
Funktionelle Analyse der *Iroquois*-Gene während der
Entwicklung des Rückenmarks:
Identifizierung von *Olig2* als Zielgen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katrin Götz

aus Solingen

November 2006

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: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Koreferent: Prof. Dr. Elisabeth Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006

*Meiner
Familie*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Neuralrohr	2
1.1.1 Dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr	2
1.1.1.1 Das dorsale Neuralrohr	3
1.1.1.2 Das ventrale Neuralrohr.....	4
1.2 Die <i>Iroquois</i> -Gene	6
1.3 Die <i>Fused toes</i> Mausmutante	11
1.4 Ziel dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Häufig verwendete Lösungen.....	13
2.2 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	15
2.3 Dephosphorylierung von DNA.....	15
2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung	15
2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	16
2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	16
2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
2.8 Transformation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i>	17
2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	17
2.8.2 Transformation.....	18
2.9 Präparation von Plasmid-DNA.....	19
2.9.1 Plasmid-Mini-Präparation	19
2.9.2 Plasmid-Maxi-Isolation	20
2.10 Isolierung von DNA aus embryonalen Membranen	20
2.11 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen	21
2.12 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	21
2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	22
2.13.1 Sequenz der verwendeten Oligonukleotide	22
2.13.2 PCR-Amplifikation	22
2.13.3 Reverse Transkription	23
2.13.4 Mutagenese – gezielter Austausch einzelner Basen	24
2.14 DNA-Sequenzierung.....	26
2.15 <i>In situ</i> -Hybridisierungstechniken.....	26
2.15.1 Ganzkörper oder „Whole-mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung	26

2.15.2	Synthese der Komplementär-RNA-Sonden.....	27
2.15.3	Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung.....	27
2.15.4	Entfernung von unspezifisch gebundener RNA-Sonde und Antikörperinkubation	28
2.15.5	Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie	29
2.15.6	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten.....	29
2.16	Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten.....	31
2.16.1	Präparation und Fixierung der Embryonen	32
2.16.2	Antikörperfärbung.....	32
2.16.3	Verwendete Erstantikörper	32
2.16.4	Verwendete Zweitantikörper	33
2.17	Histologische Techniken.....	34
2.17.1	Paraffindünnschnitte.....	34
2.17.2	Anfertigung der Kryostatschnitte.....	34
2.18	Tierexperimentelles Arbeiten	34
2.18.1	Quelle, Inkubation und Öffnen der befruchteten Hühnereier.....	34
2.18.2	<i>In ovo</i> Elektroporation ins Neuralrohr des Hühnerembryos.....	35
2.18.3	Präparation der Hühnerembryonen	35
2.18.4	Maushaltung	35
2.18.5	Isolierung definierter Embryonalstadien	36
2.18.6	Identifizierung genetisch veränderter Tiere und Embryonen.....	36
2.19	Fotodokumentation.....	36
2.20	Übersicht über die konstruierten Expressionsvektoren.....	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Musterbildung im Neuralrohr von <i>Ft/Ft</i> Embryonen	38
3.1.1	Verlust der Bodenplatte.....	38
3.1.2	Dorsalisierung des Neuralrohres.....	39
3.1.3	Ausdehnung der Motorneuronen nach ventral und dorsal	40
3.1.4	Das dorsale Neuralrohr bleibt unverändert in <i>Ft/Ft</i> Embryonen.....	42
3.1.5	Der Verlust des <i>IrxB</i> -Genkomplex ist verantwortlich für die Ausdehnung der Motorneuronen	42
3.2	Überexpressionsstudien der <i>Irx</i> -Gene im Neuralrohr von Hühnerembryonen	44
3.2.1	Expression der <i>Irx</i> -Gene im Hühnerembryo (<i>Gallus gallus</i>)	44
3.2.2	<i>In ovo</i> Elektroporation in das sich entwickelnde Neuralrohr des Hühnerembryos	47

3.2.2.1 Die Expression von <i>Olig2</i>	49
3.2.2.2 Die Expression von <i>Isl-1</i>	51
3.2.2.3 Die Expression von <i>Chx10</i>	52
3.2.2.4 Die Expression von <i>En1</i>	53
3.2.2.5 Die Expression von <i>p27</i>	54
3.2.2.6 Die Expression von <i>Cash1</i>	56
3.2.2.7 Die Expression von <i>Pax7</i>	57
3.2.2.8 Die Expression von <i>Olig3</i>	58
3.2.2.9 Die Expression von <i>Nkx6.1</i>	59
3.2.2.10 Die Expression von <i>Pax6</i>	60
3.3 Die Suche nach direkten Zielgenen	61
3.3.1 <i>Olig2</i> und <i>Olig3</i> besitzen ein paralogenes CNE.....	64
3.3.2 Einführung eines Funktionalitätstest für die einzelnen CNEs.....	66
3.3.3 Test von <i>Olig2_CNE-34</i>	69
3.3.4 Test von <i>Olig3_CNE-19</i>	70
3.3.5 Mutagenese des IBS-Elementes.....	70
3.3.6 Test der <i>Olig2_CNE-34</i> -Sequenz des Zebrafisches.....	71
3.3.7 Test von <i>Olig2_CNE+26</i>	73
3.3.8 Test von <i>Olig2_CNE-73</i>	74
3.3.9 Test von <i>Olig3_CNE+21</i>	76
3.3.10 Test von <u>nicht</u> -konservierten Bereichen, die ein IBS-Motiv enthalten.....	78
4. Diskussion	81
4.1 Funktionelle Analyse der <i>Irx</i> -Gene im Neuralrohr.....	82
4.1.1 Alle <i>Irx</i> -Gene sind funktionell redundant, wenn sie überexprimiert werden.....	83
4.1.2 Die <i>Irx</i> -Gene regulieren die Expression von <i>Olig2</i> und somit die Entstehung der Motorneuronen negativ.....	85
4.1.3 Die <i>Irx</i> -Gene beeinflussen die Expression von <i>Olig3</i>	86
4.1.4 Die Veränderung in der V1- und V2 - Neuronenpopulation.....	87
4.2 Die Identifizierung von direkten Zielgenen der <i>Irx</i> -Transkriptionsfaktoren	89
4.2.1 Hinweise aus den biologischen Daten.....	90
4.2.2 Hinweise aus den <i>in silico</i> –Daten.....	91
4.2.3 Test auf Funktionalität der identifizierten CNEs	92
4.2.4 Beurteilung der Ergebnisse aus dem Reportertest	94
4.2.5 Die Bindung von <i>Irx</i> an die DNA	95

4.3 <i>Olig2</i> ist ein direktes Zielgen der Irx-Transkriptionsfaktoren.....	98
4.4 Ausblicke.....	99
5. Zusammenfassung	101
6. Abkürzungsverzeichnis	102
7. Literatur.....	104
8. Anhang.....	115

1. Einleitung

Die Entwicklung eines mehrzelligen Organismus aus einer befruchteten Eizelle stellt eine Ansammlung hochkomplexer Prozesse wie Zellteilung, Zellwanderung, Differenzierung, Musterbildung und Organogenese dar. Viele dieser Prozesse werden durch Zell-Zell-Interaktion bzw. -Kommunikation reguliert, was wiederum eine zeitlich und räumlich kontrollierte Genaktivität sowohl voraussetzt als auch zur Folge hat. So werden beispielsweise durch die Expression von sezernierten Faktoren Signalwege aktiviert, die am Ende zu der Aktivierung oder Inhibierung von bestimmten Zielgenen führen. Die Aufschlüsselung der genetischen Kontrolle solcher Prozesse oder auch der Funktion einzelner beteiligter Faktoren ist das Ziel der Entwicklungsbiologie.

Dieses wird durch die Untersuchung verschiedener Modellorganismen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*), des Frosches (*Xenopus laevis*), des Zebrafisches (*Danio rerio*), des Huhnes (*Gallus gallus*) und der Maus (*Mus musculus*), in denen verschiedene embryologische und genetische Experimente durchgeführt werden, vorangetrieben (Wolpert, 1999). Die Fruchtfliege als Vertreter der Invertebraten eignet sich aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, ihres vergleichsweise weniger komplexen Genoms und der Verfügbarkeit vieler Mutanten besonders gut für genetische Experimente. Durch solche Mutagenesexperimente in *Drosophila* ist es gelungen, eine Reihe von Entwicklungskontrollgenen zu identifizieren (Nüsslein-Vollhard und Wieschaus, 1980). Die Maus als Modellsystem der Säugerentwicklung wird ebenfalls häufig zur Analyse von Genfunktionsverlust-Mutanten, so genannten „Knock-out“-Mutanten, benutzt. Auch hier können, im Idealfall von den phänotypischen und molekularen Veränderungen Rückschlüsse auf die Funktion eines Genes gezogen werden (Wolpert, 1999; Capecchi, 1989 a, b). Das Huhn wiederum ist ein wertvolles Modellsystem zur Realisierung embryologisch-manipulativer Experimente, die aufgrund der leichten Verfügbarkeit von Bruteiern, sowie der extrauterinen Entwicklung und der Größe des Embryos relativ einfach durchzuführen sind (Stern, 2004; Tickle, 2004; Pekaric, 2002).

Besonders bei der Analyse der Funktion von Genen im sich entwickelnden Neuralrohr findet oftmals eine Kombination aus Untersuchung von Knock-out-Mutanten der Maus, sowie Überexpressionsstudien im Huhn Verwendung.

1.1 Das Neuralrohr

Das Neuralrohr stellt die erste Entwicklungsstufe des zentralen Nervensystems der Chordaten dar. Aus ihm entstehen entlang der anterior-posterioren Achse später das Gehirn und Teile der Augenanlage sowie das Rückenmark.

Während der frühen Embryonalentwicklung kommt es durch Signale aus dem axialen Mesoderm, der Chorda dorsalis, zunächst zur Induktion der Neuralplatte aus dem Neuroektoderm. Änderungen in Zellform und –adhäsion führen zur Einfaltung dieser Platte, wodurch die Neuralrinne entsteht, deren Ränder sich dann weiter nach oben stülpen und sich letztlich zum Neuralrohr schließen. Bei der Schließung des Neuralrohres wandern einzelne Zellen, die so genannten Neuralleistenzellen, aus dem Epithel aus und nehmen einen mesenchymalen Charakter an. Sie wandern vom Neuralrohr fort und bilden eine Vielzahl von Zelltypen, wie z.B. Knorpelstrukturen des Kopfbereiches, Pigmentzellen des Dermis oder auch Schwann'sche Scheidezellen (Wolpert, 1999).

Zu Beginn besteht das Neuralrohr aus einer einzigen Zellschicht, die dann eine schnelle Folge von Zellteilungen durchläuft. Schon kurz nach dem Schließen des Neuralrohres verlassen einzelne Zellen den Zellzyklus und wandern in die Peripherie des Neuralrohres, wo sie differenzieren. Diese äußere Zone wird mit zunehmender Einwanderungen und Differenzierung von Zellen immer dicker. Sie wird auch als Mantelzone (MZ) bezeichnet, während die innere Proliferationszone ventrikuläre Zone (VZ) genannt wird.

Diese grundlegende anatomische Anordnung von mitotischen Zellen in der VZ und post-mitotischen Zellen in der MZ bleibt während der Entwicklung erhalten, auch wenn im weiteren Verlauf eine zweite anatomisch-funktionelle Unterteilung erfolgt. Diese führt dazu, dass im dorsalen Bereich des Neuralrohres hauptsächlich sensorische Interneuronen entstehen, während in der ventralen Hälfte Motorneuronen und ventrale Interneuronen gebildet werden. Diese dorso-ventrale Musterbildung des Neuralrohres ist in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden, so dass sich das Neuralrohr gut für die Analyse der genetischen Kontrolle dieser Musterbildungsprozesse eignet (Cayuso und Marti, 2005).

1.1.1 Dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr

Während der Auffaltung des späteren Neuralrohres entsteht jeweils ein Signalzentrum am dorsalen und eins am ventralen Ende des Neuralrohres. Durch Signale aus dem darüber liegenden Ektoderm kommt es zur Induktion der Dachplatte am dorsalen Rand des Neuralrohres, wo daraufhin verschiedene Mitglieder der *Bmp*-Familie (Bone morphogenetic proteins) sowie andere Mitglieder der *TGF- β* -Familie exprimiert werden (Lee and Jessell,

1999; Liem et al., 1995, 1997). Diese Bmp-Signale bilden einen nach ventral gerichteten Gradienten aus, durch den konzentrationsabhängig positionelle Informationen vermittelt werden. Dem gegenüber steht das Signalzentrum an der ventralen Seite des Neuralrohrs, die Bodenplatte, wo es durch ein Shh-Signal (Sonic Hedgehog) aus dem darunter liegenden axialen Mesoderm zur Induktion von *Shh*-Expression in der Bodenplatte selbst kommt (Placzek, 1995; Jessell and Dodd, 1990). Die positionelle Information, die durch diese beiden entgegengesetzten Morphogengradienten entsteht, wird durch die konzentrationsabhängige Expression verschiedener bHLH (basic Helix-Loop-Helix)- und HD (Homeodomänen)-Transkriptionsfaktoren vermittelt.

1.1.1.1 Das dorsale Neuralrohr

Im dorsalen Neuralrohr entstehen Neuronen, die die eingehenden somatosensorischen Informationen verschalten und weiterleiten. Bisherige Analysen haben zur Identifizierung von acht verschiedenen dorsalen Interneuronentypen geführt, die durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren identifiziert werden können. Es gibt sechs früh entstehende dorsale Interneuronen, dI 1-6, die in Klasse A- und Klasse B-Neuronen unterteilt werden können. Klasse A-Neuronen (dI 1-3) sind abhängig von Signalen der Dachplatte, während Klasse B-Neuronen unabhängig von diesen Signalen entstehen (Müller et al., 2002; Lee et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Signale aus der Dachplatte zunächst verschiedene Vorläuferdomänen entstehen, die durch die Expression unterschiedlicher bHLH-Faktoren gekennzeichnet sind. So wird *Math1* (Mammalien atonal homolog 1) in der dorsalsten Vorläuferregion exprimiert und ist für die Entstehung von dI1-Neuronen verantwortlich (Nakada et al. 2004; Bermingham et al. 2001). *Ngn1* und *Ngn2* (*Neurogenin 1* und 2) werden in der Vorläuferzellen der dI2-Neuronen exprimiert und in *Ngn1^{-/-}/Ngn2^{-/-}*-Doppelmutantem werden keine dI2-Neuronen gebildet (Gowan et al. 2001). *Mash1* (Mammalien acheate-scute homolog 1) wird in den Vorläufern der dI3-5 Neuronen exprimiert, aber bisher konnte die Expression von *Mash1* nicht der Entstehung eines bestimmten Neuronentyps zugeordnet werden. *Olig3*, ein Mitglied der *Olig*-Familie, wird in den Vorläufern der dI1-3-Neuronen, den Klasse A-Neuronen, exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass in *Olig3^{-/-}*-Embryonen nur noch wenige dI1-Neuronen gebildet werden, während die dI2 und dI3-Neuronen vollständig fehlen. An ihrer Stelle werden Neuronen der Klasse B gebildet (Müller et al., 2005). Die für die Musterbildung im dorsalen Neuralrohr notwendigen Faktoren sind bisher jedoch nur teilweise bekannt und oft sind mehrere verschiedene proneurale Gene an der Bildung der einzelnen Neuronentypen beteiligt. In

Abb.1.1 ist ein Überblick über verschiedene, im dorsalen Neuralrohr exprimierte Transkriptionsfaktoren dargestellt, deren Expressionsmuster es erlaubt die unterschiedlichen Neuronentypen zu identifizieren.

Während die oben genannten bHLH-Faktoren zur Markierung der verschiedenen Vorläuferzellen benutzt werden können, werden verschiedene HD-Transkriptionsfaktoren in den einzelnen postmitotischen Neuronen exprimiert. *Lh2a/b* wird ausschließlich in dI1-Neuronen exprimiert, *Isl1 (Islet1)* in dI3-Neuronen und *Lbx1* in allen Klasse B-Neuronen. DI2-Neuronen exprimieren unter Anderem *Lim1/2*, jedoch nicht *Pax2*, was sie von den dI4 und dI6-Neuronen unterscheidet, die sowohl *Pax2* als auch *Lim1/2* exprimieren (siehe Abb.1.2). Zusätzlich zu den hier genannten sind noch weitere TF bekannt, deren Expression spezifisch für die unterschiedlichen Neuronentypen ist. Da sie jedoch für das Verständnis dieser Arbeit nicht entscheidend sind, werden sie nicht näher beschrieben.

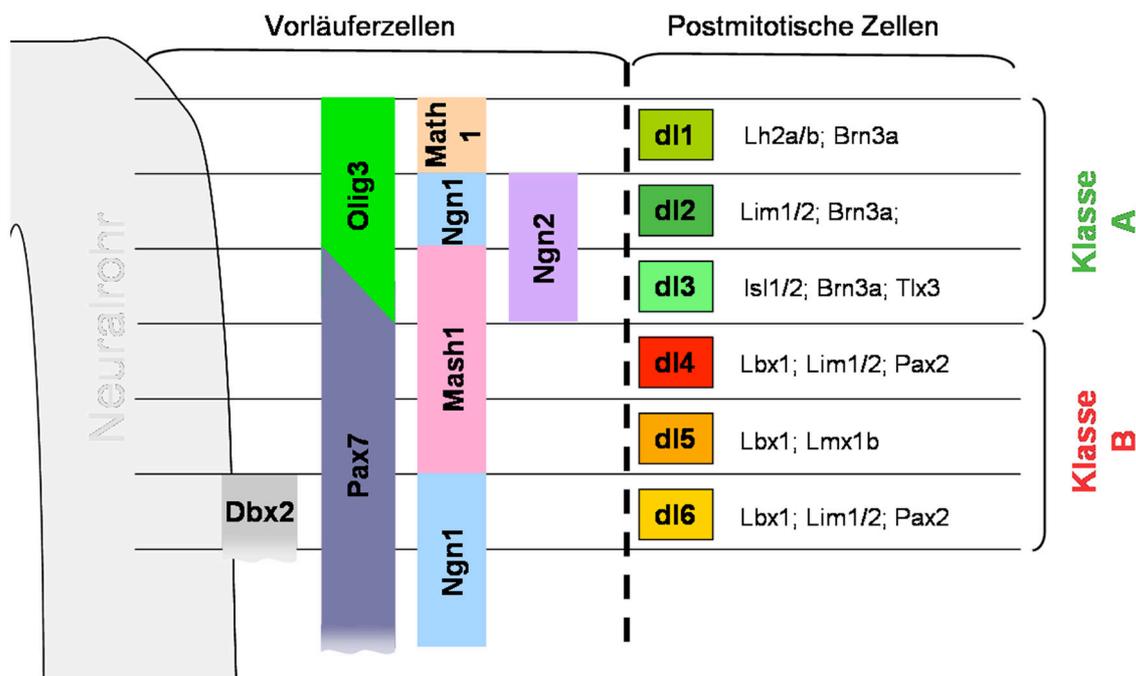


Abb.1.1: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der dorsalen Hälfte des Neuralrohrs. Im linken Teil sind die Vorläuferregionen in der ventrikulären Zone mit den Expressionsdomänen einiger bHLH- und HD-Transkriptionsfaktoren dargestellt. Im rechten Teil sieht man die postmitotischen Interneuronen und eine Auswahl an Markern, die es in Kombination ermöglichen, zwischen den einzelnen Neuronentypen zu unterscheiden (Abb. verändert nach Helms and Johnson, 2003 und Müller et al., 2005).

1.1.1.2 Das ventrale Neuralrohr

Während in der dorsalen Hälfte des Neuralrohrs sensorische Neuronen entstehen, werden im ventralen Bereich Motorneuronen sowie ventrale Interneuronen gebildet. Die ventrale Musterbildung ist in großem Maße abhängig von dem Signalmolekül Shh. Zunächst führt ein

Shh-Signal aus dem axialen Mesoderm, der Chorda dorsalis, zur Induktion von *Shh*-Expression im ventralen Signalzentrum des Neuralrohrs, der Bodenplatte. Überexpressionsanalysen und Inhibitorexperimente haben eindeutig gezeigt, dass das Vorhandensein eines ungestörten Shh-Signalweges für die Ausbildung der Bodenplatte und, im weiteren Verlauf, der ventralen Neuronentypen bzw. Vorläuferdomänen des Neuralrohrs notwendig ist. Das Shh-Signal von der Bodenplatte bildet einen nach dorsal gerichteten Gradienten aus und wirkt in konzentrationsabhängiger Weise als Morphogen auf die Entstehung der verschiedenen ventralen Vorläuferregionen ein. Innerhalb dieses Shh-Gradienten werden verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert, die entsprechend der lokal herrschenden Shh-Konzentration aktiviert oder inhibiert werden. Man unterteilt diese Faktoren in so genannte Klasse I- und Klasse II-Gene. Klasse II-Gene werden positiv von Shh reguliert, während Klasse I-Gene durch jeweils verschiedene Konzentrationen von Shh inhibiert werden. Durch weitere Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu dieser Shh-abhängigen Regulierung eine gegenseitige Inhibierung zwischen einzelnen Klasse I- und Klasse II-Genen besteht (Briscoe et al., 2000). Diese wechselseitige Reprimierung führt zu der Ausbildung von scharfen Expressionsgrenzen der einzelnen Faktoren. Diese Grenzen definieren die Unterteilung in fünf ventrale Vorläuferdomänen, pV3, pMN (Motorneuronen), pV2, pV1 und pV0, aus denen im weiteren Verlauf die verschiedenen Neuronentypen V3, MN, V2, V1 und V0 differenzieren. Während bisher drei Klasse II-Gene, *Nkx2.2*, *Nkx6.1* und *Olig2* identifiziert werden konnten, wurden *Pax7*, *Pax6*, *Dbx1*, *Dbx2* und *Irx3* den Klasse I-Genen zugeordnet (Novitsch et al., 2001; Briscoe et al., 2000) (siehe Abb.1.3). Mit Ausnahme von *Olig2*, einem bHLH-Transkriptionsfaktor, handelt es sich hierbei ausschließlich um HD-Transkriptionsfaktoren, was eine Einordnung von *Olig2* in die Gruppe der Klasse I-Gene nicht unumstritten machte. Es konnte gezeigt werden, dass *Nkx2.2* und *Pax6*, *Nkx6.1* und *Dbx2*, sowie *Irx3* und *Olig2* jeweils eine Klasse I / Klasse II-Paarung bilden und sich gegenseitig inhibieren (Novitsch et al., 2001; Briscoe et al., 2000). Ähnlich wie im dorsalen Teil des Neuralrohrs können auch im ventralen Bereich die einzelnen Neuronentypen durch die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Hier ist dies jedoch deutlich einfacher, da oftmals die Expression des jeweiligen Genes auf nur einen Neuronentyp beschränkt ist. So wird *Sim1* in V3-Neuronen exprimiert, *Isl1* und *MNR2* in Motoneuronen, V2-Neuronen exprimieren *Chx10*, V1-Neuronen *En1* (*Engrailed1*) und V0-Neuronen *Evx1* (*Even-skipped homologue1*) (Moran-Rivard et al., 2001; Briscoe et al., 2000; Tanabe et al., 1998; Matisse und Joyner, 1997; Ericson et al., 1992; Bastian und Gruss, 1990). Eine Übersicht ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

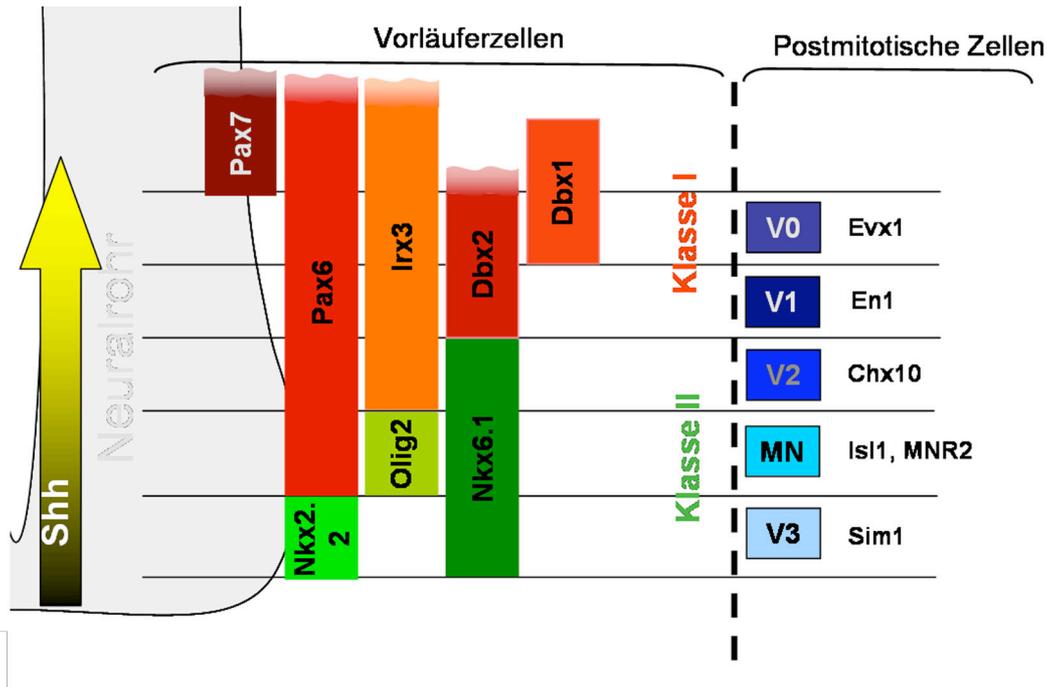


Abb.1.2. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht über die ventrale Hälfte des Neuralrohrs. Die Vorläuferregionen der ventrikulären Zone und die Expression der verschiedenen proneuralen HD und bHLH-Faktoren sind in der linken Hälfte abgebildet, während rechts die postmitotischen Neuronen und die Marker, deren Expression die verschiedenen Neuronentypen definiert, dargestellt sind.

1.2 Die *Iroquois*-Gene

Man findet die *Iroquois* (*Iro/ Irx*)-Gene in allen mehrzelligen Organismen vom Nematoden bis zum Mensch (Perovic et al., 2003), wo sie bei verschiedenen Aspekten der Musterbildung während der Entwicklung eine Rolle spielen (Cavodeassi et al., 2001).

Die *Iroquois*-Proteine gehören zur Familie der Homeodomänen (HD)-Transkriptionsfaktoren (TF). Sie alle haben eine hoch konservierte HD von 63 Aminosäuren (aa), die im Gegensatz zu beispielsweise der Hox-TF (60 aa) einen zusätzlichen 3 aa langen Loop (Schleife) ausbildet, was zur Einordnung der *Iroquois*-Proteine in die Familie der Tale TF führte (Bürglin, 1997). Neben der HD gibt es einen zweiten, 13 aa langen Bereich mit hoher Homologie zwischen den einzelnen *Iroquois*-Faktoren, die so genannte *Iro-Box*. Deren Funktion ist nicht eindeutig geklärt, man nimmt jedoch an, dass sie der Protein-Protein-Interaktion dienen könnte (Cavovassi et al., 2001; Bürglin 1997; McNeill et al., 1997). Außerhalb dieser beiden konservierten Bereiche findet man nur wenig Homologie und auch keinerlei bekannte Domänenstrukturen (siehe Abb.1.1).

Zuerst entdeckt wurden die *Iroquois* (*Iro*)-Gene in *Drosophila*, als man mit Hilfe einer großen Anzahl von Mutagenese-Experimenten nach Genen suchte, die eine Rolle bei der

Entwicklung der äußeren sensorischen Organe spielen. Dabei stieß man auf eine Mutante, der die lateralen Borsten auf dem Rücken fehlten und es konnte gezeigt werden, dass die Mutation den *Iro*-Lokus betraf, in dem die *Iro*-Gene *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*) in einem Genkomplex (Cluster), *IroC*, organisiert liegen. Der Phänotyp der mutanten Fliegen erinnerte stark an die Haartracht der Iroquois-Indianer – auch als Irokesen bekannt - und war namensgebend für den Locus. Man fand heraus, dass der Verlust der lateralen Borsten auf die fehlende Expression der proneuralen Gene des *achaete-scute* (*as-sc*)-Komplexes (*AS-C*) zurückzuführen war. Dieser Komplex setzt sich aus vier Genen zusammen, die für bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-Transkriptionsfaktoren kodieren, und von denen zwei - *achaete* und *scute* - als essentiell für die Borstenbildung bestimmt worden waren (Romani et al., 1990; Garcia-Bellido, 1979). Die Expression dieser Gene ist normalerweise im Epithel der Imaginalscheibe lokalisiert, woraus sich später das laterale Notum entwickelt. Ohne die Expression des *as-sc*-Komplexes werden keine Vorläuferzellen der sensorischen Organe (sensory organ precursor cells) gebildet und somit im weiteren Verlauf auch keine lateralen Borsten entwickelt. Diese Befunde gaben den Hinweis, dass der *IroC*-Lokus für Faktoren kodiert, die die Expression des *AS-C* ermöglichen oder initiieren (Cavodassi et al. 2001; Gomez-Skamerta et al, 1996). Neben dieser Funktion wird für die Iroquois-Proteine eine zweite wichtige Rolle während der Entwicklung von *Drosophila* beschrieben. So ist der *IroC*-Komplex während der frühen Embryonalentwicklung essentiell für Entwicklung und Musterbildung der Augen-/Antennen-Imaginalscheibe, aus der sich im weiteren Verlauf die Augen, große Teile der Kopfstrukturen sowie die Antennen bilden (Cavodassi et al., 1999). In *Xenopus*, Huhn, Maus und Mensch konnten jeweils sechs *Iroquois* (*Irx*)-Gene identifiziert werden (Bruneau et al., 2001; Garriok et al., 2001; Ogura et al, 2001; Bosse et al., 1997, 2000; Cohen et al., 2000; Christoffels et al., 2000; Peters et al., 2000; Gomez-Skarmeta et al., 1998; R. Dildrop, mündliche Mitteilung).

Sie sind in zwei Komplexen (Cluster) auf zwei verschiedenen Chromosomen organisiert. Der *IrxA*-Cluster setzt sich aus *Irx1*, 2 und 4 zusammen und ist auf Chromosom 5 im Mensch bzw. Chromosom 13 in der Maus lokalisiert. Auf Chromosom 16 (Mensch) bzw. 8 (Maus) findet sich der *IrxB*-Cluster, in dem die Gene *Irx3*, 5 und 6 organisiert sind (Peters et al., 2000). Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass die beiden Cluster durch ein chromosomales Duplikationsereignis aus ursprünglich einem Cluster entstanden sind. So sind sich die *Irx*-Proteine des *IrxA*- und des *IrxB*-Clusters in großem Maße ähnlich, wobei die größte Übereinstimmung zwischen *Irx1/Irx3*, *Irx2/Irx5* und *Irx4/Irx6* gefunden werden kann, so dass man hier von paralogen Genen spricht (Peters et al., 2000).



Abb.1.3 Vergleich der Proteinsequenzen der einzelnen murinen Irx-Proteine. Der Vergleich wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt. Die paralogen Irx sind jeweils in der gleichen Farbe dargestellt. Bereiche mit mindestens 50% Homologie sind in grau hinterlegt. Die Homeodomäne ist in gelb hinterlegt, die Iro-Box in grün.

Weiterhin ist die Orientierung des Leserasters bei den Paralogen identisch und man findet zumindest in einigen Geweben sehr ähnliche Expressionsmuster, was auf eine Duplikation der regulatorischen Elemente hinweist (Houweling et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass sich die *Irx*-Proteine der Vertebraten untereinander mehr ähneln als sie es im Vergleich zu den *Drosophila* *Iro*-Proteinen tun, und die Leserasterorientierung in *Drosophila* von der der Vertebraten abweicht, kann man davon ausgehen, dass die *Irx/Iro*-Cluster-Organisation von jeweils drei Genen in Vertebraten und Insekten durch unabhängige Duplikationsereignisse entstanden ist (Ogura et al., 2001; Peters et al., 2000; Gomez-Skamerta et al., 1996).

Die *Irx*-Gene werden in der Embryonalentwicklung der Maus an vielen verschiedenen Orten exprimiert. Dabei zeigen sie oft ein teilweise oder auch vollständig überlappendes Expressionsmuster. Man findet ihre Expression unter anderem in den sich entwickelnden Gliedmaßen, im Herz, im Neuralrohr, im Gehirn, in einigen kraniofazialen Strukturen, in der Dermis, den Lungen, der Niere sowie in den Augen (Houweling et al., 2001).

Dieses Expressionsmuster in der Maus lässt vermuten, dass die *Irx*-Gene unterschiedliche Prozesse der Entwicklung beeinflussen könnten. Bislang konnten einige der Rollen, die die *Irx*-Gene in der Entwicklung spielen, aufgedeckt werden. So konnte für *Xiro1*, das *Xenopus*-Homolog von *Iroquois1*, gezeigt werden, dass es während der frühen Entwicklung als Übermittler des Wnt-Signalweges reprimierend auf *Bmp4* im dorsalen Ektoderm wirken kann und somit eine entscheidende Rolle bei der Neurogenese spielen könnte (Gomez-Skamerta et al., 2001). Überexpressionsstudien im Huhn zeigten, dass *Irx2* bei der Organisation der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze mitwirken könnte (Matsumoto et al., 2004). Ebenfalls im Huhn konnte demonstriert werden, dass durch die gegenseitige Inhibierung von *Six3* und *Irx3* im Bereich der *Zona limitans intratalamica* (*Zli*) das Vorderhirn in eine anteriore und eine posteriore Region unterteilt wird (Kobayashi et al., 2002). Des Weiteren zeigen alle sechs *Irx*-Gene ein spezifisches Expressionsmuster im sich entwickelnden Herzen (Christoffels et al., 2002; Mummehoff et al., 2001; Bruneau et al., 2000). Verschiedene Analysen zeigten, dass *Irx4* eine kritische Rolle bei der Herzkammer-spezifischen Genexpression spielt, indem es die Expression der ventrikel-spezifische Isoform des Myosin-heavy-Chain-Gens (*vMHC*) aktiviert und gleichzeitig die Expression der atrien-spezifischen Isoform, *aMHC*, im Ventrikel inhibiert (Bruneau et al., 2000; Bao et al., 1999). Zusätzlich fand man heraus, dass *Irx4*^{-/-}-Mäuse im adulten Zustand eine Kardiomyopathie entwickeln (Bruneau et al., 2000) und *Irx5* für die Ausbildung des ventrikulären Repolarisations-Gradienten benötigt wird (Costantini et al., 2005). Experimente in der Ratte geben zudem den Hinweis, dass die *Irx*-Gene auch bei Ausbildung der proximo-distalen Differenzierung des Lungenepithels eine Rolle spielen (van

Tuyl et al., 2006). Weiterhin werden alle *Irx*-Gene in den postmitotischen Ganglienzellen der Retina exprimiert und in *Irx5*^{-/-}-Mäusen kommt es zu einer Fehlentwicklung der bipolaren Zapfenzellen des Auges (Cheng et al., 2005). Auch im sich entwickelnden Neuralrohr zeigen alle *Irx*-Gene bis auf *Irx4* ein spezifisches Expressionsmuster (Houweling et al., 2001) und *Irx3* wurde in die Gruppe der Klasse I-Gene eingeordnet, wo es durch die gegenseitige Inhibierung mit *Olig2* an der Definition der Motorneuronenvorläuferdomäne beteiligt ist (Novitch et al., 2001; Briscoe et al., 2000; siehe Abb.1.2).

Die oben genannten Befunde geben den starken Hinweis, dass die *Irx*-Gene in Vertebraten entscheidende Entwicklungsprozesse kontrollieren könnten. Eine genaue Funktionsanalyse der *Irx*-Gene gestaltet sich jedoch oftmals schwierig, da die bisher generierten Knockout-Modelle der einzelnen *Irx*-Gene oftmals nur einen sehr milden Phänotyp zeigten (van Tuyl et al., 2006; Bruneau et al., 2005; Lebel et al., 2003). Dieses lässt sich durch die große Homologie der *Irx* zueinander erklären, wodurch eine funktionelle Redundanz sehr wahrscheinlich ist. Daher ist bisher nur sehr wenig über ihren genauen Wirkungsmechanismus bekannt, zumal es bisher noch nicht gelungen ist, direkte Zielgene der Iroquois-Transkriptionsfaktoren zu identifizieren.

Einen guten Hinweis diesbezüglich gibt die Arbeit von Biloni et al. (2005), in der es gelang, die Iroquois-Binde-Stelle (IBS) für das *Drosophila* Iro-Homolog mirr zu identifizieren. DNA-Bindungsstudien zeigten, dass die acht Basenpaar lange Sequenz von ACAnnTGT die Erkennungssequenz für die Iro-Proteine darstellt und auch von dem Vertebraten-Homolog *Irx4* erkannt wird. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass eine Mutation innerhalb der IBS von ACAnnTGT zu ATAnnTAT zu einem vollständigen Verlust der Bindung führt (Biloni et al., 2005).

Um die Rolle der *Irx*-Gene weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Neuralrohr als System zur Analyse der *Irx*-Funktion benutzt. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt. Initial wurde die bereits zuvor begonnene Analyse der Musterbildung des Neuralrohrs in *Ft/Ft*-Embryonen, in denen unter anderem der gesamte *IrxB*-Cluster deletiert ist (siehe 1.3), fortgesetzt. Weiterführend wurden dann Überexpressionsstudien im sich entwickelnden Neuralrohr von Hühnerembryonen durchgeführt, wobei alle Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene berücksichtigt wurden. Das Neuralrohr stellt ein sehr gut beschriebenes System dar, so dass es möglich ist, auch kleine molekulare Veränderungen anhand der Analyse der Expressionsmuster einer Vielzahl von Markern zu verfolgen.

1.3 Die *Fused toes* Mausmutante

Bei der *Fused toes* (*Ft*) Mutation handelt es sich um eine dominante Mutation, die durch eine Transgen-Insertion hervorgerufen wurde. Dabei entstand eine ca. 1,6 Mb große Deletion auf Chromosom 8 (van der Hoeven et al., 1994), die neben drei bis dahin unbekannt Genen – *Fts*, *Ftm* (*Fantom*) und *Fto* (*Fatso*) – auch die Gene des *IrxB*-Clusters – *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* – umfasst (Peters et al., 1999, 2000). In heterozygotem Zustand prägt sich die Mutation in einer deutlichen Fusion der Finger 1-4 der Vorderpfoten (Syndaktylie), was namensgebend für die Mutation war, sowie in einer Thymus-Hyperplasie aus (Heymer und Rütter, 1999; Volkmann et al., 1996; van der Hoeven et al., 1994). In homozygotem Zustand ist die *Ft*-Mutation um den Entwicklungszeitpunkt E12.5 bis E14.5 embryonal letal und führt zu einer Entwicklungsverzögerung der betroffenen Embryonen (van der Hoeven et al., 1994). Der zu beobachtende Phänotyp ist wesentlich stärker als der der heterozygoten Embryonen und zeigt sich in Missbildungen der kraniofazialen Strukturen, der Gliedmaßen, dem Verlust der Rechts-Links-Asymmetrie und einer Vergrößerung des Perikards. Außerdem kommt es in *Ft/Ft*-Embryonen zu dem Verlust der *Shh*-Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs und somit zu einer Desorganisation der dorso-ventralen Musterbildung im Neuralrohr (Götz et al., 2005, Peters, 2002). Aufgrund des Neuralrohr-spezifischen Expressionsmusters der Gene des *IrxB*-Clusters gibt die Analyse des Neuralrohrphänotyps von *Ft/Ft*-Embryonen die Möglichkeit, Hinweise über die Funktion der *Irx*-Gene im Neuralrohr zu erhalten.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die oben genannten bisherigen Erkenntnisse zeigen, dass die *Iroquois*-Gene in Invertebraten und Vertebraten an entscheidenden Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Trotzdem ist es bisher nicht gelungen, ihren genauen Wirkungsmechanismus aufzudecken. Ein entscheidender Schritt wäre zum Beispiel, Zielgene der *Irx*-Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Die bisherigen Hinweise über die Funktion der *Irx*-Gene wurden oftmals durch Überexpressionsstudien gesammelt, da die dort erhaltenen Effekte oft eindeutiger waren, als es durch die Analyse von Knock-out-Modellen gelang. Dieses kann durch die postulierte Redundanz der *Irx* zueinander begründet werden, wodurch der Phänotyp eines Einzel-Knock-outs oftmals sehr mild ausfällt. So konnte beispielsweise durch Überexpression von *Irx2* im Huhn gezeigt werden, dass *Irx2* für die Etablierung der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze wichtig sein könnte (Matsumoto et al., 2004), während *Irx2*^{-/-}-Mäuse keine Veränderung dieser Grenze aufweisen (Lebel et al., 2003). Aufgrund der oft überlappenden Expression in verschiedenen Geweben während der Entwicklung und der hohen Konservierung der *Irx*-

Proteine ist es jedoch wahrscheinlich, dass die *Irx*-Faktoren zusammen betrachtet wichtige Funktionen während unterschiedlicher Entwicklungsprozesse einnehmen können. Sie könnten zusammen demnach größeren Einfluss auf die Entwicklung nehmen, als es die Einzel-Knock-out-Modelle vermuten lassen. Um die Funktion und auch die funktionelle Redundanz der *Irx*-Gene weiter zu analysieren wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurde der Neuralrohrphänotyp von *Ft/Ft*-Embryonen fortführend zu den Ergebnissen der vorangegangenen Diplomarbeit (Götz, 2002) analysiert. Die *Ft*-Mutation bietet die Möglichkeit, die funktionelle Redundanz der *Irx* eventuell zu umgehen, da hier der gesamte *IrxB*-Cluster betroffen ist (siehe 1.3). Die so gewonnenen Hinweise über die mögliche Funktion der betroffenen *Irx*-Gene können in Folge durch Überexpressionsanalysen im Huhn weiter verfolgt werden. Hierbei sollten durch *in ovo* Elektroporation in das Neuralrohr jedoch alle Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene berücksichtigt und die Konsequenz der Überexpression der *Irx*-Gene für die dorso-ventrale Musterbildung analysiert werden. Anhand der so gewonnenen Ergebnisse besteht die Möglichkeit, potentielle Kandidaten für direkte Zielgene der *Irx* zu identifizieren und diesbezüglich weiter zu analysieren.

2. Material und Methoden

Alle im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden, soweit nicht speziell erwähnt, von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Fluka, New England Biolabs (NEB), Merck, Riedel de Haen, Roche Molecular Biochemicals, Roth und Sigma bezogen. Die Verwendung der erforderlichen Lösungen, Puffersysteme und Spezialchemikalien wird bei den einzelnen Methoden genauer beschrieben. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines Wasser aus einer hauseigenen Millipore-MilliQ-Anlage verwendet. Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C, 2 bar für 30 min., Filtrieren oder durch trockene Hitze bei 180°C für 30 min. sterilisiert.

Alle eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien, soweit nicht bei den einzelnen Versuchen erwähnt, werden in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendet.

2.1 Häufig verwendete Lösungen

Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE	-Merck #14277
DEPC-H₂O	H ₂ O + 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gelöst; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30 min.	
Ethidiumbromid	10 mg/ml	- Applichem #A1152
EDTA	0,5 M; pH 8.0	
50% Formamid	50% (v/v) Formamid 50% (v/v) DEPC-H ₂ O	
LiCl	4 M	

Natriumacetat	3 M; pH 5,2
Phenol/Chloroform	3:1; TE gesättigt
Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS
PBS	4mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7.3 autoklaviert, 121°C, 2bar; 30 min.
PBT	PBS +1% (v/v) Tween 20
TAE	40 mM Tris/Acetat 2 mM EDTA pH 8.2
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8.0
Ethanol	70% in H ₂ O
Ethanol	100%

2.2 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die zur Spaltung der DNA verwendeten Restriktionsenzyme wurden im Allgemeinen von Roche oder NEB bezogen und zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Pro μg DNA wurden 1-10 U Enzym in 1x Enzympuffer verwendet und 1-2 Stunden bei 37° inkubiert. Für einige Enzyme war eine andere Inkubationstemperatur zu wählen, die den Angaben des Herstellers entnommen wurde. Anschließend wurde der Restriktionsansatz in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5). Bei der Linearisierung von Plasmiden für die Ganzkörper („Whole mount“) *in situ* Hybridisierung (siehe 2.156.1) und die *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten (siehe 2.15.5) wurde ein Aliquot des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel überprüft. Mit dem Rest wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.6) mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt.

2.3 Dephosphorylierung von DNA

Wurde Vektor-DNA, die für eine Klonierung weiter verwendet wurde, mit nur einem Restriktionsenzym gespalten, so wurde diese im Anschluss mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (NEB) behandelt. Dadurch wurde ein unerwünschtes Religieren der erzeugten komplementären Enden stark vermindert. In der Regel wurde dem Restriktionsansatz 1 μl der alkalischen Phosphatase zugesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und darauf folgender Ethanol-Fällung (siehe 2.4) oder durch eine Gelelektrophorese (siehe 2.5) und anschließender Gelextraktion (siehe 2.6) inaktiviert und gleichzeitig die DNA aufgereinigt.

2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung

Bei den aufzureinigenden Proben wurden zur Extraktion der Proteine aus den Nukleinsäurelösungen eine Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurden die Proben zunächst mit Wasser auf 100 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform zugegeben und gründlichen durchmischt. Zur Phasentrennung wurde kurz zentrifugiert (5 min. 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13), die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die proteinhaltige Interphase sowie die organische Phase wurden verworfen. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,1 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen Ethanol (abs.) zugegeben und 20 min. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 13000 Upm sedimentiert, mit 500 μl Ethanol (70%) gewaschen, kurz zentrifugiert und der Überstand

vollständig abgesaugt. Nachdem der Niederschlag an der Luft getrocknet war, wurde er in einem angemessenen Volumen TE oder Wasser aufgenommen.

Lösungen: **Natriumacetat** 3 M; pH 5,2

2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Als Gel sowie als Laufpuffer wurde das TAE-Puffersystem eingesetzt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8 – 2% (w/v) (Agarose, Applichem #A1091) verwendet. Der aufgekochten Agaroselösung wurden 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und die zu analysierenden Proben vor Beladung des Gels mit 0,2 Volumen DNA-Auftragspuffer vermischt.

Zur späteren Größen- und Mengenabschätzung der DNA-Fragmente wurden außerdem folgende, ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer vermischt und restriktionsenzymatisch gespaltene DNA als Längenstandard aufgetragen:

1kb-DNA-Leiter: 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054;
2036; 1636; 1018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp
(GibcoBRL #15615-024)

λ-Hind III: 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 bp
(Stratagene #201109)

Marker VIII: 19; 26; 34; 34; 37; 67; 110; 124; 147; 190; 242; 320; 404; 489; 501;
692; 900; 1114 bp
(Roche #11336045001)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte schließlich bei einer konstant gehaltenen Spannung von 5 Volt/cm bei Raumtemperatur. Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert.

2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierenden DNA-Fragmente konnten durch das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und wurden möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurde das „Jet SorbKit“ (GENOMED, # 110600)

bzw. das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, #28704) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde mit TE-Puffer aus der Glasmilchlösung bzw. vom Filter gelöst und konnte anschließend direkt weiter verwendet werden. Zur Überprüfung der Qualität und Konzentration der isolierten DNA wurde mit einem Aliquot eine Gelelektrophorese (siehe 2.5) durchgeführt.

2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente mit kohäsiven oder glatten Enden aneinander zu fügen, wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Dazu wurden die aufgereinigte Vektor- und die einzufügende DNA in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:3 eingesetzt. Für einen 20µl Ansatz wurden 2µl 10x Ligase-Puffer und 1µl T4-Ligase (NEB, # MO202S) zugegeben und entsprechend mit Wasser auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 14-16°C für 12-24 Stunden oder für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Hälfte des Ansatzes konnte im Anschluss für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt werden (siehe 2.8), der Rest wurde bei 4°C gelagert.

2.8 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Als bakterieller Wirt wurde der *Escherichia coli* Stamm JM109 (recA1, lacZΔM15) verwendet. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue, H. et al. (1990). Zunächst wurde mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokkulum für eine 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Die Inkubation erfolgte hier bei Raumtemperatur bis eine $OD_{600} = 0,93$ erreicht war. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min. auf Eis gestellt, 10 min. bei 2500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R), 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Bakteriensediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren 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 erfolgte die Aliquotierung der Zellen in 200 µl Portionen und, nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff, die Lagerung bei –80°C.

Lösungen:	LB-Medium	1% (w/v) NaCl	
		1% (w/v) Trypton	-Applichem #A1553
		0,5% (w/v) Hefe-Extrakt	-Applichem #A1552
		in H ₂ O	
		autoklaviert, 121°C, 2 bar, 30 min.	

SOB-Medium	2% (w/v) Trypton 0.5% Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 6.7-7	-Applichem #A1553 -Applichem #A1552
TB-Puffer	10 mM PIPES 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl pH 6.7	

2.8.2 Transformation

Für die Transformation wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der Plasmid-DNA (20-100 ng) für 15 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien einem kurzem Hitzeschock (5 min. 37°C) ausgesetzt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 30-45 min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgend wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert (3 min., 6000 Upm; Heraeus Biofuge 13), das Sediment in ungefähr 200 µl LB-Medium resuspendiert und die Suspension in Abhängigkeit der für das verwendete Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die herangewachsenen Bakterienkolonien transformierter Zellklone wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, welche hauptsächlich der Analyse der Klone dienten und die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA ermöglichten.

Lösungen: LB-Medium

Nährböden	1.5% (w/v) Bacto-Agar 50 µg/µl Ampicillin oder 25 µg/µl Kanamycin in LB-Medium	-Applichem #A0949 -Applichem #A0839 -Applichem #A1493
------------------	---	---

2.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die im Folgenden beschriebenen Methoden stellen Modifikationen der Methode der alkalischen Lyse von Birnboil und Doly (1979) und Birnboil (1983) dar.

2.9.1 Plasmid-Mini-Präparation

Es wurden jeweils 2 ml Selektionsmedium mit je einer Bakterienkolonie angeimpft und für minimal 6 Stunden, maximal über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden in Reaktionsgefäße überführt, 3 min. bei 6000 Upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 100 µl kalter Lösung I vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und erfolgreicher alkalischer Lyse wurden die Proben durch Zugabe von 150 µl kalter Lösung III neutralisiert. Die entstandenen Niederschläge wurden sedimentiert (10 min.; 13200 Upm; Heraeus Biofuge 13) und die klaren, plasmidhaltigen Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur Präzipitation der enthaltenen Nukleinsäuren wurden 350 µl kalter Isopropanol (abs.) zugegeben und erneut bei 13200 Upm für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, der Niederschlag mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und wiederholt zentrifugiert (2 min.; 13200 Upm, Heraeus Biofuge 13). Zuletzt wurde der Überstand vollständig abgesaugt, das Sediment kurz an der Luft getrocknet und in 30-40 µl TE aufgenommen. 2 µl der resuspendierten DNA wurden zur Kontrolle für die restriktionsenzymatische Spaltung (siehe 2.2) eingesetzt und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5).

Lösungen:

LB-Medium

Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin in LB-Medium	-Applichem #A0839 -Applichem #A1439
-------------------------	--	--

Lösung I	25 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A pH 8.0
-----------------	---

Lösung II	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
------------------	----------------------------

Lösung III	294,5 g Kaliumacetat 110 ml Eisessig auf 1l H ₂ O pH 5.5
-------------------	--

2.9.2 Plasmid-Maxi-Isolation

Zur Gewinnung größerer Mengen (100 µg – 1 mg) Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurde das „QIAGEN Plasmid Kit“ („Midi“ bis 100 µg –QIAGEN GmbH #12145/ „Maxi“ bis 500 µg – QIAGEN GmbH #12163) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Für eine Plasmid-Maxi-Isolation wurden zunächst je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge 50 oder 100 ml Selektionsmedium mit einem Teil der zuvor analysierten Bakteriensuspension der Plasmid-Mini-Isolation angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht auf einem Plattformschüttler bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch (siehe 2.13) bestimmt. Die Qualität der DNA wurde restriktionsenzymatisch (siehe 2.4) und gelelektrophoretisch (siehe 2.5) analysiert.

2.10 Isolierung von DNA aus embryonalen Membranen

Hierzu wurden die extraembryonalen Membranen der zu analysierenden Mausembryonen mit 200 µl Lyse-Puffer und 10 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 66 µl gesättigter Kochsalzlösung und kurzem Schütteln wurden die Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation (10 min., 13200 Upm; Heraeus Biofuge 13) sedimentiert. 200 µl des Überstands wurden vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA mit 133 µl Isopropanol vermischt. Nach kurzem Schütteln und Zentrifugation bei 13200 Upm für 5 min. (Heraeus Biofuge 13) wurde der Überstand abgesaugt, die sedimentierte DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (2 min. 13200 Upm; Heraeus Biofuge 13). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt, der Niederschlag kurz an der Luft getrocknet und die DNA in 40-60 µl TE resuspendiert. Die erhaltene genomische DNA konnte direkt für weiterführende Analysen eingesetzt oder bei 4°C gelagert werden.

Lösungen:

Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8.0
	100 mM EDTA, pH 8.0
	100 mM NaCl
	1% (w/v) SDS

Proteinase K

Gesättigte Kochsalzlösung

Isopropanol

2.11 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen

Frisches oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagertes Material wurde gewogen und mit 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 100 mg Gewebe versetzt. Die Proben wurden im Polytron (Stufe 4, Kinematica AG, Luzern) homogenisiert und entsprechend den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Bei kultivierten Zellen wurde 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 10 cm² er Kulturschalen verwendet und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Danach folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (s. 2.4). Das RNA-Sediment wurde dann nach Lufttrocknung in einem angemessenen Volumen DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Alternativ wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, # 74104) entsprechend den Angaben des Herstellers zur RNA-Isolierung verwendet und die gewonnene RNA ebenfalls bei -80°C gelagert.

Lösungen : **TRIZOL Reagenz** - GibcoBRL #15596
 Chloroform
 Isopropanol

2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

dsDNA	=	50 $\mu\text{g/ml}$
RNA	=	25 $\mu\text{g/ml}$

2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.13.1 Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5` nach 3`)
Ft	GTCCTTTCTCCATGGGTATG
Ft/Wt	CTGAAAGGTTGTA CTGAGCC
Wt	GTGGAACCCCTTCTGTACATG
F1_OligBox	AATGAATTCGCTAGCTAGCTAGTGCAGCCTGGTTGCTGCCTACAGT
B1_OligBox	AATGAATTCGCTAACTAGTTCCCCAGCCCTCCTGGCGTCCATA
MutBox_F1	GAAAGGTT CATATATATTCAGCCTTAC
MutBox_B1	GTAAGGCTGAATATATATGAACCTTTC
O3_CNE+21_F1	GCATCTAGAGAACGGAACATGTCCGTGAG
O3_CNE+21_B1	GCAGCTAGCGGAAACCATGGAAGTTAAGAC
O2_CNE-73_F1	GCATCTAGACGCTGAGAGAGACTGGAGGTG
O2_CNE-73_B1	GCAGCTAGCGAAATACACAGAGTGGTACTG
Zef_Obox_F2	GCATCTAGATTT CAGTTGGAGGGAAGATTAG
Zef_Obox_B1	GCAGCTAGCCACTCACTCTCACCTTG
Mus_O21_F1	GCATCTAGACTGTGAGAGAGTGACAGA
Mus_O21_B1	GCAGCTAGCCGAGGCAGTTGCAGGTGA
F1_O3box	TTGCTAGCTCATGTCTTCTCTTGAGCTCTGGTCC
B1_O3box	TTACTAGTTTAGAAGCCACGGTATGTTTCGACTGG
22040 F (Bereich B)	TTTCTAGAAATGCCTACATAGAGGGTGA
22040 R (Bereich B)	AAGCTAGCCCGTGGGTCAGCACTAATAA
14180 F (Bereich A)	TTTCTAGAGCTTAGCCCCTAAATGGATAC
14180 R (Bereich A)	AAGCTAGCTCAAACGCATTGGAGGAAAC
53770 F (Bereich C)	TTTCTAGACACTCTTGCCAAGGATCTCAC
53770 R (Bereich C)	AAGCTAGCGAGTCACTGAGCAGTACTCAG

2.13.2 PCR-Amplifikation

Alle PCR-Reaktionen wurden in Eppendorf- (Mastercycle-Gradient bzw. Mastercycler personal) oder MWG- (Primus 25) Maschinen unter Verwendung von dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Als Enzym wurde die *Taq*-Polymerase (GoTaq, Promega oder die im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere hergestellte) mit dem dazugehörigen Puffersystem verwendet.

Im Allgemeinen wurde ein 20µl-PCR-Ansatz gewählt, in dem jeweils 0,2 µl *Taq*-Polymerase (2U), 2 µl 10x Reaktionspuffer bzw. 4µl 5x Reaktionspuffer, 25 pmol dNTP-Gemisch und jeweils 20 pmol der spezifischen Oligonukleotide enthalten waren.

Standardmäßig wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der DNA-Fragmente gewählt:

1x	2 min., 94°C				
22-35x	<table> <tr> <td rowspan="3">}</td> <td>10 sec., 94°C</td> </tr> <tr> <td>30 sec., 56°-60°C</td> </tr> <tr> <td>30 sec., 72°C</td> </tr> </table>	}	10 sec., 94°C	30 sec., 56°-60°C	30 sec., 72°C
}	10 sec., 94°C				
	30 sec., 56°-60°C				
	30 sec., 72°C				
1x	7 min., 72°C				

Anschließend wurden die PCR-Reaktionen bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung (s. 2.6) bei 4°C gelagert.

Lösungen:

dNTP-Gemisch	10 mM dATP - Roche #1969064
	10 mM dCTP
	10 mM dGTP
	10 mM dTTP

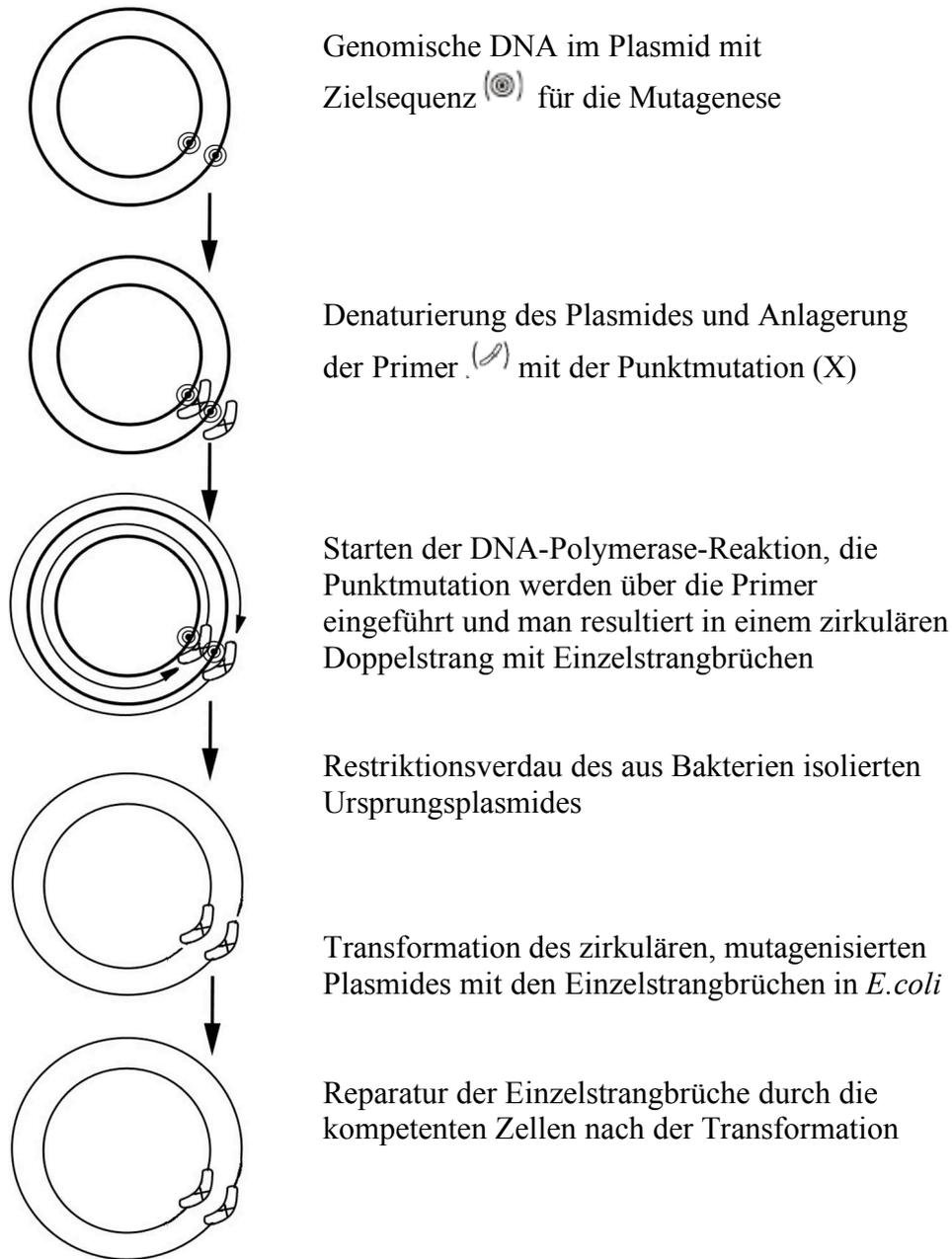
Oligonukleotide 100 pmol/µl in H₂O - MWG-Biotech

H₂O autoklaviert; 121°C, 2 bar, 30 min.

2.13.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das „Expand Reverse Transcriptase“-System (Roche #1785834) verwendet. Es wurden 100 ng - 2 µg Gesamt-RNA und 25 pmol *Oligo(dT)*-Oligonukleotide eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Alle Inkubationsschritte wurden in PCR-Maschinen durchgeführt und die Reaktionen anschließend bei 4°C gelagert. Für die anschließende PCR-Amplifikation (s. 2.13) wurde 1 µl des 20 µl-Ansatzes verwendet.

2.13.4 Mutagenese – gezielter Austausch einzelner Basen



Legende

-  Ursprungsplasmid
-  Primer mit Punktmutation
-  Mutagenisiertes Plasmid

Entnommen aus dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit INSTRUCTION MANUAL, STRATGENE

Um die gewünschten Punktmutationen in die Sequenz des Olig2_CNE-34 einzuführen wurde analog den Anweisungen des „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit INSTRUCTION MANUAL“ (STRATAGENE) vorgegangen.

Dazu wurden Oligonukleotide, die jeweils komplementär zu den gegenüberliegenden Einzelsträngen der Zielsequenz waren und zwei Basenaustausche im Vergleich zur Ursprungssequenz trugen, benutzt. So wurde in einer PCR-Reaktion, in der das Ursprungsplasmid als Template eingesetzt wurde, durch die Anlagerung der „Mutations-Oligonukleotide“ und die Verlängerung durch die *Taq*-DNA-Polymerase (Triple-Master-PCR-System, Eppendorf #0032008.216) wieder ein zirkulärer Strang hergestellt. In den darauf folgenden Zyklen der PCR entstand so ein doppelsträngiges Plasmid, welches auf beiden komplementären Strängen die jeweiligen Punktmutation trug, jedoch ebenfalls auf jedem Strang einen Einzelstrangbruch aufwies.

Da das Ursprungsplasmid durch eine DNA-Präparation aus *E.coli* gewonnen und dort *dam* methyliert wurde, konnte die Ursprungs-DNA durch einen Restriktionsverdau (siehe 2.3) mit *DpnI* in mehrere kleine Stücke zerschnitten werden. Dabei wurde ausgenutzt, dass *DpnI* spezifisch die methylierte Erkennungssequenz schneidet, während das in der PCR entstandene, mutagenisierte Plasmid nicht methyliert vorlag und somit unbeschadet blieb. Mit dem so aufgereinigten, mutagenisierten Plasmid „*Olig2_CNE-34*“ wurde eine Transformation in kompetente Zellen durchgeführt (siehe 2.8). Die kompetenten Bakterien besitzen die Fähigkeit die noch vorhandenen Einzelstrangbrüche zu reparieren, so dass die aus den Bakterien aufgereinigte DNA (siehe 2.9) als zirkuläres Plasmid ohne Brüche vorlag.

Im Anschluss an die Transformation wurde der Ansatz auf eine Agarplatte ausplattiert und von den gewachsenen Einzelkolonien wurden am nächsten Tag Mini-Kulturen angeimpft.

Die aus der DNA-Präparation (siehe 2.8) gewonnene Plasmid-DNA wurde zunächst restriktionsenzymatisch überprüft. Hierbei konnte ausgenutzt werden, dass durch die Punktmutationen die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NdeI* zerstört wurde, und somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen möglichen Resten des Ursprungsplasmides und des gewünschten mutierten Plasmides bestand.

Von den positiven Klonen wurden zwei zur Sequenzierung (siehe 2.14) an das BMFZ gegeben, um die korrekte Etablierung der Punktmutationen zu überprüfen.

PCR-Bedingungen für die Mutagenese

1x	2 min.,	94°C
25x	}	10 sec., 94°C
		30 sec., 58°C
		3min. 30 sec., 68°C
1x	7 min.,	68°C

2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von in der PCR (siehe 2.13) erhaltenen DNA-Fragmenten erfolgte am Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich –Heine-Universität.

Im Allgemeinen wurden Standard-Oligonukleotide verwendet und die zu sequenzierende DNA wurde nach der Präparation in H₂O aufgenommen.

2.15 *In situ*-Hybridisierungstechniken

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von Transkripten direkt im Gewebe am Ort ihrer Expression. Dazu wird mit einer markierten, komplementären RNA-Sonde hybridisiert, welche dann mittels Detektion durch spezifische, enzymgekoppelte Antikörper und Umsetzung einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden können.

2.15.1 Ganzkörper oder „Whole-mount“ *in situ* Hybridisierung

Die Transkripte wurden im gesamten Embryo mittels einer Whole-mount *in situ* Hybridisierung oder *per in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten nachgewiesen.

Dazu wurden folgende komplementäre RNA-Sonden hergestellt

Probe	Restriktionsenzym für Komplementär-RNA	RNA-Polymerase für Komplementär-RNA	Nummer im Plasmidstock *
<i>Irx1 (Huhn)</i>	<i>Eco47III</i>	T7	348
<i>Irx2 (Huhn)</i>	<i>BsiWI</i>	T7	357
<i>Irx3 (Huhn)</i>	<i>SacI</i>	T7	361
<i>Irx4 (Huhn)</i>	<i>NotI</i>	T3	377
<i>Irx5 (Huhn)</i>	<i>MscI</i>	T3	360

Probe	Restriktionsenzym für Komplementär-RNA	RNA-Polymerase für Komplementär-RNA	Nummer im Plasmidstock *
<i>Irx6 (Huhn)</i>	<i>HindIII</i>	T3	359
<i>Cash1 (Huhn)</i>	<i>XhoI</i>	T3	284
<i>Olig2 (Huhn)</i>	<i>Asp718</i>	Sp6	347
<i>Irx1 (Maus)</i>	<i>Bgl II</i>	T3	165
<i>Olig2 (Maus)</i>	<i>Spe I</i>	T7	353
<i>Shh (Maus)</i>	<i>HindIII</i>	T3	29
<i>Dbx 1 (Maus)</i>	<i>EcoRI</i>	T7	+
<i>Dbx2 (Maus)</i>	<i>BamHI</i>	T3	+
<i>Gli2 (Maus)</i>	<i>HindIII</i>	T7	85

* Institutsinterne Nummerierung des Plasmidbestandes am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere; + noch nicht eingeordnet

2.15.2 Synthese der Komplementär-RNA-Sonden

Pro 20 µl Ansatz wurden ca. 1µg des zuvor linearisierten Plasmids, 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche #1465384), 2 µl 10x DIG-Nukleotid-Mix (Roche #1277073), 1µl RNase Block, 2 µl RNA-Polymerase (T3 –Roche #1031163; T7 –Roche #881767, Sp6 –Roche #810274) und DEPC-H₂O vermischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl LiCl (4 M), 2 µl EDTA (0,5 M) und 75 µl Ethanol (abs.) zur Fällung der RNA zugegeben, durchmischt und für 30 min. bei -20°C inkubiert. In Folge wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min.; 13200 Upm; 4°C; Heraeus Biofuge 13), der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Zuletzt wurde die RNA kurz auf Eis an der Luft getrocknet und in 60 µl 50% Formamid aufgenommen. Ein Aliquot der RNA-Sonde wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.3) überprüft, der Rest konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Lösungen: LiCl 4 M

2.15.3 Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung

Nach der Präparation der Embryonen an den zu analysierenden Entwicklungszeitpunkten wurden sie kurz in PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Am nächsten Tag wurden sie für jeweils 10 min. zweimal in PBT und je einmal in 25% Methanol, 50% Methanol, 70% Methanol und 100% Methanol inkubiert. In diesem Zustand konnten die Embryonen entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die „Whole-mount“ *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck wurden die Embryonen zunächst durch jeweils 10 min. Inkubation in 70%, 50%, 25% Methanol rehydriert und in PBT gewaschen. Je nach Bedarf und Alter der Embryonen wurden sie dann in H₂O₂ gebleicht, zweimal in PBT gewaschen und 10-20 min. bei 37°C mit Proteinase K behandelt. Zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte im Anschluss eine 5 minütige Inkubation mit Glycin. Anschließend wurden die Embryonen für 5 min. in PBT gewaschen und dann 20 min. auf Eis in PFA/Glutaraldehyd nachfixiert. Hiernach wurde erneut kurz mit PBT gewaschen und der Hybridisierungsmix zur Prähybridisierung zugegeben. Die Inkubation hierzu erfolgte für 3 Stunden oder über Nacht bei 65°C. Danach wurde die Prähybridisierungslösung gegen den RNA-Sonden-haltigen (~1 µg/ml) Hybridisierungsmix ausgetauscht und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Lösungen:	25% Methanol	25% (v/v) Methanol in PBT	
	50% Methanol	50% (v/v) Methanol in PBT	
	70% Methanol	70% (v/v) Methanol in PBT	
	H₂O₂	6% (v/v) H ₂ O ₂ in PBT	
	Proteinase K	5 µg/ml in PBT	
	Glycin	2 mg/ml in PBT	
	PFA/Glutaraldehyd	4% (w/v) PFA 0,1% Glutaraldehyd in PBS	
	Hybridisierungsmix	50% Formamid 5x SSC; pH 4.5 0,1% (v/v) Triton X 50 µg/ml Heparin 0,5 mg/ml tRNA 5 mM EDTA; pH 8.0 in DEPC-H ₂ O	-Sigma #H9399 -Roche #109525

2.15.4 Entfernung von unspezifisch gebundener RNA-Sonde und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen in mehreren Lösungen gewaschen, um unspezifisch gebundene RNA-Sonde zu entfernen. Es wurde zweimal für 30 min. mit Hybridisierungsmix, zweimal für 30 min. mit Lösung I und einmal für 20 min. mit Lösung I/MABT gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten mit vorgewärmten Lösungen bei 65°C. Im Anschluss wurde zweimal für 10 min. mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen, bevor die Embryonen zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurde die

Blocklösung durch den AP-gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000 in Blocklösung; Roche #1093274) ersetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Lösungen:

Lösung I	50% Formamid 1x SSC; pH 4.5 0,1% (v/v) Triton X-100 in DEPC-H ₂ O	
Lösung I/MABT	50% (v/v) Lösung I 50% (v/v) MABT	
MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7.5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X	
Blocklösung	2% (w/v) Blockreagenz 20% Schafserum – hitzeinaktiviert in MABT	-Roche #1096176

2.15.5 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Embryonen mehrfach (6-8x) für je eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C mit MABT gewaschen. Am nächsten Tag folgten zwei Waschschriffe für jeweils 30 min. mit NTMT und schließlich die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers. Die Färbereaktion musste beobachtet werden und zum Beenden mit PBT abgestoppt werden. Es folgte mehrmaliges Waschen mit PBT, bevor die Embryonen in PFA fixiert und bei 4°C gelagert werden konnten.

Lösungen:

MABT		
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9.5 50 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Tween-20 0,2 mg/ml Levamisole	-Sigma #L9756
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP In NTMT	-Roche #1681451

2.15.6 *In situ* Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten

Die im Folgenden beschriebene Methode ermöglicht es, Transkripte in Geweben oder Organen auf zuvor angefertigten Paraffindünnschnitten nachzuweisen. So ist es durch Einsatz unterschiedlicher RNA-Sonden möglich, die Expression mehrerer Gene, auf aufeinander

folgenden Schnitten eines Präparates, zu analysieren. Auf Paraffindünnschnitten ist die Lokalisation der Transkripte in dem betreffenden Gewebe oder Organ zudem genauer zu analysieren als bei der Methode der „Whole mount“-Hybridisierung.

Nach der Herstellung der Paraffindünnschnitte (siehe 2.13.1) wurde zunächst das Paraffin von den Präparaten entfernt. Dies geschah durch folgende Inkubationsschritte:

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

Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde nochmals 5 min. in PBS gewaschen, für 15 min. bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase genau 5 min. in Glycin inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte für jeweils 5 min. in PBS und eine Nachfixierung der Präparate für 20 min. bei Raumtemperatur in PFA/Glutaraldehyd. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min. in PBS wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger möglichst nah mit einem Fettstift umrandet (ImmEdge-Pen; Vector Laboratories Inc.) und in eine H₂O-gesättigte Kammer gelegt. Anschließend wurden auf jeden Gewebeschnitt 5µl Hybridisierungsmix gegeben und zwei Stunden bei 70°C vorhybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch den RNA-Sonde-haltigen (~1ng/µl) Hybridisierungsmix ersetzt und über Nacht bei 70°C inkubiert.

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

2 x 10 sec.	H ₂ O bidest
jeweils 10 sec.	50%, 70%, 90%, 96%, Ethanol
2 x 10 sec.	Ethanol abs.

1 min. Xylol/Ethanol

3 x 5 min. Xylol

Zum Eindeckeln wurden die Objekträger aus dem Xylol genommen, mit Entellan-Eindeckelmedium versehen und einem Deckgläschen bedeckt. Zum Trocknen wurden sie über Nacht waagrecht unter einen Abzug gelegt.

Lösungen: Xylol/Ethanol 50% (v/v) Ethanol abs.
50% (v/v) Xylol

Proteinase K

Glycin

PFA/Glutaraldehyd

Hybridisierungsmix 2,5 ml Formamid
1,25 ml 20x SSC
50 mg Blockreagenz -Roche #1096176
295 ml bidestiliertes Wasser
bei 65°C lösen
50 µl 0,5 M EDTA
5 µl Tween-20
50 µl CHAPS (10%)
100 µl Heparin (1 mg/ml)
500 µl Hefe – tRNA (10 mg/ml)

B-Block-Lösung 2% Blockreagenz -Roche #1096176
10% Ziegen Serum
in PBT

NTM 100 mM Tris/HCl pH 9.5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Färbelösung

Entellan -Merck #1.07961.0500

2.16 Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten

Bei einer Antikörperfärbung lassen sich die Proteine durch den Einsatz verschiedener spezifischer Erstantikörper nachweisen. Diese Erstantikörper werden dann wiederum von Spezies-spezifischen Zweitantikörpern erkannt. In dem hier verwendeten Verfahren werden die benutzten Zweitantikörper verschiedene Fluorochrome, welche bei Anregung durch unterschiedliche Wellenlängen des UV-Lichtes fluoreszieren, gekoppelt. Der Einsatz von Antikörperfärbungen ermöglicht eine sehr genaue Lokalisation der zu analysierenden Genexpression, da hier im Gegensatz zur *in situ*-Hybridisierung kein Farbniederschlag in der Umgebung der markierten Sonde erfolgt, sondern die Färbung direkt an dem erkannten Protein sichtbar wird.

2.16.1 Präparation und Fixierung der Embryonen

Die Embryonen wurden zum gewünschten Zeitpunkt wie in (2.18.3) beschrieben präpariert und für 1-1½ Stunden bei 4°C auf einem Schüttler in 4%PFA fixiert. Im Anschluss wurde 1x mit PBS gewaschen und in 30% Sucrose/PBS überführt. Die Embryonen wurden nun über Nacht oder bis sie auf den Boden abgesunken waren bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert und dann in O.C.T. eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Anfertigung der Kryostatschnitte erfolgte wie in 2.17 beschrieben.

2.16.2 Antikörperfärbung

Die Präparate wurden auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet (ImmEdge Pen) und in einer Glasgondel für 10 min in PBT inkubiert. Darauf wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und es erfolgte eine 10 minütige Inkubation in Blockierlösung, welche direkt auf die Präparate gegeben wurde. Nach dem Abkippen der Blockierlösung wurden ca. 100µl des ersten Antikörpers, welcher zuvor in Blockierlösung verdünnt wurde, auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper vorsichtig zur weiteren Anwendung eingesammelt und die Objektträger 3x für je 10 min in PBT in einer Glasgondel gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation des zweiten Antikörpers direkt auf den Objektträgern für mindesten 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Es folgten zwei finale Waschschrte für je 10 min in PBT bevor die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt werden konnten. Nachdem das Eindeckelmedium angetrocknet war wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

2.16.3 Verwendete Erstantikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Chx10	1:1000	J. Ericson	
Engrailed1	1:50	DSHB	4G11
Irx1	1:3000	EMT	
Irx3	1:5000	J. Briscoe	
Irx5	1:2000	EMT	
Irx6	1:2000	EMT	
Islet1	1:100	DSHB	39.4D5
Lmx1	1:100	DSHB	50.5A5
Lim1/2	1:20	DSHB	4F2

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Mnr2	1:100	DSHB	81.5C10
Nkx2.1	1:100	DSHB	74.5A5
Nkx6.1	1:3000	P. Serup	
Olig2	1:3000	J. Briscoe	
Olig3	1:10000	T. Müller / H. Takebayashi	
Pax2	1:200	Zymed	71-6000
Pax6	1:50	DSHB	Pax6
Pax7	1:50	DSHB	Pax7
Shh	1:100	DSHB	5E1

Alle mit DSHB gekennzeichneten Antikörper wurden von der Developmental Studies Hybridoma Bank der Universität von Iowa bezogen.

2.16.4 Verwendete Zweitantikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Alexa Fluor®647 Ziege anti-Kaninchen	1:200	Molecular Probes	A-21245
Alexa Fluor®647 Ziege anti-Maus	1:200	Molecular Probes	A-21236
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova	711-165-152
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Maus IgG	1:200	Dianova	715-165-151
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Meerschweinchen	1:200	Dianova	706-165-148
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Ziege	1:200	Dianova	705-165-147

Lösungen: Mowiol

5g Mowiol in 20ml PBS lösen (Rühren, ü/N)

+ 10 ml Glycerin (Rühren, ü/N)

15 min. 12.000 rpm (Beckmann Zentrifuge J2-21), aliquotieren

2.17 Histologische Techniken

2.17.1 Paraffindünnschnitte

Zur Herstellung von Paraffindünnschnitten wurden die Embryonen je nach Entwicklungsstadium 2-4 Stunden bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert und anschließend durch Inkubation für jeweils 2 Stunden in 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol unter leichtem Schütteln entwässert. Danach wurden sie in 1-Butanol überführt und nach Inkubation über Nacht zunächst für mindestens 4 Stunden in flüssigem Paraplast (Sherwood Medical Co., #8889-502005) inkubiert. In dem Inkubationsbehälter wurde dann ein Vakuum erzeugt und weitere 2 Stunden inkubiert. Anschließend konnten die Präparate ausgerichtet und eingebettet werden. Nach Aushärtung über Nacht wurden an einem Mikrotom (Leica RM 2035) in der Regel 14 µm dicke Paraffindünnschnitte hergestellt.

Diese wurden zu Streckung in ein Wasserbad (45°C, GFL 1052) überführt und auf Objektträger gezogen (SuperFrost Plus, Menzel Gläser). Zur vollständigen Streckung und Antrocknung auf dem Objektträger folgte eine Inkubation auf einer Streckbank (30-60 min. 45°C; OMNILAB Jürgens) und Trocknung bei 37°C über Nacht. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Objektträger bei Raumtemperatur oder bei 4°C gelagert werden.

2.17.2 Anfertigung der Kryostatschnitte

Nach Fixierung und Gefrieren der Embryonen (siehe 2.17) wurden die 12-16µm dicken Gefrierdünnschnitte auf einem Cryostat (Leica CM 3050S) angefertigt und auf Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel Gläser) aufgenommen. Die Objektträger wurden kurz zum Trocknen liegengelassen und dann nach Möglichkeit sofort in die Antikörperfärbung überführt. Ansonsten war eine kurzfristige Lagerung bei 4°C bzw. eine längere Lagerung bei -80°C möglich.

2.18 Tierexperimentelles Arbeiten

2.18.1 Quelle, Inkubation und Öffnen der befruchteten Hühnereier

Die befruchteten Eier wurden von der Firma Deindl -Geflügelzucht und -vertrieb bezogen und bis zur Verwendung bei 14°C gelagert. Zum Beginn der Inkubation wurden die Eier auf die Seite gelegt und die oben liegende Seite mit einem Strich markiert. Da die Position des Embryos innerhalb des Eies durch die Schwerkraft bestimmt wird und sich immer oben befindet, wurde somit die Position des Embryos markiert.

Die Eier wurden nun bei 38°C und hoher Luftfeuchtigkeit bis zum gewünschten Stadium inkubiert. Dann wurde mit Hilfe einer Kanüle ein Loch in die „stumpfe“ Seite des Eies

gestochen und ca. 4ml des Albumins abgezogen, womit der Flüssigkeitsspiegel im Ei gesenkt und ein Festkleben des Embryos an der Eischale verhindert wurde. Das so präparierte Ei konnte jetzt mit Tesafilm umklebt und an der zuvor markierten Seite aufgeschnitten werden, so dass der Embryo zugänglich war. Nach der Durchführung der Experimente wurde das Ei wieder mit Tesafilm zugeklebt und bis zum benötigten Stadium weiter inkubiert.

2.18.2 *In ovo* Elektroporation ins Neuralrohr des Hühnerembryos

Für die *in ovo* Elektroporation wurde das Ei wie in (2.19.1) beschrieben bis zum Stadium HH12-14 inkubiert und dann geöffnet. Nun wurde unter einer Stereolupe (Leica Wild M8) DNA, die zuvor mit 1µl Fast Green versetzt wurde, mit Hilfe einer fein ausgezogenen Glaskapillare (Harvard Aparatus #GC120-10) direkt in das Lumen des Neuralrohrs injiziert. Sofort im Anschluss wurden 2 Elektroden rechts und links neben dem Embryo auf der Oberfläche des Dotters positioniert und leicht nach unten gedrückt. Falls nicht ausreichend Albumin über den Elektroden lag, wurde sie mit HBSS (Invitrogen # 24020-091) überschichtet und mit Hilfe eines Elektroporators (BTX ECM830) ein elektrische Feld erzeugt (5 Pulse á 100ms, 30 Volt, Intervall 500ms). Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNA innerhalb eines elektrischen Feldes immer zur Kathode und – in diesem Fall – in nur eine Hälfte des Neuralrohres ein. So konnte mit Hilfe der *in ovo* Elektroporation eine Hälfte des Neuralrohres elektroporiert werden, während die andere Hälfte als interne „Kontrolle“ diente. Nach Abschluss der Elektroporation wurde der Embryo, falls zuvor noch nicht geschehen, mit HBSS / PS (Penicillin/Streptomycin) überschichtet, wieder mit Tesafilm zugeklebt und 24 bzw. 48 Stunden weiter inkubiert.

2.18.3 Präparation der Hühnerembryonen

Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Embryonen mit einer feinen Präparierschere und Pinzetten aus dem Ei geschnitten und in PBS unter einem Stereomikroskop von den extraembryonalen Membranen befreit. In den meisten Fällen wurde zusätzlich der Kopf entfernt, da so eine schnellere Durchtränkung des Gewebes mit den verschiedenen Lösungen gewährleistet war.

2.18.4 Maushaltung

Die Tierhaltung und –zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.18.5 Isolierung definierter Embryonalstadien

Die Mäuse wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife verpaart und am nächsten Morgen wurde das Weibchen auf Bildung eines Vaginalpfropfens hin untersucht. Bei erfolgter Befruchtung wurde 12 Uhr Mittag des jeweiligen Tages als Tag (E) 0.5 der Embryonalentwicklung definiert und die Tiere wieder getrennt. Nach Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums wurden die Weibchen durch Strecken getötet, die Uteri präpariert und die Embryonen sowie die embryonalen Membranen unter dem Stereomikroskop in eiskaltem PBS isoliert.

2.18.6 Identifizierung genetisch veränderter Tiere und Embryonen

Heterozygote adulte *Fused toes*-Mäuse können an ihrem Phänotyp identifiziert werden (siehe Einleitung), bei den Embryonen wurde zusätzlich zur phänotypischen Identifizierung eine Genotypisierung mittels PCR (siehe 2.10) vorgenommen, um zwischen Wildtypen und heterozygoten bzw. homozygoten Embryonen unterscheiden zu können.

Hierzu wurde die genomische DNA aus den embryonalen Membranen isoliert (siehe 2.9) und für die diagnostische PCR-Amplifikation eingesetzt.

2.19 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation wurde an einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS NT, Leica, Heidelberg) oder an einem Durchlichtmikroskop (Axioskop2, Zeiß) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.20 Übersicht über die konstruierten Expressionsvektoren

Es wurden verschiedene *Irx*-Expressionsvektoren zur Elektroporation in das Hühnerneuralrohr (siehe 2.18.2) konstruiert. Dazu wurden bereits existierende cDNAs der einzelnen *Irx*-Gene in die entsprechenden Expressionsvektoren eingesetzt (siehe 2.2, 2.3, 2.5, 2.6 und 2.7). Die angegebene Plasmidnummerierung bezieht sich auf die Nummerierung des allgemeinen Plasmid-Stocks im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere.

Für die Überexpressionsanalysen im Hühnerembryo wurde im Allgemeinen der pCAGGS-Vektor, welcher ein IRES-Element, eine Kernlokalisierungssequenz und die kodierende Sequenz für ein GFP trägt benutzt (Niwa et al., 1991)(siehe Abb.2.1 und 3.2.3). Die Konstruktion der Vektoren für die durchgeführten Reporter-Experimente wird in 3.3 näher beschrieben.

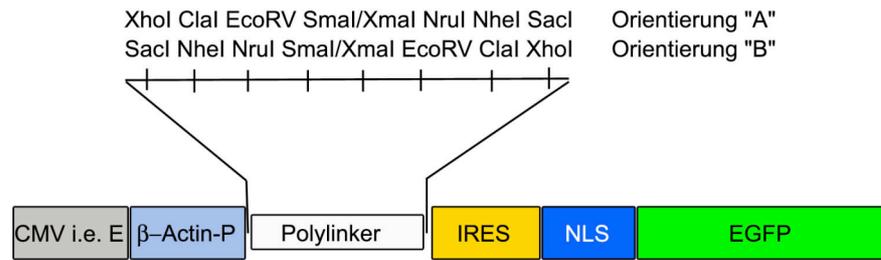


Abb.2.1 Schematische Darstellung des pCAGGS-IRES-GFP-Vektors. Der Vektor enthält einen CMVi.e.-Enhancer (grau) und einen Huhn-β-Actin-Promotor (grau-blau) „upstream“ des Polylinkers zum Starten der Expression. An den Polylinker schließt sich eine IRES-Site (Internal Ribosomal Entry Site, gelb) sowie eine Kernlokalisierungssequenz (blau) für das „downstream“ liegende GFP (grün) an. Der Expressionsvektor existiert in zwei verschiedenen Ausführungen – A und B – die jeweils eine andere Orientierung des Polylinkers besitzen.

***Irx1*-GFP-Expressionsvektor (#384)**

Hier wurde die bereits existierende cDNA des *Irx1*-Gens des Huhnes aus Plasmid # 389 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Briscoe) als *XbaI/XhoI*-Fragment isoliert und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI/NheI* in den pCAGGS-IRES-GFP-Vektor kloniert.

***Irx2*-GFP-Expressionsvektor**

Die murine cDNA des *Irx2*-Gens wurde aus dem Plasmid #165 als *XhoI/SpeI*-Fragment isoliert und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI/NheI* in den pCAGGS-IRES-GFP-Vektor (B) kloniert.

***Irx3*-GFP-Expressionsvektor (#383)**

Die murine cDNA des *Irx3*-Gens wurde aus dem Plasmid #287 (RCAS-Irx3) zunächst als *ClaI*-Fragment isoliert und in den pBluescriptSK-Vektor über die *ClaI*-Schnittstelle eingefügt. Von dort wurde es dann als *XhoI/SpeI*-Fragment isoliert und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI/NheI* in den pCAGGS-IRES-GFP-Vektor (B) kloniert.

***Irx5*-GFP-Expressionsvektor (#390)**

Die murine cDNA des *Irx5*-Gens wurde aus dem Plasmid #330 als *XhoI/SpeI*-Fragment isoliert und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI/NheI* in den pCAGGS-IRES-GFP-Vektor (A) kloniert.

***Irx6*-GFP-Expressionsvektor (#382)**

Die murine cDNA des *Irx6*-Gens wurde aus dem Plasmid #275 als *XhoI/SpeI*-Fragment isoliert und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI/NheI* in den pCAGGS-IRES-GFP-Vektor (B) kloniert.

3. Ergebnisse

3.1 Musterbildung im Neuralrohr von *Ft/Ft* Embryonen

Es wurde zunächst die in der vorangegangenen Diplomarbeit (Götz, 2002) begonnene Analyse der Neuralrohrmusterbildung in *Ft/Ft*-Embryonen vertieft. Da hier neben drei anderen Genen auch der gesamte *IrxB*-Genkomplex deletiert ist, bestand die Möglichkeit, phänotypische Veränderungen in *Ft/Ft*-Embryonen zu finden, die spezifisch für den Verlust dieser *Irx*-Gene sein könnten. Die weiterführenden Analysen wurden bei einem Aufenthalt im Labor von Dr. J. Briscoe im National Institute for Medical Research, London, UK durchgeführt. Dort wurden Antikörper-Färbungen mit verschiedenen Markern durchgeführt, die eine genauere Darstellung des Neuralrohrphänotypes gestatteten, als es mit den vorangegangenen Analysen, wo ausschließlich *in situ* Hybridisierungen benutzt wurden, möglich war. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Götz et al. 2005 nachzulesen und werden im Folgenden nur noch verkürzt beschrieben.

3.1.1 Verlust der Bodenplatte

Es wurden vergleichende Untersuchungen des Neuralrohres von Wildtyp und *Ft/Ft*-Embryonen der Entwicklungsstadien E10.5 und E11.5 durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es in *Ft/Ft* Embryonen zu einem Verlust der *Shh*-Expression in der Bodenplatte und somit des ventralen Signalzentrums im Stadium E10.5 kommt. Obwohl im Stadium E10.5 die Expression durch den Nachweis des Transkriptes noch gezeigt werden konnte (Götz, 2002), war es zum gleichen Entwicklungszeitpunkt nicht möglich, Shh-Protein zu detektieren. Die Shh-Expression in der Chorda dorsalis hingegen blieb unverändert (siehe Abb.3.1). Einen Tag später, im Stadium E11.5 ist auch der Nachweis des Transkriptes in der Bodenplatte nicht mehr möglich gewesen, so dass von einem vollständigen Verlust der Bodenplatte als Signalzentrum ausgegangen werden konnte. Dieses wurde durch die Analyse weiterer Marker, die in der Bodenplatte exprimiert werden, bestätigt. So fehlen zum Zeitpunkt E11.5 neben der Expression von Shh auch die von *Bmp6*, *Lmx1b* und *Fox2A* (ehemals *Hnf3β*) (Abb.3.1 und Götz, 2002; Götz et al., 2005).

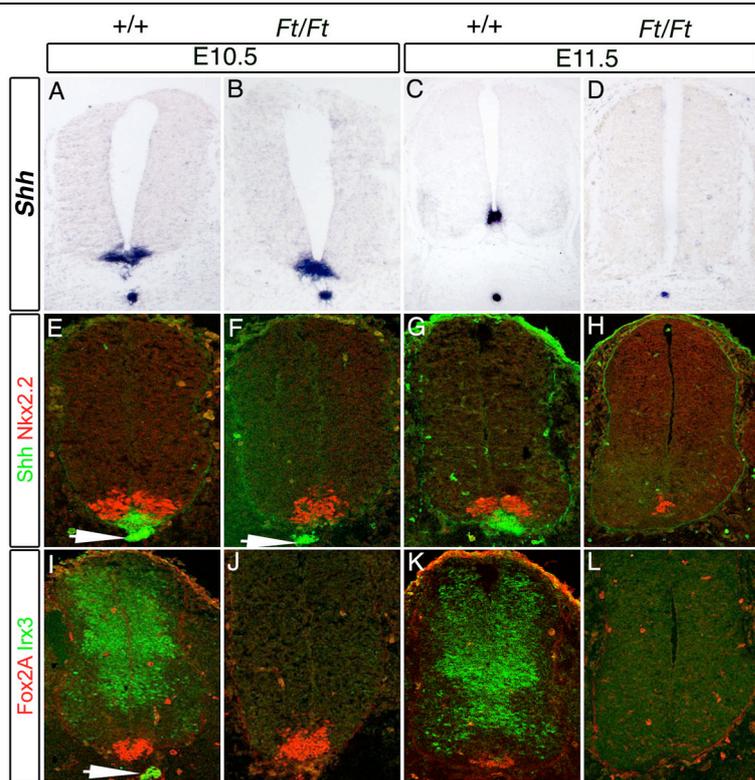


Abb.3.1 Verlust der Bodenplatte in *Ft/Ft*-Embryonen. Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen (A-D) und Antikörperfärbungen (E-L) auf transversalen Schnitten des Neuralrohrs von wildtypischen und *Ft/Ft*-Embryonen aus den Stadien E10.5 und E11.5. Während auf dem RNA-Level im E10.5 sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante die Expression von *Shh* in der Chorda dorsalis und in der Bodenplatte nachweisbar ist (A,B), kann im E11.5 kein *Shh*-Transkript mehr in der Bodenplatte der *Ft/Ft*-Mutante gefunden werden (D). Die Expression in der Chorda dorsalis bleibt unverändert, auch wenn in der Mutante die Chorda nah am Neuralrohr verbleibt und nicht nach ventral abwandert wie im Wildtyp (vergleiche C und D). Auf der Ebene der Proteine ist bereits am Tag E10.5 keine *Shh*-Expression in der Bodenplatte der *Ft/Ft*-Mutante mehr nachweisbar (F), während ein anderer

Bodenplattenmarker – Fox2A – am Tag E10.5 in Wildtyp und Mutante noch zu sehen ist (I,J) und erst einen Tag später, am Tag E11.5 in der Mutante verschwunden ist (L). Die Expression von Nkx2.2 in der pV3-Domäne ist in *Ft/Ft*-Embryonen bereits am Tag E10.5 reduziert und an die ventrale Mittellinie verschoben (F) und am Tag E11.5 fast vollständig verschwunden (H). Wie erwartet konnte in *Ft/Ft*-Embryonen keine *Irx3*-Expression nachgewiesen werden (J, L).

3.1.2 Dorsalisierung des Neuralrohres

Der Verlust des ventralen Signalzentrums, der Bodenplatte, machte es nötig, die Musterbildung im ventralen Teil des Neuralrohres detailliert zu analysieren, da diese in großem Maße vom Shh-Signal abhängig ist.

Die Expression von Nkx2.2, einem Klasse II-Gen, welches positiv von Shh reguliert wird, markiert die Vorläufer-Zellen der ventralsten Neuronen des Neuralrohres, die pV3-Population (Briscoe et al., 1999). Die Analyse von Nkx2.2 zeigte, dass die Expressionsdomäne in *Ft/Ft*-Embryonen am Tag E10.5 bereits verkleinert und einen Tag später fast vollständig verschwunden war (siehe Abb.3.1). Übereinstimmend hierzu wurde bereits in der Diplomarbeit eine Veränderung in der Expression von *Pax6* gefunden. Die Expressionsdomäne von *Pax6* markiert im Wildtyp eine Reihe von Vorläuferzellen vom dorsalen Rand des Neuralrohres bis einschließlich der Vorläuferregion der Motorneuronen und grenzt an die Expressionsdomäne von Nkx2.2 und wird von Nkx2.2 reprimiert (Briscoe et al., 2000). In *Ft/Ft*-Embryonen hingegen wurde eine ventrale Ausdehnung der *Pax6*-Expression bis fast an die Region der fehlenden Bodenplatte heran gefunden (Götz, 2002; Götz et al., 2005). Ähnlich verhielt sich die Expression von *Pax2*, einem Marker für

verschiedene differenzierte Interneuronen wie dI4-, dI6-, V0- und V1-Neuronen (Burill et al., 1997). In *Ft/Ft*-Embryonen blieb die dorsale Expressionsdomäne von *Pax2* unverändert, die ventrale jedoch dehnte sich bis an die Mittellinie aus (Götz et al., 2005, Götz, 2002). Die Expression eines weiteren Klasse II-Gens, *Nkx6.1*, war dagegen in *Ft/Ft*-Embryonen nur unwesentlich verändert. Es konnten einige *Nkx6.1* exprimierende Zellen dorsal von der normalen Expressionsdomäne gefunden werden (Abb.3.3, A, B). Im Wesentlichen deuten diese Befunde jedoch auf eine Dorsalisierung des Neuralrohrs in *Ft/Ft*-Embryonen, also den Verlust der ventralsten Strukturen, wie Bodenplatte und V3-Neuronen, bei gleichzeitiger Ausdehnung weiter dorsal gelegener Domänen hin.

3.1.3 Ausdehnung der Motorneuronen nach ventral und dorsal

Eine weitere im ventralen Bereich des Neuralrohrs angesiedelte Neuronenpopulation ist die der Motorneuronen. *Olig2* markiert im ventralen Neuralrohr die Vorläuferzellen der späteren Motorneuronen und gehört ebenfalls zu den Klasse II-Genen, die positiv von *Shh* reguliert werden. Zusätzlich zu der Regulierung durch *Shh* besteht eine gegenseitige Inhibierung mit *Irx3*, durch welche die dorsale Grenze der Expressionsdomäne von *Olig2* definiert wird (Novitsch et al., 2001). Die ventrale Expressionsgrenze schließt an die dorsale Grenze von *Nkx2.2* an und wird durch die reprimierende Wirkung dieses Faktors auf *Olig2* definiert (Novitsch et al., 2001). Überraschenderweise ist für *Olig2* trotz des *Shh*-Verlustes in *Ft/Ft*-Embryonen keine Verkleinerung, sondern eine Vergrößerung der Expressionsdomäne am Tag E10.5 zu beobachten gewesen, was sich sowohl auf der Transkriptebene (Götz, 2002) als auch auf der Proteinebene nachweisen ließ (siehe Abb.3.2). Man findet eine Ausdehnung der Expressionsdomäne von *Olig2* sowohl nach ventral als auch nach dorsal (siehe Abb.3.2.). Dabei kann die ventrale Ausdehnung durch den Verlust der Expression von *Nkx2.2*, welche wiederum bedingt durch den Verlust des *Shh*-Signals auftritt, begründet werden, während die dorsale Ausdehnung durch den Verlust der reprimierend wirkenden *Irx3*-Expression, welche durch die *Ft*-Mutation deletiert wurde, zu erklären ist.

Um diese Ausdehnung der Motorneuronenvorläuferdomäne detaillierter zu verfolgen, wurde zusätzlich eine Analyse von Markern der umliegenden, sich später entwickelnden Neuronentypen durchgeführt. Einen Tag später, im Stadium E11.5, wurde entsprechend eine Ausdehnung der Motorneuronen, markiert durch *HB9* (Arber et al., 1999), nach ventral und dorsal beobachtet (Abb.3.2). Im Gegensatz dazu war die durch *Chx10* markierte V2-Domäne (Sanders et al., 2000), welche sich dorsal an die Motorneuronendomäne anschließt, deutlich

verkleinert (siehe Abb.3.2), so dass der Eindruck entstand, die Motorneuronendomäne dehne sich zu Lasten der V2-Domäne aus.

Die Veränderung der *Olig2*-Expression in den Vorläuferzellen lässt sich also auch in den daraus differenzierenden Motorneuronen, sowie den benachbarten Neuronen nachvollziehen. Auffällig war, dass auch die ausgedehnte Expressionsdomäne von *Olig2* eine scharfe neue Grenze an der dorsalen Seite hat (Abb.3.2). Da diese Grenze in *Ft/Ft*-Embryonen nicht wie im Wildtyp durch die gegenseitige Inhibierung mit *Irx3* definiert werden konnte, wurde nach anderen möglichen Faktoren gesucht. Es wurde in der Diplomarbeit gezeigt, dass sich die Expressionsdomäne von *Irx1* in *Ft/Ft*-Embryonen stark ausdehnt. Ein Vergleich der Domänen von *Irx1* und *Olig2* auf direkt aufeinander folgenden Paraffinschnitten zeigte, dass die vergrößerten Expressionsdomänen von *Irx1* und *Olig2* in *Ft/Ft*-Embryonen eine gemeinsame Grenze haben (Abb.3.2, rote Markierung in E, F, Götz, 2002). Diese ersten Analysen führten zu der Hypothese, dass *Irx1* im Falle des Verlustes von *Irx3* dessen reprimierende Wirkung auf *Olig2* übernommen hat.

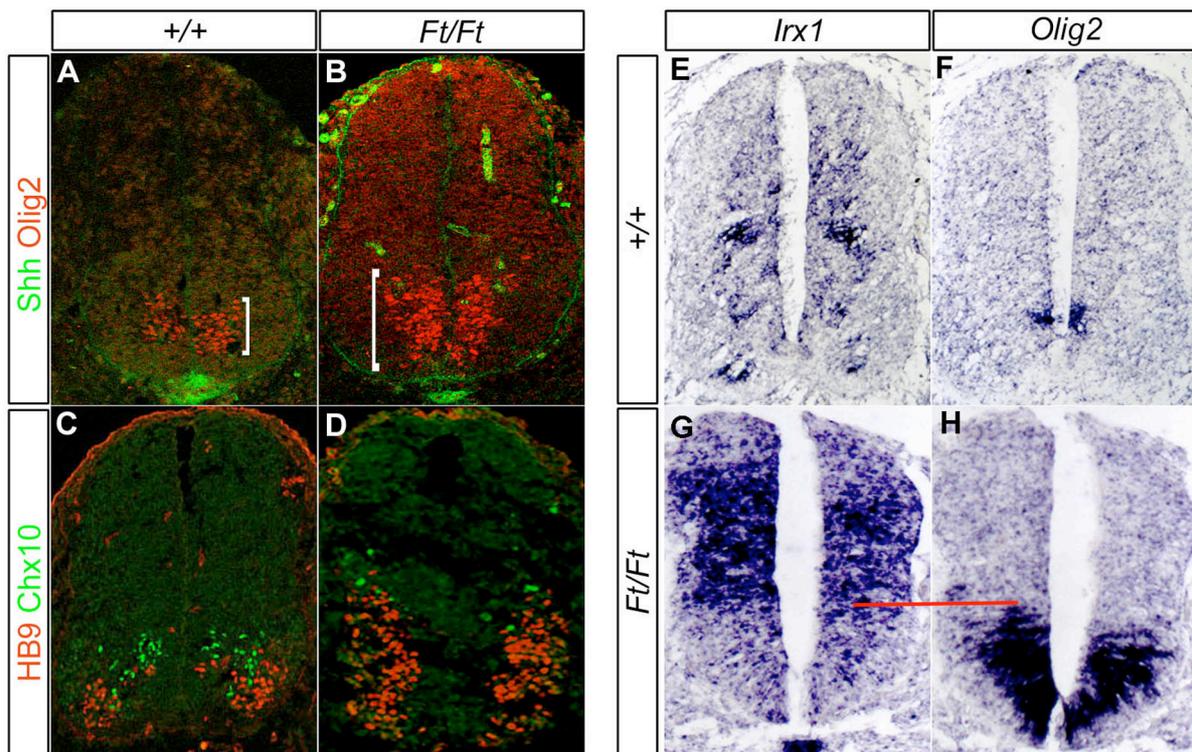


Abb.3.2 Ausdehnung der Motorneuronen nach ventral und dorsal in *Ft/Ft*-Embryonen. Es wurden Antikörperfärbungen (A-D) und *in situ*-Hybridisierungen (E, F) auf transversalen Neuralrohrschnitten von wildtypischen und *Ft/Ft*-Embryonen aus E11.5 (C,D) und E10.5 (A,B,E-H) durchgeführt. Anhand der Färbung für *Olig2* (rot, A,B) lässt sich erkennen, dass die sich Motorneuronenvorläuferdomäne in *Ft/Ft*-Embryonen stark nach dorsal und ventral ausgedehnt hat. Entsprechend ist einen Tag später, an E11.5 eine eindeutige Vergrößerung der Motorneuronenpopulation, markiert durch HB9 zu sehen (rot, D). Gleichzeitig wird die Domäne der V2-Neuronen, markiert durch *Chx10* deutlich kleiner (grün, B). Vergleicht man die Expressionsdomänen von *Irx1* (G) und *Olig2* (H) in *Ft/Ft*-Embryonen, so fällt auf, dass sich beide Domänen im Vergleich zum Wildtyp (E und F) ausdehnen und nun eine gemeinsame Expressionsgrenze besitzen (rote Markierung).

3.1.4 Das dorsale Neuralrohr bleibt unverändert in *Ft/Ft* Embryonen

Neben der Untersuchung der ventralen Marker des Neuralrohres in *Ft/Ft*-Embryonen wurden auch die Expressionsdomänen verschiedener Faktoren, welche im dorsalen Bereich lokalisiert sind, analysiert. In der Expression von *Lmx1b* – einem Marker für dI5-Neuronen (Helms and Johnson, 2003), *Lh2b* – einem Marker für dI1-Neuronen (Lee and Jessell, 1999), *Wnt3a* – einem Dachplattenmarker (Lee and Jessell, 1999), *Pax7* – einem Marker für dorsale Vorläuferzellen (Helms and Johnson, 2003), sowie in der Expression von *Dbx1* und *Dbx2*, welche die pV0- bzw. pV1/V0-Population markieren (Pierani et al., 2001), konnten keine Veränderungen in *Ft/Ft*-Embryonen festgestellt werden (Abb.3.3). Die dorsale Musterbildung im Neuralrohr scheint demnach in der *Ft*-Mutante unverändert zu sein.

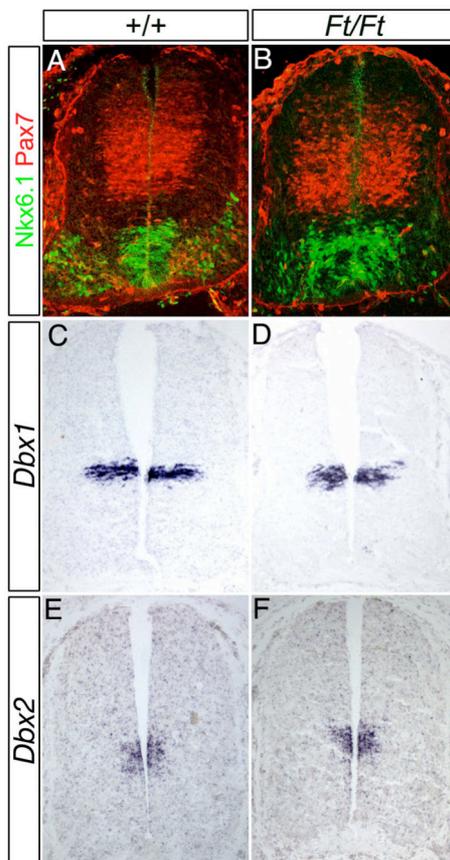


Abb.3.3. Die dorsale Musterbildung des Neuralrohres bleibt unverändert in *Ft/Ft*-Embryonen. Dargestellt sind Antikörperfärbungen (A, B) und in situ Hybridisierungen (C-D) auf Neuralrohrschnitten vom Stadium E10.5. Links ist immer der Wildtyp zu sehen und rechts der *Ft/Ft*-Embryo. Die Expression von Pax7 in der dorsalen Hälfte des Neuralrohres ist in Stärke und Ausdehnung unverändert in *Ft/Ft*-Embryonen (rot, A, B). Ebenfalls unverändert sind die Expressionsdomänen von *Dbx1* (C, D) und *Dbx2* (E, F). Die Expression von Nkx6.1 in der ventralen Hälfte des Neuralrohres erscheint in *Ft/Ft*-Embryonen etwas aufgelöster und es finden sich vereinzelte Nkx6.1 positive Zellen dorsal von der normalen Expressionsdomäne (grün, A, B).

3.1.5 Der Verlust des *IrxB*-Genkomplex ist verantwortlich für die Ausdehnung der Motorneuronen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen einen Neuralrohrphänotyp in *Ft/Ft*-Embryonen, bei dem zwei verschiedene Aspekte zu beachten sind. Zum einen findet sich ein Verlust der Shh-Expression in der Bodenplatte und somit des ventralen Signalzentrums. Dieses zieht eine Reihe von Veränderungen nach sich, wie sie auch in anderen Mutanten, in denen der Shh-Signalweg gestört ist, beobachten werden können. So ist beispielsweise in der *Gli2*^{-/-}-Mutante

ebenfalls ein Verlust der Shh-Expression in der Bodenplatte sowie eine starke Reduzierung der Nkx2.2-Expression mit gleichzeitiger Ausdehnung der Pax6-Domäne beschrieben (Ding et al., 1998). Es wäre demnach möglich, dass der Verlust eines der von der *Ft*-Mutation betroffenen Gene einen Einfluss auf die Expression von *Gli2* hat. Eine Überprüfung der Expression von *Gli2* zeigte jedoch keine Veränderung in *Ft/Ft*-Embryonen, so dass in der *Ft/Ft*-Mutante eine andere Ursache für den Shh-Verlust in der Bodenplatte vorliegen muss (siehe Abb.3.4).

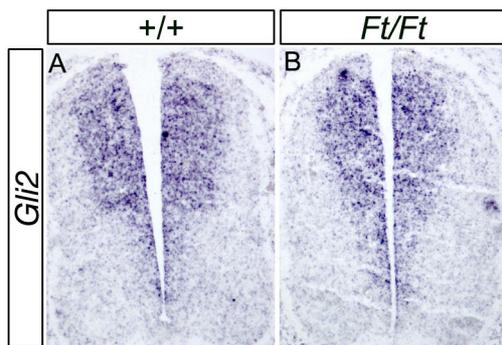


Abb.3.4 Die Expression von *Gli2* ist unverändert in *Ft/Ft*-Embryonen. Im E11.5 durchgeführte in situ Hybridisierungen zeigten keine Unterschiede zwischen der Expressionsstärke oder der Ausdehnung der Expressionsdomäne von *Gli2* im Wildtyp und *Ft/Ft*-Embryonen.

Wie schon in 1.3 beschrieben, wurde durch die Insertion des Transgens, welche die *Ft*-Mutation verursachte, auf Chromosom 8 ein 1,6 Mb großes Stück deletiert. Da von dieser Mutation insgesamt sechs Gene betroffen waren, ist es durch die Analyse der *Ft*-Mutante nur bedingt möglich, Rückschlüsse auf die Funktion einzelner betroffener Gene zu ziehen.

Die ebenfalls im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere generierte Nullmutation des *Ftm*-Gens, welches eines der von der *Ft*-Mutation betroffenen Gene ist, führte zu einem ähnlichen, jedoch nicht identischen Phänotyp des sich entwickelnden Neuralrohres im homozygoten Zustand, wie er bei *Ft/Ft*-Embryonen zu beobachten war. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen spiegelt der Phänotyp in einer Vielzahl von Geweben und Organen eine Störung bzw. den Verlust des Shh-Signalweges wieder. Im Neuralrohr finden sich, analog zum *Ft/Ft*-Phänotyp, der Verlust der Bodenplatte und die daraus resultierende Dorsalisierung des Neuralrohres wieder. In diesem Fall sind jedoch im Gegensatz zum *Ft/Ft*-Phänotyp auch die Motorneuronen stark reduziert, wie es bei einem gestörten oder fehlenden Shh-Signal aus der Bodenplatte zu erwarten wäre (Tian et al., 2004), und man findet unter anderem eine Ausdehnung der V2-Neuronen, markiert durch Chx10, bis an die ventrale Mittellinie heran (mündliche Mitteilung J. Vierkotten).

Im Gegensatz dazu konnte in *Ft/Ft*-Embryonen eine Vergrößerung der Motorneuronenvorläuferdomäne und auch der späteren Motorneuronendomäne beobachtet

werden. Dieses kann als zweiter, Shh-unabhängiger, und somit *Ftm*-unabhängiger, Aspekt des *Ft*-Phänotypes betrachtet werden kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Nullmutationen zweier weiterer von der *Ft*-Mutation betroffener Gene keinen auffälligen Phänotyp hervorrufen. So zeigen *Fts*^{-/-}-Mäuse keinen Phänotyp (Lesche, 1997) und *Fto*^{-/-}-Mäuse sind fertil und weisen lediglich ein geringeres Wachstum und eine verminderte Gewichtszunahme auf (mündliche Mitteilung J. Vierkotten und S. Kuschel).

Somit bestand die Hypothese, dass der Verlust des *IrxB*-Genkomplex in *Ft/Ft*-Embryonen für die Ausdehnung der Motorneuronen-Domäne, sowie die Verkleinerung der V2-Neuronen-Domäne verantwortlich ist. Die Beweisführung ist hier jedoch durch die Tatsache, dass eben nicht ausschließlich die Gene des *IrxB*-Genkomplex betroffen sind nicht uneindeutig. Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, wäre die Analyse eines neuen Mausmodels, in dem nur der *IrxB*-Genkomplex deletiert wird, nötig. Ein solches Maus-Modell wird zurzeit im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere generiert, steht jedoch zum momentanen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

3.2 Überexpressionsstudien der *Irx*-Gene im Neuralrohr von Hühnerembryonen

Da die Untersuchung der *Ft*-Mutante keinen weiteren Aufschluss über die genaue Funktion der *Irx*-Gene geben konnte, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein anderer experimenteller Ansatz verfolgt. Neben der gängigen Methode der Analyse von Genfunktionsverlust-Mutationen, so genannten „Knock-out“-Mutationen, besteht auch die Möglichkeit, durch die Fehl- oder Überexpression eines Genes dessen Funktion zu untersuchen. Für diese Art der Analysen wurde im Folgenden das Modellsystem Huhn (*Gallus gallus*) gewählt, da hier die Entwicklung des Embryos außerhalb des Muttertieres stattfindet und Bruteier sowohl leicht erhältlich als auch einfach zu inkubieren sind. Zusätzlich können leicht manipulative Eingriffe während der Embryonalentwicklung vorgenommen werden. Besonders bei der Analyse von Genfunktionen im Neuralrohr ist der Hühnerembryo ein etablierter Modellorganismus, der vielfache Verwendung findet.

3.2.1 Expression der *Irx*-Gene im Hühnerembryo (*Gallus gallus*)

Bisher war die Expression der einzelnen *Iroquois*-Gene nur im sich entwickelnden Maus-Embryo beschrieben (van Tuyl et al., 2005; Houweling et al., 2001, Christoffels et al., 2000,

Cohen et al., 2000), so dass vor Beginn der Experimente das Expressionsmuster der *Irx*-Gene im Hühnerembryo untersucht werden musste.

Dazu wurden *in situ*-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt (siehe 2.16), wobei besonders die Expression im Neuralrohr von Interesse war. Der Nachweis der *Irx*-Transkripte im Stadium HH18, also zu einem Zeitpunkt, an dem sich im Neuralrohr noch keine der verschiedenen Neuronentypen differenziert haben, ist in Abbildung 3.5 dargestellt. In diesem Stadium werden bereits alle *Irx*-Gene bis auf *Irx4* (D) im Neuralrohr exprimiert, auch wenn die Grenzen ihrer Expressionsdomänen zum Teil schwer festzulegen sind. *Irx1*, 2, 3 und 5 werden in einem sehr ähnlichen Muster über etwa 2/3 des Neuralrohres exprimiert und lassen, mit Ausnahme von *Irx1*, nur das ventralste Drittel frei. *Irx1* wird zusätzlich auch in einem schmalen Streifen am ventralen Rand des frühen Neuralrohres exprimiert (A). Die Expression von *Irx6* unterscheidet sich von der der anderen *Irx*-Gene und ist nur in zwei schmalen, punktaktigen Domänen am ventralen, äußeren Rand des Neuralrohres nachweisbar (rote Markierung in F). Während *Irx3* und *Irx5* außerdem klar in der Chorda dorsalis exprimiert werden (Pfeile in C und E) hebt sich die Färbung der anderen *Irx*-Transkripte hier nicht vom Hintergrund ab.

Ebenfalls in Abbildung 3.5 ist die Expression der einzelnen *Irx*-Gene im Neuralrohr im Entwicklungsstadium HH23-25 zu sehen. Dieses Stadium entspricht ungefähr einem Entwicklungsfortschritt von 24 Stunden im Vergleich zum Stadium HH18 und stellt einen Zeitpunkt der Neuralrohrentwicklung dar, an dem bereits der größte Teil der differenzierten Neuronentypen nachweisbar ist. Die Expression von *Irx1* (Ai) und *Irx2* (Bi) ließ sich immer zuerst in zwei punktaktigen Domänen etwa in der Mitte des Neuralrohres erkennen (rote Umkreisung in Ai und Bi). Bei weiterer Entwicklung der Farbreaktion wurde dann auch eine größere, etwas diffusere Domäne sichtbar. Während *Irx1* sowohl in einem Streifen in der ventrikulären Zone als auch in der Peripherie des Neuralrohres exprimiert wird, ist die Expression von *Irx2* nur über einen großen Teil der ventrikulären Zone ausgedehnt. Die *Irx3* Expression (Ci) ist, ähnlich wie in der Maus, ebenfalls über einen ausgedehnten Bereich der Vorläuferregion und in den ventralen Außenbereichen des Neuralrohres, wo zu späteren Entwicklungsstadien die Motorneuronen zu finden sind, zu erkennen. Zusätzlich kann das *Irx3*-Transkript in der Chorda dorsalis nachgewiesen werden (Pfeil in Ci). Während *Irx4* nicht im Neuralrohr exprimiert wird (siehe Di), ist die *Irx5* Expression ebenso wie die von *Irx3* in der ventrikulären Zone, in den ventralen äußeren Bereichen und in der Chorda dorsalis zu sehen (Pfeil in Ei). Während demnach die Expressionen von *Irx1* und *Irx2* bzw. von *Irx3*

und *Irx5* einander stark ähneln, wird *Irx6* abweichen davon ausschließlich ventral im Neuralrohr in der Region der späteren Motorneuronen exprimiert.

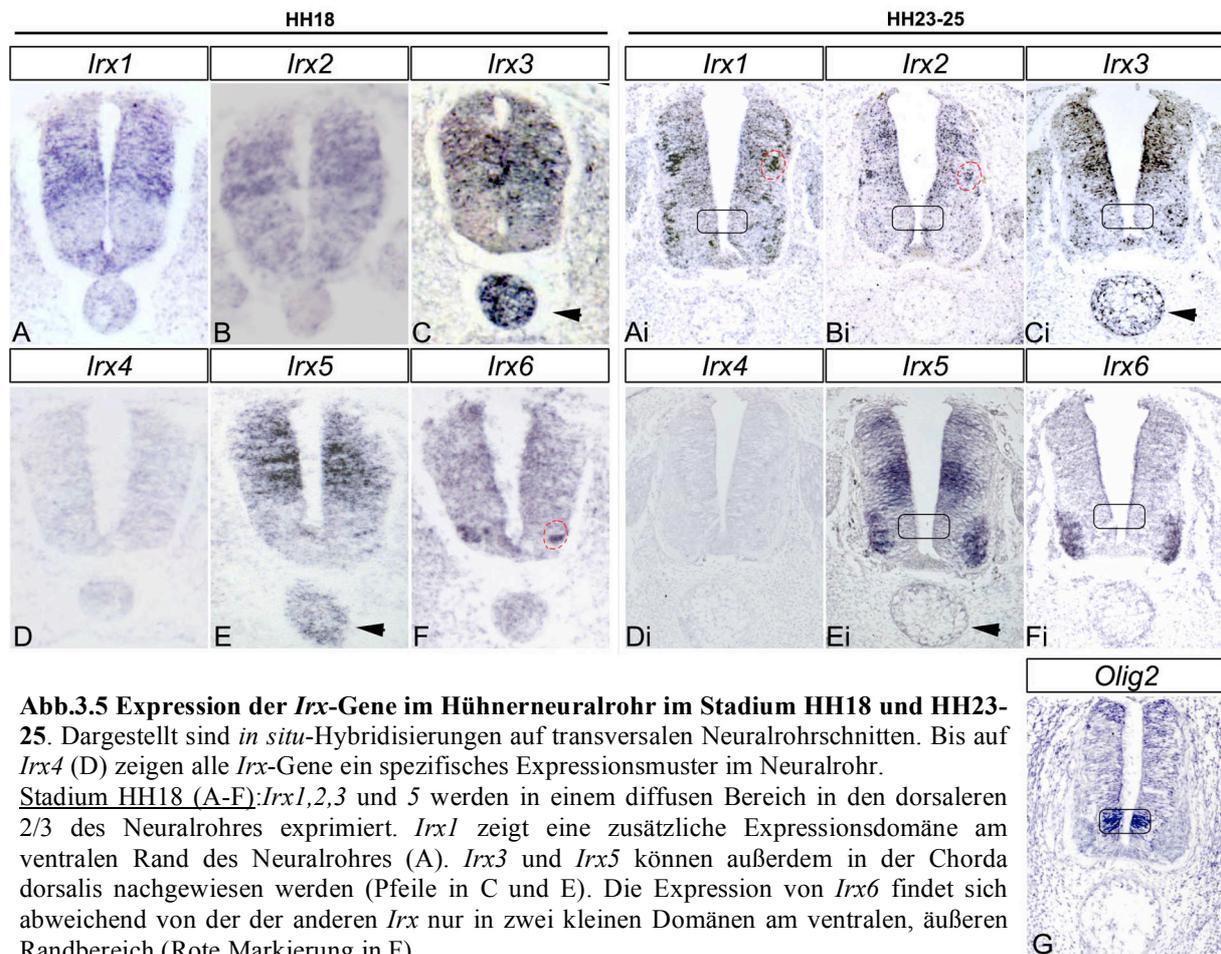


Abb.3.5 Expression der *Irx*-Gene im Hühnerneuralrohr im Stadium HH18 und HH23-25. Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen auf transversalen Neuralrohrschnitten. Bis auf *Irx4* (D) zeigen alle *Irx*-Gene ein spezifisches Expressionsmuster im Neuralrohr.

Stadium HH18 (A-F): *Irx1,2,3* und *5* werden in einem diffusen Bereich in den dorsaleren 2/3 des Neuralrohres exprimiert. *Irx1* zeigt eine zusätzliche Expressionsdomäne am ventralen Rand des Neuralrohres (A). *Irx3* und *Irx5* können außerdem in der Chorda dorsalis nachgewiesen werden (Pfeile in C und E). Die Expression von *Irx6* findet sich abweichend von der der anderen *Irx* nur in zwei kleinen Domänen am ventralen, äußeren Randbereich (Rote Markierung in F).

Stadium HH23-25 (Ai-Gi): Die Expression von *Irx1*(Ai) und *Irx2* (Bi) ähneln einander stark und können zuerst anhand der kreisförmigen kleinen Domänen etwa in der Mitte des Neuralrohres identifiziert werden (rote Markierung in Ai, Bi). *Irx3* (Ci) wird über einen großen Bereich der Neuronenvorläuferdomäne exprimiert. *Irx5* (Ei) lässt sich ebenfalls in der ventrikulären Zone nachweisen, jedoch ist die Expression hier in einem schmalen Streifen dorsal, sowie einem breiten Streifen weiter ventral stärker und ist zusätzlich auch in dem Bereich der späteren Motorneuronen detektierbar. Hier findet sich auch die Expression von *Irx6* (Fi), welches sonst keine weiteren Expressionsorte im Neuralrohr besitzt. Zusätzlich werden *Irx3* und *Irx5* auch in der Chorda dorsalis exprimiert (Pfeile in C und E). Es fällt auf, dass sich die zum Teil sehr unterschiedlichen Expressionsdomänen der einzelnen *Irx*-Gene in keinem Fall mit der Expressionsdomäne von *Olig2* (ii) überschneiden (schwarze Umrahmung in Ai-Gi).

Der Bereich der Motorneuronenvorläuferdomäne, in dem sich die *Olig2*-Expression findet (siehe Gi), ist jedoch frei von der Expression aller *Irx* Gene (schwarze Umrahmung in Ai-Fi). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Expression der *Irx*-Gene im Hühnerembryo nicht grundlegend von der im Mausembryo unterscheidet, so dass Ergebnisse der Untersuchungen aus Maus und Huhn im Konsens zur Analyse der Funktion der *Irx*-Gene betrachtet werden können.

3.2.2 *In ovo* Elektroporation in das sich entwickelnde Neuralrohr des Hühnerembryos

Da bis auf *Irx4* alle *Irx*-Gene ein spezifisches Expressionsmuster im Neuralrohr zeigten, wurden als nächstes Vektoren konstruiert, die die ektopische Expression der einzelnen *Irx*-Gene im Neuralrohr sich entwickelnder Hühnerembryonen erlauben sollten.

Dazu wurde jeweils die kodierende Sequenz der einzelnen Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene in den pCAGGS-Vektor eingefügt (siehe 2.2). In diesem Vektor befindet sich 3' von der Klonierungs-Region ein so genanntes IRES-Element (**I**nternal **R**ibosomal **E**ntry **S**ite) und darauf folgend die kodierende Sequenz für GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein), welche mit einer Kernlokalisierungssequenz (NLS: **N**uclear **L**ocalisation **S**equence) versehen ist (Niwa et al., 1991). Die Wahl eines solchen Expressionsvektors ermöglicht die Translation zweier Proteine von nur einem Transkript, so dass die Zellen, welche in Folge des Experimentes ektopisch ein *Irx*-Gen exprimieren, anhand der Fluoreszenz des GFPs identifiziert werden können. Da sich auf der entstehenden mRNA die kodierende Sequenz für das GFP „downstream“ des kodierenden Bereiches für das jeweilige *Irx*-Gen befindet, kann man davon ausgehen, dass es nur zur Expression des GFPs kommt, wenn zumindest die Transkription für beide Gene korrekt verlaufen ist. Des Weiteren kann hier die Qualität der Elektroporation direkt anhand der Fluoreszenz des GFPs im lebenden Hühnerembryo im Ei schon vor der Präparation beurteilt werden, ohne dass ein aufwendiges Präparieren, Fixieren und eventuelles Färben der Embryonen notwendig ist.

Die jeweiligen Expressionsvektoren wurden dann in das sich entwickelnde Neuralrohr elektroporiert, so dass in einer Hälfte eine ektopische Expression der einzelnen *Irx*-Gene erzeugt wurde (siehe 2.18.2). Es wurde zunächst überprüft, ob die oben beschriebenen Expressionsvektoren im Neuralrohr zu der gewünschten Überexpression der *Irx*-Gene mit einer Kolokalisation des GFPs führten. Die dazu durchgeführten Antikörperfärbungen gegen die einzelnen *Irx*-Proteine zeigten eindeutig die Koexpression mit dem GFP (gelbe Zellen in Abb.3.6). Die hier benutzten Antikörper führten jedoch, mit Ausnahme von anti-*Irx3* (siehe Abb.A.9), nicht zu der Erkennung der endogen exprimierten *Irx*-Proteine, sondern waren nur in der Lage die ektopisch exprimierten *Irx*-Proteine zu detektieren. Es handelt sich bei allen *Irx*-Antikörpern um anti-Maus-*Irx**-Antikörper, und die verwendeten *Irx*-Expressionskonstrukte kodieren für die murinen *Irx*-Proteine, so dass sie sich von den endogen exprimierten *Irx*-Proteinen unterscheiden.

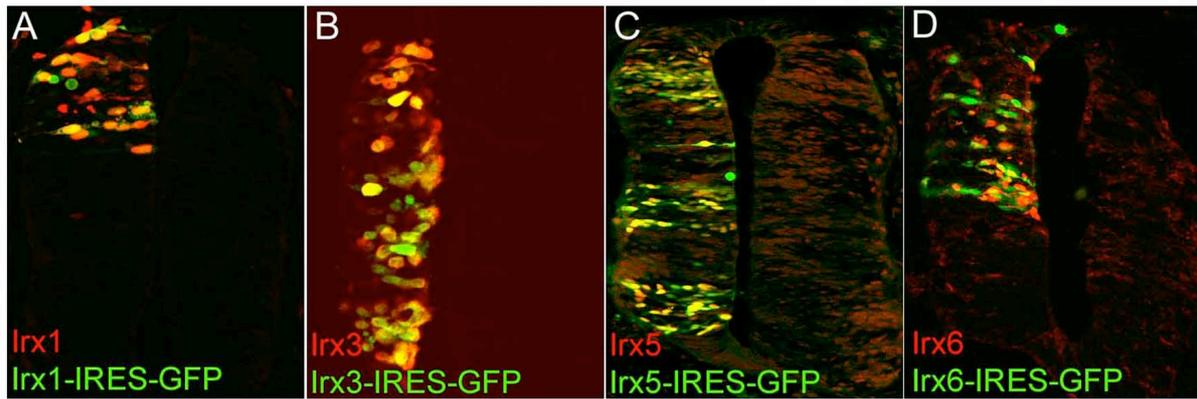


Abb.3.6 Ektopische *Irx*-Expression nach Elektroporation in das Neuralrohr. Dargestellt sind Antikörperfärbungen gegen die einzelnen *Irx*-Proteine, *Irx1* (A), *Irx3* (B), *Irx5* (C), *Irx6* (D) (rot) nach der Überexpression. In grün ist die Fluoreszenz des GFPs zu sehen. Anhand der Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (gelb) erkennt man die Kolokalisation der *Irx*-Proteine mit dem GFP. Gegen *Irx2* steht kein Antikörper zur Verfügung.

Zur Elektroporation wurde ein Entwicklungsstadium gewählt (HH12-14), in dem bereits proneurale Gene exprimiert werden, jedoch noch keine der späteren Neuronen gebildet sind. Nach der Elektroporation erfolgte eine Inkubation des Hühnerembryos von 24 oder 48 Stunden. Im Anschluss wurde durch die Analyse verschiedener neuronaler Marker die elektroporierte mit der nicht elektroporierten Hälfte („Kontrolle“) des Neuralrohres verglichen. Während nach 24h überwiegend die Expression von proneuralen Genen untersucht wurde, wurde eine Inkubationszeit von 48h genutzt um die sich in diesem Zeitraum entwickelten postmitotischen Neuronentypen zu analysieren. Durch die Betrachtung verschiedenerer neuronaler Marker sollte es somit möglich sein, denkbare Effekte der *Irx*-Gene auf die Musterbildung des Neuralrohres zu analysieren. Die Elektroporation des pCAGGS-IRES-GFP-Vektors, in den kein *Irx*-Gen inseriert wurde, führt ebenfalls zur Expression von GFP im Neuralrohr. Die GFP-Expression alleine hat jedoch keinerlei Auswirkung auf die Musterbildung des Neuralrohres und beeinflusst in keiner Weise die Expression anderer Gene (Briscoe et al., 2000). Die Elektroporation dieser Kontroll-DNA wurde immer durchgeführt, ist jedoch nur in den Abbildungen im Anhang exemplarisch dargestellt. In Abbildung 3.7 ist zur leichteren Orientierung eine schematische Übersicht über das Neuralrohr zu sehen. Die Erklärung hierzu befindet sich in der Einleitung.

Im Folgenden werden die durchgeführten Analysen der einzelnen Neuralrohrmarker beschrieben.

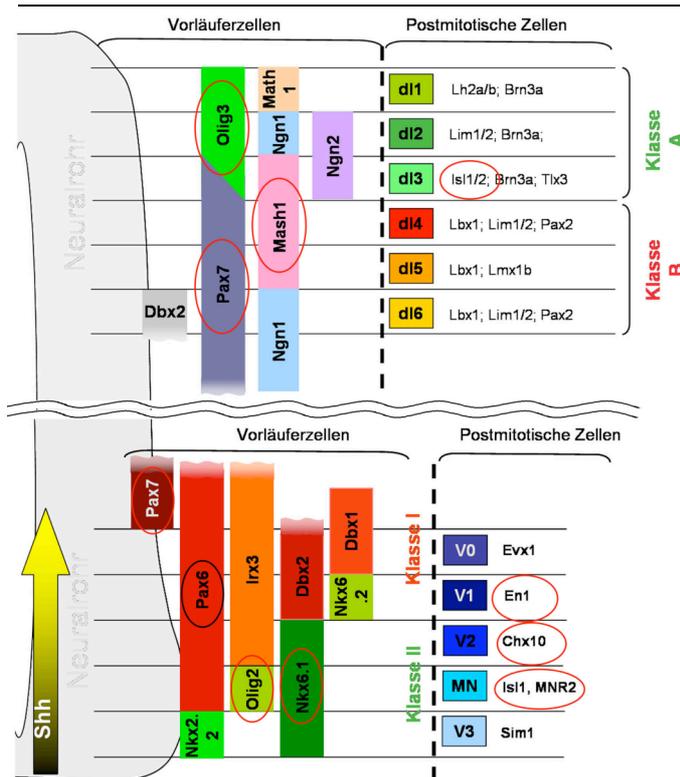


Abb.3.7 Schematische Übersicht des Neuralrohrs. Zur leichteren Orientierung sind die im weiteren Verlauf analysierten Marker für die verschiedenen Neuronenpopulationen umrandet. Eine detaillierte Erläuterung ist in 1.2 zu finden.

3.2.2.1 Die Expression von *Olig2*

Olig2 gehört zur Familie der bHLH Transkriptionsfaktoren und wird im ventralen Neuralrohr im Bereich der Motorneuronenvorläuferdomäne exprimiert (Lu et al., 2000). Es ist bekannt, dass *Irx3* und *Olig2* an der pMN/pV2- Grenze eine gemeinsame Expressionsgrenze besitzen, die durch gegenseitige Inhibierung definiert wird. Überexpressionsstudien zeigten, dass die ektopische Expression von *Irx3* zur Inhibierung und Reduzierung der *Olig2*-Expression führt (Novitch et al. 2001). Es sollte daher zunächst geklärt werden, ob die anderen *Irx*-Faktoren ähnliche Effekte auslösen können. Dazu wurde 24h nach der Elektroporation der einzelnen *Irx*-Gene die Expression von *Olig2* analysiert. In Abbildung 3.8 ist zu sehen, dass nicht nur *Irx3*, sondern jeder der überexprimierten *Irx*-Transkriptionsfaktoren in der Lage ist, die endogene Expression von *Olig2* zu inhibieren. Man erkennt, dass alle Zellen, die durch die Elektroporation getroffen wurden (grüne Fluoreszenz des GFP), kein *Olig2* exprimieren (rote Fluoreszenz). Dieser Effekt ist zellautonom und wird nicht auf benachbarte Zellen übermittelt, da sich unmittelbar neben den elektroporierten Zellen *Olig2* exprimierende Zellen finden (siehe Stern beispielhaft in Abb.3.8 (D)).

Es konnte somit einleitend gezeigt werden, dass mit dem hier benutzten System die bereits veröffentlichten Ergebnisse reproduziert werden konnten. Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass nicht nur *Irx3* sondern alle *Irx*-Faktoren in der Lage sind, eine reprimierende Wirkung auf *Olig2* auszuüben.

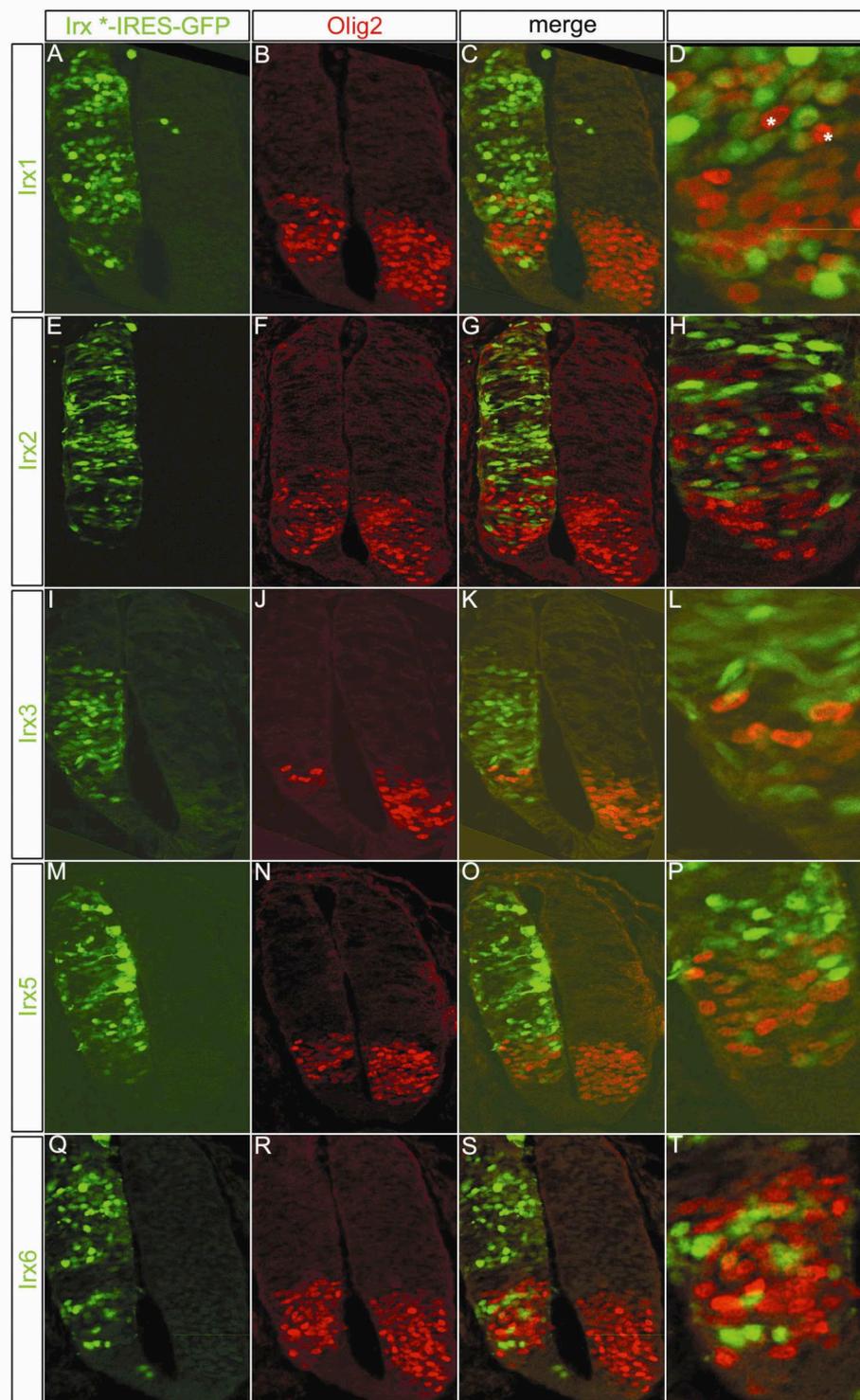


Abb.3.8 Die Überexpression von *Irx*-Genen führt zur Reduzierung der *Olig2*-Expression. Dargestellt sind Antikörperfärbungen gegen *Olig2* (rot) auf transversalen Schnitten des Neuralrohres von Hühnerembryonen 24 h nach der Elektroporation. Die Überexpression der *Irx*-Gene, *Irx1* (A-D), *Irx2* (E-H), *Irx3* (I-L), *Irx5* (K-P) und *Irx6* (O-T), kann anhand der Fluoreszenz des GFPs (grün) verfolgt werden. In der linken Spalte ist jeweils nur die ektopische Expression der *Irx*-Gene dargestellt, in der nächsten Spalte ist Expression von *Olig2* (rot) zu sehen. Vergleicht man in dieser Spalte jeweils die elektroporierte Seite (links) des Neuralrohres mit der „Kontrollseite“ (rechts), so erkennt man, dass die Überexpression der *Irx*-Gene zu einer Reduzierung der *Olig2*-Expression führt. In den beiden rechten Spalten sind jeweils beide Fluoreszenzen dargestellt, wobei die äußerste rechte Spalte eine Ausschnittvergrößerung zeigt. Anhand der fehlenden Überlagerung der Fluoreszenzen (gelb) in der Vergrößerung ist zu erkennen, dass in allen Zellen, die aufgrund der Elektroporation ektopisch ein *Irx*-Gen exprimieren, keine *Olig2*-Expression mehr nachweisbar ist. Dieser Effekt ist zellautonom, da sich direkt neben den elektroporierten Zellen, *Olig2* exprimierende Zellen finden (Sternchen in D).

In den folgenden Abbildungen ist zur leichteren Übersicht jeweils exemplarisch die Überexpression eines einzigen *Irx*-Gens dargestellt. Die Darstellung der Elektroporation der restlichen *Irx*-Gene befindet sich im Anhang.

3.2.2.2 Die Expression von *Isl-1*

Um zu untersuchen, welche Folge die Reduzierung der *Olig2*-Expression in der Motorneuronenvorläuferdomäne auf die weitere Musterbildung des Neuralrohrs hat, wurde die Expression eines Motorneuronen-spezifischen Gens analysiert. *Islet-1* (*Isl-1*) ist ein LIM-Homeodomänen Faktor und wird in den Motorneuronen (Pfaff et al., 1996) sowie in den dI3- (dorsale Interneuronen) Neuronen exprimiert (Helms and Johnson, 2003). 48 Stunden nach der Elektroporation der verschiedenen *Irx*-Gene wurde die Expression von *Isl-1* untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression aller *Irx* Genen zu einem dramatischen Verlust von Motorneuronen führt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass zusätzlich zu der negativen Regulation der Motorneuronendomäne auch eine Reduzierung bzw. der Verlust der dI3-Neuronen erfolgte (Pfeile in Abb.3.9 und Abb.A.1). Die reprimierende Wirkung der *Irx*-Faktoren auf *Olig2* führt demnach nicht nur zu einer transienten Reduzierung der Motorneuronenvorläuferdomäne, sondern zeigt sich auch einen Tag später in einer verminderten Anzahl von Motorneuronen. In Abb.3.9 ist exemplarisch die Expression von *Isl-1* nach der Elektroporation von *Irx5* gezeigt. Die Ergebnisse der Analysen der Überexpression aller *Irx*-Gene sind im Anhang in Abb.A.1 zu sehen.

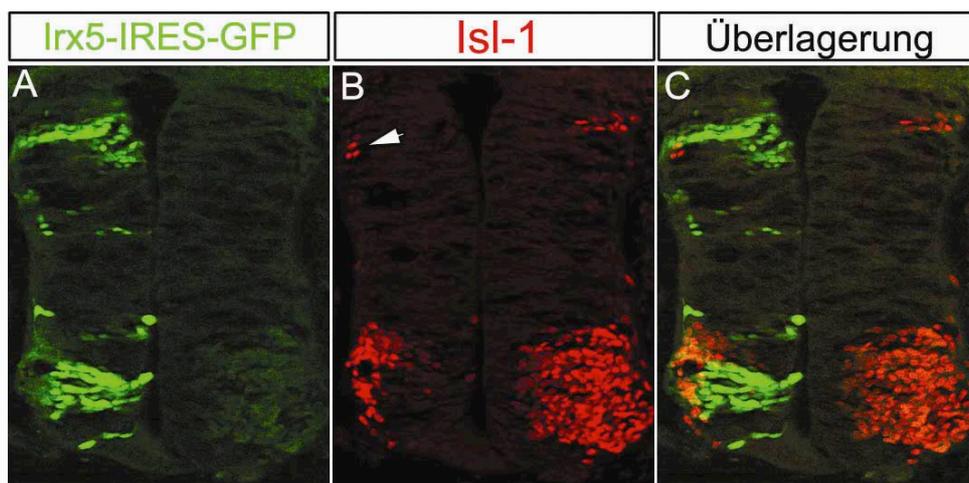


Abb.3.9 Die Motorneuronen- und dI3-Neuronen-Domänen werden in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene reduziert. Abgebildet ist eine Antikörperfärbung gegen *Isl-1* (B) (rot) 48 h nach der Überexpression von *Irx5* (A) (grün). Die ventrale Expressionsdomäne von *Isl-1* markiert die Motorneuronen, während die dorsale Expressionsdomäne in den dI3-Neuronen lokalisiert ist. Im Vergleich der elektroporierten Hälfte des Neuralrohrs (links) mit der nicht behandelten Kontrollseite (rechts) ist zu erkennen, dass die Überexpression von *Irx5* zu einer starken Verkleinerung der ventral Motorneuronen-Domäne führt. Zusätzlich ist auch die dI3-Neuronenpopulation stark reduziert (Pfeil in B).

3.2.2.3 Die Expression von *Chx10*

Um die Auswirkungen der Überexpression der *Irx*-Gene fortführend zu untersuchen wurden zunächst weitere ventrale Neuronenpopulationen analysiert.

Chx10 wird in V2-Neuronen exprimiert, welche die nächst dorsal gelegene, benachbarte Neuronenpopulation zu den Motorneuronen bilden (Smith et al, 2002; Briscoe et al., 2000). Wie auch die anderen Domänen der differenzierten Neuronen, ist die V2-Domäne eine sehr distinkte, klar abgegrenzte Neuronenpopulation. In Folge der Überexpression der *Irx*-Gene konnten einige *Chx10* exprimierende Zellen ventral und dorsal außerhalb der normalen V2-Domäne gefunden werden (Abb.3.10 und Abb.A.2). Diese Induktion ektopischer V2-Neuronen deckte sich mit den Analysen der *Ft/Ft*-Embryonen, in denen eine Verkleinerung der *Chx10*-Expressionsdomäne beobachtet werden konnte (Siehe 3.1.3). Die Überexpression der *Irx*-Gene führte demnach nicht zu einem generellen Zellverlust, wie aufgrund der Ergebnisse der *Isl-1*-Expression (siehe 3.2.3.2) theoretisch zu vermuten gewesen wäre. Die ektopischen *Chx10*-exprimierenden Zellen waren jedoch nicht die von der Elektroporation getroffenen, was an der fehlenden Überlagerung der beiden Fluoreszenzmarker (gelb) zu erkennen ist. Die Induktion zusätzlicher V2-Neuronen wurde demzufolge nur indirekt durch die *Irx* Gene verursacht. Diese Befunde erweckten den Eindruck, als ob sich an Stelle der reduzierten, ventral gelegenen Motorneuronen nun V2-Neuronen bilden könnten. Diese Ventralisierung der V2-Domäne wird auch in *Olig2*^{-/-}-Mutanten gefunden. Dort kommt es zu einem völligen Verlust von Motorneuronen und einer Ausdehnung der V2-Neuronenpopulation nach ventral (Sun et al., 2006). Da aber auch weiter dorsal von der endogenen *Chx10*-Domäne zusätzliche *Chx10* positive Zellen gefunden werden konnten, lag hier keine vollkommene Übereinstimmung mit dem *Olig2*^{-/-}-Phänotyp vor, und es wurden im nächsten Schritt die benachbarte dorsal gelegene V1-Neuronenpopulation untersucht.

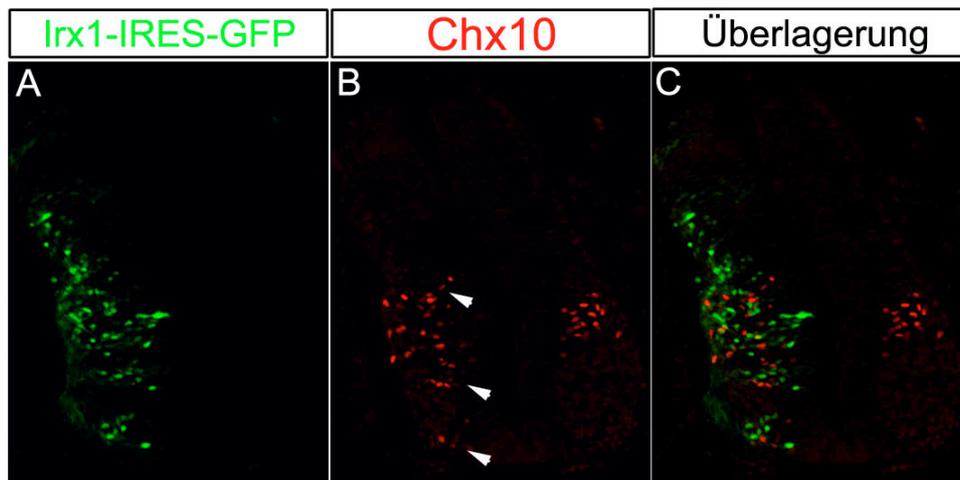


Abb.3.10 Die V2-Neuronen-Domäne dehnt sich bei ectopischer Expression der *Irx*-Gene aus. Es wurde eine Antikörperfärbung gegen Chx10 (rot) auf transversalen Neuralrohrschnitten 48 Stunden nach Elektroporation von *Irx1* (grün) durchgeführt. Im Vergleich der Chx10-Expression in der elektroporierten Hälfte des Neuralrohrs (links) mit der unbehandelten Hälfte (rechts) ist eine eindeutige Ausdehnung der V2-Neuronenpopulation zu erkennen. Es finden sich sowohl dorsal als auch ventral der eigentlichen V2-Domäne Chx10-exprimierende Zellen (Pfeile in B). Anhand der fehlenden gelben Zellen in der Überlagerung (C) wird deutlich, dass es keine Zellen gibt, die *Irx1* und Chx10 exprimieren, so dass es sich nicht um eine direkte Induktion der Chx10-Expression durch *Irx1* handeln kann. Im Anhang in Abb.A.2 sind die Ergebnisse der Elektroporation der anderen *Irx*-Gene dargestellt.

3.2.2.4 Die Expression von *En1*

Folgt man der Reihe der ventralen Neuronen weiter nach dorsal, so schließt sich als nächstes die Population der V1-Neuronen an. Diese kann durch die Expression von *En1* (Engrailed-1) identifiziert werden (Pierani et al., 1999; Ericson et al., 1997). Auch hier kann man eine Veränderung der Expression in Folge der Elektroporation der *Irx*-Gene beobachten. In Abbildung 3.11 und Abb.A.3 sieht man deutlich, dass die *En1*-Domäne auf der elektroporierten Seite des Neuralrohres verkleinert ist. Dieser Befund ließ sich durch die Ergebnisse der bisher durchgeführten Analysen nicht eindeutig erklären, so dass im Folgenden weitere neuronale Marker betrachtet wurden.

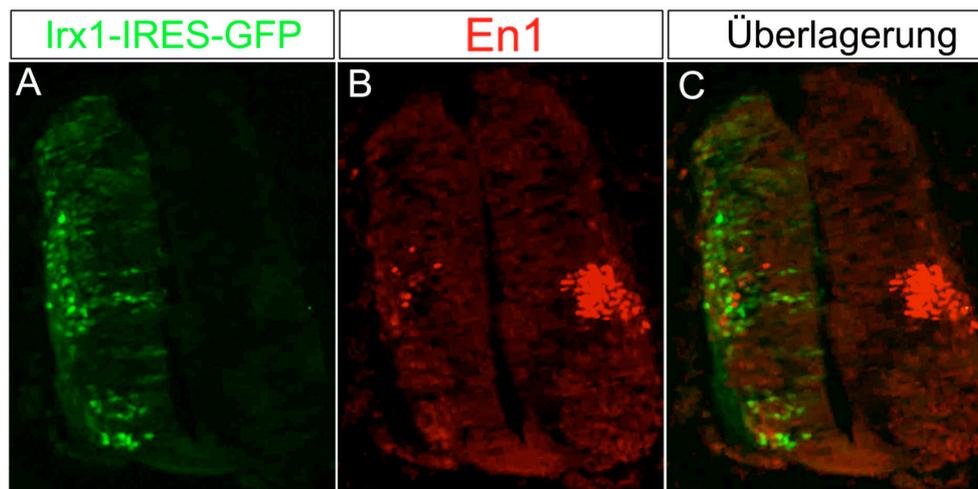


Abb.3.11 Die V1-Neuronenpopulation wird durch die Überexpression der *Irx*-Gene verkleinert. Die Antikörperfärbung gegen En1 (rot) auf Neuralrohrschnitten 48 h nach Überexpression von *Irx1* (grün) zeigt eine deutliche Verkleinerung der V1-Neuronenpopulation auf der elektroporierten Seite.

3.2.2.5 Die Expression von p27

Die Analyse der differenzierten Neuronen zeigte eine Veränderung der Musterbildung im ventralen Neuralrohr als Folge der Überexpression der *Irx*-Gene. So wurden weniger V1- und Motorneuronen, bei einer gleichzeitigen Ausdehnung der V2-Neuronen gefunden. Anhand der Expression von p27 (Kip1), einem allgemeinen Marker für postmitotische Zellen (Cunningham et al., 2002), wurde überprüft, ob die Überexpression der *Irx*-Gene möglicherweise einen Effekt auf die Differenzierung der Zellen im Neuralrohr hat, wie es für ein anderes proneurales Gen, *Cash1*, welches die Differenzierung fördert, gezeigt werden konnte (Nakada et al., 2003). Wie in Abbildung 3.12 und A.4 zu erkennen ist, wurde die Expression von p27 durch die Überexpression der *Irx*-Gene nicht verändert. Es findet also weder eine vermehrte noch eine reduzierte Differenzierung statt. Weiterhin findet man die von der Elektroporation getroffenen Zellen 48 Stunden später sowohl in der Proliferationszone nahe dem Lumen als auch in den postmitotischen Zellen der Mantelzone, welche p27 exprimieren, wodurch ebenfalls gezeigt wird, dass die Überexpression *Irx*-Gene weder die Differenzierung fördert noch verhindert. Die Überexpression der *Irx*-Genen löst demnach nicht ein generelles Differenzierungsproblem aus, sondern verändert spezifisch das dorso-ventrale Musterbildungsprogramm im Neuralrohr.

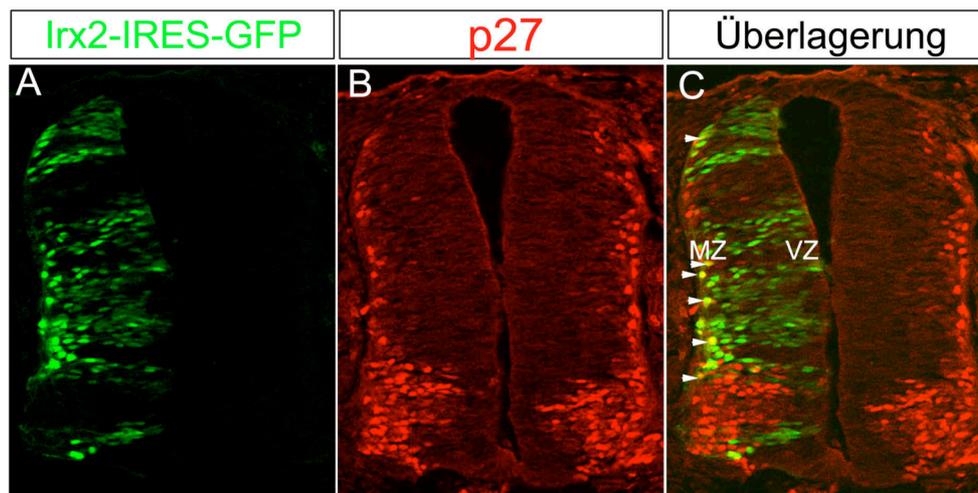


Abb.3.12 Die *Irx*-Gene haben keinen generellen Einfluss auf die Differenzierung.

Anhand der Antikörperfärbung gegen p27 (rot) auf Neuralrohrschnitten 48 h nach der Elektroporation von Irx2 (grün) lassen sich differenzierte, postmitotische Neuronen nachweisen. Es zeigt sich kein Unterschied in der Expression von p27 in der elektroporierten Hälfte und der Kontrollseite des Neuralrohrs (B). Die ektopisch Irx2-exprimierenden Zellen finden sich gleichmäßig verteilt von der inneren VZ zur äußeren MZ und in der MZ findet sich eine Koexpression von p27 und Irx2 (gelb, Pfeile in C). MZ: Mantelzone; VZ: ventrikuläre Zone

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass in Folge der Überexpression von *Irx*-Genen die dorso-ventrale Musterbildung des Neuralrohrs verändert wurde. Auffällig war zunächst, dass die Anzahl der Motoneuronen-Vorläuferzellen, markiert durch *Olig2*, reduziert wurde. Dieser Effekt war nicht nur transient, sondern ließ sich auch in den daraus differenzierenden Neuronentypen wieder finden, wo es ebenfalls eine verminderte Anzahl von Motoneuronen gab. Die Analyse weiterer differenzierter Neuronentypen zeigte, dass gleichzeitig die V2-Neuronendomäne ausgedehnt wurde und eine Reduzierung der V1-Neuronen beobachtet werden konnte. Neben diesen Veränderungen im ventralen Teil des Neuralrohres, konnte außerdem ein Effekt in der dorsalen Hälfte beobachtet werden.

Dort führte die Überexpression von *Irx*-Genen zu einer Verkleinerung bzw. dem Verlust der Expression von *Isl-1* in den dl3-Neuronen. Es konnte jedoch kein generelles Problem in der Differenzierung, gezeigt durch die Expression von p27, gefunden werden.

Es wurde daher nach proneuralen Faktoren gesucht, die in den entsprechenden Vorläuferzellen exprimiert werden und für die Entwicklung der hier veränderten Neuronentypen verantwortlich sind.

3.2.2.6 Die Expression von *Cash1*

Bei dieser Suche wurde als erstes die Expression von *Cash1* analysiert. *Cash1*, ein bHLH-Transkriptionsfaktor, ist ein Homolog zu den *Drosophila* *acheate-scute*-Proteinen (*Cash*: Chicken Acheate-Scute-Homologue; in der Maus *Mash*: Mouse Acheate-Scute-Homologue; Johnson et al., 1990) und wird in einer zweigeteilten Domäne im Neuralrohr exprimiert. Im dorsalen Neuralrohr wird *Cash1* im Bereich der Vorläufer der dI3,4 und 5 –Neuronen exprimiert, während sich im ventralen Neuralrohr die Expressionsdomäne auf den Bereich der V2-Vorläuferpopulation beschränkt (Li et al., 2005; Helms und Johnson, 2003; Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Gowan et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Cash1* einerseits die Differenzierung von Isl-1 exprimierenden dI3-Neuronen fördert (Nakada et al., 2003) und andererseits die Bildung von V2-Neuronen verhindert bzw. hemmt (Li et al., 2005). Weiterhin zeigen *Mash1*^{-/-}-Mutanten eine vermehrte Anzahl von Chx10-exprimierenden V2-Neuronen (Li et al., 2005). Diese Umstände machten *Cash1* zu einem guten Kandidaten für ein proneurales Gen, welches für die beobachteten Veränderungen in der Expression von Isl-1 in den dI3-Neuronen sowie Chx10 in den V2-Neuronen verantwortlich sein könnte. Verstärkt wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass die Iro-Faktoren in *Drosophila* für die Expression der Gene *acheate-scute*-Komplexes notwendig sind (Kehl et al., 1998; Leyns et al., 1996) und vermutet wird, dass sie direkt oder indirekt für die Induktion der Expression verantwortlich sind (Cavodeassi et al., 2001; Gomez-Skamerta et al., 1996). Auch wenn bisher keine entsprechende Regulation für die Vertebraten-Homologe der *acheate-scute* bzw. *Iro* –Komplexe gezeigt werden konnte, war es denkbar, dass die Überexpression der *Irx*-Gene im Neuralrohr zu einer Veränderung der *Cash1*-Expression geführt haben konnte. Die beobachteten Veränderungen in den dI3-Neuronen sowie den V2-Neuronen wären jedoch nur mit einer verminderten Expression von *Cash1* zu erklären, wohingegen die Überexpression der *Irx*-Gene analog zu den *Drosophila*-Daten zu einer gesteigerten *Cash1*-Expression führen müssten. Trotz dieser widersprüchlichen Erwartungshaltung wurde die Expression von *Cash1* analysiert. Da hier kein Antikörper zur Verfügung stand, wurden statt einer Antikörperfärbung *in-situ*-Hybridisierungen auf benachbarten transversalen Schnitten durchgeführt. Wie in Abb. 3.13 zu erkennen ist, blieb die *Cash1*-Expression auch nach der Elektroporation von *Irx2* unverändert. Die Ergebnisse der Überexpression der restlichen *Irx*-Gene ist im Anhang in Abb.A.5 zu sehen. Demnach führte die Überexpression der *Irx*-Gene nicht zu einer Beeinflussung der *Cash1*-Expression und erklärte so auch nicht die Veränderungen in der dI3- bzw. V2-Neuronenpopulationen.

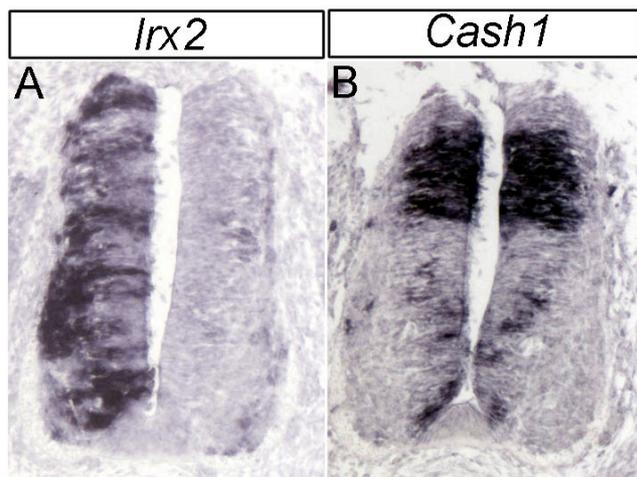


Abb.3.13 Die Expression von *Cash1* wird durch die Überexpression der *Irx*-Gene nicht verändert. Dargestellt sind *in situ*-Hybridisierungen gegen *Irx2* (A) und *Cash1* (B) auf aufeinander folgenden Paraffinschnitten nach der Elektroporation von *Irx2*. Da es sich bei dem überexprimierten *Irx*-Gen um das murine Gen handelt, konnte durch die Wahl einer entsprechenden *Irx2*-Sonde nur die ektopische *Irx2*-Expression sichtbar gemacht werden. Vergleicht man nun die *Cash1*-Expression in der elektroporierten (links) und der „Kontrollseite“ (rechts) des Neuralrohres miteinander, so ist kein Unterschied zu erkennen.

3.2.2.7 Die Expression von *Pax7*

Ein weiterer untersuchter Transkriptionsfaktor ist das proneurale Gen *Pax7*, ein Mitglied der *Pax*-Genfamilie, welches durch Bmp-Signale aus der Dachplatte induziert wird und den KlasseI-Genen zugeordnet ist. Durch die reprimierende Wirkung des Shh-Signals wird die Expression von *Pax7* auf die dorsale Hälfte des Neuralrohres beschränkt (Liem et al., 1997) und erstreckt sich von den Vorläufern der dI1- bis zu denen der dI6-Neuronen (Briscoe et al., 2000, Jostes et al., 1990). Die Analyse von *Pax7*^{-/-}-Mutanten zeigte, dass *Pax7* an der Bildung von dorsalen Kommissuralneuronen beteiligt ist (Mansouri und Gruss, 1998) und somit eventuell für den beobachteten Verlust der dI3-Neuronen (siehe 3.2.3.2) verantwortlich sein könnte. Die Analyse der *Pax7*-Expression 24 Stunden nach der Elektroporation zeigte jedoch keine Veränderung in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene (Abb.3.13 und A.6). Stattdessen wurden die ektopisch exprimierten *Irx*-Gene überlappend mit der endogenen *Pax7*-Expression gefunden (Abb.3.13 C, gelbe Zellen).

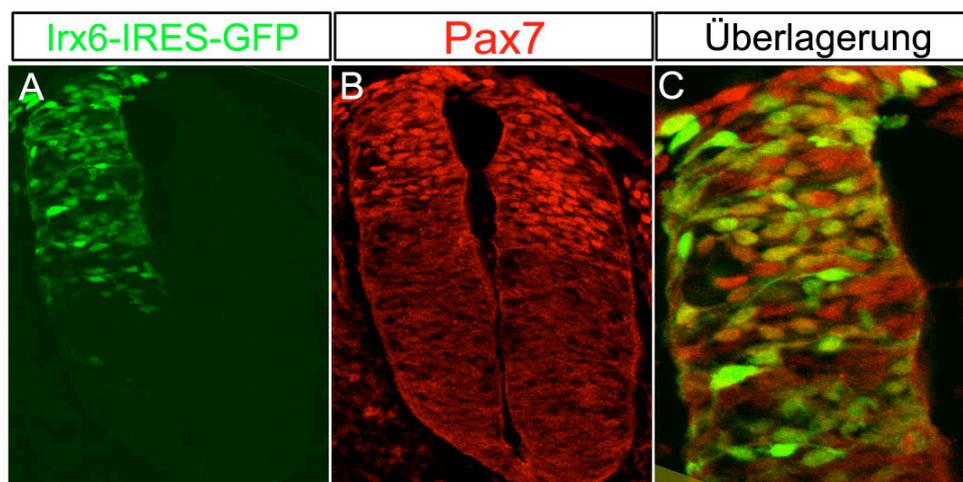


Abb.3.14 Die ektopische Expression der *Irx*-Gene hat keinen Einfluss auf die Expression von *Pax7*. Die Antikörperfärbung gegen *Pax7* (rot) 24 h nach der Überexpression von *Irx6* (grün) im Neuralrohr zeigt keine Veränderung der *Pax7*-Expression in der elektroporierten Hälfte des Neuralrohres. Anhand der Überlagerung in der Ausschnittvergrößerung (C) lässt sich gut erkennen, dass die Überexpression von *Irx6* die *Pax7*-Expression nicht beeinflusst und es zur Koexpression von *Irx6* und *Pax7* kommt (gelbe Zellen).

3.2.2.8 Die Expression von *Olig3*

Ein weiterer möglicher Faktor ist *Olig3*, neben *Olig2* ebenfalls ein Mitglied der bHLH Olig-Familie, welches in den dorsalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Ding et al., 2005; Müller et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass *Olig3*^{-/-}-Embryonen einen Verlust von dI2- und dI3-Neuronen aufweisen (Müller et al., 2005), so dass aufgrund der beobachteten Reduzierung der dI3-Neuronen (siehe 3.2.3.2) in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene die Expression von *Olig3* analysiert wurde. 24 Stunden nach der Elektroporation der *Irx*-Gene zeigte sich für *Olig3* ein ähnlicher Effekt, wie er für *Olig2* (siehe 3.2.3.1) zu beobachten war. Die *Olig3* Expression wurde teilweise durch die Überexpression der *Irx*-Gene inhibiert. Diese Reprimierung war jedoch überwiegend in der ventralen Hälfte der *Olig3*-Domäne zu sehen, während in der dorsalen Hälfte Zellen gefunden wurden, die sowohl *Irx* als auch *Olig3* exprimierten (siehe Abb.3.15 und A.7). Demnach führte die Überexpression von *Irx*-Genen zu einer teilweisen Reprimierung der *Olig3*-Expression in den dorsalen Vorläuferdomänen, aus welcher normalerweise die späteren dI3-Neuronen gebildet würden. Genau wie im Fall von *Olig2* war die Reduzierung der *Olig3*-Expression kein transienter Effekt, sondern zog eine verminderte Differenzierung von dI3-Neuronen, markiert durch *Isl-1*, nach sich. Somit wurde ein proneurales Gen gefunden, welches durch die Überexpression der *Irx*-Gene in seiner Expression gestört wurde und für die beobachteten Veränderungen im dorsalen Neuralrohr verantwortlich gemacht werden kann.

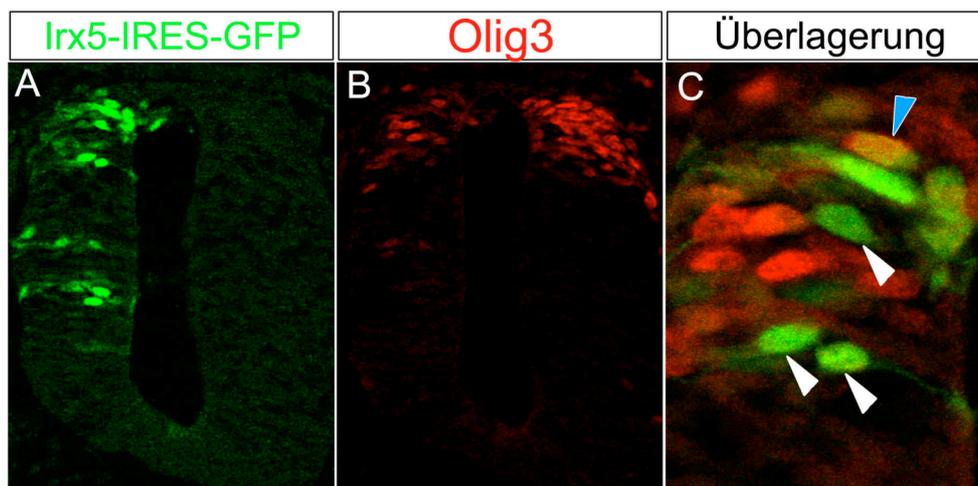


Abb.3.15 Die *Olig3*-Expression wird durch *Irx*-Überexpression inhibiert. Die Abbildung zeigt Antikörperfärbungen gegen *Olig3* (rot) auf transversalen Neuralrohrschnitten 24 h nach der Elektroporation von *Irx5* (grün). Vergleicht man die *Olig3*-Expression in der linken, elektroporierten Hälfte des Neuralrohrs mit der in der rechten Kontrollseite, so fällt zunächst eine Reduzierung der *Olig3*-Expression in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene auf. In der Überlagerung und Ausschnittvergrößerung erkennt man dann, dass *Irx5* in der dorsalen Hälfte der *Olig3*-Expression keinen reprimierenden Effekt ausübt. Stattdessen findet man Zellen die sowohl das ektopische *Irx*-Gen, als auch *Olig3* exprimieren (gelbe Zellen, blaue Pfeile), während in der ventralen Hälfte der *Olig3*-Expression keine Koexpression gefunden werden kann. Hier führt die *Irx*-Expression zu einer Reprimierung der *Olig3*-Expression und in allen *Irx*-exprimierenden Zellen (grün) ist kein *Olig3* nachweisbar (weiße Pfeile).

3.2.2.9 Die Expression von *Nkx6.1*

Die weiteren Analysen richteten sich gezielt auf die Suche nach proneuralen Genen, die eventuell die gestörte Musterbildung im ventralen Teil des Neuralrohes verursacht haben könnten. Die zuvor beschriebene Ausdehnung der V2-Domäne (siehe 3.2.3.3) ließ sich zum Teil durch die Reduzierung der *Olig2*-Expression erklären, da auch in *Olig2*^{-/-}-Mutanten eine Vergrößerung der V2-Neuronenpopulation in den ventralen Bereich beschrieben ist (Sun et al., 2006). Die durchgeführten Experimente führten jedoch nicht nur zu einer Ausdehnung der V2-Neuronen nach ventral, sondern auch nach dorsal, wobei hier gleichzeitig eine Reduzierung der V1-Domäne beobachtet wurde (siehe 3.2.3.4). Demnach musste hier nach Faktoren gesucht werden, die für die Differenzierung dieser Neuronentypen verantwortlich sind und eventuell durch die Überexpression der *Irx*-Gene in ihrer Funktion gestört wurden. Ein Mitglied der *Nkx*-Genfamilie, *Nkx6.1*, ist ein solches proneurales Gen. *Nkx6.1* wird im ventralen Neuralrohr in den pV3, pMN und pV2 exprimiert und gehört zu den von Shh positiv regulierten Klasse II-Genen (Briscoe et al., 2000). In *Nkx6.1*^{-/-}-Embryonen wurde ein Verlust der V2-Neuronenpopulation bei gleichzeitiger Ausdehnung der V1-Neuronendomäne beschrieben (Sander et al., 2000). Es wäre demnach möglich, dass die Überexpression der *Irx*-Gene zu einer gestörten *Nkx6.1*-Expression führte, wodurch die Änderungen in der Expression von *Chx10* und *En1* begründet liegen könnten. Die Analyse der *Nkx6.1* Expression im Anschluss an die Überexpression von *Irx*-Genen zeigte jedoch keine bemerkenswerte Veränderung (siehe Abb.3.16 und A.8), so dass es für die beschriebenen Veränderungen in der Expression von *Chx10* in den V2-Neuronen bzw. von *En1* in den V1-Neuronen eine andere Ursache geben musste.

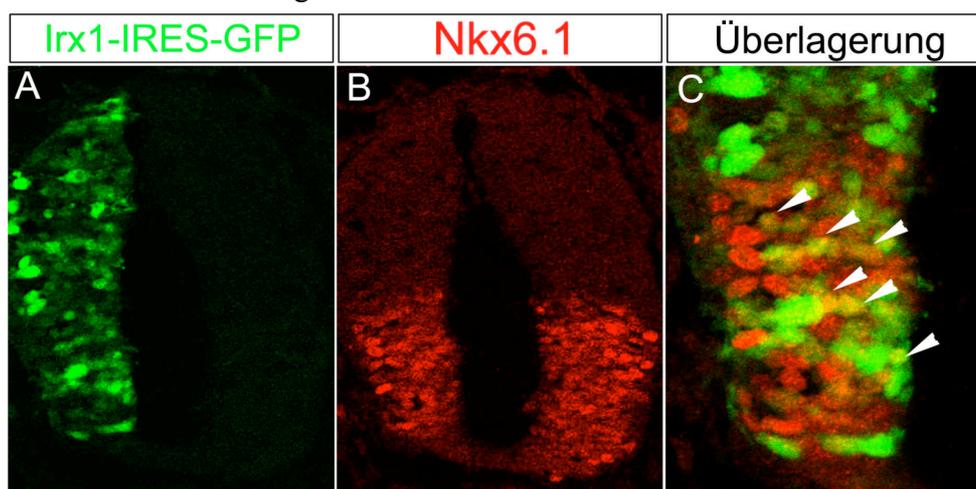


Abb.3.16 Die Expression von *Nkx6.1* bleibt auch nach der Elektroporation der *Irx* unverändert. Dargestellt ist eine Antikörperfärbung gegen *Nkx6.1* (rot) auf einem transversalen Neuralrohrschnitt 24 h nach der Elektroporation von *Irx1* (grün). Es zeigt sich keine Veränderung der *Nkx6.1*-Expression beim Vergleich der elektroporierten Seite des Neuralrohrs (links) mit der Kontrollseite (rechts). Weiterhin sind in der Überlagerung in der Ausschnittsvergrößerung (C) einige Zellen, die sowohl *Irx1* als auch *Nkx6.1* exprimieren (gelb, Pfeile), zu sehen.

3.2.2.10 Die Expression von Pax6

Pax6, ein Mitglied der *Pax*-Genfamilie, wird in einer großen Domäne der Neuronenvorläufer von der dorsalen Seite bis an die pV3-Vorläuferdomäne exprimiert. *Pax6* gehört zu den von Shh negativ regulierten Klasse I-Genen und bildet mit *Nkx2.2* zusammen durch gegenseitige Inhibierung die Grenze zwischen der pV3 und pMN-Vorläuferdomäne aus (Lei et al., 2006; Briscoe et al., 2000; Ericson et al., 1997). In der *Pax6*-Nullmutante *Sey/Sey* (*Small Eye*) konnte ein vollständiger Verlust der V1-Neuronen-Population, welche durch die Expression von *En1* gekennzeichnet ist, beobachtet werden. Die benachbarten V2 und V0 –Neuronen, markiert durch *Chx10* und *Evx1*, hingegen werden, wenn auch zum Teil in verminderter Zahl, noch gebildet (Takahashi und Osumi, 2002; Burill et al., 1997; Ericson et al., 1997). Es gibt weiterhin Hinweise, dass *Pax6* zellautonom für die korrekte Entstehung der V1-Interneuronenpopulation verantwortlich ist. In diesem Szenario reguliert *En1*, in der Hierarchie nachgeschaltet von *Pax6*, die Entstehung inhibitorischer Synapsen von den aus den V1-Neuronen spezialisierenden Renshaw-Zellen und den Motorneuronen (Sapir et al., 2004). Aufgrund der beobachteten starken Reduzierung von *En1*-exprimierenden V1-Neuronen in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene (siehe 3.2.3.4) wurde demnach die Expression von *Pax6* analysiert. Damit sollte geklärt werden, ob eventuelle Veränderungen in dieser Expression für die Abnahme der Anzahl der V1-Neuronen verantwortlich sein konnten. Bei Betrachtung der *Pax6*-Domäne nach der Überexpression der einzelnen *Irx*-Gene fiel zunächst eine reduzierte *Pax6*-Expression in der elektroporierten Hälfte des Neuralrohres auf (siehe Abb.3.17 und A.9). Die Expression schien vermindert, jedoch nicht vollständig verschwunden. Es konnten vereinzelte Zellen gefunden werden, die sowohl *Pax6* als auch das ektopische *Irx*-Gen exprimierten (weiße Pfeile in Abb.3.17), wobei in diesen Fällen die *Irx*-Expression eher schwächer war (vergleiche GFP-Expression in den einzelnen Zellen). Dahingegen zeigten Zellen, die vergleichsweise stark das entsprechende *Irx*-Gen exprimierten, nahezu keine *Pax6*-Expression mehr (blaue Pfeile in Abb.3.17). Insgesamt scheint demnach eine starke Überexpression der *Irx*-Gene inhibierend auf die *Pax6*-Expression zu wirken. Dieser Befund trug zwar einerseits dazu bei die beobachtete Reduzierung der V1-Neuronen zu erklären, war jedoch andererseits auch überraschend, da die endogene Expression von *Irx3* und *Pax6* in großen Abschnitten überlappend ist (siehe Abb.A.9). Es blieb demnach zu vermuten, dass es sich hier eventuell um einen Dosis-abhängigen Repressor-Effekt der *Irx*-Gene handelt, der durch die relative starke ektopische Expression ausgelöst wird.

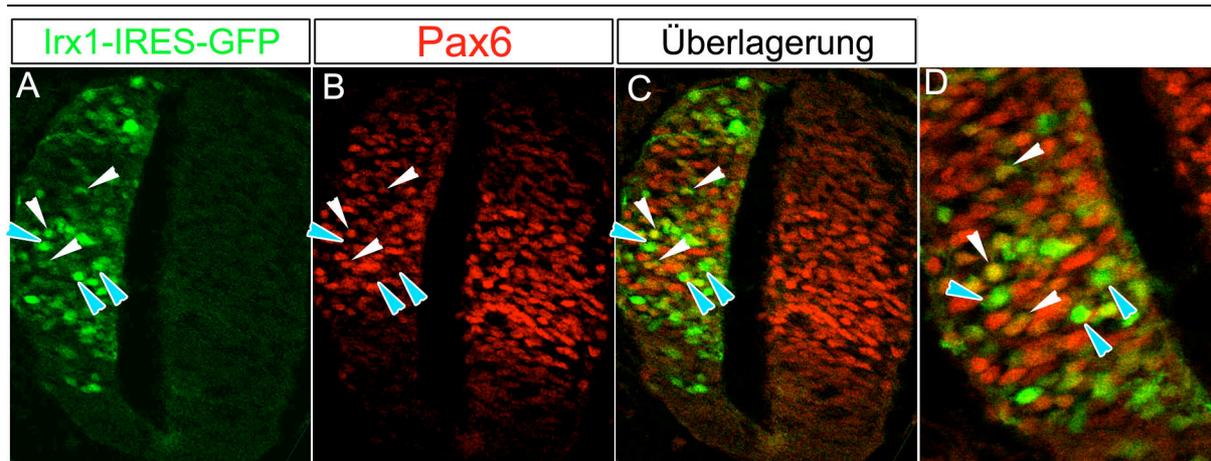


Abb.3.17 Die Expression von Pax6 wird durch die ektopische exprimierten *Irx*-Gene reduziert. Dargestellt ist eine Antikörperfärbung gegen Pax6 (rot, B) nach der Elektroporation von *Irx1* (grün, A). Es fällt zunächst auf, dass die Pax6-Expression auf der elektroporierten Seite des Neuralrohres reduziert wirkt (B). In der Überlagerung (C) und der Ausschnittvergrößerung (D) wird sichtbar, dass Zellen, die relativ stark ektopisch *Irx1* exprimieren, fast keine Pax6-Expression mehr zeigen (blaue Pfeile), wohingegen Zellen, die vergleichsweise weniger des elektroporierten *Irx*-Genes exprimieren, gelb erscheinen, also weiterhin Pax6 exprimieren (weiße Pfeile).

3.3 Die Suche nach direkten Zielgenen

Die Überexpressionsstudien der *Irx*-Gene zeigten, dass alle Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene die gleichen Veränderungen in der dorso-ventralen Musterbildung des Neuralrohres bewirken, wenn sie ektopisch exprimiert werden. Diese Veränderungen konnten einen Hinweis auf die Funktion der *Irx*-Gene für die Musterbildung des Neuralrohres geben, es blieb jedoch weiter unklar, ob die *Irx*-Gene direkt oder nur indirekt verantwortlich für die gestörte Musterbildung sind. Man findet unter anderem immer eine Reduzierung der *Olig2*- (Siehe 3.2.3.1) und der *Olig3*-Expression (siehe 3.2.3.8). Durch die Veränderung der Expression dieser beiden proneuralen Gene kommt es im weiteren Verlauf der Entwicklung zu der ebenfalls beobachteten Verkleinerung der Motorneuronendomäne, sowie zur Reduktion der dI3-Neuronenpopulation (Siehe 3.2.3.2). Weiterhin besitzen *Irx3* und *Olig2* im wildtypischen Zustand eine gemeinsame Expressionsgrenze, die durch die gegenseitige Inhibierung dieser beiden Faktoren bestimmt wird (Novitch et al., 2001; Briscoe et al., 2000). Außerdem ist im Falle der *Ft*-Mutante *Irx1* in der Lage die reprimierende Wirkung von *Irx3* auf *Olig2* zu übernehmen (siehe 3.1.3, Abb.3.2). Unklar ist jedoch, wie diese Inhibierung vollzogen wird. Es stellte sich nun die Frage, ob die Reduzierung der *Olig2* und *Olig3* Expression indirekt erfolgt oder ob es sich um eine direkte Inhibierung durch die *Irx*-Transkriptionsfaktoren handelte, und die beiden Gene der *Olig*-Familie somit potentiell zu den ersten identifizierten direkten Zielgenen der *Irx*-Faktoren gehören.

Die *Olig*-Genfamilie umfasst drei Mitglieder, *Olig1*, 2 und 3, die alle für bHLH-Transkriptionsfaktoren kodieren. Sie sind vermutlich durch Duplikationsereignisse entstanden und können als Paraloge bezeichnet werden. *Olig1* und *Olig2* sind beide auf Chromosom 21 des Menschen (Maus Chr. 16) lokalisiert. Beide Gene besitzen dieselbe Leserasterorientierung und *Olig2* befindet sich ungefähr 40 kb „upstream“ von *Olig1*, wobei weder zwischen den beiden Genen noch in einem Abstand von ca. 200 kb bzw. 160 kb „upstream“ oder „downstream“ für andere Gene kodiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass *Olig1* und *Olig2* in einem sehr ähnlichen Expressionsmuster im Neuralrohr der Maus exprimiert werden. Beide werden um den Tag E.9.5 beginnend im ventralen Neuralrohr exprimiert. Dabei ist die Expression von *Olig2* deutlich stärker als die von *Olig1* und schränkt sich dann im weiteren Verlauf der Entwicklung bis zum Tag E12.5 auf die schmale Region der Motorneuronenvorläuferdomäne ein. Die *Olig1*-Expression nimmt zunächst schnell soweit ab, dass sie nicht mehr nachgewiesen werden kann, bis sie am Tag E12.5 überlappend mit *Olig2* wieder auftaucht. Danach ändern sich die Expressionsdomänen der beiden *Olig*-Gene und sie werden in den sich nun entwickelnden Oligodendrocyten exprimiert (Zhou et al., 2000). Der Zeitraum, in dem die *Olig1*-Expression an Stärke verliert und nicht mehr nachgewiesen werden kann (E10.0- E12.5) entspricht in etwa dem hier analysierten Entwicklungszeitraum im Hühnerembryo, so dass *Olig1* in dieser Analyse nicht berücksichtigt wurde. Man unterscheidet demnach auch zwischen einer frühen und einer späten Expression von *Olig1* und 2, wobei sie während der späten Expressionsphase entscheidend an der Bildung der Oligodendrocyten beteiligt sind, wie verschiedene Überexpressionsstudien und die Analyse von *Olig1*^{-/-}- und *Olig2*^{-/-}-Einzelmutanten, sowie von *Olig1*^{-/-};*Olig2*^{-/-}-Doppelmutanten gezeigt haben (Lu et al., 2002, 2001, 2000, Takebayashi et al., 2002, Zhou und Anderson, 2002). Für *Olig2* konnte außerdem gezeigt werden, dass es in der frühen Phase der Entwicklung eine essentielle Rolle für die Bildung der Motorneuronen spielt. *Olig2*^{-/-}-Mutanten zeigen einen völligen Verlust von Motorneuronen (Takebayashi et al., 2002).

Das dritte Mitglied der *Olig*-Genfamilie -*Olig3*- ist anders als die beiden ersten *Olig*-Gene auf Chromosom 6 des Menschen lokalisiert. Die Expression von *Olig3* kann erstmals um Tag E9.5 im Neuralrohr nachgewiesen werden und beschränkt sich zunächst bis einschließlich Tag E10.5 auf den dorsalsten Teil des Neuralrohres, jedoch ohne die Dachplatte einzuschließen. Im Stadium E11.5 wird die dorsale *Olig3*-Domäne zunehmend kleiner, während gleichzeitig im ventralen Neuralrohr eine neue *Olig3*-Expressionsdomäne nachweisbar ist, welche zunächst in drei distinkte Bereiche unterteilt werden kann, jedoch

nicht mit der *Olig2*-Expression überlappt. Während die dorsale Expressionsdomäne auf die ventrikuläre Zone des Neuralrohres beschränkt ist, handelt es sich bei den ventralen *Olig3*-exprimierenden Zellen um postmitotische Neuronen (Takebayashi et al., 2002, 2000). Wie schon in 3.2.3.8 erwähnt, konnte der dorsalen Expression von *Olig3* bereits eine Funktion zugewiesen werden, da in *Olig3*^{-/-}-Embryonen nur noch eine reduzierte Anzahl von dI1-Neuronen, jedoch keine dI2 und dI3-Neuronen mehr nachgewiesen werden können (Müller et al., 2005).

Um erstmals potentielle direkte *Irx*-Zielgene zu identifizieren, wurden die Ergebnisse von Biloni et al., 2005, verwendet. Durch DNA-Bindungsstudien mit dem *Drosophila* Iroquois Homolog *mirr* konnte gezeigt werden, dass die acht Basenpaar lange Sequenz ACAnnTGT für die spezifische Bindung der Iroquois-Transkriptionsfaktoren an die DNA ausreichend und notwendig ist. Dieses Motiv wird nicht nur von *Mirr* (Mirror), sondern auch von den anderen *Drosophila* Iro-Proteinen sowie dem Vertebraten-Homolog *Irx4* erkannt und wird als IBS (Iroquois Binding Sequence) bezeichnet (Biloni et al., 2005).

Wenn die zuvor beobachtete Reduzierung der *Olig2* und *Olig3* -Expression durch eine direkte Reprimierung der Transkription durch die überexprimierten *Irx* Gene erfolgt war, mussten sich in der chromosomalen Umgebung von *Olig2* und *Olig3* IBS-Elemente befinden. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass eine funktionelle Transkriptionsfaktorbindestelle hoch konserviert bei verschiedenen Spezies zu finden ist. Daher wurde zunächst nach sogenannten CNEs (conserved non-coding elements) der Nähe der *Olig2*- und *Olig3*-Loci gesucht.

Diese Datenbankanalyse wurde von Dr. Renate Dildrop im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere durchgeführt und führte zu der Identifizierung von 27 CNEs in der *Olig2*-Region und 33 CNEs in der *Olig3*-Region. Es wurden Elemente gesucht, die mindestens in Mensch, Maus, Ratte und Huhn konserviert waren. Viele der so identifizierten CNEs waren jedoch auch noch weiter bis zum Frosch und/oder Fisch konserviert (verwendete Abkürzungen: hum: Human - *Homo sapiens*, mus: Maus - *Mus musculus*, rat: Ratte *Rattus norvegicus* chk: Huhn - *Gallus gallus*, xen: Frosch - *Xenopus tropicallis*, zef: Zebrafisch - *Danio rerio*, fug: Kugelfisch – *Takifugu rupripes* , tet: grüner Kugelfisch - *Tetraodon nigriviridis*). Die Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) und teilweise per Hand in einem Multi-Spezies-Sequenzvergleiches gegenüberstellt.

In den identifizierten CNEs wurde nun nach dem Vorhandensein eines hochkonservierten IBS-Motives gesucht, so dass am Ende im Genom um *Olig2* und *Olig3* jeweils zwei CNEs - *Olig2_CNE-34* und *Olig2_CNE+26* bzw. *Olig3_CNE-19* und *Olig3_CNE+21* - als potentielle

Irx-Bindestellen zur weiteren Analyse zur Verfügung standen (siehe Abb.3.18). Die Zahl hinter den jeweiligen CNEs gibt ihre Entfernung zum Transkriptionsstart in Kb an. Eine detailliertere Übersicht über alle identifizierten CNEs ist im Anhang in Abb.A10 und A.11 zu sehen.

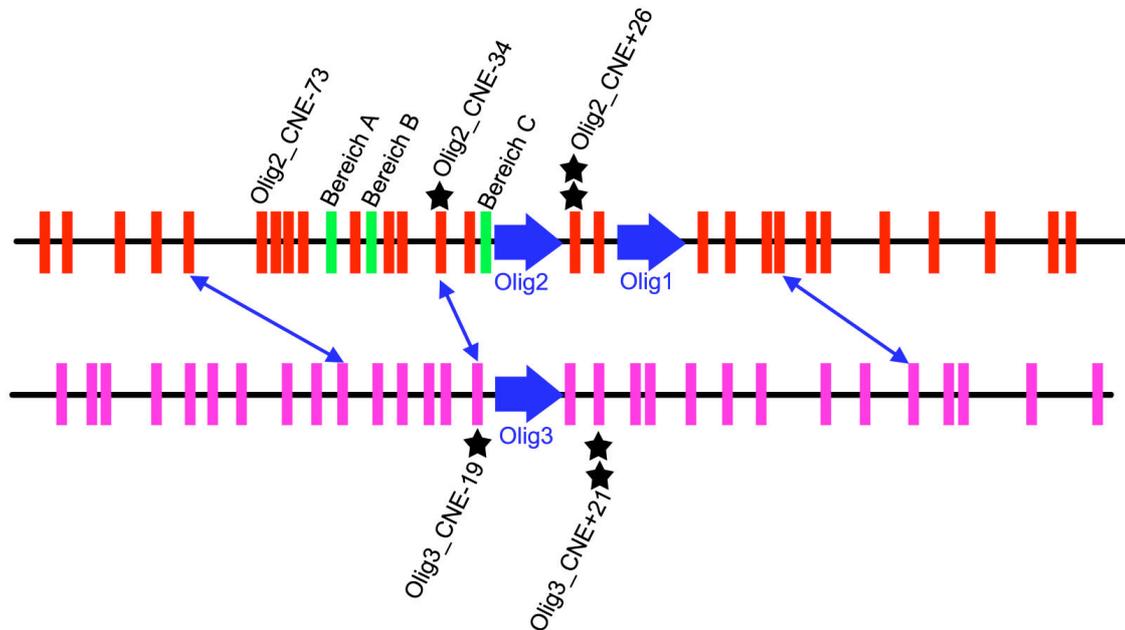


Abb.3.18 Schematische Übersicht über den *Olig2/Olig1*- bzw. den *Olig3*-Lokus. Die Gene und ihre Leserichtung sind durch blaue Pfeile gekennzeichnet. Die roten bzw. rosa Balken markieren alle identifizierten CNEs. Dabei wurden um *Olig2* in 350 kb 27 CNEs und um *Olig3* in 350 kb 33 CNEs gefunden. Die mit den Sternen markierten CNEs enthalten ein bzw. zwei IBS-Motive in hoher Konservierung von Mensch bis Frosch/Fisch. Die blauen Doppel-Pfeile verbinden CNEs in der *Olig2*- und *Olig3*-Region miteinander, die als Paraloge angesehen werden. Die grünen Balken markieren nicht konservierte Bereiche, in denen das IBS-Motiv lediglich in Ratte bzw. Maus existiert (Das Schema wurde nach einer Vorlage von Dr. Renate Dildrop erweitert).

3.3.1 *Olig2* und *Olig3* besitzen ein paraloges CNE

Ein Sequenzvergleich zwischen zweien der identifizierten CNEs, einem aus dem *Olig2*-Locus *Olig2*-CNE-34, und einem anderen aus dem *Olig3*-Locus, *Olig3*_CNE-19, zeigte, dass es sich bei diesen beiden CNEs um paraloge handelt, die eine große Übereinstimmung zeigen (siehe Abb.3.19, mündliche Mitteilung RD). Sie sind vermutlich zusammen mit den *Olig*-Genen selbst bei einem Duplikationsereignis entstanden.



Abb.3.19 Olig2_CNE-34 und Olig3_CNE-19 sind Paraloge. Ein Multispezies-Alignment der beiden CNEs zeigt, dass sie zu großen Teilen identisch sind und somit als Paraloge bezeichnet werden können. In blauer Schrift dargestellt sind die Bereiche, in denen die Konservierung innerhalb der einzelnen CNEs bis mindestens zum Frosch bzw. Fisch vorliegt. Die IBS ist in gelb hinterlegt, die Abschnitte mit hoher Homologie zwischen den beiden CNEs sind in Grau hinterlegt. Neben dem IBS-Motiv gibt es auf jeder Seite einen 14bp großen, ebenfalls hochkonservierten Block (Sternchen). Rot unterstrichen sind die Ränder des für den nachfolgenden Test ausgewählten murinen Olig2_CNE-34. Innerhalb des Olig2_CNE-34 gibt es in Zebrafisch und *Tetraodon* in der IBS einen Austausch von ACAnnTGT zu ACAnnTGC (rot).

Somit besitzen *Olig2* und *Olig3* zwei paraloge CNEs, in denen zentral ein IBS-Motiv lokalisiert ist. Aufgrund dieses Befundes wurde die Hypothese bestärkt, dass es sich bei den *Olig*-Genen um direkte Zielgene der Irx-Transkriptionsfaktoren handelt.

3.3.2 Einführung eines Funktionalitätstest für die einzelnen CNEs

Um festzustellen, ob durch die identifizierten, IBS-enhaltenden CNEs eine direkte Regulation der *Olig*-Gene durch die *Irx*-Faktoren vermittelt wird, wurden sie in einem Reporter-Experiment auf ihre Fähigkeit getestet, die regulatorische Wirkung eines *Irx*-Transkriptionsfaktors zu vermitteln.

Dazu wurde ein Reporter-System benutzt, in dem die Expression des Reporters in Abhängigkeit von einer funktionellen Bindung des Transkriptionsfaktors an das Erkennungsmotiv reguliert wird (siehe Abb. 3.20). Da durch die Überexpression der *Irx*-Gene im Neuralrohr eine Reduzierung der endogenen *Olig2*- und *Olig3*-Expression erreicht wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass im Neuralrohr alle eventuell für die Bindung der *Irx* an die DNA notwendigen Ko-Faktoren vorhanden sind. Da verhältnismäßig große Mengen des Reportervektors eingesetzt wurden, um die Expression des Reporter genes beobachten zu können, war die endogene *Irx*-Expression für eine Regulation der Expression nicht ausreichend. Es wurde deshalb jeweils das entsprechende Reporterkonstrukt mit einem *Irx*-Expressionsvektor in das Neuralrohr koelektroporiert.

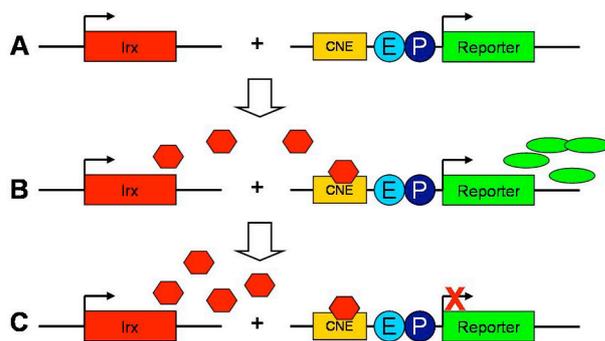


Abb.3.20 Schematische Darstellung des Reporterexperimentes. A: Koelektroporation eines *Irx*-Expressionsvektors und eines CNE-Reportervektors in das Neuralrohr. Handelt es sich bei dem CNE um ein funktionelles regulatorisches Element, welches ein *Irx*-Protein binden kann (B), so wird durch die Reporterexpression durch die reprimierende Wirkung der *Irx*-Proteine inhibiert (C). E: Enhancer; P: Promotor

Das Reporterkonstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Gomez-Skarmeta zur Verfügung gestellt und setzte sich aus einem M48-Enhancer-Element, einem Ziro3-Promotor und der kodierenden Sequenz für EGFP zusammen (siehe Abb.3.21). Der M48-Enhancer besteht aus der HCNR (Highly Conserved Non-Coding Region) m54390, einem 799bp langem Fragment von der Position 54390 des murinen Chromosom 16, welches als Enhancer wirkt (Calle-Mustienes et al., 2005). In einer ebenfalls im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere angefertigten Diplomarbeit wurde zuvor gezeigt, dass das Vorhandensein des Enhancer-Elementes für die Expression des GFPs im Hühnerneuralrohr notwendig ist und der Ziro3-Promotor einen Minimal-Promotor darstellt, der alleine nicht zur Expression ausreicht (Meimers, 2005).

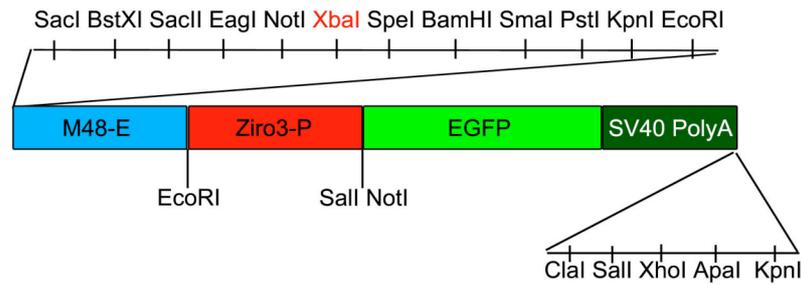


Abb.3.21 Schematische Darstellung des benutzten Reporter-Konstruktes. In einem pGEM-T-Vektor befinden sich der M48-Enhancer (M48-E; blau; EcoRI-Fragment), ein Zebrafisch Iroquois3-Promotor (Ziro3-P; rot), sowie die kodierende Sequenz für EGFP (hellgrün) und ein SV40-PolyA-Signal (Dunkelgrün). Alle benutzten CNEs wurden in die *XbaI*-Restriktionsstelle „upstream“ des Enhancers inkloniert (rot markiert).

Alle getesteten CNEs wurden in die *XbaI*-Schnittstelle (rot markiert in Abb.3.20) des M48-Enhancer eingesetzt (siehe 2.7). Dies wurde ermöglicht, indem zuvor an die verwendeten Oligonukleotide jeweils eine *XbaI*- (Forward-Primer) und eine *NheI* (Backward-Primer) – Erkennungssequenz angefügt worden war. Ihre Orientierung entsprach der „echten“ Orientierung im Genom in Bezug auf die Leserichtung des *Olig2*-Gens. Es wurde außerdem überprüft, ob die jeweiligen CNEs eventuell eine Enhancer-Funktion übernehmen können, indem sie in einen entsprechenden Vektor der keinen M48-Enhancer enthielt, eingesetzt wurden. Jedoch zeigte keines der verwendeten CNEs eine Enhancer-Funktion, so dass nach der Elektroporation dieser Konstrukte keine GFP-Expression gefunden werden konnte.

Zunächst wurde nun sichergestellt, dass die Expression des Reportergens vom Grundvektor durch die Koelektroporation eines Kontrollvektors oder eines *Irx*-Expressionsvektors nicht beeinflusst wurde. Dazu wurde der Reportervektor jeweils mit einem *Irx1*- oder einem *Irx3*-Expressionsvektor gemeinsam in das Neuralrohr elektroporiert. Beide *Irx*-Faktoren führten nicht zu einer Veränderung in der GFP-Expression im Vergleich zu der bei einer Koelektroporation eines Kontrollvektors, sondern wurden überlappend mit dem GFP exprimiert (siehe Abb.3.22). Somit konnte der oben beschriebene Reportervektor zum Test einer funktionellen Bindung an die einzelnen CNEs verwendet werden.

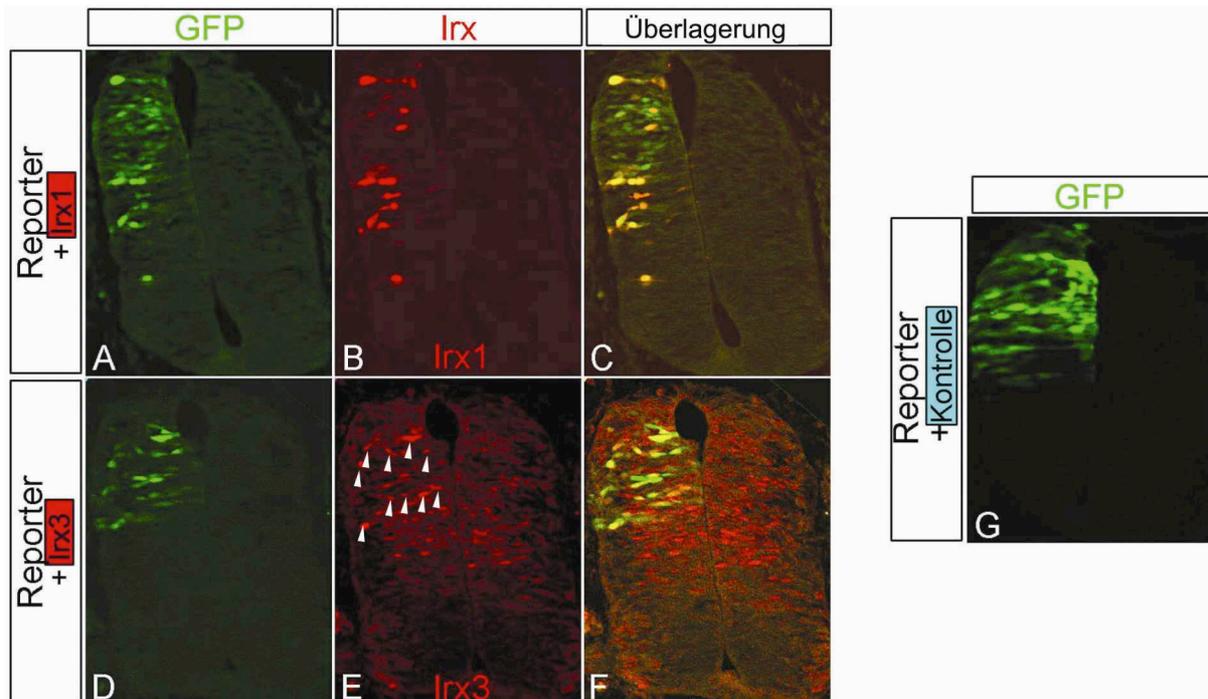


Abb.3.22 Die Expression des Reporterkonstruktes wird durch die Koelektroporation eines *Irx*-Gens nicht beeinflusst. Dargestellt sind Antikörperfärbungen (rot) gegen *Irx1* (B,C) und *Irx3* (E,F) auf transversalen Neuralrohrschnitten nach der Koelektroporation der *Irx*-Vektoren mit dem Ausgangs-Reporterkonstrukt. Die Expression des Reporters wird durch die Fluoreszenz des GFPs (grün) sichtbar. Man erkennt, dass die GFP-Expression durch die gleichzeitige Expression von *Irx1* bzw. *Irx3* nicht gestört wird und sich mehrere Zellen identifizieren lassen, die beide Konstrukte exprimieren (gelbe Zellen in C und F). Auch die Koelektroporation eines Kontrollplasmides führte nicht zur Veränderung der GFP-Expression (G). Da der Antikörper gegen *Irx3* nicht nur das ektopisch exprimierte *Irx3*, sondern auch die endogene Expression erkennt, ist es etwas schwierig die elektroporierten Zellen zu erkennen. Sie sind daher mit Pfeilen markiert.

Es wurden im Weiteren verschiedene CNEs aus dem *Olig2*- und *Olig3*-Locus getestet. In den nachfolgenden Reporter-Experimenten mit den ausgewählten CNEs wurde zunächst immer überprüft, ob nach Elektroporation des Reportervektors mit den entsprechenden eingesetzten CNEs eine GFP-Expression zu erkennen war. Da dieses in allen durchgeführten Experimenten der Fall war, wird auf eine Darstellung im Einzelnen verzichtet. Gezeigt wird jeweils das Ergebnis der Koelektroporation des jeweiligen Reportervektors mit einem Kontrollplasmid. Die daraus resultierende Reporterexpression wurde jeweils als Referenz für die entsprechende Expression nach der Koelektroporation eines *Irx*-Expressionvektors gesetzt. Dazu wurden innerhalb eines Testes für ein CNE (+ Kontrollvektor bzw. + *Irx*) die gleichen Belichtungs- bzw. Intensitätswerte zur Dokumentation gewählt.

3.3.3 Test von Olig2_CNE-34

Als Erstes wurde das murine Olig2_CNE-34 getestet und die Expression des Olig2_CNE-34-Reporters nach Koelektroporation mit einem Kontrollplasmid bzw. einem *Irx*-Expressionsvektor in das Neuralrohr analysiert. Die Expression des Reportergens vom Olig2_CNE-34-Reporter selbst war unverändert im Vergleich zum Grundvektor und auch die Koelektroporation eines Kontrollplasmides führten nicht zu einer Veränderung der GFP-Expression (Abb.3.22 G). Im Unterschied dazu führte die Koelektroporation von *Irx1* bzw. *Irx3* zu einer fast vollständigen Löschung der Reporterexpression (siehe Abb.3.23). Es konnte demnach gezeigt werden, dass verschiedene *Irx*-Faktoren über das regulatorische Element Olig2_CNE-34 eine reprimierende Wirkung auf das Reportergen ausüben. Hinsichtlich der Funktion der *Irx*-Gene konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Überexpressionsstudien, die gleiche Wirkung von *Irx1* und *Irx3* auf die GFP-Expression beobachtet werden. Es wurde somit davon ausgegangen, dass die *Irx*-Proteine in der hier konstruierten Situation funktionell redundant agieren können, so dass im weiteren Verlauf des Reporterexperimentes *Irx1* stellvertretend für die anderen *Irx*-Faktoren eingesetzt wurde.

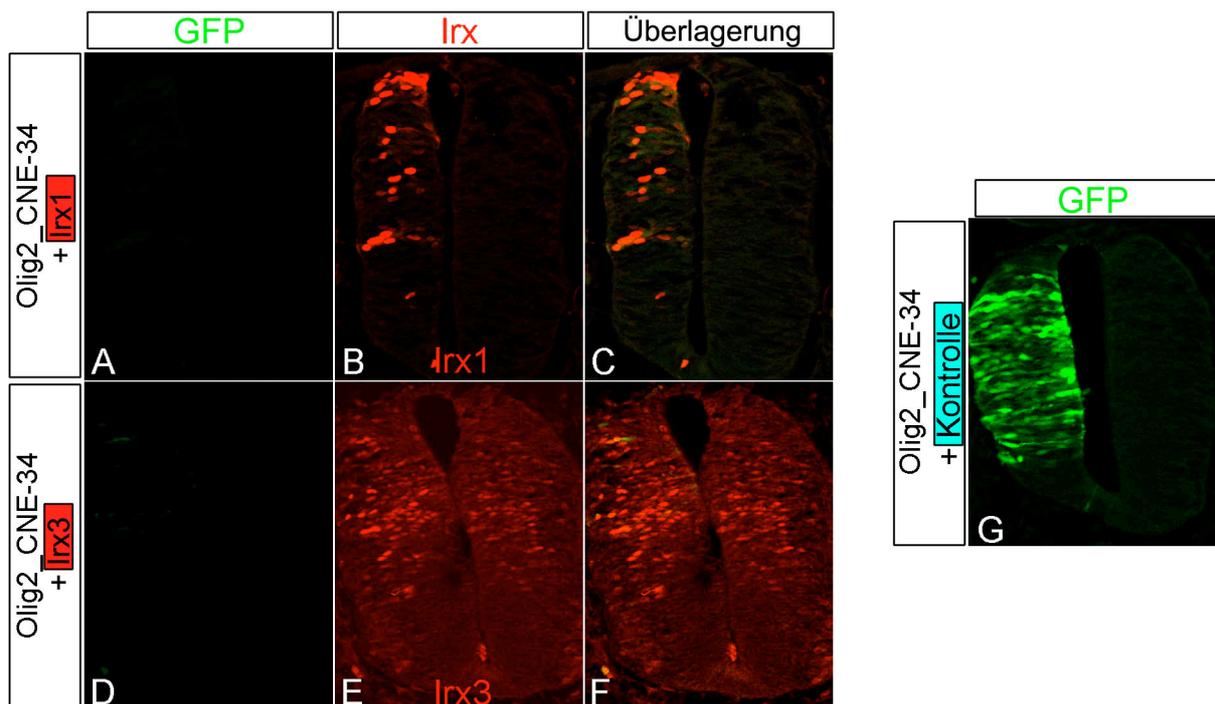


Abb.3.23 Olig2_CNE-34 vermittelt die Repressorwirkung der *Irx*-Proteine auf den Reporter. Dargestellt sind Antikörperfärbungen (rot) gegen *Irx1* (B, C) und *Irx3* (E, F) nach der Koelektroporation des Olig2_CNE-34-Reportervektors mit den jeweiligen *Irx*-Expressionsvektoren. Die Expression des Reportergens ist jeweils anhand der GFP-Expression zu erkennen (grün in A, D, G). Die Expression vom Olig2_CNE-34-Reporter blieb auch nach der Koelektroporation eines Kontrollplasmides unverändert (G, vgl. mit Abb. 3.20 G). Die Koelektroporation von *Irx1* bzw. *Irx3* führt zum fast vollständigen Verlust der GFP-Expression (A, D vgl. mit G). Der Antikörper gegen *Irx3* erkennt sowohl die ektopische als auch die endogene *Irx3*-Expression, so dass auch in der nicht elektroporierten Hälfte des Neuralrohres eine Färbung zu erkennen ist (E, F).

3.3.4 Test von Olig3_CNE-19

Analog zu Olig2_CNE-34 wurde nun als nächstes das homologe regulatorische Element des murinen *Olig3*-Locus, Olig3_CNE-19 getestet. Auch hier war eine normale Expression des GFPs vom Olig3_CNE-19-Reporter zu beobachten. Ebenso führte die Koelektroporation eines Kontrollplasmides nicht zu einer Störung oder Veränderung der GFP-Expression (siehe Abb.3.24 D). Wurde jedoch gleichzeitig mit dem Olig3_CNE-19-Reportervektor ektopisch *Irx1* exprimiert, so konnte ein dramatischer Verlust der Reporterexpression beobachtet werden. Ähnlich wie bei Olig2_CNE-34 war ein fast vollständiger Verlust der GFP-Expression zu erkennen (Abb.3.24 A). Demnach kann *Irx1* auch über das regulatorische Element Olig3_CNE-19 seine reprimierende Wirkung auf die GFP-Expression übermitteln.

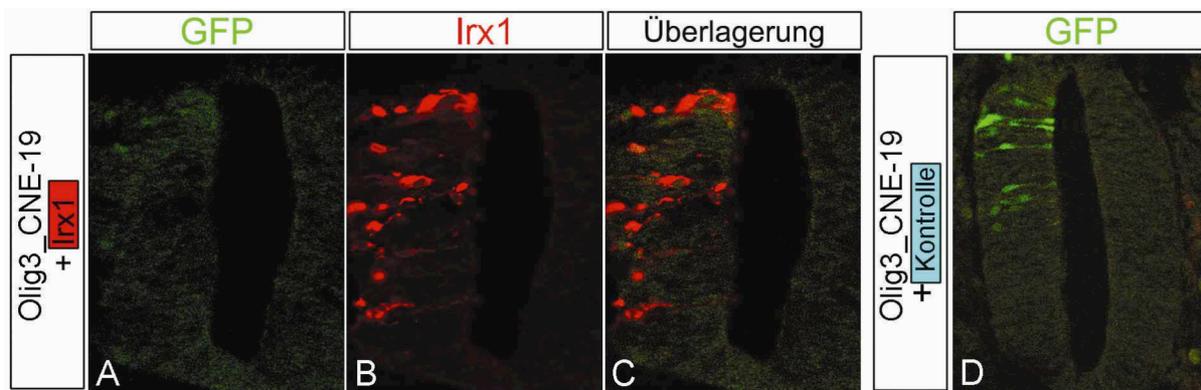


Abb.3.24 Durch Olig3_CNE-19 wird die reprimierende Wirkung von *Irx1* auf den Reporter vermittelt. Während weder das regulatorische Element Olig3_CNE-19 selbst, noch die Koelektroporation eines Kontrollplasmides zu einer Veränderung der GFP-Expression führen (grün, D), wird die Reporterexpression (grün, A) durch die Koelektroporation von *Irx1* (rot, B) fast vollständig ausgeschaltet.

3.3.5 Mutagenese des IBS-Elementes

Die oben aufgeführten Ergebnisse machten deutlich, dass es sich bei den ausgewählten, homologen CNEs aus dem *Olig2*- und *Olig3*-Locus um zwei funktionelle regulatorische Elemente handelt, die in der experimentellen Situation die reprimierende Wirkung von *Irx1* auf die Reporterexpression vermitteln. Unklar blieb jedoch, ob diese inhibitorische Wirkung von der als IBS beschriebenen Sequenz abhängig ist und damit möglicherweise durch die Bindung der *Irx*-Proteine verursacht wurde. Um sicherzustellen, dass die Bindung von *Irx1* an die IBS des eingefügten Elementes für die Inhibierung der Reporterexpression verantwortlich sein könnte, wurde ein weiteres Konstrukt getestet. *Olig2_CNE-34* trägt eine mutierte Version der IBS, ist ansonsten jedoch identisch mit Olig2_CNE-34. Durch den Austausch zweier Basenpaare mittels einer so genannten „Site-directed PCR Mutagenese“ (siehe 2.13.4) wurde eine Änderung des Iroquois-Erkennungsmotives von ACAnnTGT nach ATAnnTAT hervorgerufen. Es wurde zuvor gezeigt, dass diese Mutation zu einem völligen

Verlust der Bindung von Iroquois-Proteinen führt (Bilioni et al., 2005), so dass hier ein nicht-funktionelles Element vorliegen sollte.

Zunächst wurde wiederum sichergestellt, dass das Einbringen der Mutation und die Ko-Expression eines Kontrollvektors keinen Einfluss auf die Aktivität des Reporters hatten (siehe Abb.3.25 D). In diesem Fall führte jedoch auch die Ko-Expression von *Irx1* zu keiner Veränderung in der Expression des Reporters und die GFP-Expression war vergleichbar zu der von *Olig2_CNE-34* (Abb.3.23 A). Stattdessen konnte eine Überlappung der Expression von *Irx1* und des GFPs des Reporterkonstruktes gefunden werden (gelbe Zellen in Abb.3.25 C).

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass tatsächlich das Vorhandensein einer IBS innerhalb des *Olig2_CNE-34* zu der Vermittlung einer negativen Regulierung bzw. Inhibierung der Expression durch *Irx* führt. Aufgrund der Homologie zwischen *Olig2_CNE-34* und *Olig3_CNE-19* wird postuliert, dass auch hier die Existenz einer funktionellen IBS für die Übermittlung der Funktion des *Irx*-Faktors notwendig ist.

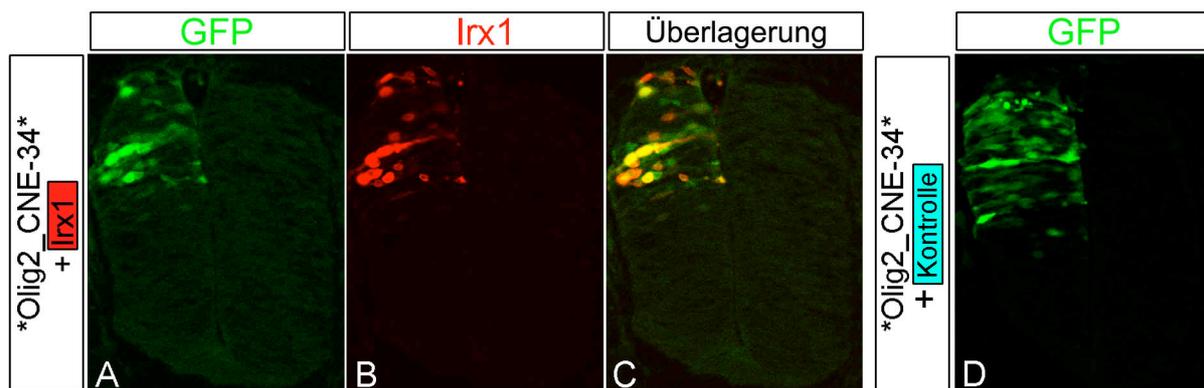


Abb.3.25 Die Mutagenese der IBS verursacht den Verlust der Repression durch *Irx*. Durch die Mutagenese der IBS in **Olig2_CNE-34**, sowie die Koelektroporation des Kontrollplasmides wurde keine Veränderung der GFP-Expression verursacht (D). In diesem Fall wurde jedoch auch durch die Koelektroporation von *Irx1* (rot, B) keine Reduzierung der Reporterexpression hervorgerufen (grün, vgl. A und D). Statt dessen ist in der Überlagerung zu erkennen, dass die von der Elektroporation getroffenen Zellen beide Konstrukte – den **Olig2_CNE-34**-Reportervektor und den *Irx1*-Expressionsvektor – exprimieren (gelbe Zellen in C).

3.3.6 Test der *Olig2_CNE-34*-Sequenz des Zebrafisches

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den beiden homologen CNEs um mögliche *Irx*-Bindestellen handelt, die die reprimierende Wirkung auf das entsprechend nachgeschaltete Gen übertragen. In dem in Abb.3.19 dargestellten Multi-Spezies-Alignment ist jedoch zu erkennen, dass die IBS des *Olig2_CNE-34* in den ausgewählten Fisch-Spezies, Zebrafisch und *Tetraodon*, verändert ist. Sie wird im Folgenden als *Olig2_CNE-34-Zef* bezeichnet und befindet sich im Zebrafisch lediglich 2kb vom *Olig2*-Transkriptionsstart entfernt, womit es eine typische Entfernung eines regulatorischen Elementes besitzt. Hier

findet sich nicht das eigentliche IBS-Motiv ACAnnTGT, sondern die Version ACAnnTGC. Die Daten von Biloni et al. geben die Möglichkeit eines Basenaustausches an dieser Stelle von Thymin nach Cytosin als die unwahrscheinlichste an, so dass sich die Frage stellte, ob es sich auch bei dieser veränderten Form der IBS des *Olig2_CNE-34-Zef* um ein regulatorisches Element handelt. Daher wurde entsprechend den vorangegangenen Reporter-Experimenten, das *Olig2_CNE-34-Zef* in den Reportervektor eingefügt und getestet. Auch hier führte das Element selbst, sowie die Koelektroporation eines Kontrollplasmides nicht zu einer Veränderung der Reporterexpression (siehe Abb. 3.26 D). Die gleichzeitige Überexpression von *Irx1* führte in diesem Fall nicht zu einer vollständigen Löschung der Reporterexpression, wie es im Falle der getesteten Elemente *Olig2_CNE-34* bzw. *Olig3_CNE-19* zu beobachten gewesen war (vgl. Abb.3.26 A mit Abb.3.23 A und 3.24 A). Stattdessen konnten einige Zellen gefunden werden, die trotz der Koelektroporation von *Irx1* eine GFP-Expression zeigten. Teilweise handelte es sich bei diesen Zellen um solche, die ausschließlich den Reportervektor exprimierten, ohne *Irx1*-Expression zu zeigen (weiße Pfeile in Abb.3.26). Überraschenderweise konnten jedoch auch vereinzelt Zellen gefunden werden, die sowohl den Reporter, als auch *Irx1* exprimierten (gelbe Pfeile, Abb.3.26). In diesen Zellen fand demnach keine negative Regulation der GFP-Expression durch *Irx1* statt. Auch wenn die GFP-Expression nach der Koelektroporation von *Irx1* im Vergleich zur Koelektroporation eines Kontrollvektors im Gesamteindruck abgeschwächt erschien, konnte somit keine eindeutige, uneingeschränkte negative Regulation durch den *Irx*-Transkriptionsfaktor festgestellt werden.

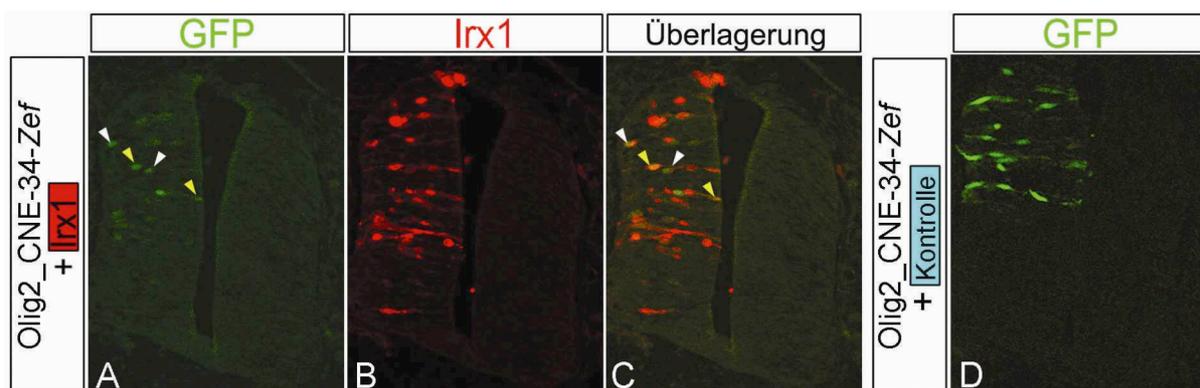


Abb.3.26 Die veränderte IBS in *Olig2_CNE-34-Zef* führt zu einer abgeschwächten Repressorwirkung von *Irx1*. Es fällt auf, dass die Überexpression von *Irx1* (rot, B) nicht zu einer vollständigen Löschung der Reporterexpression führt (grün, A). Die verbleibende GFP-Expression ist einerseits in Zellen lokalisiert, die kein *Irx1* exprimieren (weiße Pfeile), kann jedoch auch teilweise überlappend mit der ektopischen *Irx1*-Expression gefunden werden (gelbe Pfeile in A und C). Im Vergleich zur GFP-Expression nach der Koelektroporation eines Kontrollvektors (D) erscheint die *Olig2_CNE-34-Zef*-Reporterexpression nach Koelektroporation von *Irx1* jedoch insgesamt abgeschwächt.

3.3.7 Test von Olig2_CNE+26

Bei den bisher getesteten CNEs handelte es sich immer um verschiedene Versionen der beiden Homologen CNEs Olig2_CNE-34 und Olig3_CNE-19. Innerhalb des *Olig2*-Lokus wurde jedoch ein weiteres CNE identifiziert, in dem die IBS hochkonserviert durch die verschiedenen Spezies erhalten ist, so dass auch dieses Element getestet wurde. Olig2_CNE+26 befindet sich zwischen der kodierenden Sequenz von *Olig2* und der von *Olig1* (siehe Abb.3.18). Innerhalb des 252bp langen Bereiches des CNEs befinden sich zwei IBS-Motive. Das erste findet man hochkonserviert vom Menschen bis zum Frosch, während das zweite in der vollständigen Folge von ACAnnTGT nur in Maus und Ratte vorhanden ist (siehe Abb.3.28)

Entsprechend den vorangegangenen Reporterexperimenten wurde das murine Olig2_CNE+26 in den Reportervektor eingesetzt und zunächst mit einem Kontrollplasmid koelektroporiert. Dieses führte nicht zu einer Veränderung in der GFP-Expression. Die gleichzeitige Elektroporation eines *Irx1*-Expressionsvektor führte jedoch zur vollständigen Löschung der Olig2_CNE+26-Reporterexpression. Es handelt sich demnach auch bei Olig2_CNE+26 hinsichtlich der Repressorwirkung durch die *Irx*-Proteine um ein regulatorisches Element (Abb.3.27).

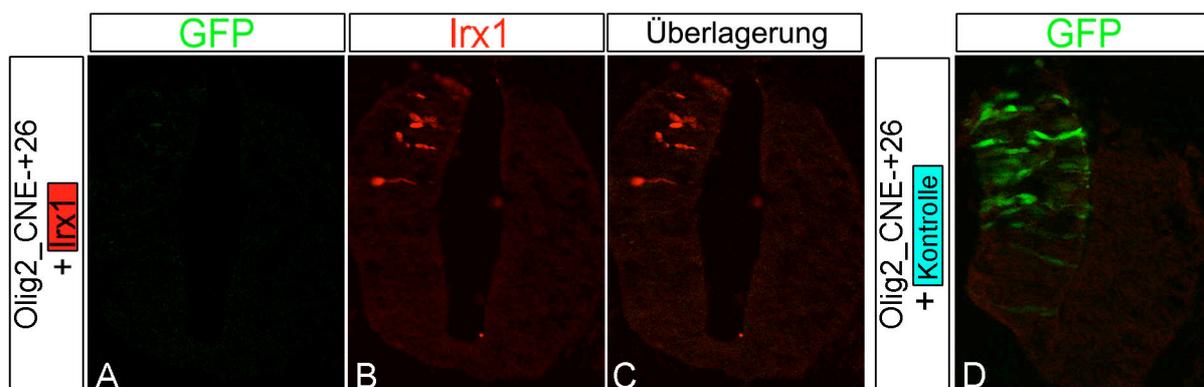


Abb.3.27 Olig2_CNE+26 vermittelt die *Irx*-Repressorwirkung auf die Reporterexpression. Wie zuvor ist die Reporterexpression anhand der GFP-Expression (grün) zu erkennen, während die *Irx1*-Expression durch eine Antikörperfärbung (rot) dargestellt ist. Im Vergleich zur GFP-Expression nach der Koelektroporation mit einem Kontrollplasmid (D), führt die Koelektroporation von *Irx1* zum vollständigen Verlust der GFP-Expression (A).



Abb.3.28 Multispezies-Sequenzvergleich von Olig2_CNE+26. In der Abbildung ist ein Ausschnitt des Olig2_CNE+26 zu sehen. In blauer Schriftfarbe sind die von Mensch bis mindestens Huhn konservierten Bereiche dargestellt. Innerhalb des CNEs findet sich eine IBS, die durch alle Spezies konserviert ist, und eine zweite, welche vollständig nur in Maus und Ratte vorhanden ist (rote Schrift, gelb hinterlegt). In Rot unterstrichen sind die Ränder des für den Test ausgewählten Bereiches des murinen Olig2_CNE+26.

3.3.8 Test von Olig2_CNE-73

Neben den oben bereits beschriebenen CNEs aus dem *Olig2*-Locus, in denen sich die IBS hochkonserviert durch die verschiedenen Spezies findet, existieren außerdem einzelne CNEs, die das IBS Motiv lediglich in einer oder in zwei Spezies vorweisen. Bei Olig2_CNE-73 handelt es sich um ein solches CNE, in dem die IBS ausschließlich in Maus und Ratte zu finden ist (siehe Abb.3.29). Es wurde demnach erwartet, dass es sich hierbei nicht um eine funktionelle IBS handelte, da sie in den anderen Spezies nicht existiert. Der Test des Olig2_CNE-73 aus der Ratte zeigte, wie zuvor die anderen Elemente, keine Veränderung der GFP-Expression nach Koelektroporation mit einem Kontrollplasmid (siehe Abb.3.30). Überraschenderweise kam es jedoch auch hier zu einer starken Reduzierung der Reporterexpression in Folge der Koelektroporation mit *Irx1* (siehe Abb.3.30). Allerdings konnten auch hier, vergleichbar mit Olig2_CNE-34-Zef, vereinzelte Zellen gefunden werden, in denen sowohl der Reporter aktiv war, als auch *Irx1* exprimiert wurde. Demnach war auch

für Olig2_CNE-73 keine eindeutige Aussage bezüglich der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung der Irx-Faktoren zu treffen. Dem Gesamteindruck nach wurde jedoch die Expression des Reporters stark reduziert, so dass es möglich ist, dass es sich auch hier um ein -in diesem *in vivo*-Experiment- funktionelles regulatorisches Element bezüglich der Repressorwirkung der Irx-Proteine handelt.

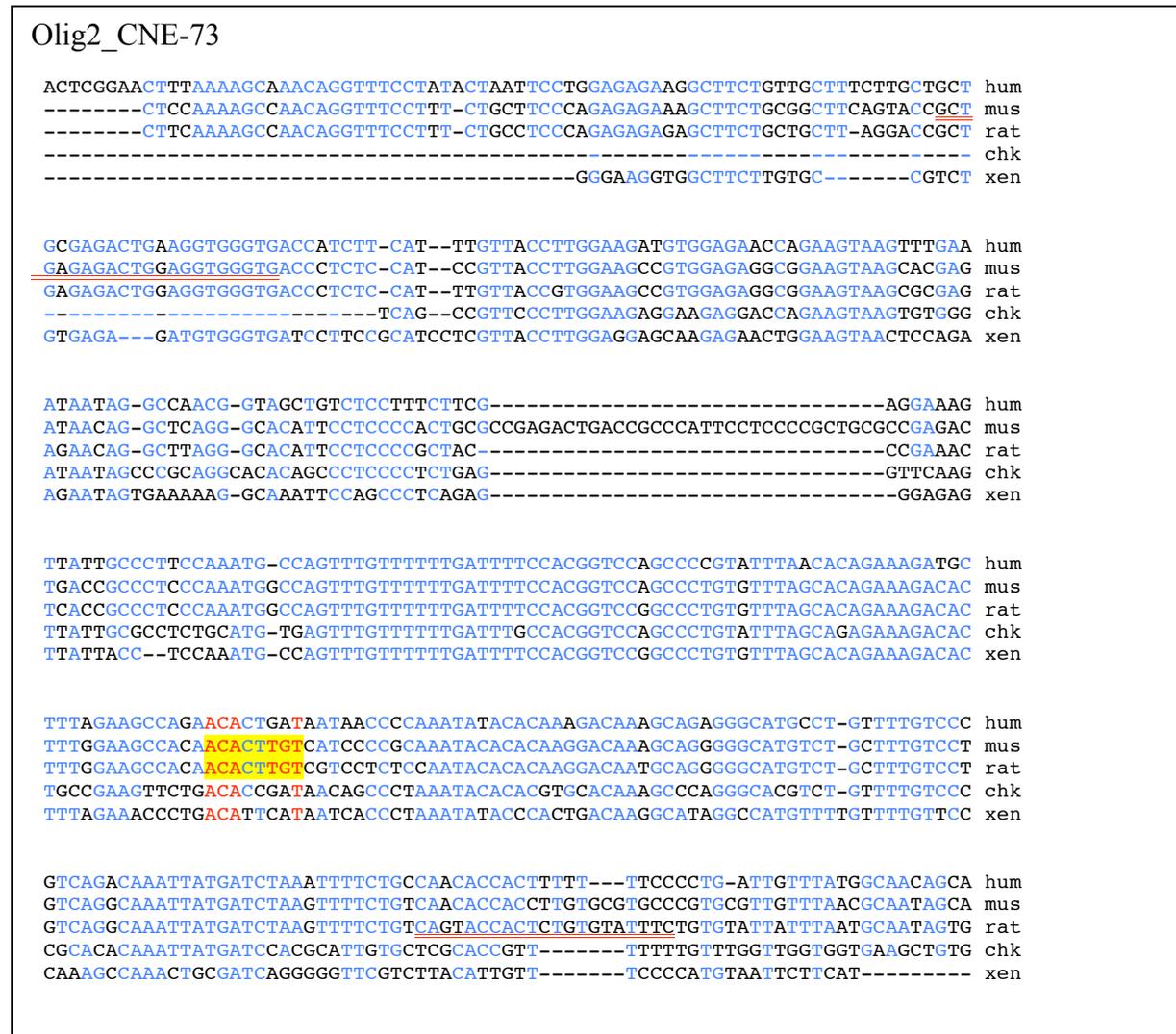


Abb.3.29 Multi-Spezies-Sequenzvergleich von Olig2_CNE-73. Der Sequenzvergleich zeigt die Konservierung des Elementes vom Mensch bis mindestens zur Ratte in blauer Schriftfarbe. Die IBS findet sich lediglich in Maus und Ratte und ist in Gelb hinterlegt. In Rot unterstrichen sind die Ränder des zum Test ausgewählten Bereiches des Olig2_CNE-73 aus der Ratte.

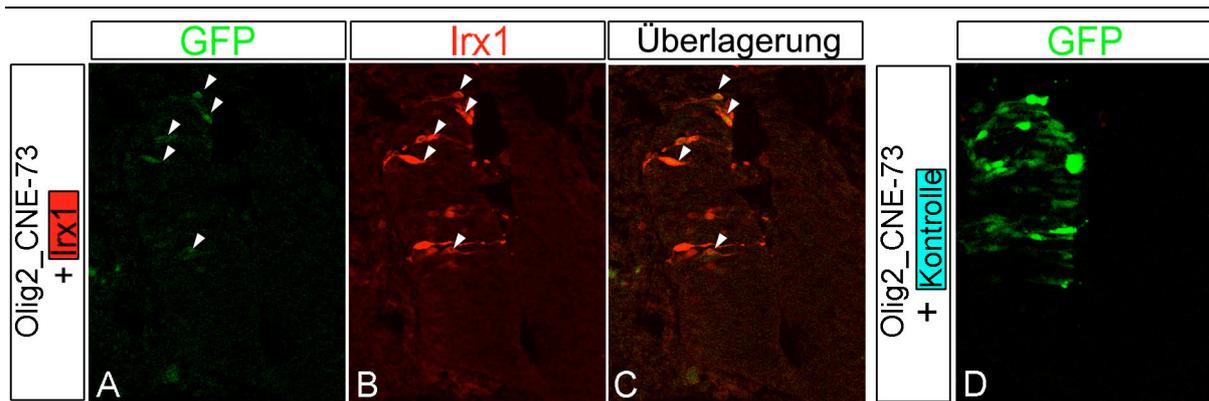


Abb.3.30 Irx1 reprimiert die Reporterexpression über Olig2_CNE-73 nicht vollständig. Im Vergleich der Reporterexpressionen (grün) nach der Koelektroporation eines Kontrollvektors (D) mit der nach der Koelektroporation von Irx1 (A) ist klar zu erkennen, dass die Expression von Irx1 (rot, B) zu einer starken Reduzierung der GFP-Expression führt. Es kommt jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Reporterexpression, da einzelne, GFP-exprimierende Zellen gefunden werden können (Pfeile in A)

3.3.9 Test von Olig3_CNE+21

Bei der Suche nach konservierten Elementen in der Umgebung von *Olig3* konnten neben dem zu Olig2_CNE-34 homologen Olig3_CNE-19 noch ein weiteres CNEs identifiziert werden, in dem das IBS-Motiv über die verschiedenen Spezies konserviert ist. Olig3_CNE+21 enthält im Gegensatz zu den anderen bisher getesteten CNEs das IBS-Motiv zweimal in hoher Konservierung von Mensch bis Zebrafisch (siehe Abb. 3.31).

Es wurde ein 639 bp langer Bereich des murinen Olig3_CNE+21 ausgewählt und wie zuvor die anderen CNEs getestet. Auch hier wurde die Reporterexpression nicht durch die Koelektroporation eines Kontrollplasmides beeinflusst (siehe Abb.3.32, D). Die Anwesenheit von Irx1 führte jedoch wiederum zu einer deutlichen Reduzierung der GFP-Expression (Abb.3.32 A). Auch hier konnten teilweise Zellen identifiziert werden, in denen trotz Koelektroporation eines Irx-Vektors eine Expression des Reporters zu finden war. Bei genauerer Betrachtung in einer Ausschnittvergrößerung ist jedoch zu erkennen, dass es zu keiner Überlagerung der Expression von Irx1 und GFP kommt. Stattdessen ist die Expression des GFPs im Kern der getroffenen Zellen zu finden, während die Irx1-Expression im Cytoplasma lokalisiert ist. Da es sich bei den Irx um Transkriptionsfaktoren handelt, ist eine Lokalisierung außerhalb des Kerns als ungewöhnlich zu betrachten. Es wäre vorstellbar, dass in vereinzelt Zellen eine Modifikation des Irx-Proteins zu einer gestörten Funktion und Lokalisierung im Cytoplasma geführt hat, so dass die Restexpression des Reporters als vernachlässigbar angesehen wird. Demnach kann auch Olig3_CNE+21 die Funktion von Irx1 vermitteln, wodurch die reprimierende Wirkung des Transkriptionsfaktors gewährleistet wird.

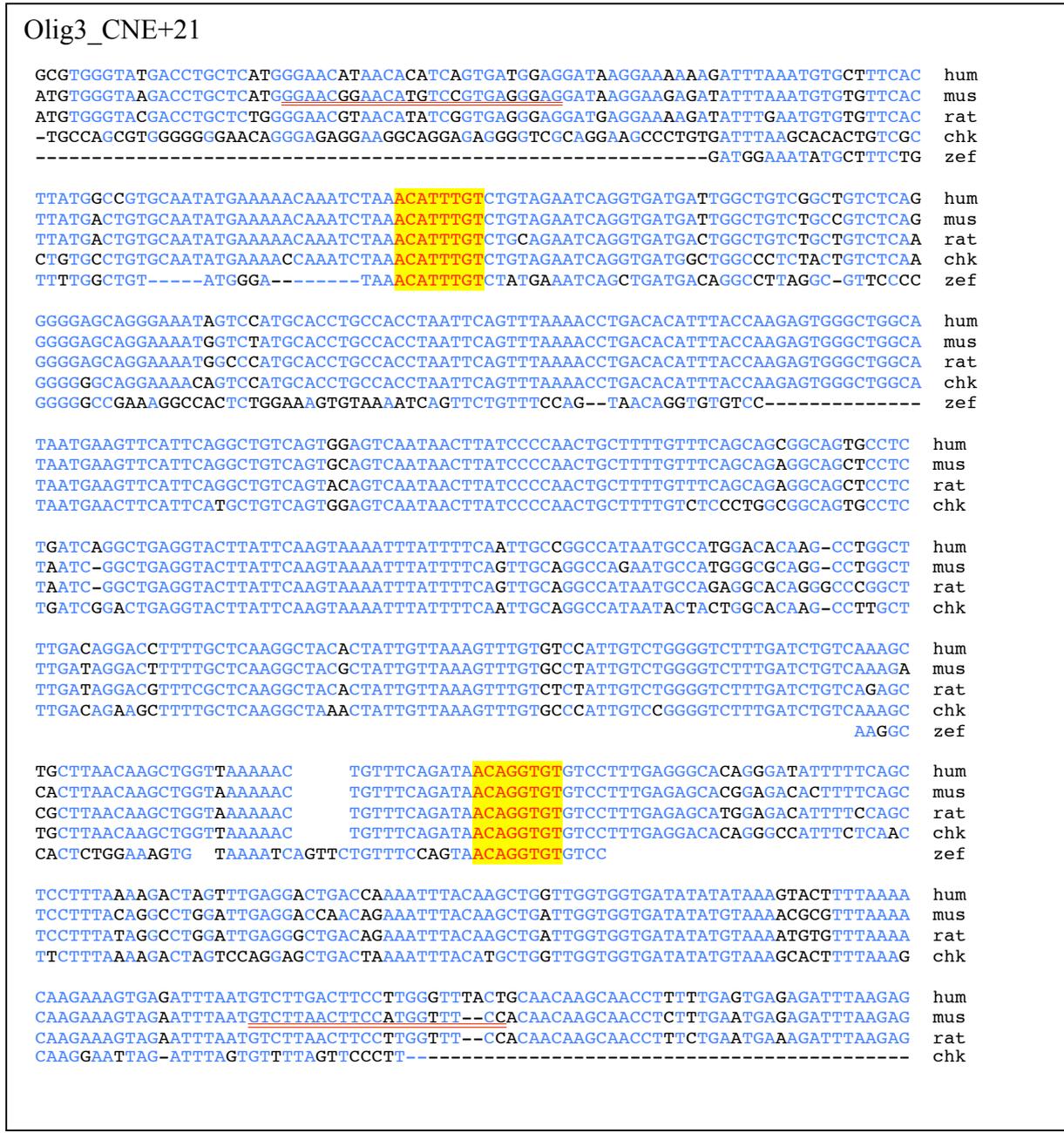


Abb.3.31 Multi-Spezies-Sequenzvergleich von Olig3_CNE+21. Der Sequenzvergleich zeigt, dass Olig3_CNE+21 das IBS-Motiv zweimal hoch konserviert durch alle aufgeführten Spezies von Mensch bis Zebrafisch enthält (rote Schrift, gelb hinterlegt). Die blaue Schriftfarbe markiert Bereiche hoher Homologie bis mindestens zum Huhn. In Rot unterstrichen sind die Ränder des zum Test ausgewählten Bereiches des murinen Olig3_CNE+21 zu sehen.

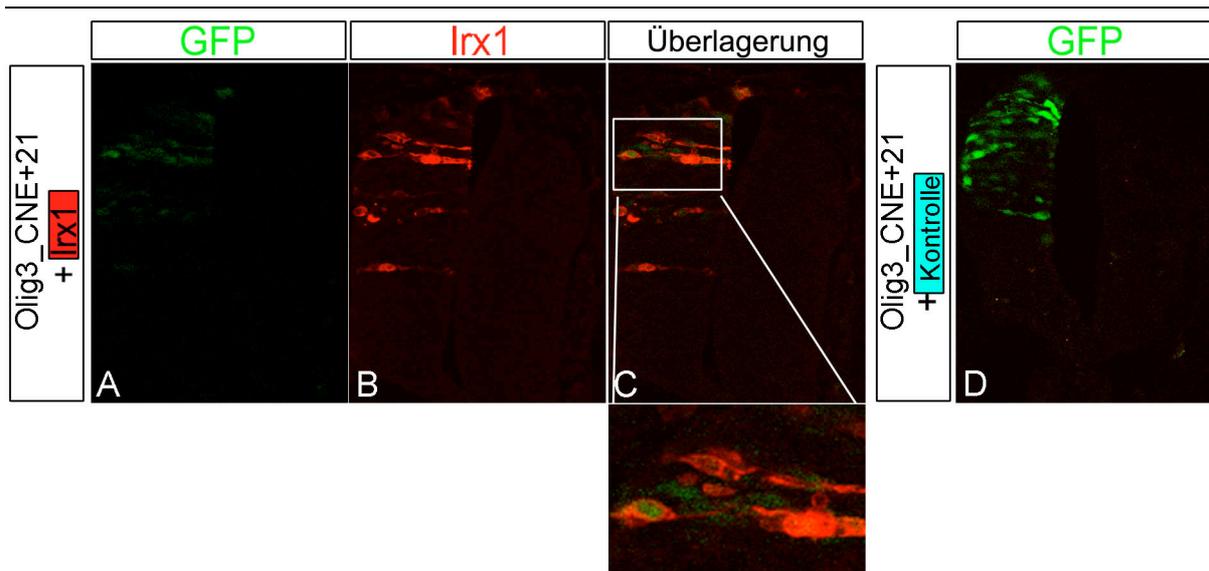


Abb.3.32 Olig3_CNE+21 enthält eine funktionelle IBS. Der Vergleich der Reporterexpressionen (grün) nach Koelektroporation des Kontrollplasmides (D), bzw. von Irx1 (A) lässt eindeutig erkennen, dass die Anwesenheit von Irx1 (rot, B) eine starke Reduzierung der GFP-Expression verursacht. In der Ausschnittvergrößerung der Überlagerung ist zu erkennen, dass die Restexpression des Reporters nicht überlappend mit der Irx1-Expression gefunden wird. Satt dessen ist die GFP-Expression im Kern und die Irx1-Expression im Cytoplasma lokalisiert.

3.3.10 Test von nicht-konservierten Bereichen, die ein IBS-Motiv enthalten

Bisher konnte für fast alle getesteten CNEs aus dem *Olig2*- und dem *Olig3*-Lokus gezeigt werden, dass sie ein funktionelles IBS-Motiv enthalten, über welches *in vivo* in dem hier angewandten Reporterexperiment die Repressorwirkung von Irx1 vermittelt wird. Demnach besitzen sowohl *Olig2* als auch *Olig3* mehrere funktionelle Erkennungssequenzen für die Iroquois-Transkriptionsfaktoren und werden negativ von ihnen reguliert. Obwohl auch die biologischen Konsequenzen aus den Überexpressionsstudien der *Irx*-Gene stark darauf hindeuteten, dass es sich bei den beiden *Olig*-Genen um direkte Zielgene der Irx-Faktoren handelt, waren die Ergebnisse zum Teil unerwartet. Es bestand die Annahme, dass es durch das experimentelle Design immer gelingen würde die reprimierende Funktion der Irx-Proteine zu vermitteln, sofern das zu testende Element ein IBS-Motiv beinhalten würde, da durch die ektopische Expression des *Irx*-Gens und der frei zugänglichen IBS optimale Bedingungen für eine DNA-Protein-Bindung herrschen. Um die Qualität der Ergebnisse des Reportertestes zu überprüfen, wurden deshalb Sequenzbereiche aus der Region des *Olig2*-Lokus getestet, die zwar ein IBS-Motiv enthalten, jedoch nicht über die verschiedenen Spezies konserviert sind. Es wurde darauf geachtet, dass die ausgewählten Sequenzbereiche in der Nähe der zuvor ausgewählten CNEs liegen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sie sich im Bereich des offenen Chromatins befinden. Demnach müssten sie auch in der endogenen Situation für die Irx-Transkriptionsfaktoren zugänglich sein. Die einzelnen ausgewählten

Bereiche enthalten nur in der Ratte bzw. in Maus und Ratte ein IBS-Motiv und sind selbst nicht konserviert, so dass angenommen wird, dass sie keine Funktion erfüllen sollten. Ihre Bezeichnung gibt die Lokalisierung auf dem Chromosom wider. Es wurden drei Bereiche „upstream“ des Olig2-Lokus ausgewählt, die im Folgenden als Bereich A, B und C betitelt werden. Bereich A befindet sich zwischen Olig2_CNE-68 und Olig2_CNE-60, Bereich B zwischen Olig2_CNE-60 und Olig2_CNE-49 und Bereich C zwischen Olig2_CNE-18 und dem Promotor (siehe Abb.3.18).

Alle drei Bereiche wurden in gleicher Weise wie zuvor die verschiedenen CNEs in dem Reporterexperiment getestet. Keiner der Bereiche veränderte die Expression des GFPs bei Koelektroporation eines Kontrollvektors (Abb.3.33 D, H, L). Die Koelektroporation von *Irx1* führte in keinem der drei Fälle zu einer vollständigen Löschung des GFPs, auch wenn die Expression des Reporters nicht bei allen getesteten Bereichen gleich war. Während bei Bereich A vergleichsweise weniger GFP-Expression in den einzelnen Zellen zu finden war, so konnte bei Bereich B und Bereich C eine deutliche Expression des Reporters in mehreren Zellen, die gleichzeitig *Irx1* exprimierten, erkannt werden. In diesen Zellen konnte somit keine Reprimierung der GFP-Expression durch *Irx1* erfolgt sein (Pfeile in Abb.3.33). Trotzdem erfolgte dem Gesamteindruck nach eine Reprimierung der Reporterexpression. Diese war jedoch im Vergleich zu den oben beschriebenen getesteten CNEs nicht so stark bzw. eindeutig. Man könnte demnach zu dem Schluss kommen, dass die hier ausgewählten IBS-enthaltenden Bereiche eine in diesem *in-vivo* Experiment vergleichsweise schwächere Repressorfunktion der *Irx*-Proteine vermitteln.

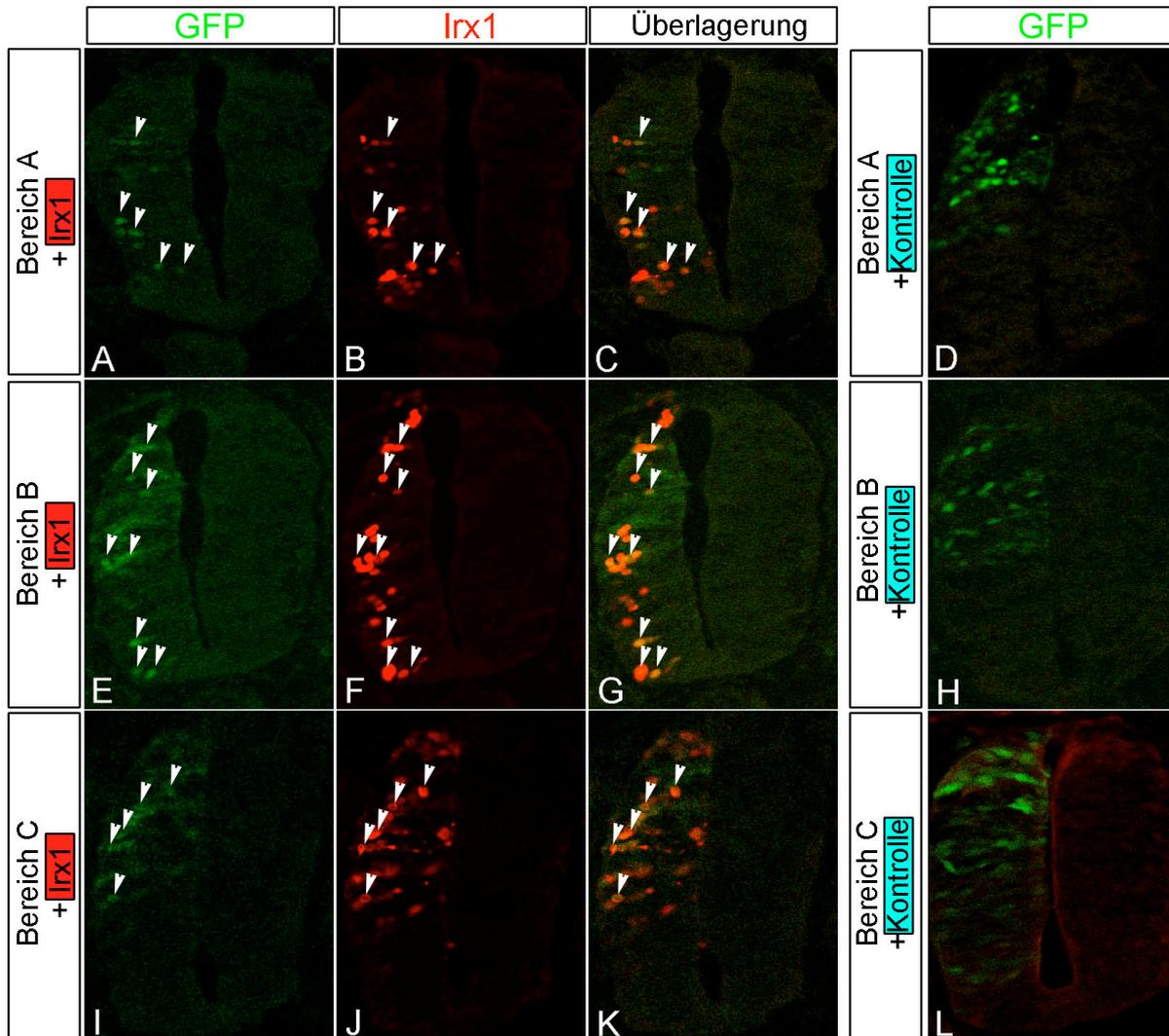


Abb.3.33 Die getesteten nicht konservierten Bereiche vermitteln nur eine abgeschwächte inhibierende Wirkung der Irx. Es wurden drei nicht konservierte Bereiche aus dem Olig2-Locus, A (A-D), B (E-H) und C (I-L), getestet. Zu sehen ist eine Antikörperfärbung gegen Irx1 (rot) sowie die Expression des Reporters (GFP, grün) nach der Koelektroporation mit Irx1 bzw. mit einem Kontrollvektor. Die Anwesenheit eines Kontrollvektors hat keinen Einfluss auf die GFP-Expression (D, H, L). Auch bei der Koelektroporation von Irx1 exprimieren mehrere Zellen den Reporter (Pfeile). Da gleichzeitig die Expression von Irx1 nachweisbar ist, kann in diesen Zellen keine negative Regulation der Reporterexpression erfolgt sein.

4. Diskussion

Eine der Aufgaben der Entwicklungsbiologie ist es, die genaue Rolle und Funktion einzelner Entwicklungsgene zu ergründen. Dabei nimmt die detaillierte Aufklärung von Signalwegen und Genregulationsmechanismen an Bedeutung zu. Die Familie der *Iroquois*-Gene gehört zu den Genen, die während der Embryonalentwicklung aktiv sind. Während in *Drosophila* den Iro-Genen bereits eine Reihe von Funktionen zugeordnet werden konnte (Cavodeassi et al., 2000,1999; Gomez-Skamerta et al., 1996) ist ihre Rolle in der Vertebratenentwicklung weiterhin unklar. Sie kodieren für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren, die durch das gesamte Tierreich hochkonserviert zu finden sind. Ihre Expressionsdomänen in einer großen Anzahl von unterschiedlichen embryonalen Geweben sowie eine Reihe unterschiedlicher Untersuchungen deuten an, dass die *Iroquois*-Gene für die verschiedensten Aspekte der Musterbildung eine wichtige Rolle nicht nur in der *Drosophila*-Entwicklung einnehmen. Trotz ihrer Bedeutung für diese Entwicklungsprozesse ist ihre genaue Funktionsweise bisher nur in Ansätzen geklärt.

Daher sollte in dieser Arbeit die Funktion der *Irx*-Gene weiter untersucht werden. Bisherige Analysen, insbesondere in *Drosophila* zeigten, dass die *Irx* speziell in der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle spielen, so dass in den hier durchgeführten Untersuchungen das sich entwickelnde Neuralrohr als gut verstandenes Modellsystem zur funktionellen Analyse der einzelnen *Irx*-Gene genutzt wurde.

Die Rolle der *Irx*-Gene während der Entwicklung des Nervensystems

Die bisherigen Untersuchungen der *Irx*-Gene machten deutlich, dass sie sowohl in der frühen, als auch in der späten Entwicklung und Musterbildung des Nervensystems eine entscheidende Rolle spielen. Schon ihre Entdeckung in *Drosophila* zeigte, dass sie für Faktoren kodieren, die die Expression der proneuralen Gene des *AS*-Komplexes ermöglichen (Cavodeassi et al., 2001). Für drei der *Iroquois*-Gene in *Xenopus*, *Xiro1*, 2 und 3 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie die frühe Neurulation beeinflussen können (Bellefroid et al., 1998, Gomez-Skamerta et al., 2001, 1998). So führte beispielsweise die Überexpression von *Xiro3* zu einer Vergrößerung des sich entwickelnden Neuralrohres und zusätzliches neuronales Gewebe bildete sich an Stelle der Epidermis (Bellefroid et al., 1998). Die Etablierung von neuronalen Territorien in *Xenopus* ist abhängig von der Reprimierung der Funktion von Bmp-4. Diese Reprimierung von Bmp-4 erfolgt zum einen durch sezernierte Faktoren, die den Bmp-Signalweg stören als auch durch die Inhibierung der Bmp-4-Expression selbst, was durch den

Wnt-Signalweg vermittelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass *Xiro1* durch den Wnt-Signalweg aktiviert wird und im Neuroektoderm als Repressor wirkt, der zu der Inhibierung von *Bmp-4* führt. Unklar blieb jedoch, ob es sich hierbei um eine direkte oder eine indirekte Inhibierung der *Bmp4*-Expression durch *Xiro1* handelte, auch wenn eine *in vitro*-Bindung der *Xiro*-Homeodomäne an die *Bmp-4*-Promotor-Sequenz gezeigt werden konnte (Gomez-Skamerta et al., 2001). Neben dieser Rolle während der frühen Neurulation gibt es jedoch auch einige Hinweise auf Funktionen der Iroquois-Proteine während der späteren Musterbildung des Nervensystems. Hier konnte für einzelne *Irx*-Gene eine Aufgabe bei der Ausbildung von Grenzen zwischen verschiedenen neuronalen Territorien festgestellt werden. So wird im Gehirn die Grenze zum späteren Vorderhirn, die *Zona limitans intrathalamica*, durch die gegenseitige Inhibierung von *Six3* und *Irx3* definiert (Kobayashi et al., 2002). *Irx2* dagegen könnte eine Rolle bei der Festlegung der Mittelhirn-Hinterhirngrenze bzw. der Ausbildung des Cerebellums übernehmen, wobei es zu einer gegenseitigen Aktivierung von *Irx2* und *Gbx2* kommt (Ogura et al., 2001). Diese Festlegung von Grenzen zwischen den unterschiedlichen neuronalen Gebieten durch eine gegenseitige Regulierung zweier Faktoren geht oftmals einher mit scharf zueinander abgegrenzten Expressionsdomänen der einzelnen betroffenen Faktoren. Bisher konnte jedoch in keinem Fall geklärt werden, ob diese Regulation direkt durch die einzelnen Iroquois erfolgt oder ob sie indirekt über weitere Faktoren vermittelt wird.

Durch die in dieser Arbeit vorgenommene Analyse der Neuralrohrentwicklung in der *Ft*-Mutante in Kombination mit der Durchführung von Überexpressionsstudien der einzelnen *Irx*-Gene im sich entwickelnden Neuralrohr des Hühnerembryos konnten einige weitere Hinweise auf die Funktion der *Irx*-Gene gesammelt werden. Die so erhaltenen Ergebnisse ermöglichten dann die systematische Suche nach potentiellen direkten Zielgenen der *Irx*-Proteine.

4.1 Funktionelle Analyse der *Irx*-Gene im Neuralrohr

Die dorso-ventrale Musterbildung des sich entwickelnden Neuralrohres beginnt mit der Etablierung von unterschiedlichen neuronalen Vorläuferpopulationen. Die korrekte Ausbildung dieser Populationen wird über die distinkte räumliche Expression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert (Briscoe et al., 2000, Helms and Johnson, 2003). Im ventralen Neuralrohr reguliert das sezernierte Protein *Shh* (Sonic Hedghog) die Expression einer Reihe von HD-Transkriptionsfaktoren, zu denen neben Mitgliedern der *Pax*-, *Nkx*- und

Dbx-Familie auch die der *Irx*-Gene zählen (Qui et al., 1998, Pierani et al., 1999, Briscoe et al., 2000). Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren wird entweder positiv oder negativ über den von der Bodenplatte ausgehenden Shh-Gradienten reguliert (siehe 1.2). Durch die gegenseitige Inhibierung von Paaren dieser Transkriptionsfaktoren entstehen scharfe Expressionsgrenzen, welche entscheidend für die räumliche Organisation der entstehenden neuronalen Vorläuferpopulationen sind. Viele dieser proneuralen HD-Proteine sind in der Lage die Entstehung von ektopischen Neuronensubtypen zu induzieren, wenn sie experimentell außerhalb ihrer normalen Expressionsdomäne exprimiert werden (Briscoe et al., 2000, Pierani et al., 2001). Dieser Vorgang wird wahrscheinlich durch die Aktivierung der Expression von in der Hierarchie nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren ausgelöst, welche wiederum eine intermediäre Rolle in der Determinierung des neuronalen Zellschicksals übernehmen und selber in den postmitotischen Neuronen exprimiert werden (Sharma et al., 1998; Tanabe et al., 1998; Briscoe et al., 2000). Eine mögliche Erklärung der Funktionsweise der unterschiedlichen proneuralen Transkriptionsfaktoren des Neuralrohres wäre demnach, dass sie sowohl als Aktivatoren – auf die nachgeschalteten „postmitotischen“ Transkriptionsfaktoren-, als auch als Repressoren untereinander wirken können. Für die Mitglieder der *Dbx*- und *Nkx*-Familie konnte gezeigt werden, dass sie ihre inhibitorische Wirkung auf den jeweiligen Klasse I- bzw. Klasse II-Partner über die Rekrutierung des Ko-Repressores *Groucho* erreichen. Für den *Irx*-Faktor *Irx3* hingegen konnte keine Interaktion mit bzw. Bindedomäne für *Groucho* gefunden werden (Muhr et al., 2001). Obwohl gezeigt wurde, dass *Irx3* durch gegenseitige Inhibierung mit dem bHLH-Protein *Olig2* für die Etablierung der dorsalen Grenze der Motorneuronenvorläuferdomäne verantwortlich ist (Novitsch et al., 2001, Mizuguchi et al., 2001), bleibt demnach unklar, wie diese Regulation erfolgt. Ebenso ist auch die Funktion der vier weiteren Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene nicht bekannt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Überexpressionsstudien sollen helfen, hier weitere Einblicke zu bekommen.

4.1.1 Alle *Irx*-Gene sind funktionell redundant, wenn sie überexprimiert werden.

Es konnte zunächst festgestellt werden, dass die Überexpression aller Neuralrohr-spezifischen *Irx*-Gene immer die gleichen Veränderungen in der dorso-ventralen Musterbildung des Neuralrohres hervorrufen. Da es sich bei den *Irx*-Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt, ist für ihre Funktion zunächst die Struktur ihrer DNA-bindenden Domäne entscheidend. Weiterhin spielen potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen eine Rolle,

über die eine mögliche Spezifizierung der Funktion erfolgen kann. Vergleicht man die Protein-Sequenzen der einzelnen *Irx*-Proteine untereinander (siehe 1.1) so wird deutlich, dass sie sich über den Bereich der Homeodomäne nicht nur ähnlich, sondern sogar zu 92% identisch sind (gelb hinterlegt in Abb. 1.1). Auch der Bereich der einzig weiteren erkennbaren Domäne der *Irx*-Proteine, die so genannte Iro-Box, ist hochkonserviert (grün hinterlegt, Abb. 1.1). Die verschiedenen *Irx*-Proteine unterscheiden sich demnach nur kaum erkennbar in der Struktur ihrer bekannten Domänen, so dass es nicht überrascht, dass sie funktionell redundant agieren können. Ihre spezifische Funktion während der Entwicklung wird dagegen wahrscheinlich über eine räumlich und zeitlich differenzierte Expression erreicht, da die *Irx*-Gene zwar ein sehr ähnliches und auch oft überlappendes aber nicht identisches Expressionsmuster zeigen. Es wurde bereits eine Reihe von konservierten Elementen im Bereich der *Iroquois*-Gene identifiziert, die als Enhancer-Elemente die Expression der *Irx*-Gene regulieren können. Dabei wurden sowohl Elemente gefunden, die die Expression einzelner *Irx*-Gene in unterschiedlichen Domänen steuern, als auch solche, die für ein einheitliches Expressionsmuster von mehreren *Irx*-Genen verantwortlich sein könnten (Calle-Mustienes et al., 2005). Die hier verwendeten Konstrukte zur Überexpression der einzelnen *Irx*-Gene ermöglichen jedoch eine starke Expression, die unabhängig von den sonst herrschenden Regulationsmechanismen eine gleichmäßige Expression der *Irx*-Gene hervorruft. Ebenso stehen alle eventuell benötigten Kofaktoren im Neuralrohr allen *Irx*-Proteinen gleichermaßen zur Verfügung, wenn man davon ausgeht, dass die Iro-Box als Protein-Protein-Interaktions-Domäne agiert. So können alle *Irx*-Gene in den Überexpressionsstudien in derselben Weise exprimiert werden und auch die gleichen regulatorischen Funktionen übernehmen. Weiterhin wird durch die Überexpression ein verhältnismäßig großer Überschuss an *Irx*-Protein in der Zelle produziert, so dass es immer möglich sein sollte alle potentiellen Zielgene anzusteuern bzw. die offenen Bindestellen zu besetzen. Der hier verwendete experimentelle Ansatz der Überexpression der einzelnen *Irx*-Gene führte somit zu keiner Erkenntnis über die endogen verschiedenen Funktionen, die die *Irx*-Faktoren möglicherweise erfüllen können. Hier könnte der Vergleich von Verlust-Mutanten der einzelnen *Irx*-Gene und von Kombinationen von *Irx*-Genen weitergehende Aufschlüsse geben. Allerdings wäre es auch hier möglich, dass im Falle des Verlustes von nicht allen *Irx*-Genen die Funktion durch die anderen aufgefangen werden kann, so dass wiederum keine Aussage zu der endogenen Funktion eines einzelnen *Irx*-Genes getroffen werden könnte.

4.1.2 Die *Irx*-Gene regulieren die Expression von *Olig2* und somit die Entstehung der Motorneuronen negativ

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression aller *Irx*-Proteine, analog zu den bereits bekannten Daten für *Irx3* (Novitsch et al., 2001), zu der Inhibierung der *Olig2*-Expression führt. Diese Befunde werden unterstützt durch die Ergebnisse der Analysen der Neuralrohrentwicklung in den *Ft/Ft*-Embryonen, in denen neben den Genen *Fts*, *Fto* und *Ftm* auch der gesamte *IrxB*-Genkomplex deletiert ist. Die hier zu beobachtende Veränderung der dorso-ventralen Musterbildung des Neuralrohres ist zu einem großen Teil abhängig von dem beschriebenen Verlust der *Shh*-Expression in der Bodenplatte (Götz et al., 2005). Diese Störung des *Shh*-Signalweges ist jedoch nicht abhängig von der Deletion des *IrxB*-Genkomplexes, sondern konnte bereits durch die Deletion eines einzelnen, von der *Ft*-Mutation betroffenen Genes – *Ftm* – erreicht werden. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen führt der *Shh*-Verlust in der Bodenplatte jedoch zu einem dramatischen Verlust von Motorneuronen, während sich die V2-Neuronen bis an die ventrale Mittellinie ausdehnen (mündliche Mitteilung J. Vierkotten). Im Gegensatz hierzu konnte in *Ft/Ft*-Embryonen eine Ausdehnung der *Olig2*-Expression in der Motorneuronenvorläuferdomäne sowie der HB9-Expression in den Motorneuronen gezeigt werden. Gleichzeitig ist eine Verkleinerung der V2-Neuronendomäne, markiert durch *Chx10* zu beobachten gewesen. Diese Veränderungen konnten weder in der *Ftm*-Mutante, noch in der *Fts*- (Lesche, 1997) oder *Fto*-Mutante (mündliche Mitteilung S. Kuschel/ J. Vierkotten), welche beide keinen schwerwiegenden Phänotyp aufweisen, gefunden werden, womit sie durch den Verlust des *IrxB*-Genkomplexes hervorgerufen worden sein könnten.

Demnach führt die in dieser Arbeit durchgeführte Überexpression von *Irx*-Genen zu einer reduzierten *Olig2*-Expression, während der Verlust der drei *Irx*-Gene des *IrxB*-Genkomplexes in der *Ft*-Mutante zu einer Ausdehnung der *Olig2*-Expression führt. Gleichzeitig besitzt jedoch auch die ausgedehnte *Olig2*-Expression eine scharfe dorsale Grenze, welche normalerweise durch die gegenseitige Inhibierung mit *Irx3* definiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der homozygoten *Ft*-Mutante die Expression von *Irx1* ebenfalls ausdehnt und nun an die neue dorsale Grenze von *Olig2* anstößt (Götz, 2002). *Irx1* kann demnach in der Abwesenheit von *Irx3* dessen reprimierende Wirkung auf *Olig2* übernehmen, wodurch auch die in den Überexpressionsstudien beobachtete funktionelle Redundanz der *Irx* unterstützt wird.

Die ebenfalls beobachtete Verkleinerung der Motorneuronenpopulation in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene bzw. die Ausdehnung der Motorneuronendomäne in *Ft/Ft*-

Embryonen lässt sich ebenfalls auf den Einfluss der *Irx*-Gene auf die *Olig2*-Expression zurückführen. So konnte zuvor gezeigt werden, dass *Olig2* für die Entstehung der Motorneuronen notwendigerweise verantwortlich ist (Takebayashi et al., 2002).

4.1.3 Die *Irx*-Gene beeinflussen die Expression von *Olig3*

Die Analyse einiger Marker für postmitotische Neuronen erbrachte jedoch neben den oben genannten Aspekten weitere Hinweise auf Funktionen der *Irx*-Gene in der dorso-ventralen Musterbildung des Neuralrohres. So konnte durch die Untersuchung der *Isl-1*-Expression (siehe 3.2.2.2) zunächst gezeigt werden, dass die Überexpression der *Irx*-Gene zu einer verkleinerten Motorneuronenpopulation führt, was – wie oben beschrieben – als sekundärer Effekt der reduzierten *Olig2*-Expression betrachtet werden kann. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die *Irx*-Faktoren nicht nur die Expression von *Olig2* reprimieren können, sondern auch direkt negativ auf die Expression von *Isl-1* einwirken können. Bei der Betrachtung der *Isl-1* Expression fiel weiterhin auf, dass auch die zweite Expressionsdomäne von *Isl-1* in den dI3-Neuronen in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene deutlich verkleinert oder sogar vollständig verschwunden war. Auch hier wäre eine negative Regulation der *Isl*-Expression durch die *Irx*-Faktoren eine mögliche Erklärung. Es ist jedoch bekannt, dass ein weiteres Mitglied der *Olig*-Genfamilie, *Olig3*, im dorsalen Neuralrohr exprimiert wird und für die Ausbildung von dI3-Neuronen notwendig ist. Die Analyse der *Olig3*-Expression zeigte, dass auch hier die Überexpression der *Irx*-Gene eine reprimierende Wirkung ausübt. Erstaunlicherweise konnte jedoch nicht innerhalb der gesamten *Olig3*-Domäne diese inhibitorische Wirkung der *Irx*-Faktoren beobachtet werden. Stattdessen wurde im ventralen Bereich der Expressionsdomäne die *Olig3*-Expression durch die ektopische *Irx*-Expression fast vollständig reduziert, während im dorsalen Bereich der *Olig3*-Domäne Zellen gefunden wurden, die sowohl eine ektopische *Irx*-Expression als auch die endogene *Olig3*-Expression zeigten.

Bisher ist völlig unklar, ob die *Irx*-Faktoren zur Bindung an die DNA oder im weiteren Verlauf zur Umsetzung ihrer regulativen Funktion auf die Rekrutierung weiterer Proteine als Kofaktoren angewiesen sind. Die Beobachtung, dass die Überexpression der *Irx*-Gene nur in einem Teil der *Olig3*-Expressionsdomäne zu der Reduzierung der *Olig3*-Expression führt, weist auf die Existenz möglicher, für die Inhibierung von *Olig3* notwendigen, Kofaktoren hin. Des Weiteren wird die dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr über ein komplexes Netzwerk von einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert, so dass es denkbar ist, dass die Reprimierung von *Olig3* nicht alleine durch die *Irx*-Faktoren, sondern nur durch die

Kombination eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren zusammen mit den *Irx*-Proteinen möglich ist. Diese werden demnach in der dorsalsten Region des Neuralrohres nicht exprimiert, so dass es zu keiner negativen Transkriptionsregulation durch die *Irx* kommen kann.

4.1.4 Die Veränderung in der V1- und V2 - Neuronenpopulation

Neben den gerade erwähnten Veränderungen in der Expression der beiden Mitglieder der *Olig*-Genfamilie und den daraus resultierenden Veränderungen in der Motorneuronen- sowie der dI3-Neuronen-Population wurden weitere Veränderungen in einigen ventralen Neuronenpopulationen gefunden. So führte die Überexpression der *Irx*-Gene nicht nur zu einer Verkleinerung der Motorneuronendomäne, sondern gleichzeitig auch zu einer Ausdehnung der V2-Neuronenpopulation und einer Reduzierung der V1-Neuronen-Population. Beide Neuronentypen entstehen aus Vorläuferzellen, in denen gleich eine Vielzahl von proneuralen Genen exprimiert wird. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Kombination von Faktoren für die Differenzierung eines speziellen Neuronentypen notwendig ist. So exprimieren postmitotische V1-Neuronen transient den Transkriptionsfaktor En-1 (Engrailed-1) und entstehen aus Pax6 / Dbx2 / Nkx6.2 / Irx3 –exprimierenden pV1-Vorläuferzellen (Matisse and Joyner, 1997; Saueressig et al., 1999; Vallstedt et al., 2001). Chx10 hingegen wird in den postmitotischen V2-Neuronen exprimiert (Liu et al., 1994, Ericson et al., 1997), welche aus Vorläuferzellen differenzieren, die sowohl Pax6, Nkx6.1 als auch Irx3 exprimieren (Briscoe et al., 2000; Vallstedt et al., 2001). In der *Pax6*-Mutante *Sey* (*Small eye*) können keine En1-exprimierenden V1-Neuronen mehr gefunden werden, während die Expression von Chx10 in den V2-Neuronen lediglich reduziert wird, sich die V3-Neuronen allerdings nach dorsal ausdehnen (Ericson et al., 1997). In *Nkx6.1*^{-/-}-Mutanten werden dagegen vermehrt En-1-exprimierende V1-Neuronen gebildet und man findet kaum noch V2-Neuronen (Vallstedt et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Nkx6.1* bei der Anwesenheit von Irx3 zu der Induktion von zusätzlichen V2-Neuronen und Motorneuronen führen kann (Briscoe et al., 2000, Sander et al., 2000). Auch die Überexpression von *Dbx1*, welches in der p0-Domäne exprimiert wird, führt zu einer Reduzierung von En1-positiven V1-Neuronen (Pierani et al., 2001). Nach dem Modell der 'De-Repression' wird die Differenzierung spezieller Neuronentypen aus einer Vorläuferdomäne durch die Kombination der proneuralen Gene innerhalb dieser Domänen jedoch nicht aktiviert, sondern inhibiert. Nur in Bereichen, in denen diese Kombination von Repression entfällt, kann das entsprechende Effektor-Gen, welches die

Neuronendifferenzierung vorantreibt, exprimiert werden (Lee und Pfaff, 2001). Neben dem Einfluss, den die proneuralen Gene auf die Differenzierung der unterschiedliche Neuronentypen haben, gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass die in den postmitotischen Neuronen exprimierten Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig inhibieren können. So wurde gezeigt, dass der V0-Neuronen-Marker *Evx1* in der Lage ist, die Expression von *En1* zu inhibieren und die Differenzierung von V1-Neuronen zu verhindern (Moran-Rivard et al., 2001).

Die beobachteten Veränderungen in der Differenzierung der V1- und V2-Neuronen in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene können somit durch unterschiedliche Ansätze erklärt werden. Es könnten einerseits Veränderungen in der Pax6- bzw. Nkx6.1-Expression hervorgerufen worden sein. Es wäre aber auch möglich, dass die ektopisch exprimierten *Irx*-Gene nicht indirekt über die proneuralen Gene, sondern direkt auf die Expression der „Effektor-Gene“ in den postmitotischen Neuronen einwirken. Die erzielten Ergebnisse geben hier keinen eindeutigen Aufschluss. Während die Expression von Nkx6.1 unverändert blieb, wurde eine Reduktion der Pax6-Expression beobachtet. Die verminderte Pax6-Expression kann somit, analog zu dem Phänotyp der *Sey/Sey*-Mutante, für die Verkleinerung der V1-Neuronenpopulation verantwortlich sein. Allerdings wurden abweichend von den Befunden in der *Sey/Sey*-Mutante ektopische V2-Neuronen gefunden. Nicht nur für die proneuralen Gene, sondern auch für die postmitotisch exprimierten Transkriptionsfaktoren wurde beschrieben, dass sie sich gegenseitig inhibieren können (Briscoe et al., 2000, Moran-Rivard et al., 2001). Die Ausdehnung der V2-Neuronen kann somit auch durch den partiellen Verlust der benachbarten Motor- und V1-Neuronen ermöglicht worden sein. Es wäre denkbar, dass durch die reduzierte Expression von *En-1* in den V1-Neuronen und von *Isl-1* in den Motoneuronen die Repression auf *Chx10* in den betroffenen Zellen durch diese beiden Faktoren nicht mehr vorhanden war und es so ausgedehnt exprimiert werden konnte.

In der Tat führen Mutationen in verschiedenen proneuralen Genen oftmals zu einer lokal veränderten De-Repression, wodurch ein spezieller Neuronentyp durch die benachbarten Neuronentypen ersetzt wird (Ma, 2006; Mizuguchi *et al.* 2006; Wildner *et al.* 2006; Glasgow *et al.* 2005; Helms *et al.* 2005; Muller *et al.* 2005; Gowan *et al.* 2001; Fode *et al.* 2000).

Es wäre jedoch auch möglich, dass es sich bei *En1* um ein direktes Zielgen der *Irx*-Proteine handelt. Normalerweise werden die *Irx*-Faktoren nicht überlappend mit *En1* exprimiert, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die ektopische Expression der *Irx*-Gene in den postmitotischen V1-Neuronen die Expression von *En1* verhindert.

Besonders erwähnt werden muss an dieser Stelle jedoch noch einmal die durch die Überexpression der *Irx*-Gene hervorgerufene Veränderung der Pax6-Expression. Die hier vorliegende Inhibierung der Pax6-Expression durch die ektopisch exprimierten *Irx*-Gene war überraschend, da Pax6 und Irx3 normalerweise endogen koexprimiert werden (siehe Abb.A.9). Es war somit ursprünglich nicht zu erwarten, dass die Überexpression der *Irx*-Gene zu einer Änderung der Pax6-Expression führt. Es wäre möglich, dass die Koexpression von Pax6 und Irx3 einer Dosis-abhängigen Regulation folgt. Erst durch die hohe Konzentration der überexprimierten *Irx*-Gene würde es dann zur negativen Regulation der Pax6-Expression kommen. Dieser Annahme folgend, wäre es demnach möglich, dass hier eine direkte Regulation der Pax6-Expression durch die *Irx*-Faktoren vorliegt. In diesem Fall sollten im Genom um Pax6 ein oder mehrere hochkonservierte IBS-Motiv(e) zu finden sein. Eine erste Suche in den Datenbanken des ECR-Browsers (www.ecrbrowser.dcode.org) führte zu der Identifizierung ca. 40 CNEs im Genom um *Pax6*, die von Mensch bis Huhn konserviert sind. Davon sind 7 in den Introns und 33 in der benachbarten Region von Pax6 lokalisiert. In 15 der so identifizierten CNEs konnte ein IBS-Motiv gefunden werden. Allerdings sind nur 2 dieser CNEs durchgehen in Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Zebrafisch und Krallenfrosch konserviert und enthalten ebenfalls das IBS-Motiv. Nach diesem Auswahlkriterium existieren demnach im Genom um Pax6 zwei potentielle Iroquois-Bindestellen, die eine Regulation der Pax6-Expression durch die *Irx* ermöglichen würden. Die Datenbankanalyse diente jedoch nur einer ersten Orientierung, ohne dass eines der CNEs weiter untersucht wurde. Eine Darstellung der zwei ausgewählten CNEs ist im Anhang in Abbildung A.13 zu sehen.

4.2 Die Identifizierung von direkten Zielgenen der *Irx*-Transkriptionsfaktoren

Es existiert eine Reihe von Untersuchungen zur Funktion und Aufgabe der verschiedenen *Iroquois*-Gene, aus denen eine Vielzahl von Hinweisen auf die regulatorische Funktion der einzelnen *Irx*-Gene hervorgeht. So führt beispielsweise die gegenseitige Inhibierung von Irx3 und Six3 zu der Unterteilung des Vorderhirns in einen anterioren und eine posterioren Bereich (Kobayashi et al., 2001) und die wechselseitige Reprimierung von Olig2 und Irx3 definiert die dorsale Grenze der Motorneuronenvorläuferdomäne im ventralen Neuralrohr (Novitsch et al., 2001; Briscoe et al., 2000). Besonders in Fällen, in denen gezeigt werden konnte, dass die *Irx*-Gene an der Bildung von bestimmten Grenzen beteiligt sind, kann die Möglichkeit hinterfragt werden, ob an dieser Stelle eine direkte Regulation vorliegt.

Anhand der hier durchgeführten funktionellen Analysen der *Irx*-Gene im sich entwickelnden Neuralrohr sollte daher versucht werden potentielle direkte Zielgene der *Irx*-Gene zu identifizieren und somit die nächste Stufe in der Aufklärung der Rolle der *Irx* zu betreten.

4.2.1 Hinweise aus den biologischen Daten

Die Untersuchungen der Neuralrohrentwicklung in *Ft/Ft*-Embryonen sowie die Durchführung der Überexpressionsstudien im Neuralrohr von Hühnerembryonen lieferten hinsichtlich der Rolle der *Irx*-Gene zum Teil gut übereinstimmende Ergebnisse. Diese deuten stark darauf hin, dass es sich bei *Olig2* um ein direktes Zielgen der *Irx*-Transkriptionsfaktoren handelt. So führte der Verlust des *IrxB*-Genkomplexes in der *Ft*-Mutante zu einer Ausdehnung der *Olig2*-Expression in der Motorneuronen-Vorläuferdomäne, während die Überexpression aller *Irx*-Gene zu einer Inhibierung der *Olig2*-Expression in den betroffenen Zellen führte. Weiterhin wird auch in der endogen, wildtypischen Situation keines der *Irx*-Gene überlappend mit der *Olig2*-Domäne exprimiert (siehe Abb.3.5) und es ist, wie oben beschrieben bekannt, dass *Irx3* und *Olig2* eine gemeinsame Expressionsgrenze besitzen. Zusätzlich konnte selbst im Falle des Verlustes des *IrxB*-Genkomplexes auch bei der ausgedehnten *Olig2*-Expression eine scharfe dorsale Grenze beobachtet werden, ähnlich der in der wildtypischen Situation. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von *Irx1* in *Ft/Ft*-Embryonen ebenfalls ausdehnt und in dieser Situation an die Expression von *Olig2* angrenzt (Götz et al., 2005).

Es deuten somit alle Daten darauf hin, dass es sich bei *Olig2* um ein von den *Irx*-Faktoren reprimiertes Zielgen handelt.

Neben den Befunden zu *Olig2* existieren aus den Überexpressionsanalysen weitere Ergebnisse, die Faktoren hervorbrachten, die durch die ektopische Expression der *Irx*-Gene in ihrer Expression verändert wurden. So ließ sich neben der Expression von *Olig2* auch die von *Olig3* und *Pax6* inhibieren. Wie zuvor in 4.1.4 beschrieben war dieses Ergebnis zumindest für *Pax6* eher überraschend, da hier die endogene Expression von *Pax6* mit der der *Irx*-Gene, speziell mit *Irx3*, weitestgehend überlappt. Hier korrelieren demnach die Daten aus der Überexpressionsstudie nicht mit der endogenen Situation. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine Regulation handelt, die durch die relativ hohe Dosis der überexprimierten *Irx*-Faktoren ausgelöst wird. Die bisher bekannten Daten über ein regulatorisches Verhältnis zwischen den Iroquois-Proteinen und *Pax6* weisen ebenfalls nicht in diese Richtung. Die Arbeit von Aldaz et al., (2003) deutet sogar eher darauf hin, dass die Iroquois in *Drosophila* bei der Aktivierung von *eyegone*, einem Mitglied der *Pax*-Genfamilie,

eine Rolle spielen. Aufgrund der schwierigen Datenlage ist hier somit keine eindeutige Aussage zu treffen. Die reprimierende Wirkung der ektopisch exprimierten *Irx*-Gene auf *Olig3* hingegen konnte auch mit den endogenen Expressionsmustern in Übereinstimmung gebracht werden. So ist die Expression von *Olig3* im dorsalen Neuralrohr in den Vorläufern der dII-3-Neuronen lokalisiert, wo sich keine bzw. nur eine schwache *Irx*-Expression finden lässt. So werden *Irx1*, *Irx2* und *Irx6* überhaupt nicht in dieser Region des Neuralrohres exprimiert und die Expression von *Irx3* und *Irx5* ist im dorsalen Neuralrohr deutlich schwächer als weiter ventral (siehe Abb.3.5 und A. 9). Somit bestand auch für *Olig3* die Möglichkeit, dass es sich um ein potentiell direktes Zielgen der *Irx*-Transkriptionsfaktoren handelt.

4.2.2 Hinweise aus den *in silico* –Daten

Um den Hinweisen auf potentielle direkte Zielgene aus den funktionellen Analysen der *Irx*-Faktoren weiter nachzugehen führte der nächste Schritt zu der Frage nach der Anwesenheit von Iroquois-Bindestellen (IBS) im Genom der betroffenen Gene. Das Erkennungsmotiv der Iroquois-Proteine wurde erst kürzlich durch die Arbeit von Biloni et al. identifiziert und eröffnete erstmals die Möglichkeit einer *in silico*-Suche nach potentiellen Zielgenen. Diese Suche konzentrierte sich aufgrund der oben genannten Befunde zunächst auf die Region im Genom um *Olig2* und *Olig3* und wurde von Dr. R. Dildrop am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere durchgeführt. Dabei wurde, wie bereits in 3.3 beschrieben, mit der Suche nach konservierten nicht kodierenden Elementen (CNEs) begonnen. Da davon ausgegangen wird, dass funktionelle regulatorische Elemente evolutionär konserviert vorliegen, konnte so die Suche nach dem Iroquois-Erkennungsmotiv schon weiträumig eingeschränkt werden. In den mit Hilfe des ECR-Browsers identifizierten CNEs wurde dann nach dem IBS-Motiv gesucht, so dass im Genom um *Olig2* und *Olig3* jeweils zwei CNEs identifiziert wurden, in denen das IBS-Motiv hochkonserviert zu finden war (siehe Übersicht in Abb.A.10 und 11). Besonders auffällig war, dass es sich bei den beiden jeweils „upstream“ des Gens lokalisierten CNEs, *Olig2_CNE-34* und *Olig3_CNE-19*, um Paraloge handelt. Lediglich in den ausgewählten Fischarten existiert im *Olig2_CNE-34* ein Basenaustausch innerhalb des IBS-Motives von ACATATGT nach ACATATGC. Die Tatsache, dass es bei beiden aus den funktionellen Analysen hervorgegangenen Kandidatengen eine paraloge potentielle *Irx*-Bindestelle gab, verstärkte die Hypothese, dass es sich bei den beiden *Olig*-Genen um direkte Zielgene der *Irx*-Faktoren handelt. Weiterhin findet sich bei diesen CNEs auf jeder Seite neben dem IBS-Motiv ein ebenfalls hochkonservierter Block von jeweils 14

Basenpaaren. Für das E-Box-Motiv, welches das Erkennungsmotiv einer Reihe von bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-Familien-Mitgliedern darstellt, konnte gezeigt werden, dass die Bindungsspezifität zwischen den einzelnen Faktoren über die unmittelbare Umgebung der E-Box reguliert wird (Bendall und Molloy, 1994). Bei den anderen beiden gefundenen CNEs, Olig2_CNE+26 und Olig3_CNE+21, handelt es sich um potentielle regulatorische Elemente, in denen das IBS-Motiv jeweils zweimal hochkonserviert gefunden werden konnte, so dass auch hier als wahrscheinlich angesehen wurde, dass es sich hierbei um tatsächlich funktionelle Irx-Bindestellen handeln könnte. Neben diesen hochkonserviert vorliegenden IBS-Motiven existieren jedoch zusätzlich auch einige, die zwar innerhalb eines CNEs lokalisiert, jedoch nicht durch die Spezies konserviert sind. Exemplarisch wurde in dieser Arbeit das Olig2_CNE-73 genannt. Hier findet sich die IBS lediglich in Maus und Ratte, so dass angenommen wurde, dass es sich hierbei nicht um eine funktionelle Irx-Bindestelle handelt.

4.2.3 Test auf Funktionalität der identifizierten CNEs

Um die Funktionalität der potentiellen Bindestellen der in der *in silico*-Analyse identifizierten CNEs nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit ein Reporterexperiment durchgeführt, in dem die Expression des Reporters durch die Anwesenheit eines regulatorischen Elementes, welches die Wirkung des Irx-Transkriptionsfaktors vermittelt, reguliert werden kann (siehe 3.3.1). Die funktionellen Analysen der *Irx*-Gene im Neuralrohr der *Ft*-Mutante und im Neuralrohr der Hühnerembryonen deuteten darauf hin, dass es sich bei den beiden *Olig*-Genen um potentielle Irx-Zielgene handelt, welche negativ reguliert werden. Es wurde somit erwartet, dass sich CNEs, die eine funktionelle Irx-Bindestelle enthalten, in dem durchgeführten Reporterexperiment entsprechend verhalten. Analog zu den biologischen Daten sollte also bei Anwesenheit des entsprechenden CNEs eine Repression der Reporterexpression durch die Irx-Proteine bewirkt werden können. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die oben genannten CNEs, Olig2_CNE-34, Olig2_CNE+26; Olig3_CNE-19 und Olig3_CNE+21, erwartungsgemäß die repressorische Wirkung der Irx-Faktoren auf die Reporterexpression vermitteln können. In allen Fällen wurde bei der Koexpression des entsprechenden Reporterkonstruktes mit einem Irx-Expressionsvektor die Reporterexpression fast bzw. vollständig gelöscht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der hier beobachtete inhibitorische Effekt von der Anwesenheit einer IBS abhängig ist. So führte eine Mutagenese des Erkennungsmotives von ACATATGT zu ATATATAT in Olig2_CNE-34 zu einem vollständigen Verlust der Repressorwirkung des Irx. In den von Biloni et al., durchgeführten

DNA-Bindungsstudien wurde zuvor gezeigt, dass bei dieser Sequenzfolge keine Bindung (0%) des Iroquois-Proteines an die DNA erfolgt. Demnach handelt es sich bei den in den *in-silico*-Analysen ausgewählten CNEs um funktionelle Elemente, die durch die Anwesenheit eines IBS-Motives die Wirkung eines Irx-Faktors vermitteln und als Repressorelement wirken.

Neben diesen CNEs wurden jedoch auch weitere Elemente getestet, bei denen die Erwartungshaltung bezüglich ihrer Funktionalität nicht so eindeutig war. Zunächst wurde die fischspezifische Form des paralogen CNEs *Olig2_CNE-34-Zef* getestet, in dem eine Veränderung des IBS-Motives vorliegt (siehe 4.2.2). In den beschriebenen DNA-Bindungsstudien wurde eine Bindung der Iroquois-Proteine an eine Sequenz, in der anstelle des Thymin ein Cytosin vorhanden ist, in nur 6 % der Fälle gefunden (Bilioni et al., 2006). Eine Bindung ist somit möglich, wurde aber als unwahrscheinlich betrachtet. Entgegen dieser kritischen Erwartungshaltung konnte auch für *Olig2_CE-34-Zef* gezeigt werden, dass auch hier die reprimierende Wirkung des Irx-Faktors auf die Reporterexpression übermittelt werden kann. Allerdings war in diesem Fall keine vollständige Löschung der Reporterexpression zu beobachten, auch wenn der Gesamteindruck auf eine reduzierte Reporteraktivität hindeutete. Vielmehr konnten vereinzelte Zellen gefunden werden, in denen keine Repression der Reporteraktivität stattgefunden hatte, sondern eine Koexpression des GFPs mit dem Irx existierte. Zusammen mit den *in silico*-Daten wurde jedoch davon ausgegangen, dass es sich auch bei *Olig2_CNE-34-Zef* um ein funktionelles regulatorisches Element handelt, in dem jedoch aufgrund der veränderten IBS die Bindungsaffinität des Irx-Proteins an die DNA vergleichsweise schwächer ausfällt. Dadurch kann begründet werden, dass es in einigen Zellen offensichtlich nicht zu einer funktionellen Bindung des Irx-Faktors kam.

Weitaus überraschender war jedoch, dass auch der Test des *Olig2_CNE-73* zu einer reduzierten Reporterexpression führte. In diesem Fall lag eine Irx-Bindestelle vor, welche nicht konserviert ist, sondern ausschließlich in Maus und Ratte gefunden werden konnte. Es wurde demnach angenommen, dass das IBS-Motiv hier zufällig vorliegt und es sich demnach nicht um eine funktionelle Bindestelle handeln konnte und somit keine Repressorfunktion der Irx vermittelt werden würde.

Noch kritischer ist die Tatsache zu bewerten, dass die daraufhin getesteten nicht konservierten Bereiche aus dem *Olig2*-Lokus ebenfalls eine, wenn auch vergleichsweise schwächere, Repressionen der GFP-Expression zeigten. Hierbei wurden drei Bereiche ausgewählt, in denen in Maus und/oder Ratte ein IBS-Motiv gefunden wurde, welche jedoch insgesamt in keiner Weise konserviert vorliegen. Es konnte mit den ausgewählten Bereichen keine

vollständige Koexpression des GFPs mit dem Irx-Protein erreicht werden. Bei jedem der drei getesteten Bereiche konnten jedoch Zellen gefunden werden, in denen eine Koexpression des Reporters und des Irx existiert. Somit konnte dort keine Repression bzw. funktionelle Bindung des Irx-Proteins stattgefunden haben. Die Situation war jedoch nicht vergleichbar mit der, wo eine mutierte IBS angeboten wurde. Es wird demnach davon ausgegangen, dass auch die hier in den getesteten nicht konservierten Bereichen enthaltene IBS in der Lage ist eine schwache repressorische Wirkung der Irx-Faktoren zu vermitteln.

4.2.4 Beurteilung der Ergebnisse aus dem Reportertest

Sowohl die biologischen Daten aus den funktionellen Neuralrohranalysen, als auch die *in-silico*-Datenlage sprechen dafür, dass es sich bei den beiden *Olig*-Genen, *Olig2* und *Olig3*, um direkte Zielgene der Irx handelt. Es gelang jedoch nicht, anhand des durchgeführten Reporterexperimentes eindeutig ein einzelnes regulatorisches Element zu identifizieren, welches die Repressorfunktion der Irx-Proteine auf die nachgeschaltete Genexpression übermittelt, da alle getesteten IBS-Motive des *Olig2*- und *Olig3*-Lokus bei Anwesenheit eines Irx-Proteins zu einer reduzierten Expression des Reportergens führten. Da nicht nur konservierte Elemente getestet wurden, sondern auch nicht konservierte Bereiche, müssen die Ergebnisse kritisch diskutiert werden. Während bei hochkonservierten Elementen davon ausgegangen wird, dass sie funktionell sein können, wird dieses bei nicht konservierten Regionen nicht unbedingt erwartet. Es stellte sich die Frage, ob die experimentell herbeigeführte Situation für die überraschenden Ergebnisse verantwortlich sein könnte. So wurde der jeweils zu testende Bereich, CNE oder nicht konservierte Region, immer auf ca. 200 bis maximal 700bp eingegrenzt und in das Reporterkonstrukt eingesetzt. Die zirkuläre Vektor-DNA wurde dann zusammen mit einem Irx-Expressionsvektor injiziert und elektroporiert. Es wurde also eine Situation geschaffen, in der alle angebotenen IBS-Motive immer gleich leicht zugänglich vorlagen und in einem Überschuss angeboten wurden. Gleichzeitig wurden in der jeweiligen Zelle auch große Mengen an Irx-Protein produziert. Das in der Arbeit von Bilioni et al. identifizierte IBS-Motiv ACAnnTGT stellt das minimale Erkennungsmotiv für die Iroquois-Faktoren dar, welches für die Bindung an die DNA ausreichend ist. In dem hier durchgeführten Reporterexperiment wurde immer, bis auf den Fall der mutierten Erkennungssequenz, ein solches Motiv angeboten. Da immer nur ein CNE bzw. IBS-Motiv getestet wurde, herrschte keine Konkurrenz zwischen den Bindestellen, wie man sie sich sonst vorstellen kann. So könnten auch Bindestellen besetzt werden, die z.B. aufgrund der benachbarten Basen oder der näheren Umgebung eine geringere

Bindungsaffinität aufweisen als die eigentliche Zielsequenz (Bendall und Molloy, 1994). Dies würde unterstützt durch die große Menge an Irx-Protein, so dass auch von dieser Seite keine Limitierung vorhanden wäre.

Für sich alleine stehend erlauben die durchgeführten Reporterexperimente demnach keine eindeutige Identifizierung eines bestimmten regulatorischen Elementes, welches für die Vermittlung der Irx-Funktion verantwortlich ist. Weiterhin kann durch ein solches Experiment auch die tatsächliche Bindung des Irx-Proteins an die Zielsequenz nicht gezeigt werden. Die Mutagenese des IBS-Elementes führte zwar zu einem Verlust der Repression der Reporterexpression und alles deutet darauf hin, dass eine funktionelle Bindung eines Irx-Proteins an die CNEs für die beobachteten Effekte verantwortlich ist; um dieses jedoch zu beweisen, ist die Durchführung von Bindungsstudien notwendig.

4.2.5 Die Bindung von Irx an die DNA

Um dieser und der Frage nach tatsächlichen, für die Irx-Funktion zuständigem regulatorischen Elementen weiter nachzugehen, wurde parallel von Dr. Julia Fischer am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere eine Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt. Hierbei kann das in einer Zelle ektopisch exprimierte Protein nach Bindung an die endogene DNA aufgereinigt werden, ohne dass die Bindung der DNA verloren geht. Dann wird nach entsprechenden Aufreinigungsschritten die Bindung gelöst und die so isolierte DNA in eine PCR eingesetzt, in der man dann die Anwesenheit der gewünschten Zielsequenz überprüfen kann (Wells und Farnham, 2002, Eberhardy und Farnham, 2000). In diesem Fall wurde für die ChIP die C6-Glioma-Zelllinie ausgewählt, eine Ratten-Oligodendrocyten-Astrocytoma-Linie, in der *Olig2* exprimiert wird. Da keine Expression von *Olig3* gefunden werden konnte, wurde hier die Bindung eines überexprimierten Irx1 an verschiedene IBS-Motive des *Olig2*-Lokus getestet. Überprüft wurden dabei sowohl die beiden CNEs, in denen das IBS-Motiv hochkonserviert vorliegt, *Olig2_CNE-34* und *Olig2_CNE+26*, das CNE *Olig2_CNE-73*, in dem das IBS-Motiv nur in Maus und Ratte zu finden ist, als auch die Bereiche A, B und C, die insgesamt nicht konserviert sind und lediglich in Maus und/oder Ratte das Irx-Erkennungsmotiv besitzen.

Überraschenderweise erbrachte das durchgeführte ChIP-Experiment ähnliche Ergebnisse wie die durchgeführten Reporterexperimente. Alle überprüften möglichen Irx-Erkennungssequenzen, einschließlich der in den nicht konservierten Bereichen, lagen an den Irx-Faktor gebunden vor. Dabei schien das zu dem *Olig3_CNE-19* homologe *Olig2_CNE-34* eine höhere Bindungsaffinität an den Irx-Faktor zu besitzen schien, als die übrigen getesteten

Bereiche. Weiterhin konnte die homologe Bindestelle des *Olig3*-Gens, *Olig3_CNE-19*, nicht präzipitiert werden, da *Olig3* in der C6-Zelllinie nicht exprimiert. Es stellte sich nun die Frage, ob die Bindung des Irx-Proteins an ein IBS-Element spezifisch für die chromosomale Region eines Zielgens ist oder ob lediglich die generelle Zugänglichkeit eines Lokus entscheiden sein könnte. In diesem Fall würde jedes beliebige IBS-Motiv, welches sich in der chromosomalen Region eines in der C6-Zelllinie exprimierten Genes befindet, in dem durchgeführten ChIP-Experiment nachweisbar sein. Daher wurde geprüft, ob sich eine Bindung des Irx-Proteins an ein IBS-Motiv, welches sich in CNEs aus dem *HPRT*-Lokus befindet nachweisen lässt. Überraschenderweise konnte hier keine Bindung an die DNA nachgewiesen werden.

Demnach erfolgt die Bindung von Irx-Proteinen nicht willkürlich an jedes erreichbare IBS-Motiv, sondern ist spezifisch für Erkennungssequenzen in der Region eines Zielgenes. Ob jedoch auch in der endogenen Situation alle IBS-Elemente des *Olig2*-Lokus von einem Irx-Protein besetzt werden kann so nicht geklärt werden. In dieser experimentellen Situation liegen alle echten funktionellen IBS-Motive in der endogenen Situation vor, allerdings wurde auch hier ein ektoptisch exprimierter Irx-Faktor benutzt. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass durch die verhältnismäßig große Menge an Irx-Protein in der Zelle zwar zunächst die „echten“ Bindestellen besetzt werden, welche aufgrund ihrer Umgebung die höchste Bindungsaffinität besitzen, dann aber immer noch genügend Irx-Protein frei vorliegt, so dass auch die energetisch ungünstigeren Bindestellen in der Region eines Zielgens besetzt werden können.

Da sowohl in dem hier durchgeführten Reporterexperiment, als auch in der ChIP-Analyse mit einem ektoptisch exprimierten *Irx*-Gen gearbeitet wurde, ließen sich so die übereinstimmenden, allerdings unerwarteten Ergebnisse erklären. In diesem Fall wäre der experimentelle Ansatz nicht optimal gewählt, so dass am Ende keine eindeutige Identifizierung einer einzigen funktionellen IBS innerhalb eines regulatorischen Elementes möglich ist. Um diese Aussage treffen zu können, könnte die Durchführung einer ChIP-Analyse auf endogen exprimiertes, an die DNA gebundenes Irx-Protein z.B. im Embryo weiterhelfen. Voraussetzung hierfür ist, neben der Etablierung eines solchen Experimentes für embryonales Gewebe aus Maus oder Huhn, die Verfügbarkeit eines sehr spezifischen Antikörpers. Die im Augenblick zur Verfügung stehenden Antikörper gegen die Irx detektieren jedoch im Western-Blot auf Proteinextrakten aus embryonalem Maus-Gewebe einen relativ großen Anteil unspezifischer Antigene (mündliche Auskunft Dr. J. Fischer und P. Sikorski), so dass sie eventuell nicht die benötigte Qualität besitzen.

Eine weitere Möglichkeit ist jedoch, dass es sich bei den hier erlangten Ergebnissen nicht um „Artefakte“ handelt, welche durch den experimentelle Ansatz herbeigeführt wurden, sondern um solche, die die tatsächliche Situation widerspiegeln. In einer Analyse über die Bindungsspezifität von E-Box-bindenden Proteinen, zu denen auch Mitglieder des Myc-Netzwerkers zählen (Blackwood und Eisenmann, 1991), geben die Ergebnisse Hinweise in eine ähnliche Richtung. Anhand von ChIP-Analysen in NIH3T3-Zellen konnte gezeigt werden, dass Myc nicht nur an die Konsensus-Sequenz des E-Box-Motives bindet, sondern auch an eine Reihe von veränderten E-Box-Motiven, die mit einer Frequenz von 1/800bp sehr häufig im Genom vorkommen (Boyd et al., 1998; Grandoi et al., 1996; Blackwell et al., 1993). Es gibt jedoch mehrere Hinweise, dass die Transaktivierung der Expression des Zielgenes durch Myc von der Position der Myc-Bindung relativ zum Promotor reguliert wird, so dass die Bindung alleine nicht ausschlaggebend für die Funktion von Myc ist (Boyd et al., 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl Myc als auch USF1 an das E-Box-Motiv des cad-Promotors binden können (Boyd et al., 1998). Gleichzeitig ist bekannt, dass Myc für die Expression vom cad-Promotor notwendig ist (Miltenberger et al., 1995) und aktivierend auf die Expression wirkt, während durch USF1 keine Aktivierung erreicht werden kann. In diesem Fall ist ebenfalls nicht die spezifische DNA-Bindung, sondern die Spezifität der Transaktivierungsdomäne entscheidend für die Regulation der Transkription (Boyd et al., 1998). Aufgrund dieser Befunde wird im Falle von Myc davon ausgegangen, dass die Spezifität für ein Zielgen nicht über die Bindung von Myc an die DNA vermittelt wird, sondern über einen Post-DNA-bindenden-Mechanismus gesteuert wird (Boyd et al., 1998), so dass die Anzahl der Protein-DNA-Bindungen die der funktionellen Bindestellen übersteigen kann. Die Bindung eines Transkriptionsfaktors an die DNA korreliert demnach nicht immer direkt mit seiner Funktion.

Eine ähnliche Formulierung wäre auch für die Irx-Faktoren denkbar, so dass die in dieser Arbeit getesteten potentiellen IBS-Motive auch in der endogenen Situation tatsächlich zu einer Bindung des Irx-Transkriptionsfaktors führen könnten. Allerdings würde dann die Bindung nicht immer zu einer Regulation der Transkription des jeweiligen Zielgenes führen, sondern nur im Falle der Bindung an die „echte“, funktionelle Zielsequenz erfolgen. Dies könnte wie in dem von Zangh et al. (2006) diskutierten Modell zu erklären sein. Demnach kann die Anhäufung von potentiellen, jedoch nicht funktionellen Bindungssequenzen im Bereich eines Zielgenes die Erkennung der tatsächlichen Zielsequenz durch den Transkriptionsfaktor fördern. Nach einer Kombination aus dem 3D-Diffusions-Modell und dem „Sliding“-Modell gleitet der Transkriptionsfaktor mit nur sehr geringer Bindungsaffinität

an der DNA entlang, überprüft dabei mögliche Erkennungssequenzen (von Hippel et al., 1989; Kim et al., 1987; Berg et al., 1981; Richter et al., 1974) und springt dann zufällig an einen anderen Locus (Halford et al., 2004; Slutsky und Mirny, 2004, Gerland et al., 2002). Die Existenz von mehreren Bindungsstellen in der Region eines Zielgenes kann demnach helfen, den Transkriptionsfaktor auszubremsen und in der Nähe der tatsächlichen Zielsequenz anzureichern (Zhang et al., 2006).

4.3 *Olig2* ist ein direktes Zielgen der *Irx*-Transkriptionsfaktoren

Ein Ziel dieser Arbeit war es, potentielle direkte Zielgene der *Irx*-Faktoren zu identifizieren und zu überprüfen. Alle Ergebnisse der unterschiedlichen Analysen weisen darauf hin, dass es sich bei *Olig2* um ein solches direktes Zielgen der *Irx*-Faktoren handelt. So kann der Verlust des *IrxB*-Genkomplexes in der *Ft*-Mutante für eine Ausdehnung der *Olig2*-Expression im Neuralrohr von *Ft/Ft*-Embryonen verantwortlich gemacht werden. Übereinstimmend damit führte eine Überexpression der *Irx*-Gene zu einer Inhibierung der *Olig2*-Expression. Weiterhin überlappt keine der individuellen *Irx*-Expressionen mit der endogenen *Olig2*-Expression. Außerdem ist bekannt, dass *Irx3* und *Olig2* eine gemeinsame Expressionsgrenze besitzen, welche durch die gegenseitige Inhibierung der beiden Faktoren etabliert wird und so die dorsale Grenze der Motorneuronenvorläufer festlegt (Novitch et al., 2002, Briscoe et al., 2000). Die *in-silico*-Analyse führte zu der Identifizierung von zwei CNEs in der Region von *Olig2*, in denen sich ein Iroquois-Erkennungsmotiv (IBS) hochkonserviert vom Mensch bis zum Frosch bzw. Fisch vorliegt. Zusätzlich existiert zu einem dieser CNEs ein homologes CNE in der Region von *Olig3*. In einem *in-vivo*-Reporterexperiment konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer solchen IBS das entsprechende CNE zu einem Übermittler der repressorischen Wirkung der *Irx*-Faktoren auf die Reporterexpression macht. Eine Mutation der IBS führte zum Verlust der Repression der Reporteraktivität. Weiterhin konnte in einer parallel durchgeführten ChIP-Analyse demonstriert werden, dass *Irx* an die endogenen Zielsequenzen innerhalb der CNEs gebunden vorliegt und dass diese Bindung spezifisch für den Locus eines Zielgenes ist. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass es sich bei den von Biloni et al. (2006) identifiziertem IBS-Motiv um eine Sequenz handelt, die nicht nur von den *Drosophila* Iro-Proteinen erkannt wird, sondern auch in den Vertebraten *in vivo* die *Irx*-Bindestelle darstellt, und die regulatorische Wirkung der *Irx*-Transkriptionsfaktoren vermittelt.

Demnach konnte mit *Olig2* erstmals ein *Irx*-Zielgen identifiziert werden, auch wenn es nicht gelang, die *Irx*-Zielsequenz innerhalb des *Olig2*-Lokus auf ein einziges regulatorisches Element einzugrenzen. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass auch in der endogene Situation eine solche Einschränkung nicht vorhanden ist, sondern alle IBS-Motive innerhalb eines Zielgenlokus von den *Irx*-Proteinen besetzt werden können.

Zusätzlich konnte mit *Olig3* ein weiteres potentiell *Irx*-Zielgen präsentiert werden. Hier weisen sowohl die Überexpressionsdaten, als auch die *in-silico*-Analysen und die Ergebnisse der Reporterexperimente auf eine Regulation der *Olig3*-Expression durch die *Irx*-Faktoren hin. Lediglich der Nachweis der direkten Protein-DNA-Interaktion durch eine ChIP-Analyse ist bisher nicht erfolgt.

4.4 Ausblicke

Um die Funktion der *Irx*-Gene weiter zu untersuchen, kann die Identifizierung von weiteren direkten Zielgenen eine große Rolle übernehmen. Die Kombination von funktionellen Studien im Organismus, *in-silico*-Recherchen nach potentiellen Zielgenen und der Durchführung von ChIP-Analysen kann hier der richtige Weg sein. Um die Unsicherheiten in der Interpretation der Ergebnisse zu beseitigen, sollte jedoch versucht werden eine Präzipitation der an die endogen exprimierten *Irx*-Faktoren gebundenen Chromatinfragmente durchzuführen. Die bisher vorhandenen Daten über die verschiedenen Iroquois-Faktoren geben mehrere Hinweise auf weitere potentielle Zielgene, wie z.B. *Gbx2*, *Six3* und *Bmp4* (Kobayashi et al., 2002; Gomez-Skamerta et al., 2001; Ogura et al., 2001), die so überprüft werden könnten. Vielleicht gelingt es, durch die Bestätigung bzw. Identifizierung dieser Kandidaten weitere Kriterien – wie eventuell die Umgebungssequenz der IBS - zu sammeln, die dann eine Suche nach bisher unbekanntem Zielgenen erleichtern können.

Es wird jedoch nach wie vor problematisch bleiben, die spezifischen Funktionen der einzelnen *Irx*-Gene zu analysieren, da die offensichtliche funktionelle Redundanz jede mögliche spezielle Funktion überdeckt. Da bisher veröffentlichte Daten zu den Einzel-Knock-out-Mutanten der *Irx*-Gene hier auch keinen Aufschluss bringen konnten, wäre es denkbar, dass der kombinierte Genverlust von *Irx* mit sehr ähnlichen Expressionsmuster, *Irx1/Irx2* und *Irx3/Irx5* hier weitere Erkenntnisse bringen kann. Die Generierung eines Mausmodells, in dem der gesamte *IrxB*-Genkomplex deletiert ist, wird zur Zeit im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere bearbeitet und ermöglicht eventuell weitere Einblicke in die Rolle der *Irx*-Gene während der Entwicklung.

5. Zusammenfassung

Die Familie der *Iroquois*-Gene kodiert für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren, die über das gesamte Tierreich konserviert zu finden sind. Ihr Expressionsmuster in verschiedenen Geweben während der Embryogenese von unterschiedlichen Organismen lässt vermuten, dass sie entscheidende Aufgaben in der Entwicklung übernehmen könnten. Während den drei *Iro*-Genen in *Drosophila* bereits mehrere Funktionen zugeordnet werden konnten, existieren in den Vertebraten sechs *Irx*-Gene, deren Aufgabe noch nicht eindeutig geklärt ist. Außerdem ist es bislang nicht gelungen ein direktes Zielgen der *Irx*-Proteine zu identifizieren.

Die Analyse der dorso-ventralen Musterbildung des Neuralrohres von *Ft/Ft*-Embryonen, zeigte unter anderem eine Ausdehnung der Motorneuronen-Vorläuferdomäne, welche durch die Expression von *Olig2* gekennzeichnet ist. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass der Verlust der drei *Irx*-Gene, *Irx3*, *5* und *6*, in der *Ft*-Mutante dafür verantwortlich gemacht werden kann. Übereinstimmend damit führte die Überexpression aller *Irx*-Gene im Neuralrohr von Hühnerembryonen unter anderem zu einer reduzierten *Olig2*-Expression. Zusammen mit der schon bekannten Tatsache, dass es sich bei *Irx3* und *Olig2* um zwei sich gegenseitig inhibierende Faktoren handelt, führten diese Ergebnisse zu der Hypothese, dass es sich bei *Olig2* um ein direktes Zielgen der *Irx*-Proteine handelt. Da vor kurzem das Erkennungsmotiv der *Drosophila*-Iroquois-Proteine (IBS: Iroquois binding site) identifiziert worden war, konnte mittels einer *in silico*-Analyse in der chromosomalen Umgebung von *Olig2* nach potentiell funktionellen IBS-Elementen gesucht werden. Durch die Durchführung eines *in vivo*-Reporterexperimentes konnte gezeigt werden, dass es sich bei den dort identifizierten Sequenzbereichen um regulatorische Elemente handelt, die die reprimierende Wirkung der *Irx*-Transkriptionsfaktoren vermitteln können. Weiterhin führte eine Mutagenese des IBS-Elementes zu einem Verlust der Reporter-gen-Reprimierung. Betrachtet man die Ergebnisse zusammen mit den Analysen der *Ft*-Mutante, den Überexpressionsstudien und den *in silico*-Daten, so könnte mit *Olig2* erstmals ein Zielgen der *Irx*-Faktoren identifiziert worden sein.

Neben diesem Befund gibt diese Arbeit weiterhin den Hinweis, dass es sich auch bei *Olig3* um ein Zielgen der *Irx*-Proteine handeln könnte und deckt weitere Gene auf, die durch die Überexpression der *Irx*-Gene beeinflusst werden und als mögliche zusätzliche Kandidatengene untersucht werden könnten.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphate
BCIP	X-phosphat/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-
phosphat	
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphatgemisch
ds	doppelsträngig
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum
<i>Ft</i>	<i>Fused toes</i>
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HH	Hamburger Hamilton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
<i>Irx</i>	<i>Iroquois</i>
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter

LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)
M	Molar (mol/L)
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
Mol	Mol (6,023 x 10 ²³ Teilchen)
MZ	Mantelzone
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
N-terminal	amino-terminal
OD	Optische Dichte
pmol	pico (10 ⁻¹²)-Mol
p	posterior
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Transformationspuffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter Anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	ventral
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7. Literatur

- Aldaz**, S., Morata, G. and Azpiazu, N. (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. *Development* 130,4473 -4482
- Arber**, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T.M., and Sockanathan, S. (1999) Requirement for the Homeobox Gene *Hb9* in the Consolidation of Motor Neuron Identity. *Neuron*, Vol. 23, 659–674
- Bao**, Z. Z., B. G. Bruneau, J. G. Seidman, C. E. Seidman, and C. L. Cepko. (1999) Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 283:1161–1164.
- Bastian** H, Gruss P (1990) A murine *even-skipped* homologue, *Evx 1*, is expressed during early embryogenesis and neurogenesis in a biphasic manner. *EMBO J* 9:1839 –1852.
- Bellefroid** EJ, Kobbe A, Gruss P, Pieler T, Gurdon JB, Papalopulu N (1998) *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* genes and functions in neural specification. *EMBO J* 17:191-203.
- Bendall**, A. J., and P. L. Molloy. (1994). Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res.* 22:2801–2810.
- Berg**,O.G., Winter,R.B. and Von Hippel,P.H. (1981) Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids .1. *Models and Theory Biochem.*, 20, 6929–6948.
- Bermingham**, N.A., Hassan, B.A., Wang, V.Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen, H.J., Fritsch, B., and Zoghbi, H.Y. (2001) Proprioceptor pathway development is dependent on *Math1*. *Neuron* 30: 411–422.
- Bilioni**,A., Craig, G., Hill, C. and McNeill, H. (2005) Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *PNAS* 102 no. 41:14671–14676
- Birnboil**, H. C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-255
- Birnboil**, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plamid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7:1513-1522
- Blackwell**, T. K., J. Huang, A. Ma, L. Kretzner, F. Alt, R. Eisenman, and H. Weintraub. (1993). Binding of Myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13:5216–5224.
- Blackwood**, E.M. & Eisenman, R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.. *Science* 251,1211-1217

-
- Bosse A, Stoykova A, Nieselt-Struwe K, Chowdhury K, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P.** (2000) Identification of a novel mouse *iroquois* homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localization of all members of the mouse *iroquois* gene family. *Dev Dyn*, 218:160-174.
- Bosse, A., Zulch, A., Becker, M.B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J.L., Modollel, J. und Gruss, P.** (1997) : Identification of the vertebrate *Iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.*, **69**, 169-181.
- Boyd, K. E., and P. J. Farnham** (1997). Myc versus USF: discrimination at the *cad* gene is determined by core promoter elements. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2529–2537.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M. und Ericson, J.** (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 101, 435-445
- Briscoe, J., Sussel, L, Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T.M., Rubenstein, J. L.,R., Ericson, J.,** (1999) Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature*. 398, 15 April
- Bruneau, B. G., Z. Z. Bao, D. Fatkin, J. Xavier-Neto, D. Georgakopoulos, . T. Maguire, C. I. Berul, D. A. Kass, M. L. Kuroski-de Bold, A. J. de Bold, D. A. Conner, N. Rosenthal, C. L. Cepko, C. E. Seidman, and Seidman J. G.** (2001) Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 21:1730–1736.
- Bürglin, T:R:** (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (*MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF*) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4173-4180.
- Burrill, J. D., Moran, L., Goulding, M. D., Saueressig, H.** (1997) PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. *Development* 124, 4493-4503
- Calle-Mustienes, E. Feijóo, C. G., Manzanares, M., Tena, J. J., Rodríguez-Seguel, E., Letizia, A., Allendem M. L. and Gómez-Skarmeta, J. L.** (2005) A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate cluster gene *Iroquois* deserts. *Genome Res.* 15: 1061-1072;
- 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 Gen.*, 5, 70-76
- Cavodeassi, F., Modollel, J. and Gómez-Skarmeta, J.L.** (2001) The *Iroquois* family of genes: from body building to neural patterning. *Development* 128, 2847-2855
- Cavodeassi, F., Modollel, J. Und Campuzano, S.** (2001) The *Iroquois* homeobox genes function as dorsal selectors in the *Drosophila* head. *Development*, 127, 1921-1929.
-

-
- Cavodeassi, F.**, Diez del Corral, R., Campuzano, S. und Dominguez, M. (1999) Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development*, **126**, 4933-4942
- Cayuso, J.** and Martí. E. (2005). Morphogens in motion: Growth control of the neural tube *J. Neurobiology*, **64**, 376 – 387.
- Christoffels,, V. M.**, Keijser, A.G.M., Houweling, A. C., Clout, D. E. W. and Moorman A. F. M. (2000) Patterning the Embryonic Heart: Identification of Five Mouse *Iroquois* Homeobox Genes in the Developing Heart. *Dev. Biol.* **224**, 263–274
- Cheng, C. W.**, Chow, R. L., Lebel. M., Sakuma, R., Oi-Lam Cheung, H., Thanabalasingham, V., Zhang, X., Bruneau, B. G., Birch, D. G., Hui, CC., McInnes, RR., Cheng, S. H. (2005) The Iroquois homeobox gene, *Irx5*, is required for retinal cone bipolar cell development. *Dev. Biol.* **287**, 48-60
- Cohen, D.R.**, Cheng, C.W., Cheng, S.H. und Hui, C.C. (2000) Expression of two novel mouse *iroquois* homeobox genes during neurogenesis. *Mech. Dev.*, **91**, 317-321.
- Costantini, D.L.**, Arruda, E.P., Agarwal, P., Kim, K-H., Zhu, Y., Zhu, Y., Lebel, M., Cheng, C.W., Park, C.P. Pierce, S.A., Guerchicoff, A., Pollevick, G.D., Chan, T.Y., Kabir, M.G., Cheng, S.H., Husain, M., Antzelevitch, C., Srivastava, D., Gross, G.J., Hui, CC., Backx, P.H., and Bruneau, B.H. (2005) The Homeodomain Transcription Factor *Irx5* Establishes the Mouse Cardiac Ventricular Repolarization Gradient. *Cell*, **123**, 347–358, 21,
- Cunningham, J. J.**, Levine, E. M., Zindy, F., Goloubeva, O., Roussel, M. F., and Smeyne, R. (2002) The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p19Ink4d and p27Kip1 Are Coexpressed in Select Retinal Cells and Act Cooperatively to Control Cell Cycle Exit. *Mol. Cell. Neuroscience* **19**, 359–374
- Dambly-Chaudière, C.** and Leyns, L. (1992) The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 85-91
- Ding, L.**, Takebayashi, H., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Tanaka, K. F., Nabeshima, Y., Chisaka, O., Ikenaka, K., Ono, K. (2005) Short-term lineage analysis of dorsally derived *Olig3* cells in the developing spinal cord. *Dev. Dyn.* **234**(3):622-32
- Ding, Q.**, Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Rossant, J. und Hui, C.C., (1998) Diminished Sonic Hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development*, **125**, 2533-2543
- Eberhardy, S.R.** and Farnham, P.J. (2000) Direct examination of histone acetylation of c-Myc target genes using chromatin immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* **275**: 33798-33805
- Ericson, J.**, Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawa-kami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (1997) *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* **90**, 169–180.
-

-
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T. (1992).** Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256, 1555-1560.
- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang S-L, Anderson DJ & Guillemot F (2000).** A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14, 67–80.
- Garcia-Bellido, A. (1979)** Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 91, 491-520.
- Garriock, R.J., Vokes, S.A., Small, E.M., Larson, R. and Krieg, P.A. (2001)** Developmental expression of the *Xenopus* Iroquois-family homeobox genes, *Irx4* and *Irx5*. *Dev Genes Evol* 211:257–260
- Gerland, U., Moroz, J.D. and Hwa, T. (2002)** Physical constraints and functional characteristics of transcription factor-DNA interaction. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 99, 12015–12020.
- Glasgow SM, Henke RM, Macdonald RJ, Wright CV & Johnson JE (2005).** *Ptf1a* determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development* 132, 5461–5469.
- Gómez-Skarmeta, J.L., Calle-Mustienes, E., Modolell, J (2001)** The Wnt-activated *Xiro1* gene encodes a repressor that is essential for neural development and downregulates *Bmp4*. *Development* 128, 551-560
- Gomez-Skarmeta, J.L., Glavic, A., Calle-Mustienes, E., Modolell, J. and Mayor, R. (1998)** *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO Journal*, 17(1), 181–190
- Gómez-Skarmeta J.L., Diez del Corral R, de la Calle-Mustienes E, Ferrés-Marcó D, Modolell J. (1996)** *Araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* 85:95-105.
- Götz, K (2003)** Molekulare Analyse der Neuralrohrentwicklung in der Maus-Mutante *Fused Toes* (FT), Diplomarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Götz, K, Briscoe, J. and Rüther, U. (2005)** Homozygous *Ft* Embryos Are Affected in Floor Plate Maintenance and Ventral Neural Tube Patterning. *Dev. Dyn.* 233:623–630
- Gowan, K., Helms, A.W., Hunsaker, T.L., Collisson, T., Ebert, P.J., Odom, R. and Johnson, J.E. (2001)** Crossinhibitory activities of *Ngn1* and *Math1* allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31: 219–232.
- Grandori, C., J. Mac, F. Siebelt, D. E. Ayer, and R. Eisenman. (1996).** Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites *in vivo*. *EMBO J.* 15:4344–4357.
-

-
- Gross** MK, Dottori M, Goulding M (2002) Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron*, 34:535-549.
- Halford**, S.E. and Marko, J.F. (2004) How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.*, 32, 3040–3052.
- Hamburger**, V. and Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.
- Helms** AW, Battiste J, Henke RM, Nakada Y, Simplicio N, Guillemot F & Johnson JE (2005). Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development* 132, 2709–2719.
- Helms**, A.W. and Johnson, J.E. (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Cur. Op. Neurobiology*, 13:42–49
- Heymer**, J. und Rütger, U. (1999) : Syndactyly of *Ft/+* mice correlates with an imbalance in *Bmp4* and *Fgf8* expression. *Mech. Dev.*, **88**, 173-181
- Houweling** AC, Dildrop R, Peters T, Mummenhoff J, Moorman AFM, Rütger U, Christoffels VM. (2001) Gene and cluster-specific expression of the *Iroquois* family members during mouse development. *Mech Dev* 2001, 107:169-174
- Inoue**, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28
- Jessell**, T.M., Dodd, J., 1990. Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates. *Harvey Lect.* 86, 87– 128.
- Johnson**, J. E., Birren, S. J. and Anderson, D. J. (1990). Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861.
- Jostes**, B., Walther, C. and Gruss, P. (1991) The murine paired box gene, *Pax7*, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* **33** . 27–38.
- Kehl**, B. T., Cho, K. O. and Choi, K. W. (1998). *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the *iroquois* complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* 125, 1217-1227.
- Kim**, J.G., Takeda, Y., Matthews, B.W. and Anderson, W.F. (1987) Kinetic-studies on cro repressor operator DNA interaction. *J. Mol. Biol.*, 196, 149–158.
- Kobayashi** D, Kobayashi M, Matsumoto K, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K, (2002) Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129:83-93.
- Lebel**, M., Agarwal, P., Cheng, C. W., Kabir, M. G., Chan, T. Y., Thanabalasingham, V., Zhang, X., Cohen, D. R., Husain, M., Cheng, S. H., Bruneau, B. G., and Hui1, CC. (2003) The *Iroquois* Homeobox Gene *Irx2* Is Not Essential for Normal Development of the Heart and Midbrain-Hindbrain Boundary in Mice. *Mol. Cell. Biol.* p. 8216–8225
-

-
- Lee, S.-K. and Pfaff, S. M. (2001)** Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* Vol. 4
- Lee KJ, Dietrich P, Jessell TM (2000)** Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403:734-740.
- Lee, K. J. and Jessell, T. M. (1999)** The Specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:261–94
- Lei, Q., Jeong, Y., Misra, K., Li, S., Zelman, A. K., Epstein, D. J. and Matise, M. P. (2006)** Wnt Signaling Inhibitors Regulate the Transcriptional Response to Morphogenetic Shh-Gli Signaling in the Neural Tube. *Dev. Cell* 11, 325–337
- Lesche, R. (1997).** Molekulare und funktionelle Analyse des *Ftl*-Gens in der Maus. Dissertation, angefertigt am Fachbereich Biologie, Universität Hannover.
- Leyns, L., Gómez-Skarmeta, J. L. and Dambly-Chaudière, C. (1996).** iroquois: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 59, 63-72.
- Li, S., Misra, K., Matise, M.P. and Xiang, M. (2005)** Foxn4 acts synergistically with Mash1 to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. *PNAS*, Vol.102, no. 30
- Liem Jr., K.F., Tremml, G., Jessell, T.M., (1997).** A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127–138.
- Liem Jr., K.F., Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M., (1995).** Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969–979.
- Liu, I.S., Chen, J.D., Ploder, L., Vidgen, D., van der Kooy, D., Kalnins, V.I., and McInnes, R.R. (1994).** Developmental expression of a novel murine homeobox gene (*Chx10*): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* 13, 377–393.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH (2002)** Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109:75– 86.
- Lu QR, Cai L, Rowitch D, Cepko CL, Stiles CD (2001)** Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocyte formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex. *Nat Neurosci* 4:973–974.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000)** Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes Encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25:317–329.
- Ma, Q. (2006)** Transcriptional regulation of neuronal phenotype in mammals *J. Physiol.* 575;379-387
-

-
- Mansouri A, Gruss P (1998)** Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech Dev* 1998, 78:171-178.
- Matise MP, Joyner AL (1997)** Expression patterns of developmental control genes in normal and *Engrailed-1* mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons. *J Neurosci* 17:7805–7816.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraishi, T., Ootoguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, A. and Ogura, T. (2004)** The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nature Neurosci.* 7 (6), 605-612
- McNeill, H., Yang, C.H., Brodsky, M., Ungos, J. und Simon, M. A. (1997)** Mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorso-ventral border of the *Drosophila* eye. *Genes Dev.*, 11, 1073-1082
- Meimers, Anja (2005)** Analyse der *IrxB* Cluster-Regulation. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Miltenberger, R. J., K. Sukow, and P. J. Farnham. (1995).** An E-box-mediated increase in *cad* transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol. Cell. Biol.* 15:2527–2535.
- Mizuguchi R, Kriks S, Cordes R, Gossler A, Ma Q & Goulding M (2006).** *Asc11* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci* 9, 770–778.
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nabeshima Y-i, Shimamura K, Nakafuku M: (2001)** Combinatorial roles of *Olig2* and *Neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31:757-771
- Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M. K., Burrill, J. and Goulding, M. (2001)** *Evx1* Is a Postmitotic Determinant of V0 Interneuron Identity in the Spinal Cord *Neuron*, Vol. 29, 385–399,
- Müller, T., Anlag, K., Wildner, H., Britsch, S.; Treier, M., and Birchmeier, C. (2005)** The bHLH factor *Olig3* coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord. *Genes Dev* 19:733–743
- Müller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell, TM, Birchmeier C. (2002)** The homeodomain factor *Lbx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34:551-562.
- Mummenhoff, J., Houweling, A. C., Peters, T., Christoffels, V. M. and Rüter, U. (2001)** Expression of *Irx6* during mouse morphogenesis. *Mech. Dev.* 103: 1-2; 193-195
- Nakada, Y., Hunsaker, T.L., Henke, R.M., and Johnson, J.E. (2004).** Distinct domains within *Mash1* and *Math1* are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* 131: 1319–1330.
-

-
- Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J. (1991)** Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 15;108(2):193-9.
- Novitsch, B.G., Chen, A. und Jessell, T.M. (2001)** Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neural properties of the bHLH-repressor Olig2. *Neuron*, 31, 773-789
- Nüsslein-Vollhardt, C. und und Wieschaus, E. (1980)** : Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801
- Ogura, K., Matsumoto, K., Kuroiwa, A., Isobe, T., Otaguro, T., Jurecic, V., Baldini, A., Matsuda, Y. and Ogura, T (2001)** Cloning and chromosome mapping of human and chicken Iroquois (IRX) genes. *Cytogenet Cell Genet* 92:320–325
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S. and Stoekl., E. T. (2002)** Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat. Bio.tech.* 16 Dez
- Perovic, S., Schroder, H., Sudek, S., Grebenjuk, V., Stifanic, M., Muller, M.&Muller, W. (2003)** Expression of one sponge *Iroquois* homeobox gene in primmorphs from *Suberites domuncula* during canal formation. *Evol. Dev.* 5, 240–250.
- Peters, T. (2002)** Die *Fused toes* Mausmutation –Identifizierung und Charakterisierung der Kandidatengene, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Peters T, Dildrop R, Ausmeier K, Rütter U: (2000)** Organization of mouse *iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res* 2000, 10:1453-1462.
- Peters, T., Ausmeier, K. und Rütter, U. (1999)** Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mutation. *Mammalian Genome*, **10**, 983-986
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM (1996)** Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 26;84(2):309-20
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding, M. and Jessell T. M. (2001)** Control of Interneuron Fate in the Developing Spinal Cord by the Progenitor Homeodomain Protein *Dbx1*. *Neuron*, Vol. 29, 367–384,
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T.M. (1999)** A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903–915.
- Placzek, M., 1995.** The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 499–506.
- Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S., and Rubenstein, J.L.(1998).** Control of anteroposterior and dorsoventral domains of *Nkx-6.1* gene expression relative to other *Nkx* genes during vertebrate CNS development. *Mech. Dev.* 72, 77–88.
-

-
- Richter, P.H.** and **Eigen, M.** (1974) Diffusion controlled reaction-rates in spheroidal geometry—application to repressor-operator association and membrane-bound enzymes. *Biophys. Chem.*, 2, 255–263.
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. R. und Modollel, J.** (1990) Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev.*, 3, 997-1007.
- Sander M, Paydar S, Ericson J, Briscoe J, Berber E, German M, Jessell TM, Rubenstein JL.** (2000). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev.* Sep 1;14(17):2134-9
- Sapir, T., Geiman, E. J., Wang, Z., Velasquez, T., Mitsu, S., Yoshihiro, Y., Frank, E., Alvarez, F., J. and Goulding, M.** (2004) *Pax6* and *Engrailed 1* Regulate Two Distinct Aspects of Renshaw Cell Development. *J. Neurosci.* 24(5): 1255-1264
- Saueressig H, Burrill J, Goulding M** (1999) *Engrailed-1* and *Netrin-1* regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. *Development* 126:4201–4212.
- Sharma, K., Sheng, H.Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S., Westphal, H., and Pfaff, S.L.** (1998). LIM homeodomain factors *Lhx3* and *Lhx4* assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817–828.
- Slutsky, M. and Mirny, L.A.** (2004) Kinetics of Protein–DNA interaction: facilitated target location in sequence-dependent potential. *Biophys. J.*, 87, 4021–4035.
- Smith, E., Hargrave, M., Yamada, T., Begley, G. C., and Little, M. H.** (2002) Coexpression of *SCL* and *GATA3* in the V2 Interneurons of the Developing Mouse Spinal Cord. *Dev. Dyn.* 224:231–237
- Stern, C. D.** (2004) The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. *Developmental Cell*, Vol. 8, 9–17,
- Sun, T., Hafler, B.P., Kaing, S., Kitada, M., Ligon, K.L., Widlund, H.R., Yuk, D., Stiles, D., Rowitch, D.H.** (2006) Evidence for motoneuron lineage-specific regulation of *Olig2* in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.*
- Takahashi, M and Osumi, N.** (2002) *Pax6* regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129, 1327-1338
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K** (2002) The basic helix-loop-helix factor *olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12:1157–1163.
- Takebayashi H, Ohtsuki T, Uchida T, Kawamoto S, Okubo K, Ikenaka K, Takeichi M, Chisaka O, Nabeshima Y.** (2002) Non-overlapping expression of *Olig3* and *Olig2* in the embryonic neural tube. *Mech. Dev.* 113(2):169-74
-

-
- Takebayashi H**, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. (2000) Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech. Dev.* 99(1-2):143-8
- Tanabe, Y.**, William, C., and Jessell, T.M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95, 67–80.
- Tian, H.**, Tenzen, T. and McMahon, A. P. (2004) Dose dependency of *Disp1* and genetic interaction between *Disp1* and other hedgehog signaling components in the mouse. *Development* 131, 4021-4033
- Tickle, C.** (2004) The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech. Dev.* 21(9):1019-29.
- Vallstedt A**, Muhr J, Pattyn A, Pierani A, Mendelson M, Sander M, Jessell TM, Ericson J (2001) Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to *Nkx6* genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* 31:743–755.
- Van der Hoeven, F.**, Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M. G., Kyewski, B. und Rüther, U. (1994) Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes (Ft)*. *Development*, **120**, 2601-2607.
- van Tuyl, M.**, Liu, J., Groenman, F., Ridsdale, R., Han, R.N.N., Venkatesh, V., Tibboel, D. and Post, M. (2006) Iroquois genes influence proximo-distal morphogenesis during rat lung development. *AJP - Lung* 290:777-789
- Volkmann, A.**, Döffinger, R., Rüther, U. und Kyewski, B. A. (1996) Insertional mutagenesis affecting programmed cell death leads to thymic hyperplasia and altered thymopoiesis. *J. Immunol.*, **156**, 136-145.
- Von Hippel, P.H.** and Berg, O.G. (1989) Facilitated target location in biological-systems. *J. Biol. Chem.*, 264, 675–678.
- Wells, J.** and Farnham, P.J. (2002) Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods*, 26(1), 48-56
- Wildner H**, Müller T, Cho SH, Brohl D, Cepko CL, Guillemot F & Birchmeier C (2006). dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require *Mash1* for their development. *Development* 133, 2105–2113.
- Wilkinson D.G.** (1994) In Situ Hybridization: A Practical Approach, *IRL Press*, Oxford.
- Wolpert, L.** (Hrsg.), Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T. M., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (1999) : Entwicklungsbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*
- Zhang, C.**, Xuan, Z., Otto, S., Hover, J. R., McCorkle, S. R., Mandel, G., and Zhang, M.Q. (2006) A clustering property of highly-degenerate transcription factor binding sites in the mammalian genome. *Nucleic Acids Research*, 34, 2238–2246
-

Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109:61–73.

Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25:331–343.

8. Anhang

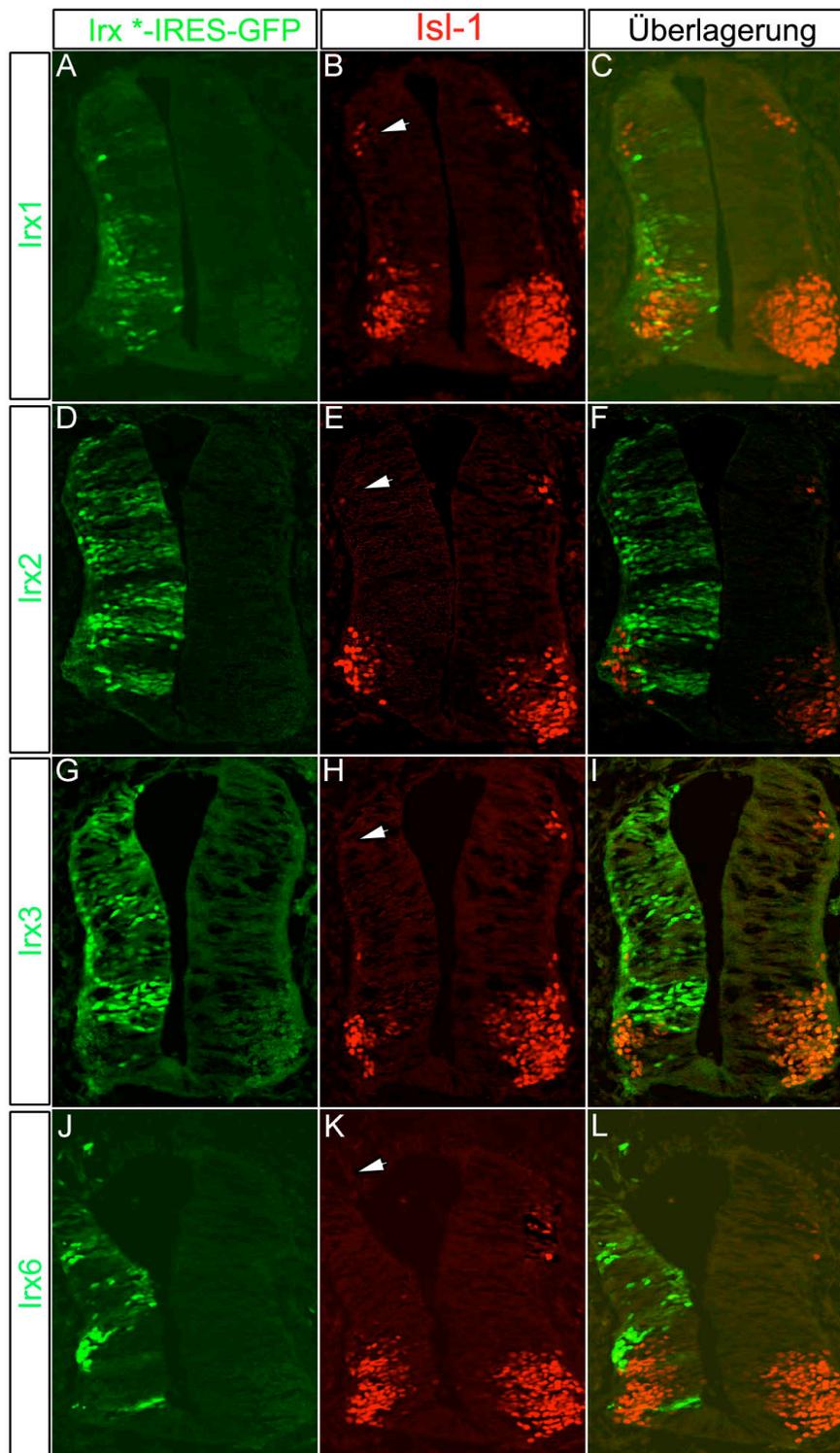


Abb. A.1: Die Motorneuronen und die dI3- Neuronenpopulation in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene werden reduziert. Dargestellt ist eine Antikörperfärbung gegen *Isl-1* (rot) nach der Elektroporation der einzelnen *Irx*-Gene (grün), *Irx1* (A-C), *Irx2* (D-F), *Irx3* (G-H) und *Irx6* (J-L). Vergleicht man die *Isl-1*-Expression in der elektroporierten Seite des Neuralrohrs (jeweils links) mit der rechten Kontrollhälfte, so fällt auf, dass die ektopische *Irx*-Expression eine drastische Reduzierung der Motorneuronendomäne verursacht, welche durch die ventrale Expressionsdomäne von *Isl-1* markiert wird. Zusätzlich ist jedoch auch eine starke Verkleinerung bzw. der völlige Verlust der dI3-Neuronenpopulation zu erkennen (Pfeile in B,E,H und K).

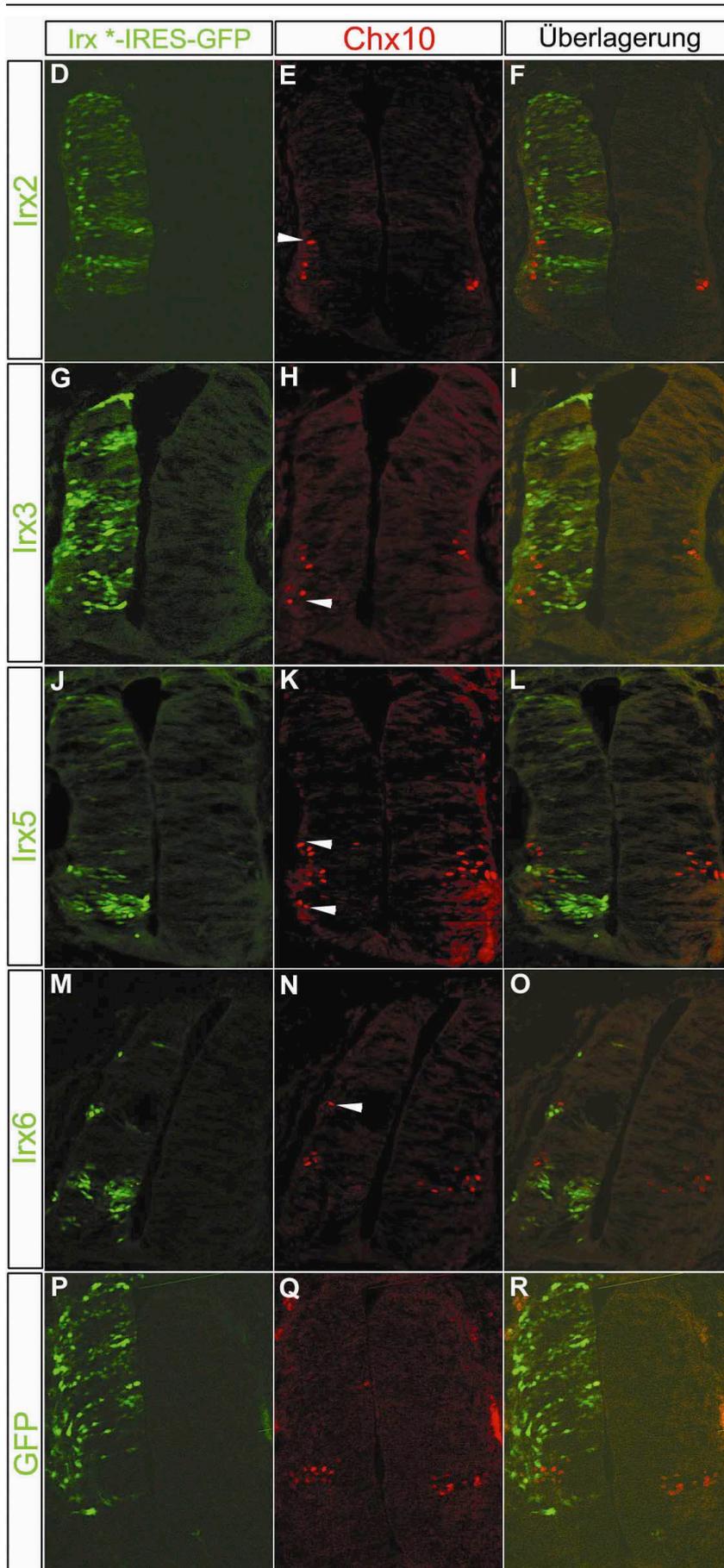


Abb.A.2: Die V2-Neuronenpopulation dehnt sich in Folge der ektopischen *Irx*-Expression aus. Die Abbildung zeigt Antikörperfärbungen gegen Chx10 auf Neuralrohrschnitten nach der Elektroporation der einzelnen *Irx*-Gene (grün) *Irx2* (A-C), *Irx3* (D-F), *Irx5* (G-I), *Irx6* (J-L), sowie eines GFP-Kontrollvektors (grün, M-O). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die von Chx10 markierte V2-Neuronenpopulation in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene ausdehnt. Es können sowohl dorsal als auch ventral von der normalen Chx10-Domäne zusätzliche Chx10-positive Zellen gefunden werden (Pfeile in B,E,H und K). Die Überexpression des GFP-Kontrollvektors hingegen verursacht keine Veränderung der Chx10-Expression (M-O).

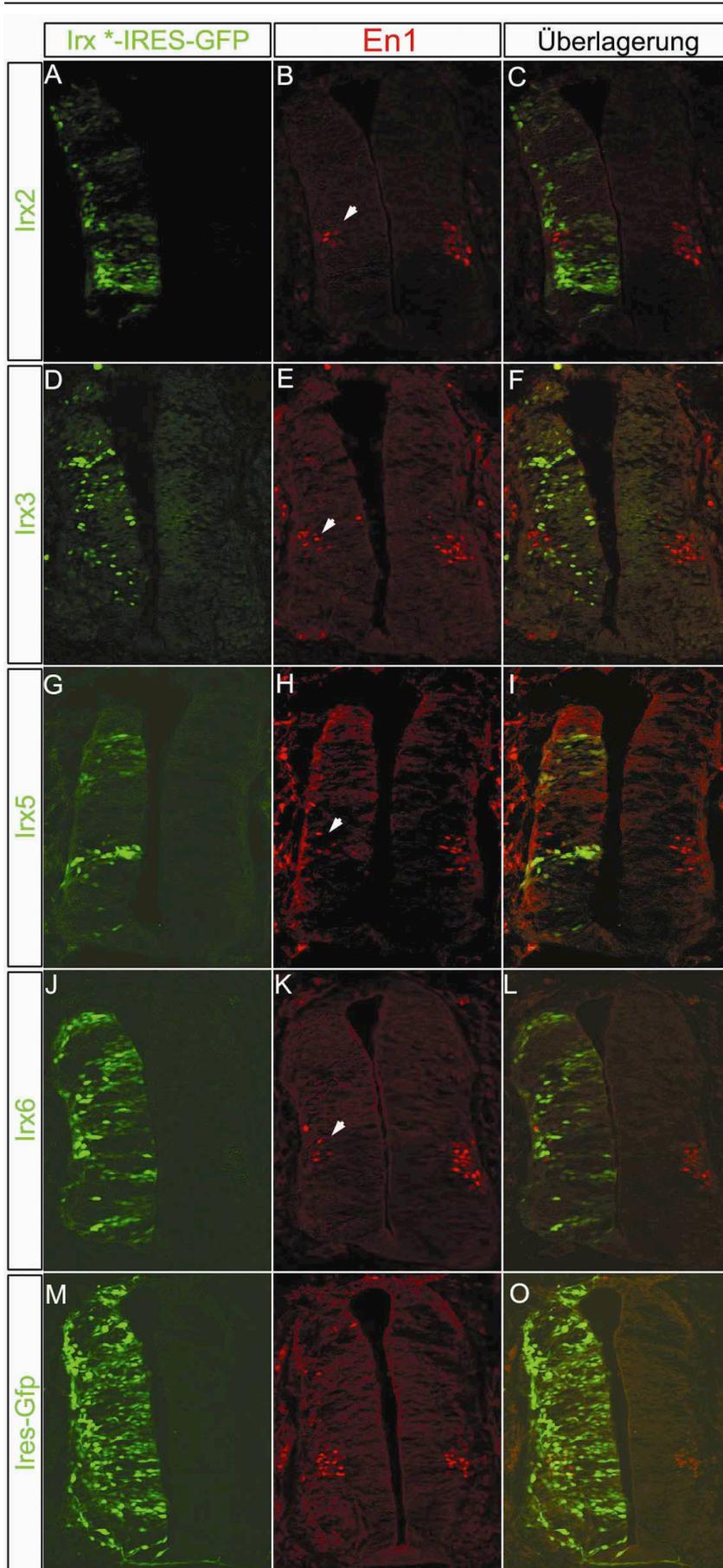


Abb.A.3: Die Überexpression der *Irx*-Gene führt zu einer Verkleinerung der V1-Neuronenpopulation. Dargestellt sind Antikörper-färbungen gegen *En1* (rot) nach der Elektroporation einzelnen *Irx*-Gene (grün) *Irx2* (A-C), *Irx3* (D-F), *Irx5* (G-I), *Irx6* (J-L), sowie eines GFP-Kontrollvektors (grün, M-O) in das Neuralrohr. Beim Vergleich der *En1*-Domäne in der nicht-elektroporierten Kontrollseite des Neuralrohrs mit der elektroporierten Seite ist leicht zu erkennen, dass die ektopische Expression der *Irx*-Gene zu einer deutlichen Reduzierung der *En1*-Expression geführt hat (Pfeile in B, E, H und K). Die Überexpression des GFP-Kontrollplasmids hingegen führt nicht zu einer Veränderung in der *En1*-Expression (M-O).

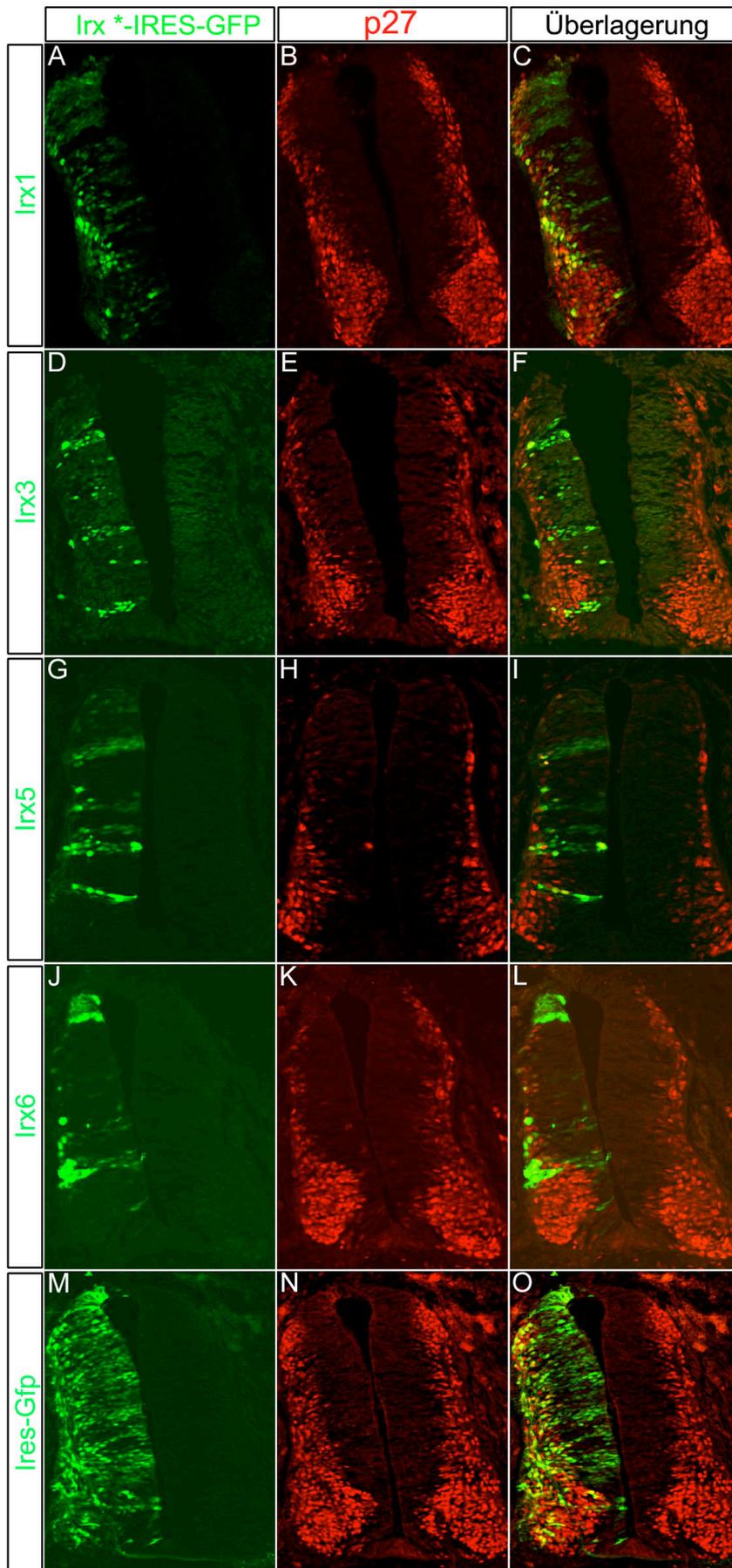


Abb.A.4: Die Expression von p27 ist nicht verändert. Dargestellt ist eine Antikörperfärbung gegen p27 (rot), einem generellem Marker für postmitotische, differenzierte Zellen. Die Elektroporation der einzelnen *Irx*-Gene (grün) *Irx1* (A-C), *Irx3* (D-F), *Irx5* (G-I), *Irx6* (J-L), sowie eines GFP-Kontrollvektors (grün, M-O) führten zu keiner beobachtbaren Veränderung in der Expression von p27. Außerdem finden sich die ektopisch *Irx*-exprimierenden Zellen sowohl in der ventrikulären Zone, nahe dem Lumen, wo sich undifferenzierte Zellen befinden, als auch in der Mantelzone überlappend mit der Expression von p27.

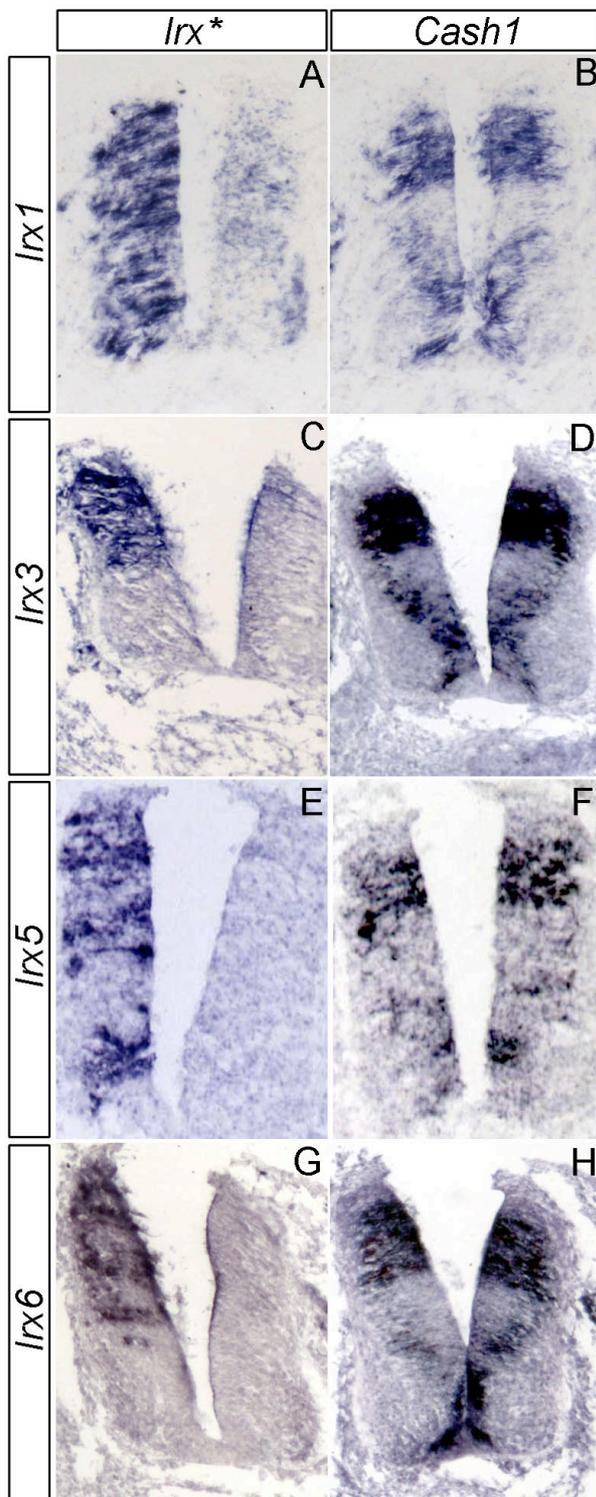


Abb.A5: Die Expression von *Cash1* wird durch die Überexpression der *Irx*-Gene nicht verändert. Dargestellt sind in situ-Hybridierungen gegen *Cash1* (B,D,F und H) sowie die ektopisch exprimierten *Irx*-Gene, *Irx1* (A), *Irx3* (C), *Irx5* (E) und *Irx6* (G) auf jeweils aufeinander folgenden transversalen Paraffinschnitten. Da für die Überexpression der *Irx*-Gene mit Ausnahme von *Irx1* die murinen Sequenzen verwendet wurden, konnte durch die Wahl einer entsprechenden Hybridisierungssonde nur die ektopische *Irx*-Expression sichtbar gemacht werden. Im Falle von *Irx1* wurde die Sequenz aus dem Huhn verwendet, so dass hier auch auf der nicht elektroporierten Seite des Neuralrohrs eine Färbung zu erkennen ist, welche der endogenen *Irx1*-Expression entspricht (A). Vergleicht man nun die Expression von *Cash1* in beiden Hälften des Neuralrohrs, so ist kein Unterschied zu erkennen. Die Überexpression der *Irx*-Gene führt demnach nicht zu einer Veränderung der *Cash1*-Expression.

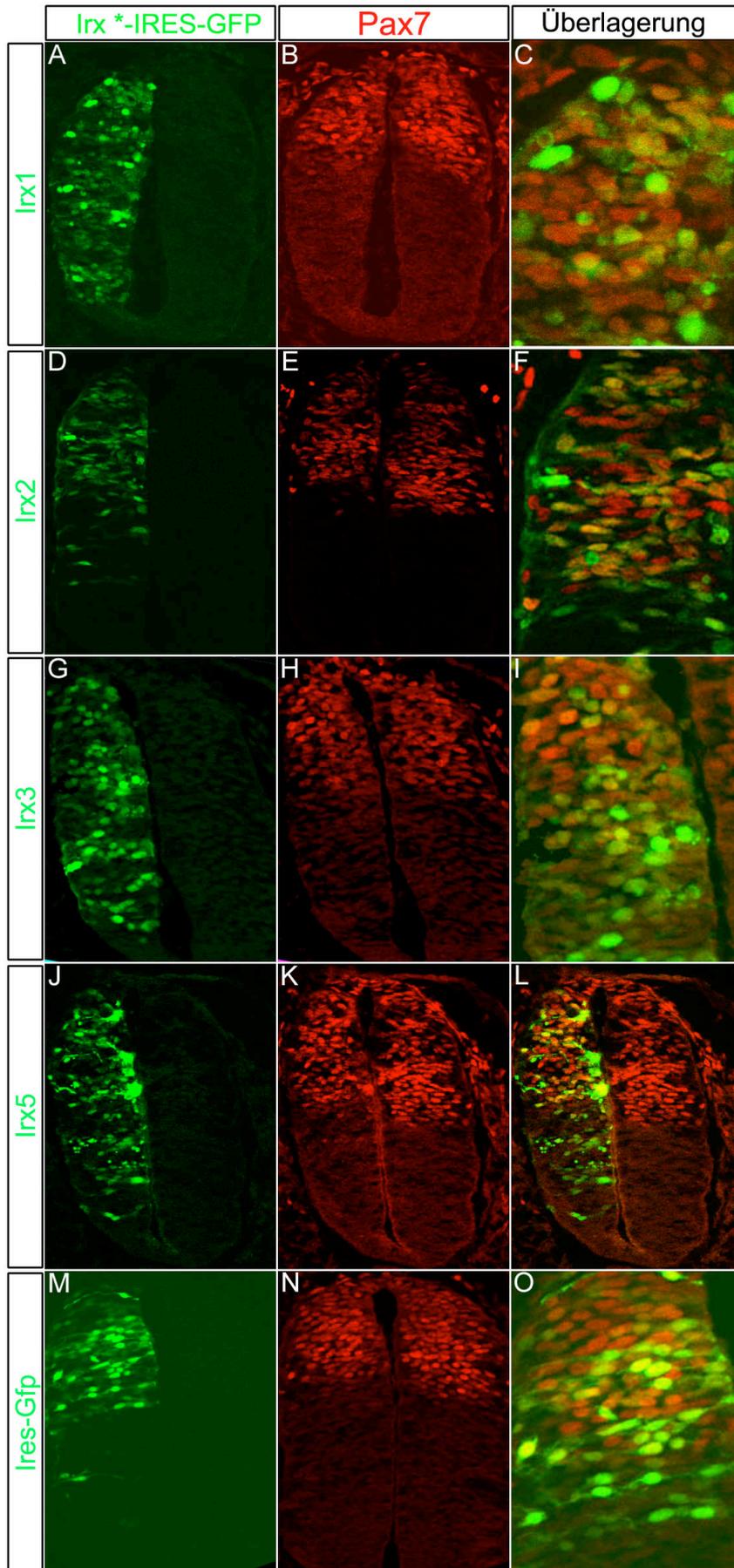


Abb.A.6: Die Expression von Pax7 wird durch die Überexpression der *Irx*-Gene nicht verändert.

Zu sehen sind Antikörperfärbungen gegen Pax7 (rot) nach der Elektroporation der einzelnen *Irx*-Gene (grün) *Irx1* (A-C), *Irx2* (D-F), *Irx3* (G-I), *Irx5* (J-L), sowie eines GFP-Kontrollvektors (grün, M-O). Der Vergleich der Pax7-Expression in der elektroporierten und der nicht-elektroporierten Hälfte des Neuralrohres zeigt keine Unterschiede in der Expressionsdomäne oder -stärke (B, E, H, K). Stattdessen exprimieren die von der Elektroporation getroffenen Zellen überlappend das endogene Pax7 und das jeweilige ektopische *Irx*-Gene (gelbe Zellen in C, F, I und L).

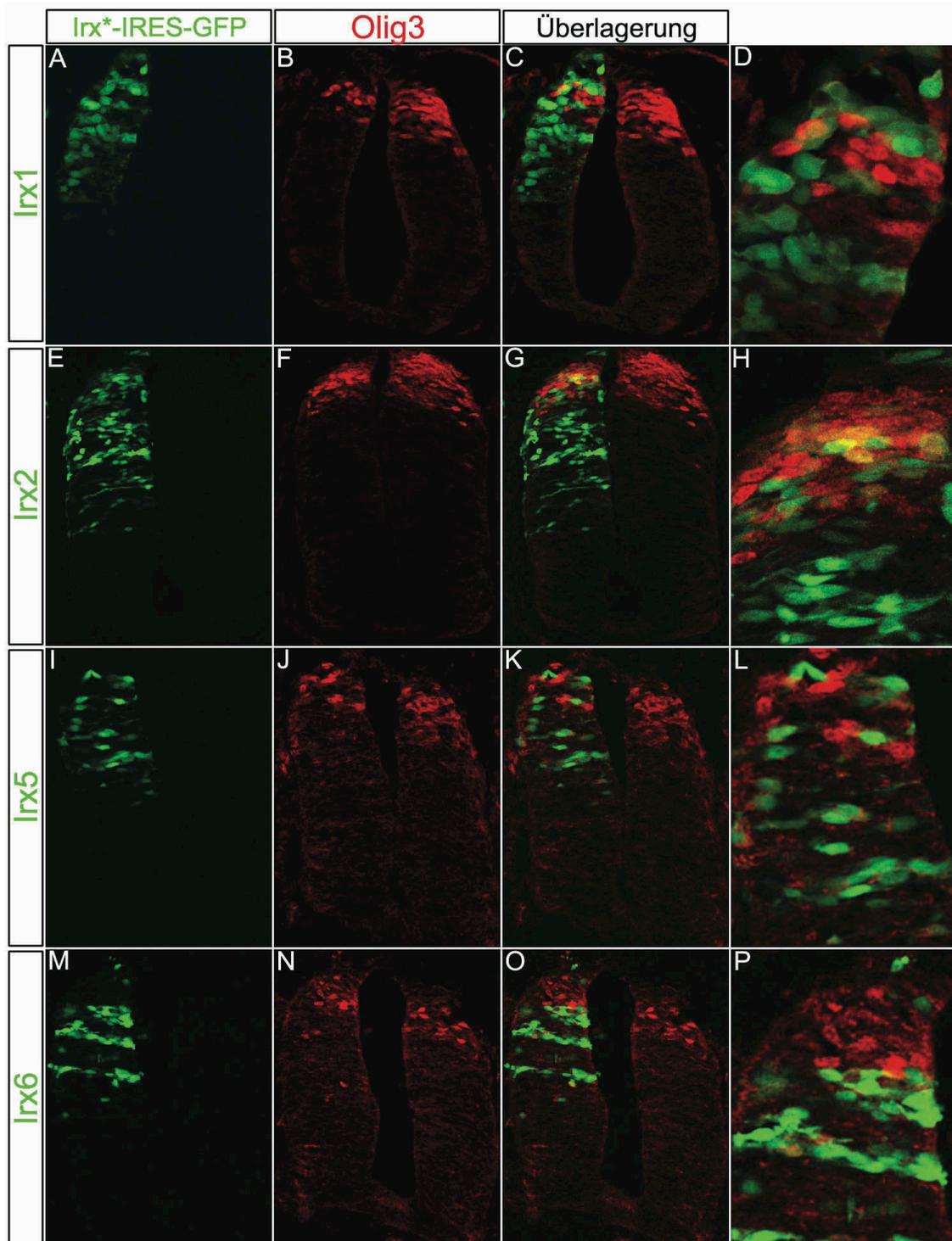


Abb.A.7: Durch die Überexpression der *Irx*-Gene wird die Olig3-Expression inhibiert. Die Abbildung zeigt Antikörperfärbungen gegen Olig3 (rot) auf transversalen Neuralrohrschnitten 24 h nach der Elektroporation der *Irx*-Gene (grün), *Irx1* (A-D), *Irx2* (E-H), *Irx3* (I-L), *Irx5* (M-P) und *Irx6* (Q-T). In den Spalten von links nach rechts ist jeweils die ektopische *Irx*-Expression (grün), die endogene Olig3-Expression (rot), sowie die Überlagerung und eine Ausschnittvergrößerung zu sehen. Vergleicht man die Olig3-Expression in der linken, elektroporierten Hälfte des Neuralrohrs mit der jeweiligen rechten Kontrollseite, so fällt zunächst eine Reduzierung der Olig3-Expression in Folge der Überexpression der *Irx*-Gene auf. In der Überlagerung und der Ausschnittsvergrößerung erkennt man dann, dass die *Irx*-Gene in der dorsalen Hälfte der Olig3-Expression keinen reprimierenden Effekt ausüben. Stattdessen findet man Zellen die sowohl das ektopische *Irx*-Gen, als auch Olig3 exprimieren (gelbe Zellen, blaue Pfeile), während in der ventralen Hälfte der Olig3-Expression keine Koexpression gefunden werden kann. Hier führt die *Irx*-Expression zu einer Reprimierung der Olig3-Expression und in allen *Irx*-exprimierenden Zellen (grün) ist kein Olig3 nachweisbar (weiße Pfeile).

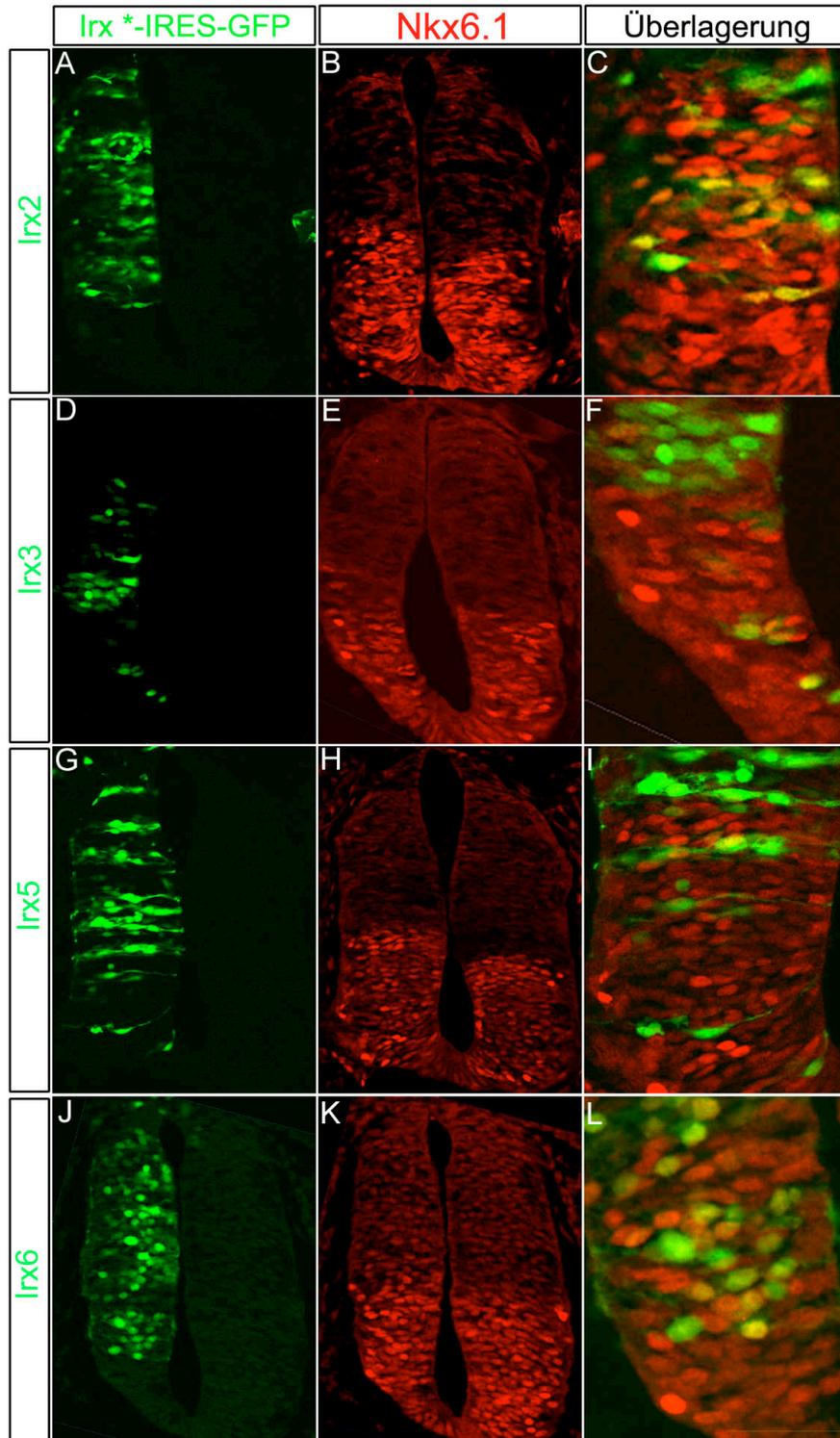


Abb.A.8: Die Expression von Nkx6.1 wird durch die Überexpression der Irx-Genen nicht verändert. Die Abbildung zeigt Antikörperfärbungen gegen Nkx6.1 (rot) auf transversalen Neuralrohrschnitten 24 h nach der Elektroporation der *Irx*-Gene (grün), Irx2 (A-C), Irx3 (D-F), Irx5 (G-I), und Irx6 (J-L). Der Vergleich der Nkx6.1-Expression in den beiden Hälften des Neuralrohres zeigt keinen Unterschied und auch in der Ausschnittsvergrößerung der Überlagerung zeigt sich, dass die ektopisch exprimierten *Irx*-Gene überlappend mit der endogenen Nkx6.1-Expression gefunden werden können (gelbe Zellen in C, F, I und L). Somit zeigt sich, dass die endogene Nkx6.1-Expression durch eine Überexpression der *Irx*-Gene nicht beeinflusst wird.

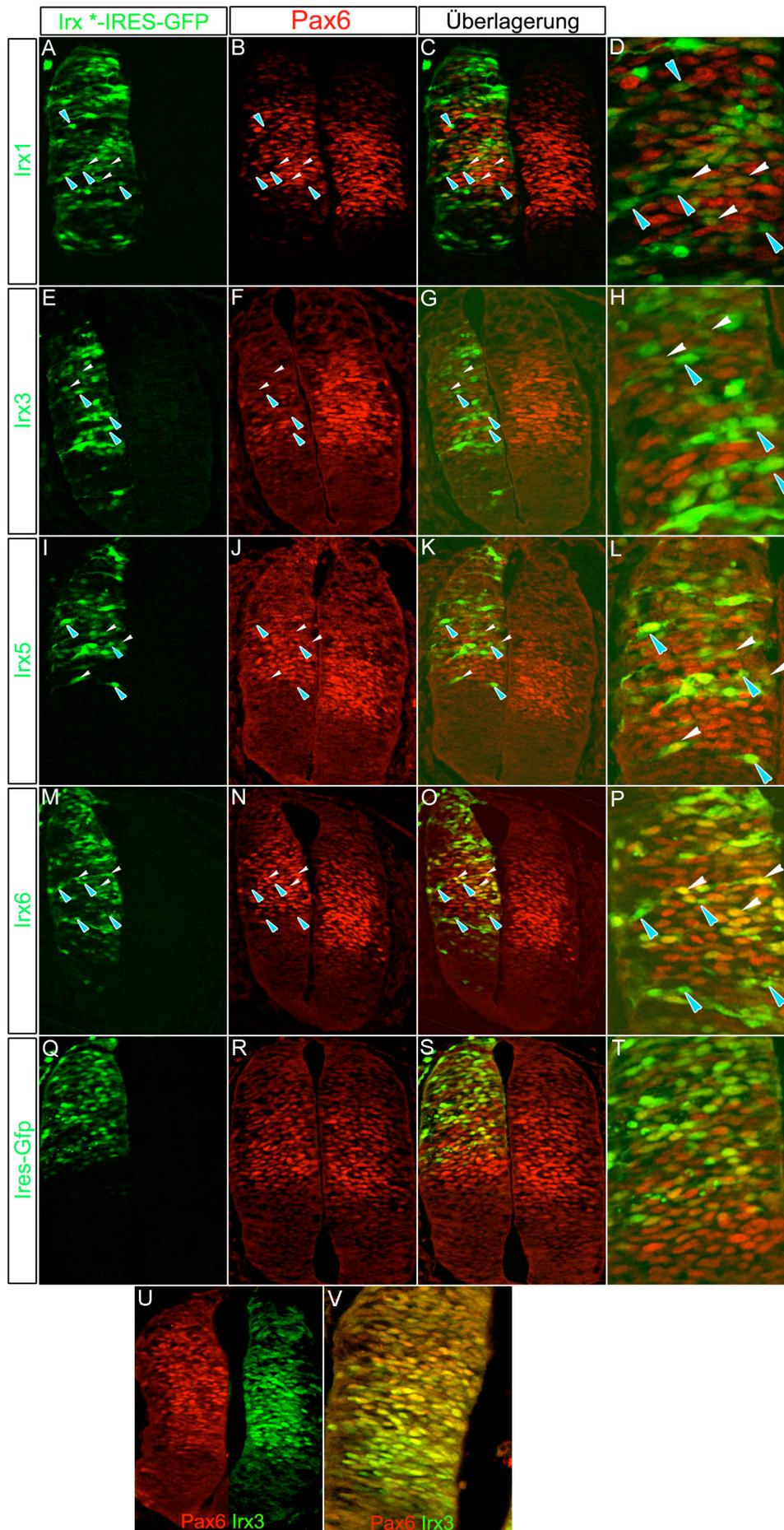


Abb.A.9: Die Expression von Pax6 wird durch die ektopische exprimierten *Irx*-Gene reduziert. Dargestellt ist eine Antikörperfärbung gegen Pax6 (rot, B) auf transversalen Neuralrohrschnitten 24 h nach der Elektroporation der *Irx*-Gene (grün), Irx1 (A-D), Irx3 (E-H), Irx5 (I-L), Irx6 (M-P) und GFP (Q-S). Es fällt zunächst auf, dass die Pax6-Expression auf der elektroporierten Seite (links) des Neuralrohres reduziert wirkt (B, F, J, N.). In der Überlagerung (C, G, K, O) und der Ausschnittsvergrößerung (D, H, L, P) wird sichtbar, dass Zellen, die relativ stark ektopisch *Irx* exprimieren, fast keine Pax6-Expression mehr zeigen (blaue Pfeile), wohingegen Zellen, die vergleichsweise weniger des elektroporierten *Irx*-Genes exprimieren, gelb erscheinen, also weiterhin Pax6 exprimieren (weiße Pfeile). Die Elektroporation eines GFP-Kontrollvektors beeinflusst die Pax6-Expression hingegen nicht (Q-S). In U und V ist zu sehen, dass die endogenen Expressionsdomänen von Pax6 (rot) und Irx3 (grün) vollständig überlappen (gelbe Zellen).

	<u>CNE size (bp) / % identity</u>		<u>Conservation in species</u>	
	Hum – chk //	hum – xen	CNE	IBS-site
			<u>Hd m r c x f</u>	<u>h d m r c x f</u>
CNE-191	107 (73)		hd-rc	- - - -
	150 (71)		hd-rc	- - - -
CNE-181	155 (73)		hdmrc	- - - -
CNE-176	352 (71)		hdmrcx	- - - - -
	235 (80)		hdmrcx	- - - - -
CNE-158	238 (90)		hdmrc	- - - -
	166 (75)		hd-rcx	- - - - -
CNE-107	153 (81)		hdmrc	- - - -
	484 (82)		hdmrcxf	- - - - - -
	97 (76)		hdmrc	- - - -
	217 (68)		hdmrc	- - - -
CNE-73	169 (79)		hdmrcx	- - ++ - -
CNE-72	129 (85)		hdmrc	- - - -
CNE-71	505 (82)		hdmrcxf	- - - - - -
CNE-68	132 (75)		hdmrcx	- + - - + -
CNE-60	151 (78)		hdmrc	- - - -
	151 (80)		hdmrc	- - - -
CNE-49	394 (80)		hdmrc	- - - -
CNE-48	464 (81)		hdmrcxf	- - - - - -
	141 (75)		hdmrcx	- - - - - -
CNE-34			hdmrcxf	+ + ++ + + -
CNE-18	272 (83)		hdmrcxf	- - - - - -
>OLIG2				
CNE+26	252 (73)		hdmrcx	+ + ++ + +
				- - ++ - -
CNE+39	78 (78)		hdmr-x	- - - -
	122 (72)		hdmr-x	- - - -
>OLIG1 (+40 kb)				
CNE+70	575 (82)		hdmrcx	- - - - -
CNE+76	107 (73)		hd--c	+ + -
CNE+84	107 (69)		hdmrcxf	- - - - -
CNE+90	445 (72)		hdmrcxf	- - - - -
CNE+92	615 (72)		hdmrcxf	- - - - -
CNE+111	106 (80)		hdmrcx	- - - - -
CNE+124	256 (72)		hdmrcx	- - - - -
CNE+127	183 (73)		hdmrc	- - - -
CNE+162	175 (82)		hdmrc	- + +- -

Abb.A.10: Übersicht über die CNEs des *Olig2*-Lokus. Schematische Übersicht über den *Olig2/Olig1*-Lokus. Der Translationsstart von *Olig2* entspricht 1 und die CNEs sind entsprechend ihrer Entfernung davon (in kb) nummeriert. Anhand der Darstellung lassen sich die Größe des CNEs (in bp), der Grad der Konserviertheit von Mensch zu Huhn bzw. **Mensch zu Frosch** (%) und das Vorhandensein eines IBS-Motives (+) erkennen. Das IBS-Motiv ist nur in CNE-34 und CNE+26 hochkonserviert. Abkürzungen: h: Mensch; d: Hund; m: Maus; r: Ratte; c: Huhn; x: Frosch; f: Fisch (zur Verfügung gestellt von R. Dildrop)

CNE size(bp) / % identity	Conservation in species			CNE	IBS-site
	hum-chk	hum-xen	hum-fish		
				<u>hdmrcxf</u>	<u>h d m r c x f</u>
CNE-132	99 (90%)			hdmrc	+ - - - -
CNE-121	617 (92%)	447 (82%)	270 (78%)	hdmrcxf	+ - - - - - - - - - - - + -
CNE-109	282 (85%) 337 (85%)	210 (74%) 304 (65%)	68 (72%) 81 (72%)	hdmrcxf hdmrcxf	- - - - - + - - - - - + -
CNE-82	623 (93%)	575 (89%)	124 (69%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE-56	285 (84%)	119 (88%)		hdmrcx	- - - - - +
CNE-48	344 (86%) 70 (92%)			hdm-c hdm-c	- - - - - - - -
CNE-29	459 (82%)			hdmrc	- - - - -
CNE-24	203 (80%)	105 (75%)		hdmrcx	- - - - - -
CNE-19	528 (86%)	- - - - -	230 (86%)	hdmrc-f	+ + + + + +
>Olig3(2250bp) - chr6:137857250 (tata-box)					
CNE+7	162 (79%)			hdmrc	- - + - -
CNE+21	538 (90%) 184 (82%)	- - - - -	266 (68%)	hdmrc-f hdmrc	+ + + + + +/- + + + + + +/- - - - - -
CNE+24	287 (88%)	218 (77%)	94 (81%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE+62	319 (97%)	297 (90%)		hdmrcx	- - - - - -
CNE+67	222 (85%)	208 (80%)	76 (77%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE+71	290 (74%)	293 (68%)		hdmrcx	- - - - - - -
CNE+77	159 (81%)			hdmrc	- - - - -
CNE+81	211 (84%) 728 (84%)	434 (73%)	102 (77%)	hdmrc hdmrcxf	- - - - - + - - - - - -
CNE+93	120 (90%) 311 (92%) 121 (80%)	228 (88%)	142 (72%)	hdmrc hdmrcxf hdmrc	- - - - - - - - - - - - - - - - -
CNE+94	342 (89%)	- - - - -	239 (71%)	hdmrc-f	- - - - - -
CNE+104	218 (80%)			hdmrc	- - - - - +
CNE+129	365 (81%)			hdmrc	- - - - - -
CNE+130	208 (90%)			hdmrc	- - - - - -
CNE+141	405 (83%)	- - - - -	55 (80%) +36 (91%)	hdmrc-f	- - - - - -
CNE+153	155 (74%)			hdmrc	- - - - -
CNE+155	511 (90%)	213 (76%)	236 (65%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE+162	612 (94%)	598 (83%)	203 (85%) +105 (80%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE+163	721 (89%)	535 (80%)	86 (72%) +134 (64%)	hdmrcxf	- - - - - - -
CNE+165	121 (73%)	99 (77%)		hd-rcx	- - - - ++
CNE+172	317 (85%) +106 (78%)	287 (77%)	246 (72%)	hdmrcxf	- - + - - - -
CNE+174	461 (89%)	393 (82%)	363 (64%)	hdmrcxf	- + - - + + +
CNE+179	378 (85%)	264 (76%)	100 (71%)	hdmrcxf	+ + - - - - -
CNE+196	210 (83%)			hd--c	- - - -
CNE+216	289 (73%)	123 (69%)		hdmrcx	- - + - - -

Abb.A.11: Übersicht über die CNEs des *Olig3*-Lokus. Schematische Übersicht über den *Olig3*-Lokus. Der Translationsstart von *Olig3* entspricht 1 und die CNEs sind entsprechend ihrer Entfernung davon (in kb) nummeriert. Anhand der Darstellung lassen sich die Größe des CNEs (in bp), der Grad der Konserviertheit von Mensch zu Huhn bzw. Mensch zu Frosch oder Mensch zu Fisch (%) und das Vorhandensein eines IBS-Motives (+) erkennen. Das IBS-Motiv findet sich in CNE-19 und CNE+21 hochkonserviert. Abkürzungen: h: Mensch; d: Hund; m: Maus; r: Ratte; c: Huhn; x: Frosch; f: Fisch (zur Verfügung gestellt von R. Dildrop)

ECRs (70%/100 bps) in Human (hg18) at chr11:3177038-31778269 Intron	
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment	
Human	-----AGCGGCCGCGC-TGGGAAACAAGAAAGCGAGCGCTTTGCTCCCTATCTTC 48
Mouse	CC---TTGAGCGGCAGCGGTGGACCGAAAACAGAAAGGAACACTTTTCTCCCTACCGTC 210
Rat	CCAAGTCGCGCCCAAGCGCGC-TGGGAAACCAGAAAGGAGCACTTTTCTCCCTACCATC 234
Chicken	-----AGCGGGGGCGGGGGGAGCGAGGGCCCGCTCTATCTTT 39
Frog	-----GGTCCACGTCCCATCTCCAGTCTTCTTAA 34
Zef	-----
Human	CCAGTGTCCGTCCTATATTGTTTTCTGCTCTTAAACTGACATGTCTAATTGGCAATTGG 108
Mouse	CCAGTGTCCGTCCTATATTGTTTTCTGCTCTTAAACTGACATGTCTAATTGGCAATTGG 270
Rat	CCAGTGTCCGTCCTATATTGTTTTCTGCTCTTAAACTGACATGTCTAATTGGTAATTGG 294
Chicken	CTGGTGTCTTCATAGATTGTTTTCTTCTCTTAAACTGACATGTCTAATTGGCAAGCGG 99
Frog	TTTGTATCTCTCTTAAAGAGAAAAAAGAACTGCGATGTCTAATTGGCAACCGG 94
Zef	-----CCTTTAACACTGACAAGTTAATTGGCAACGT 33
	* **** * * * * * * * * * * *
Human	TGCCGAATCGTGTCCAGAG-GTCTCTTGTGGAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 167
Mouse	TGCCGAATCGTGTCCAGAG-GTCTCTTGTGGAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 329
Rat	TGCCGAATCGTGTCCAGAG-GTCTCTTGTGGAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 353
Chicken	TGCCATATCGTGTCCAGAG-GTCTCTTGTGGAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 158
Frog	AGCCACATCATGTCCAAGG-GTCTCTGTGAAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 153
Zef	TGCCATATCATGTCCAAGGTGTCTCGGTGGAACATTTCTACAGCTGTCCTTCAACTA 93
	*** ** *
Human	GACGCTTATTCATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGTTCTCTAATGAGCAATTACAGAG 227
Mouse	GACGCTTATTCATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGTTCTCTAATGAGCAATTACAGAG 389
Rat	GACGCTTATTCATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGTTCTCTAATGAGCAATTACAGAG 413
Chicken	GACGCTTATTCATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGATCTCTAATGAGCAATTACATAG 218
Frog	GACGCTTATTCATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGATCTCTAATGAGCAATTACATAG 213
Zef	AACCGGTATTTATGTGCGCTTAATGAGAAACAAAACGTTCTCTAATGAGCTATTACATAG 153
	**** *
Human	CGACAGGATTGTTCCCATAAACAATTTCTTGCAGTGACAGAAAGCATCCTTTGTACCAGAT 287
Mouse	CGACAGGATTGTTCCCATAAACAATTTCTTGCAGTGACAGAAAGCATCCTTTGTACCAGAT 449
Rat	CGACAGGATTGTTCCCATAAACAATTTCTTGCAGTGACAGAAAGCATCCTTTGTACCAGAT 473
Chicken	CGACAGAAATTGTTCCCATAAACAATTTCTTGCAGTGACAGAAACATCCTTTGTACCAGAT 278
Frog	CGACAGAAATTGTTCCCATAAACAATTTCTTGTGTGACAGAAACATCCATTGTAGCAGAT 273
Zef	CGACATAACTGTTCCCATAAACATTTTCTGTGTGACAAACATATTTGTATA----- 207
	***** *
Human	ATTT----CGCATACTGTTACCGATTTTCCCTTCCTC----GCCCGACTCCATGGAGGC 339
Mouse	ATTT----CGCATACTGTTACCGATTTTCCCTTCCTA----ACCCGGCTCTGTGGAGGC 501
Rat	ATTT----CGCATACTGTTACCGATTTTCCCTTCCTA----ACCCAGCTCTGTGGAGGC 525
Chicken	ATTC----CGCACACTGTTACCGATTTTCTTCTCGGGGACGAAAACAAAAGCAGG 334
Frog	ATTGGGGGCGCACATTGTGATC----- 295
Zef	--TG----CATGCTGTT----- 220
	* * * * *
Human	GCCGGGCATCCGGAG-CCGGTCCGAGAG----- 366
Mouse	GCCCTGCACGCGGGG-CCGGTCTAAGAGCTCACCGATTACAGCAGCCCTTCGCCATCC 560
Rat	GCCCTGCATCCGGGGCCGGTCCAGAGCTCACCGATTACAGTAGCCCTTCGCCAGTGG 585
Chicken	TTGTGTGTGCGGGCACCCTCTCGAG----- 360
Frog	-----
Zef	-----

Abb.A.13: Multispezies-Sequenzvergleich eines CNEs aus dem Intronbereich von *Pax6* chr11:3177038-31778269). Die konservierten Basen sind in blau dargestellt, die potentielle Irx-Bindestelle ist in gelb hinterlegt. Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (www.ebi.ac.uk/clustalw/).

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten in seinem Institut durchführen zu können sowie für seine Unterstützung und Hilfestellung während meiner Arbeit und das Ermöglichen eines Forschungsaufenthaltes im Labor von Dr. James Briscoe in London danken.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Dr. James Briscoe und seinen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor im NIMR (National Institute for Medical Research) in London und die Hilfestellung per email.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Entwicklungs- und Molekularbiologie für die nette Zeit, den Kuchen und die Schokolade.

Ein großes Dankeschön an Wioletta Hörschgen für die dauerhafte, schnelle und wertvolle Hilfe.

Danke auch an Jeanette Vierkotten für die lange und gute Labornachbarschaft sowie Dr. Renate Dildrop und Dr. Julia Fischer für die gute Zusammenarbeit im Obox-Projekt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und besonders Raschad, die mich unterstützt haben, meine Launen ertragen mussten und ohne deren Unterstützung alles viel schwerer gewesen wäre.

Erklärung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. 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 02.11.2006

(Katrín Götzt)