Bmpr1a* regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells. *Dev. Biol.* 291:67-82
- Elfgang, C.**, **Rosorius, O.**, **Hofer, L.**, **Jaksche, H.**, **Hauber, J.**, **Bevec, D.** (1999) Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96(11):6229-6234

- Emmerling, C.** (2007) Untersuchungen zur Funktion von Fto in der Mausentwicklung. *Diplomarbeit, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- Erlebacher, A.,** Filvaroff, E., Gitelman, S. and Derynck, R. (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378
- Eswarakumar, V. P.,** Monsonego-Ornan, E., Pines, M., Antonopoulou, I., Morriss-Kay, G. M., Lonai, P. (2002) The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* 129:3783-3793
- Fan, C.M. und** Tessier-Lavigne, M. (1994) Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for Sklerotom induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79:1175-1186
- Favier, B.,** Le Meur, M., Chambon, P. and Dolle, P. (1995) Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in *Hoxd-11* mutant mice. *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 92:310-314
- Favier, B.,** Rijli, F. M., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P. and Dolle, P. (1996) Functional cooperation between the non-paralogous genes *Hoxa-10* and *Hoxd-11* in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* 122:449-460
- Ferguson, E.L. und** Anderson, K.V. (1992) Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 71:45 1-461
- Festing, M.F. und** Wolff, G.L. (1995) Inbred strains of laboratory animals: superior to outbred mice? *J Natl Cancer Inst.* 87(22):1715-6
- Fischer, J.,** Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J.C., Rütter, U. (2009) Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458(7240):894-898
- Fields, S. und** Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-246
- Francis, P. H.,** Richardson, M. K., Brickell, P. M., Tickle, C. (1994) Bone morphogenetic proteins and a signaling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* 120:209-218
- Frayling, T.M.,** Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M. et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889-894
- Fredriksson, R.,** Hagglund, M., Olszewski, P.K., Stephansson, O., Jacobsson, J.A., Olszewska, A.M., Levine, A.S., Lindblom, J., Schiöth, H.B. (2008) The obesity gene, FTO, is of ancient origin, upregulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149(5):2062-2071

- Frischer**, L.E., Hagen, F.S., Garber, R.L. (1986) An inversion that disrupts the *Antennapedia* gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* 47:1017-1023
- Fromental-Ramain**, C., Warot, X., Messadecq, N., Lemeur, M., Dolle, P. and Chambon, P. (1996) *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* 122:2997-3011
- Fukui**, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., Sasazuki, T. (2001) Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412(6849):826-31
- Gerken**, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V. et al. (2007) The Obesity-Associated *FTO* Gene Encodes a 2-Oxoglutarate Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* 318:1469-1472
- 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
- Goetz**, S.C., Ocbina, P.J.R., Anderson, K.V. (2009) Chapter 10 – The Primary Cilium as a Hedgehog Signal Transduction Machine. *Methods in Cell Biology* 94:199–222
- Goff**, D. J. und Tabin, C. J. (1997) Analysis of *Hoxd-13* and *Hoxd-11* misexpression in chick limb buds reveals that Hox genes affect both bone condensation and growth. *Development* 124:627-636
- Gofflot**, F., Gaoua, W., Bourguignon, L., Roux, C., Picard, J.J. (2001) Expression of Sonic Hedgehog downstream genes is modified in rat embryos exposed in utero to a distal inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Dev. Dynamics* 220:99-111
- Gofflot**, F., Hars, C., Illien, F., Chevy, F., Wolf, C., Picard, J.J., Roux, C. (2003) Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 12:1187-1198
- Greenwald**, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., Choe, S. (2003) The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* 11(3):605-17
- Gregio**, A.P., Cano, V.P., Avaca, J.S., Valentini, S.R., Zanelli, C.F. (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380(4):785–790
- Grindley**, J.C., Bellusci, S., Perkins, D., Hogan, B.L., (1997) Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev. Biol.* 188:337– 348
- Hajhosseini**, M.K., Lalioti, M.D., Arthaud, S., Burgar, H.R., Brown, J.M., Twigg, S.R.F., Wilkie, A.O.M., Heath, J.K. (2004) Skeletal development is regulated by fibroblast growth factor receptor 1 signalling dynamics. *Development* 131:325-335

- Hanauske-Abel**, H.M., Park, M.H., Hanauske, A.R., Popowicz, A.M., Lalande, M., Folk, J.E. (1994) Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta* 1221:115–124
- Harfe**, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., Tabin, C.J. (2004) Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118:517-528
- Haycraft**, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., Yoder, B.K. (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1:e53
- Heldin**, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997) TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-71
- Hill**, R.E. (2007) How to make a zone of polarizing activity: insights into limb development via the abnormality preaxial polydactyly. *Dev Growth Differ* 49:439-448
- Hinchliffe**, J. R. und Johnson, D. R. (1982) The Development of the Vertebrate Limb: An Approach through Experiment, Genetics and Evolution. *J Anat.* 134(1):188–189
- Hofmann**, W., Reichart, B., Ewald, A., Müller, E., Schmitt, I., Stauber, R.H., Lottspeich, F., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J., Dabauvalle, M.C. (2001) Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol.* 152(5):895 -910
- Hogan**, B.L. (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10:1580–1594
- Hogan**, B.L. (1999) Morphogenesis. *Cell* 96:225–233
- Hong**, C., Moorefield, K.S., Jun, P., Aldape, K.D., Kharbanda, S., Phillips, H.S., Costello, J.F. (2007) Epigenome scans and cancer genome sequencing converge on WNK2, a kinase-independent suppressor of cell growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104:10974–10979
- Hong**, M., Schachter, K.A., Jiang, G., Krauss, R.S. (2012) Neogenin regulates Sonic Hedgehog pathway activity during digit patterning. *Dev. Dynamics* 241:627-637
- Hooper**, J.E. und Scott, M.P. (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4):306-317
- Hopkins**, M.T., Lampi, Y., Wang, T.W., Liu, Z., Thompson, J.E. (2008) Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in Arabidopsis. *Plant Physiol* 148(1):479–489
- Huang**, H., Song, T.J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M.D., Tang, Q.Q. (2009) BMP signaling pathway is required for commitment of C3H1OT1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106:12670-12675

- Huangfu**, D. und Anderson, K.V. (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102:11325-11330
- Hui**, C.C. und Joyner, A.L. (1993) A mouse model of Greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 3:241–246
- Hui**, C.-c., Slusarski, D., Platt, K., Holmgren, R., Joyner, A. L. (1994) Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev. Biol.* 162:402-413
- 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
- Incardona**, J.P., Lee, J.H., Robertson, C.P., Enga, K., Kapur, R.P., Roelink, H. (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membranetethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:12044-12049
- Ingham**, P. W. und Fietz, M. J. (1995) Quantitative effects of *hedgehog* and *decapentaplegic* activity on the patterning of the *Drosophila* wing. *Curr. Biol.* 5:432–440
- Ingham**, P.W. und McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15(23):3059-87
- Ingo**, T., Marietta, W., Andrea, P., Hans-Helge, S., Wolfgang, A.S. (2004) Hedgehog signaling in normal urothelial cells and in urothelial carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 203:372–377
- Iozzo**, R.V., Eichstetter, I., Danielson, K.G. (1995) Aberrant expression of the growth factor Wnt-5a in human malignancy. *Cancer Res* 55:3495-3499
- Izpisua-Belmonte**, J. C. and Duboule, D. (1992) Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. *Dev. Biol.* 152:26-36
- Jansson**, B.P., Malandrin, L., Johansson, H.E. (2000) Cell cycle arrest in archaea by the hypusination inhibitor N(1)-guanyl-1,7-diaminoheptane. *J Bacteriol* 182(4):1158–1161
- Jia**, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., He, C. (2008) Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 582(23-24):3313-3409
- Jia**, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G. et al. (2011) N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 7:885-887

- Johnson, R.L., Laufer, E., Riddle, R.D., Tabin, C. (1994)** Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* 79:1165-1173
- Johnson, R.L. und Tabin, C.J. (1997)** Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90(6):979-990
- Jones, C. M., Lyons, K., Hogan, B. L. M. (1991)** Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* 111:531-542
- Jun, P., Hong, C., Lal, A., Wong, J.M., McDermott, M.W., Bollen, A.W., Plass, C., Held, W.A., Smiraglia, D.J., Costello, J.F. (2009)** Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific. *Neuro Oncol.* 1(4):414-422
- Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.J., Zhang, W., Hu, Y., Chuang, P.T. (2002)** Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* 129:5753-5765
- Keady, B.T., Samtani, R., Tobita, K., Tsuchya, M., San Agustin, J.T., Follit, J.A., Jonassen, J.A., Subramanian, R., Lo, C.W., Pazour, G.J. (2012)** IFT25 links the signal-dependent movement of Hedgehog components to intraflagellar transport. *Dev. Cell* 22(5):940-951
- Kessel, M. und Gruss, P. (1991)** Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67:89-104
- Kirsch, T., Nickel, J., and Sebald, W. (2000a)** BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J.* 19:3314-3324
- Kirsch, T., Nickel, J., and Sebald, W. (2000b)** Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett.* 468:215-219
- Kishore, G.M. und Shah, D.M. (1988)** Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57:627-663
- Knezevic, V., De Santo, R., Schughart, K., Huffstadt, U., Chiang, C., Mahon, K.A., Mackem, S. (1997)** Hoxd-12 differentially affects preaxial and postaxial chondrogenic branches in the limb and regulates Sonic hedgehog in a positive feedback loop. *Development* 124:4523-4536
- Kondo, T., Dolle, P., Zakany, J. and Duboule, D. (1996)** Function of posterior *HoxD* genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development* 122:2651-2659
- Kornak, U. und Mundlos, S. (2003)** Genetic Disorders of the Skeleton: A Developmental Approach. *Am. J. Hum. Genet.* 73:447-474
- Kraus, P., Fraidenraich, D., Loomis, C.A. (2001)** Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.* 100:45-58

- Kretzschmar**, M. and Massague, J. (1998) SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:103-111
- Kring**, S.I.I., Holst, C., Zimmermann, E., Jess, T., Berentzen, T., Toubro, S., Hansen, T., Astrup, A., Pedersen, O., Sørensen, T.I.A (2008) FTO Gene Associated Fatness in Relation to Body Fat Distribution and Metabolic Traits throughout a Broad Range of Fatness. *PLoS ONE*. 3(8):e2958
- Krumlauf**, R. (1993) Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends Genet.* 9:106-112
- Krumlauf**, R. (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201
- Kruse**, M., Rosorius, O., Krätzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G., Hauber, J. (2000) Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med.* 191(9):1581-1590
- Langille**, R. M. und Hall, B. K. (1993) Pattern formation and the neural crest. In *The Skull, Vol. 1* (ed. J. Hanken and B. K. Hall), pp. 77-111. University of Chicago Press, Chicago
- Laufer**, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., Tabin, C. (1994) *Sonic hedgehog* and *Fgf-4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79:993-1003
- Le Douarin**, N.M., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E. (2004) Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131:4637-4650
- Lee**, J.D. und Treisman, J.E. (2001) Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Curr. Biol.* 11(14):1147-52
- Lei**, Q., Zelman, A.K., Kuang, E., Li, S., Matise, M.P. (2004) Transcription of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* 131:3593-3604
- Lewis**, E.B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570
- Li**, Y., Zhang, H., Choi, S.C., Litingtung, Y., Chiang, C. (2004) Sonic hedgehog signaling regulates Gli3 processing, mesenchymal proliferation, and differentiation during mouse lung organogenesis. *Dev. Biol.* 270:214-231
- Li**, Y., Zhang, H., Litingtung, Y., Chiang, C. (2006) Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103(17):6548-53
- Li**, J., Sarosi, I., Cattle, R.C., et al. (2006b) Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39:754-766

- Li, Y., Gordon, J., Manley, N. R., Litingtung, Y. and Chiang, C. (2008)** Bmp4 is required for tracheal formation: a novel mouse model for tracheal agenesis. *Dev. Biol.* 322:145-155
- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U., Görlich, D. (2000)** Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* 19(16):4362-4371
- Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H., Chiang, C. (1998)** Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 20:58– 61
- Litingtung, Y., Dahn, R.D., Li, Y., Fallon, J.F., Chiang, C. (2002)** SHH and GLI3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418:979–983
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massague, J. (1995)** Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the twokinasereceptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.* 15:3479-3486
- 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
- Liu, A., Wang, B., Niswander, L.A. (2005)** Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* 132:3103-3111
- Logan, M. (2003)** Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* 130:6401–6410
- López-Bermejo, A., Petry, C.J., Díaz, M., Sebastiani, G., de Zegher, F., Dunger, D.B., Ibáñez, L. (2008)** The association between the *fto* gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93(4):1501-1505
- Lopez-Martinez, A., Chang, D.T., Chiang, C., Porter, J.A., Ros, M.A., Simandl, B.K., Beachy, P.A., and Fallon, J.F. (1995).** Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr. Biol.* 5:791–796
- Lum, L. und Beachy, P.A. (2004)** The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304(5678):1755-9
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L.J.J., Sohocki, M., Bradley, A., Karsenty, G. (1995)** BMP-7 is an inducer of nephrogenesis and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9:2808–2820
- Lyons, K.M., Pelton, R.W., Hogan, B.L.M. (1989)** Patterns of expression of murine *Vgr-1* and *BMP-2a* RNA suggest that transforming growth factor-p-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev.* 3:1657-1668

- Lyons, K.M., Pelton, R.W., Hogan, B.L.M.** (1990) Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 109:833-844
- Lyons, K.M., Hogan, B.L.M., Robertson, E.J.** (1995) Colocalization of Bmp-7 and Bmp-2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech. Dev.* 50:71-83
- Ma, Y., Erkner, A., Gong, R., Yao, S., Taipale, J., Basler, K., Beachy, P.A.** (2002) Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* 111:63-75
- MacDonald, B. T., Adamska, M., Meisler, M.H.** (2004) Hypomorphic expression of *Dkk1* in the *doubleridge* mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* 131:2543-2552
- Maier, B., Ogihara, T., Trace, A.P., Tersey, S.A., Robbins, R.D.** (2010) The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet β cell inflammation and dysfunction in mice. *J Clin Invest.* 120(6):2156-2170
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., et al.** (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321-325
- Makarenkova, H. und Patel, K.** (1999) Gap junction signaling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev. Biol.* 207:380-392
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.** (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934
- Masckauchan, T.N., Agalliu, D., Vorontchikhina, M. et al.** (2006) Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol Biol Cell* 17:5163-5172
- Masuya, H., Sagai, T., Wakana, S., Moriwaki, K., Shiroishi, T.** (1995) A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev.* 9:1645-1653
- May, S.R., Ashique, A.M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbali, K., Reiter, J., Ericson, J., Peterson, A.S.** (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev. Biol.* 287:378-389
- Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kioussis, W.B., Del Pozo, M.A. and Schwartz, M.A.** (2002). Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nat. Cell Biol.* 4:639-647
- Meller, N., Merlot, S., Guda, C.** (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci.* 118(21):4937-46

- Miller**, L.A., Wert, S.E., Whitsett, J.A. (2001) Immunolocalization of sonic hedgehog (Shh) in developing mouse lung. *J Histochem Cytochem* 49:1593-1604
- Miyamoto**, Y., Yamauchi, J., Sanbe, A., Tanoue, A. (2006) Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Exp Cell Res*. 313(4):791-804
- Miyazawa**, K., Shinozaki, M., Hara, T., Miyazono, K. (2002) Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling. *Genes Cells* 7:1191-204
- Miyazono**, K., Maeda, S., Imamura, T. (2005) BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(3):251-63
- Moniz**, S., Veríssimo, F., Matos, P., Brazão, R., Silva, E., Kotelevets, L., Chastre, E., Gespach, C., Jordan, P. (2007) Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2. *Oncogene* 26(41):6071-6081
- Moniz**, S., Matos, P., Jordan, P. (2008) WNK2 modulates MEK1 activity through the Rho GTPase pathway. *Cell Signal*. 20(10):1762-1768
- Morgan**, B. A., Izpisua-Belmonte, J. C., Duboule, D. and Tabin, C. J. (1992). Targeted misexpression of *Hox-4. 6* in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. *Nature* 358:236-239
- Morrissey**, E.E. und Hogan, B.L. (2010) Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev. Cell* 18(1):8–23
- 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. *J Bone Miner Res*. 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
- Namekata**, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., Kimura, H. (2004) MOCA induces membrane spreading by activating Rac1. *J Biol Chem* 279:14331–14337
- Nelson**, C.E., Morgan, B.A., Burke, A.C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L.C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L.F., Tabin, C. (1996) Analysis of Hox gene expression in the chicklimbbud. *Development* 122:1449–1466
- Nishimura**, K., Murozumi, K., Shirahata, A., Park, M.H., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2005) Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J* 385:779–785
- Niswander**, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., Martin, G. R. (1993) FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75:579–587.

- Niswander, L.**, und Martin, G. R. (1993) FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* 361:68–71
- Nusslein-Volhard, C.** und Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801
- Ohlmeyer, J.T.**, Kalderon, D., (1998) Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* 396:749–753
- Ohuchi, H.**, Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., and Noji, S. (1997) The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124:2235–2244
- Orenic, T. V.**, Slusarski, D. C., Kroll, K. L., Holmgren, R. A. (1990) Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of *Drosophila*. *Genes Dev.* 4:1053–1067
- Park, M.H.**, Wolff, E.C., Lee, Y.B., Folk, J.E. (1994) Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase: inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. *J Biol Chem* 269:27827–27832
- Park, H.L.**, Bai, C., Platt, K.A., Matise, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M., Joyner, A.L. (2000) Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* 127:1593–1605
- Park, M.H.** (2006) The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino-acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139:161–169
- Park, M.H.**, Nishimura, K., Zanelli, C.F., Valentini, S.R. (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38:491–500
- Parr, B. A.**, and McMahon, A. P. (1995) Dorsaling signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374:350–353
- Partanen, J.**, Schwartz, L. and Rossant, J. (1998) Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev.* 12:2332–2344
- Peeters, A.**, Beckers, S., Verrijken, A., Roevens, P., Peeters, P., Van Gaal, L., Van Hul, W. (2008) Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab* 93(4):481–484
- Pekarik, V.**, Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S., Stoekl., E. T. (2002) Sreening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat.Bio.tech.* 21(1):93–96

- Pepicelli**, C.V., Lewis, P.M., McMahon, A.P. (1998) Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.* 8:1083-1086
- Pepinsky**, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., Galdes, A. (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem.* 273(22):14037-45
- Perl**, A.K., Wert, S.E., Nagy, A., Lobe, C.G., Whitsett, J.A. (2002) Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:10482–10487
- Peters**, K. G., Werner, S., Chen, G. and Williams, L. T. (1992) Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114:233-243
- Peters**, T., Ausmeier, K., Rütter, U. (1999) Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm. Genome* 10:983-6
- Peters**, T., Ausmeier, K., Dildrop, R., Rütter, U. (2002) The mouse *Fused toes* (*Ft*) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm. Genome* 13:186-188
- Peters**, T., (2002) Die *Fused Toes* Mausmutation – Identifizierung und Charakterisierung der Kandidatengene. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Dissertation)*
- Phizicky**, E.M. und Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 59(1):94-123
- Pluthero**, F.G. (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 21:4850-4851
- Porter**, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V., Beachy, P.A. (1996) Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86(1):21-34
- Porter**, J.A., Young, K.E, Beachy, P.A. (1996b) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274(5285):255-259
- Puig**, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Séraphin, B. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24(3):218-229

- Qu**, S., Niswender, K.D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M.A., Wisdom, R. (1997) Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development* 124:3999-4008
- Que**, J., Choi, M., Ziel, J. W., Klingensmith, J. and Hogan, B. L. (2006) Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for Noggin and Bmps. *Differentiation* 74:422-437
- Riddle**, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401-1416
- Riddle**, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M., Tabin, C. (1995) Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83:631-640
- Rijsewijk**, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R. (1987) The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50:649-657
- Robbens**, S., Rouze, P., Cock, J., Spring, J., Worden, A., Van de Peer, Y. (2008) The FTO Gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *J Mol Evol* 66:80-84
- Rosorius**, O., Reichart, B., Krätzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M.C., Hauber, J. (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci.* 112(14):2369-80
- Ross**, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L. and MacDougald, O.A. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289:950-953
- Ruhl**, M., Himmelspach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G.K., Probst, H., Bevec, D., et al. (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol.* 123(6):1309-1320
- Ruiz**, I.A.A. (1999) The works of Gli and the power of hedgehog. *Nat. Cell Biol.* 1:147-148
- Ruppert**, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F.-T., Law, M. L., Seuneez, H.N., O'Brien, S.J., Vogelstein, B. (1988) The Gli- Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol.* 8:3104-3133
- Saini**, P., Eyler, D.E., Green, R., Dever, T.E. (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459(7243):118-121
- Sampath**, T.K. und Reddi, A.H. (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:7599-7603

- Sanchez-Pulido, L.** und Andrade-Navarro, M.A. (2007) The *FTO* (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* 8:23
- Sasaki, H.,** Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., Kondoh, H., (1999) Regulation of GLI2 and GLI3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of GLI2 and GLI3 as primary mediators of SHH signaling. *Development* 126:3915–3924
- Scherz, P.J.,** McGlinn, E., Nissim, S., Tabin C.J. (2007) Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev. Biol.* 308:343-354
- Schneuwly, S.,** Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1987) Molecular analysis of the dominant homeotic *Antennapedia* phenotyp. *EMBO J.* 6:201-206
- Scott, M.** (1992) Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71:551-553
- Scott, L.J.,** Mohlke, K.L., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Li, Y. et al. (2007) A Genom-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science* 316:1341-1345
- Scuteri, A.,** Sanna, S., Chen, W.M., Uda, M., Albai, G. (2007) Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 3:e115
- Sebold, W.** und Mueller, T.D. (2003) The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem Sci.* 10:518-21
- 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
- Shi, X.P.,** Yin, K.C., Zimolo, Z.A., Stern, A.M., Waxman, L. (1996) The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res.* 225(2):348-56
- Shi, W.,** Zhao, J., Anderson, K.D., Warburton, D. (2001) Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280(5):1030-1039
- Shi, Y.** und Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700
- Small, K. M.** und Potter, S. S. (1993). Homeotic transformations and limb defects in *Hox A11* mutant mice. *Genes Dev.* 7:2318-2328
- 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

- Steinkasserer**, A., Jones, T., Sheer, D., Koettnitz, K., Hauber, J., et al. (1995) The eukaryotic cofactor for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) rev protein, eIF-5A, maps to chromosome 17p12–p13: three eIF-5A pseudogenes map to 10q23.3, 17q25, and 19q13.2. *Genomics* 25(3):749–752
- Stern**, C. D. (2004) The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. *Dev. Cell* 8:9–17
- Stratigopoulos**, G., Padilla, S., Leduc, C.A., Watson, E., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., Zeltser, L.M., Chung, W.K., Leibel, R.L. (2008) Regulation of FTO/FTM gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(4):1185-1196
- Struhl**, G. (1981) A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* 292:635-638
- Sun**, J., Chen, H., Chen, C., Whitsett, J. A., Mishina, Y., Bringas, P., Jr, Ma, J. C., Warburton, D. and Shi, W (2008). Prenatal lung epithelial cell-specific abrogation of Alk3-bone morphogenetic protein signaling causes neonatal respiratory distress by disrupting distal airway formation. *Am. J. Pathol.* 172:571-582
- Talamillo**, A., Bastida, M.F., Fernandez-Teran, M., Ros, M.A. (2005) The developing limb and the control of the number of digits. *Clin. Genet.* 67:143–153
- te Welscher**, P., Zuniga, A. Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., Zeller, R. (2002) Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* 298:827–830
- ten Dijke**, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1994) Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985-16988
- Ten Have-Opbroek**, A.A. (1991) Lung development in the mouse embryo. *Exp Lung Res* 17:111–130
- Temtamy**, S. und McKusick, V. (1978) The genetics of hand malformations. *Birth Defects* 14:3-128
- Theil**, T., Kaesler, S., Grotewold, L., Böse, J., Rütther, U. (1999) Gli genes and limb development. *Cell Tissue Res* 296:75–83
- Tickle**, C. (2003) Patterning systems-from one end of the limb to the other. *Dev. Cell* 4(4):449-58
- Tickle**, C. (2004) The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech. Dev.* 21(9):1019-29
- Tickle**, C. (2006) Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:45-53

- Tschritter**, O., Preissl, H., Yokoyama, Y., Machicao, F., Haring, H.U., Fritsche, A. (2007) Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. *Diabetologia* 50:2602–2603
- Urist**, M.R. (1965) Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150:893-899
- van Amerongen**, R. und Nusse, R. (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136:3205–3214
- van der Hoeven**, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.G., Kyewski, B., Rütther, U. (1994) Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes (Ft)*. *Development* 120:2601-2607
- van Tuyl**, M. und Post, M. (2000) From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir. Res.* 1:30– 35
- Verissimo**, F., Jordan, P. (2001) WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20:5562–5569
- Vierkotten**, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B., Rütther, U. (2007) Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* 134(14):2569-2577
- Vogel**, A., Rodriguez, C., Warnken, W., and Izpisua' a-Belmonte, J. C. (1995). Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* 378:716–720
- Wahlen**, K., Sjolín, E., Hoffstedt, J. (2007) The common rs9939609 gene variant of the fat mass and obesity associated gene (FTO) is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 49:607–611
- Wang**, Q.T., Holmgren, R.A., (1999) The subcellular localization and activity of *Drosophila cubitus interruptus* are regulated at multiple levels. *Development* 126:5097–5106
- Wang**, B., Fallon, J.F., Beachy, P.A. (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423–434
- Wang**, C., Rütther, U., Wang, B. (2007) The Shh-independent activator function of the fulllength GLI3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev. Biol.* 305:460–469
- Warburton**, D. und Olver, B.E. (1997) Coordination of genetic, epigenetic, and environmental factors in lung development, injury, and repair. *Chest* 111:119–122
- Warburton**, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., Cardoso, W.V. (2000) The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech. Dev.* 92:55–81
- Warburton**, D., Bellusci, S., De Langhe, S., Del Moral, P., Fleury, V., Mailleux, A., Tefft, D., Unbekandt, M., Wang, K., Shi, W. (2005) Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res.* 57:26–37

- Warburton, D., Gauldie, J., Bellusci, S., Shi, W. (2006)** Lung development and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 3:668–672
- Warburton, D., Perin, L., Defilippo, R., Bellusci, S., Shi, W., Driscoll, B. (2008)** Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc Am Thorac Soc.* 5(6):703–6
- Weaver, M., Yingling, J.M., Dunn, N.R., Bellusci, S., Hogan, B.L. (1999)** Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* 126:4005–4015
- Wert, S.E., Glasser, S.W., Korfhagen, T.R., Whitsett, J.A. (1993)** Transcriptional elements from the human SP-C gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. *Dev. Biol.* 156:426–443
- Wilson, S.L., Wilson, J.P., Wang, C., Wang, B., McConnell, S.K. (2012)** Primary cilia and Gli3 activity regulate cerebral cortical size. *Dev Neurobiol.* 72(9):1196-212
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., Hogan, B.L.M. (1995)** Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9:2105-16
- Wolfer, D.P., Crusio, W.E., Lipp, H.P. (2002)** Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci.* 25(7):336-340
- Wolpert, L. (Hrsg.), Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T. M., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (1999)** Entwicklungsbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. (1988)** Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. and Massague, J. (1992)** TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014
- Xu, X., Song, Y., Li, Y., Chang, J., Zhang, H., An, L. (2010)** The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expression and Purification* 72:149-156
- Xu, B., Chen, C., Chen, H., Zheng, S.G., Bringas, P., Xu, M.Jr., Zhou, X., Chen, D., Umans, L., Zwijsen, A., Shi, W. (2011)** Smad1 and its target gene *Wif1* coordinate BMP and Wnt signaling activities to regulate fetal lung development. *Development* 138:925-935
- Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T., Jessel, T.M. (1993)** Control of cell pattern in the neural tube: Motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73:673-686

- 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
- Yang**, Y., und Niswander, L. (1995) Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anterior–posterior patterning. *Cell* 80:939–947
- Yang**, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.-T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., and Tickle, C. (1997) Relationship between distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124:4393–4404
- Yokouchi**, Y., Nakazato, S., Yamamoto, M., Goto, Y., Kameda, T., Iba, H., Kuroiwa, A. (1995) Misexpression of *Hoxa-13* induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes Dev.* 9:2509-2522
- Yu**, H., Wessels, A., Chen, J., Phelps, A.L., Oatis, J., Tint, G.S., Patel, S.B. (2004) Late gestational lung hypoplasia in a mouse model of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *BMC Developmental Biology* 4:1
- Zakany**, J. und Duboule, D. (1996) Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the *HoxD* complex. *Nature* 384:69-71
- Zakany**, J., Duboule, D. (1999) Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* 296:19-25
- Zakany**, J., Kmita, M., Duboule, D. (2004) A dual role for Hox genes in limb anterior–posterior asymmetry. *Science* 304:1669–1672
- Zanelli**, C.F., Maragno, A.L., Gregio, A.P., Komili, S., Pandolfi, J.R., et al. (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348(4):1358–1366
- Zeller**, R., López-Ríos, J., Zuniga, A. (2009) Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* 10:845-858
- Zguricas**, J., Heus, H., Morales-Peralta, E., Breedveld, G., Kuyt, B., Mumcu, E., Bakker, W., Akarsu, N., Kay, S., Hovius, S., Heredero-Baute, L., Oostra, B., Heutink, P. (1998) Clinical and genetic studies on 12 preaxial polydactyly families and refinement of the localisation of the gene responsible to a 1.9 cM region on chromosome 7q36. *J Med Genet.* 36(1):33–40
- Zhang**, Z., Yu, X., Zhang, Y., Geronimo, B., Lovlie, A., Fromm, S.H., Chen, Y. (2000) Targeted Misexpression of Constitutively Active BMP Receptor-IB Causes Bifurcation, Duplication, and Posterior Transformation of Digit in Mouse Limb. *Dev. Biol.* 220:154-167
- Zhang**, M., Wang, H., Teng, H., Shi, J., Zhang, Y. (2010) Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochem Cell Biol* 134:327-335

Zhang, Z., Zhou, D., Lai, Y., Liu, Y., Tao, X., Wang, Q., Zhao, G., Gu, H., Liao, H., Zhu, Y., Xi, X., Feng, Y. (2012) Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett.* 319(1):89-97

Zou, H., Wieser, R., Massague, J., Niswander, L. (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11:2191-2203

7. Anhang

Tabelle 7.1: Detaillierte Auflistung der Rippen- und Brustbein-Phänotypen der untersuchten, neonatal gestorbenen Tg104N-Mäuse

R= Rippenpaar, NL= normal

Mausnr.	Rippenfusion		Brustbein		Schwertfortsatz	
	Rechts	Links	gespalten	Verknöcherung	gespalten	Verknöcherung
<i>Fto</i>^{+/+}:						
N77	---	---	R5-7	NL	---	NL
N78	---	---	R6-7	NL	---	NL
N96	---	---	R6-7	NL	---	NL
N97	---	---	R4-7	NL	---	NL
N114	---	---	---	NL	---	NL
N150	---	---	R4-7	NL	---	NL
N175	---	---	---	NL	---	NL
N229	---	---	---	NL	---	NL
<i>Fto</i>^{+/-}:						
N100	---	---	---	NL	---	NL
N156	---	---	R7	NL	---	NL
N173	---	---	---	NL	---	NL
N179	---	---	---	NL	---	NL

Mausnr.	Rippenfusion		Brustbein		Schwertfortsatz	
	Rechts	Links	gespalten	Verknöcherung	gespalten	Verknöcherung
<i>Fto</i>^{-/-}						
N67	---	---	R4-7	NL	---	reduziert
N89	---	---	R3-7	NL	ja	reduziert
N90	R10-11	---	R3-7	reduziert+versetzt	---	reduziert
N93	---	---	R3-7	NL	---	reduziert
N98	---	---	R4-7	reduziert+versetzt	---	reduziert
N101	R1-2 u.5-6	R0-1	R5-7	reduziert+versetzt	ja	reduziert
N113	---	---	R6-7	NL	ja	reduziert
N120	---	---	---	NL	ja	reduziert
N143	---	---	R3-7	reduziert	---	fehlt
N144	---	---	R3-7	reduziert	---	fehlt
N145	---	---	R4-7	reduziert	---	fehlt
N148	---	---	R2-7	reduziert+versetzt	---	reduziert
N152	---	---	R3-7	reduziert+versetzt	---	fehlt
N155	---	---	R3-7	NL	---	reduziert
N157	---	---	R3-7	reduziert+versetzt	---	fehlt
N158	---	---	R3-7	reduziert+versetzt	ja	fehlt
N164	---	---	R3-7	NL	---	reduziert
N166	---	---	R3-7	NL	---	reduziert
N171	---	---	R4-7	reduziert+versetzt	ja	reduziert
N172	---	---	R5-7	NL	---	fehlt
N178	---	---	R3-7	reduziert	---	reduziert
N193	---	---	R3-7	reduziert	---	reduziert
N204	---	---	R3-7	reduziert	---	reduziert
N205	---	---	R3-7	reduziert	---	reduziert
N228	R1-2 u.9-10	---	R3-7	reduziert+versetzt	ja	reduziert
N242	R6-7	---	R6-7	reduziert+versetzt	ja	reduziert
N260	---	---	R6-7	reduziert+versetzt	ja	reduziert
N264	R4-5	---	R4-7	reduziert+versetzt	---	reduziert
N275	---	---	R4-7	reduziert	---	reduziert

Tabelle 7.2: Gegenüberstellung der verschiedenen Phänotypen der neonatal gestorbenen *Fto*-defizienten Tg104N-Mäuse

NR.	Polydaktylie	Defekt im Sternum	Defekt im Schwertfortsatz	Defekt in den Rippen
N67	x		x	
N89	x	x	x	
N90		x	x	x
N93		x	x	
N98	x	x	x	
N101		x	x	x
N113			x	
N120			x	
N143		x	x	
N144	x	x	x	
N145		x	x	
N148	x	x	x	
N152	x	x	x	x
N155		x	x	
N157	x	x	x	
N158	x	x	x	
N164	x	x	x	
N166	x	x	x	
N171	x	x	x	
N172	x		x	x
N178	x	x	x	x
N193		x	x	
N204		x	x	x
N205		x	x	x
N228		x	x	x
N275	x	x	x	

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüter für die Überlassung des Themas und die Betreuung während meiner Promotion.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Aberle für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Ein dickes Dankeschön geht an Kathrin Ikels und Steffi Kuschel, die mich bei der täglichen Arbeit mit meinen Mäusen sehr unterstützt haben.

Nochmals ein dickes Dankeschön an Kathrin Ikels, für die gute Zusammenarbeit und die mentale und Unterstützung im Labor der „kleinen Frauen“.

Ich möchte mich auch bei den restlichen Kollegen des EMTs für das angenehme Arbeitsklima bedanken, besonders auch bei dem harten Kern der Ftm-Gruppe. Wir hatten eine Menge Spaß!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und Christoph. Sie standen während des Studiums und meiner Promotion stets hinter mir. Ohne deren Unterstützung wäre das Alles nicht möglich gewesen.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Der Verlust von *Fto* in Mäusen führt zu embryonalen und postnatalen Entwicklungsstörungen, sowie zu neonataler Sterblichkeit“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 05.12.2012

(Yvonne Jäger)