
Funktionsanalyse von Ftm:
Identifizierung einer neuen Komponente
des zilienassozierten
Shh-Signalweges

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jeanette Vierkotten

aus Düsseldorf

Dezember 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. U. Rüter
Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2007

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütger danke ich für die Überlassung dieses Projektes und die Betreuung während meiner Promotion.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt Renate Dildrop für die methodische Hilfe und die netten Momente bei einer Tasse Kaffee.

Besonders möchte ich Katrin Götz danken, meiner „Favorite-Room-Mate“, die mich während all der Zeit begleitet hat und ohne deren Hilfe ich so manch schwierige Zeit und Herausforderung nicht gemeistert hätte.

Ebenso möchte ich mich bei Björn Keßler bedanken für seine Geduld und moralische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

1. EINLEITUNG	7
1.1 Allgemeine Entwicklung und Tiermodelle	7
1.2 Die <i>Fused toes (Ft)</i>-Mutante	8
1.2.1 Die Entstehung der <i>Ft</i> -Mutation.....	8
1.2.2 Der <i>Ft</i> -Phänotyp.....	8
1.2.3 Der <i>Ft</i> -Locus.....	10
1.2.4 <i>Ftm</i>	13
1.3 Der Hh-Signalweg	15
1.3.1 Die Hh-Signaltransduktion.....	16
1.3.2 Die Rolle von Shh in der Gliedmaßenentwicklung und der Musterbildung im Neuralrohr.....	19
1.4 Die Struktur von Zilien und ihre unterschiedlichen Funktionen	23
1.5 Fragestellung	26
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Häufig verwendete Lösungen	27
2.2 Bakterienstämme und Nährmedien	29
2.3 Vektoren und Oligonukleotide	29
2.4 Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren	30
2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	30
2.4.1.1 Plasmid-Mini-Isolation.....	31
2.4.1.2 Plasmid-Maxi-Isolation.....	31
2.4.2 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen.....	32
2.4.2.1 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellsuspensionen.....	32
2.4.2.2 DNA Mikroextraktion aus 96-Loch Platten.....	32
2.4.3 Isolierung von DNA aus embryonalen Membranen.....	33
2.4.4 Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung.....	33
2.4.5 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen.....	34
2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
2.4.6.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung.....	34
2.4.6.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel.....	35
2.5 Klonierungstechniken	35
2.5.1 Sequenzspezifische DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	35
2.5.2 Dephosphorylierung von DNA.....	35
2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	36
2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.5.4 Ligations von DNA-Fragmenten.....	37
2.5.5 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen.....	37
2.5.5.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	37
2.5.5.2 Transformation.....	38
2.6 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen (Hybridisierungstechniken)	39
2.6.1 Transfer von DNA-Fragmenten (Southern Blot).....	39
2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	40
2.6.3 Southern-Hybridisierung.....	40
2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.7.1 Standard-PCR.....	41
2.7.2 Reinigung von PCR-Produkten.....	42
2.7.3 Reverse Transkription.....	42

2.8 DNA-Sequenzierung	43
2.9 <i>In situ</i>-Hybridisierungstechniken	43
2.9.1 „Whole-mount“ <i>in situ</i> -Hybridisierung (WISH)	43
2.9.2 Synthese der komplementärer RNA-Sonden	44
2.9.3 Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung	44
2.9.4 Entfernung von unspezifisch gebundener RNA-Sonde und Antikörperinkubation	45
2.9.5 Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper und Histochemie.....	46
2.9.5 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffindünnschnitten	46
2.10 Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten und fixierten Zellen	48
2.10.1 Präparation und Fixierung der Embryonen.....	48
2.10.2 Antikörperfärbung auf Kryostatschnitten	49
2.10.3 Antikörperfärbung auf fixierten Zellen	50
2.11 Histologische Techniken	51
2.11.1 Paraffindünnschnitte	51
2.11.2 Kryostatschnitte	51
2.12 Isolierung von Proteinen	51
2.13 Westernblotanalysen	52
2.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.13.2 Proteintransfer („Blotten“)	53
2.13.3 Immunnachweis von Proteinen.....	53
2.14 Proteindetektion	54
2.14.1 Silberfärbung	54
2.14.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	55
2.15 Antikörpergenerierung	55
2.15.1 Herstellung von bakteriell exprimiertem Antigen	55
2.15.1.1 Expression des Fusionsproteins in <i>E.coli</i>	55
2.15.1.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	56
2.15.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.....	56
2.15.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	56
2.16 Zellkulturtechniken	57
2.16.1 Herstellung von Primärkulturen und verwendete Zelllinien.....	57
2.16.1.1 Embryonale Mausfibroblasten (MEF); (Primärkultur)	57
2.16.1.2 Mesenchymale Gliedmaßenzellen (MLCs); (Primärkultur).....	59
2.16.1.3 Embryonale Stammzellen der Maus (E14.1); (Zelllinie).....	59
2.16.2 Passagieren von Zellen.....	60
2.16.2.1 Passagieren von MEF-Zellen und MLCs.....	60
2.16.2.2 Passagieren von ES-Zellen	60
2.16.3 Zellzahlbestimmung	61
2.16.4 Kryokonservierung und Auftauen von ES-Zellen	61
2.17 Tierexperimentelle Methoden	62
2.17.1 Erzeugung von Chimären.....	62
2.17.1.1 Blastozysten-Injektion	62
2.17.1.2 Blastozysten-Transfer	63
2.17.1.3 Identifizierung chimärer Tiere.....	63
2.17.2 Isolierung definierter Embryonalstadien.....	63
2.17.3 Identifizierung genetisch veränderter Tiere und Embryonen	64
2.17.4 Maushaltung.....	64
2.18 Fotodokumentation	64
2.19 Elektronenmikroskopie	64

2.20 <i>In silico</i> -Analysen	64
3. ERGEBNISSE	65
3.1 Generierung der <i>Ftm</i> -mutanten Mauslinie.....	65
3.2. Phänotypische Auswirkungen des <i>Ftm</i> -Verlustes.....	67
3.2.1 Missbildungen kraniofacialer Strukturen und Exenzephalie	68
3.2.2 Kardiale Fehlbildungen	70
3.2.3 Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie	71
3.2.4 Polydaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen	74
3.3 Die Auswirkungen des <i>Ftm</i> -Verlustes auf die Shh-Signaltransduktion.....	75
3.3.1 Analyse der Neuralrohrmusterbildung	76
3.3.2 Epistatische Analysen.....	80
3.3.2.1 Analyse von <i>Ftm</i> / <i>Shh</i> -Mutanten.....	80
3.3.2.2 Analyse von <i>Ftm</i> / <i>Gli3</i> -Mutanten.....	82
3.4 <i>Ftm</i> und Zilien	84
3.4.1 Ziliendefekte in <i>Ftm</i> mutanten Tieren.....	84
3.4.2 Die Lokalisierung von <i>Ftm</i>	85
3.5 Die Funktion von <i>Ftm</i>	87
3.5.1 <i>Ftm</i> hat einen direkten Einfluss auf die Shh-Signaltransduktion	87
3.5.2 <i>Ftm</i> ist eine spezifische Komponente des zilienassoziierten Hh-Signalweges in Vertebraten.....	89
4. DISKUSSION	91
4.1 Generierung der <i>Ftm</i> -Mauslinie.....	91
4.2 Die phänotypischen Auswirkungen des <i>Ftm</i> -Verlustes	91
4.2.1. Missbildungen kraniofacialer Strukturen und des Gehirns.....	92
4.2.2. Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie und kardiale Fehlbildungen	93
4.2.3. Gestörte Musterbildung im ventralen Neuralrohr und präaxiale Polydaktylie.....	97
4.2.4 Der Vergleich zur <i>Ft</i> -Mutante	101
4.3 Die Funktion von <i>Ftm</i>	104
4.3.1 Die Rolle von <i>Ftm</i> in der zilienassoziierten Hh-Signaltransduktion.....	104
4.3.2 <i>Ftm</i> als Kandidatengen für menschliche Syndrome.....	106
4.3.3 <i>Ftm</i> ist eine vertebratenspezifische Komponente des Hh-Signalweges	108
5. ZUSAMMENFASSUNG	110
6. VERZEICHNISSE.....	111
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	111
6.2 Literaturverzeichnis	113
7. ANHANG.....	135

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Entwicklung und Tiermodelle

Die Entwicklung bezeichnet einen geordneten, progressiven Prozess, der zur Ausbildung eines multizellulären Organismus notwendig ist. Ziel dieses Prozesses ist es aus einer einzelnen Zelle, der Zygote, einen komplexen Organismus mit Tausenden von unterschiedlichen Zelltypen hervorzubringen. Grundlage für diesen Prozess ist die räumliche und zeitliche Koordination von Genaktivitäten, welche das Schicksal einzelner Zellen, als auch ganzer Zellverbände bestimmen, und somit sukzessiv die Entwicklung eines Organismus steuern. Die Aufgabe der Entwicklungsbiologie ist es, die Funktion entwicklungsbiologisch wichtiger Gene und das empfindliche Zusammenspiel ihrer Genprodukte zu entschlüsseln.

Einer der wichtigsten Aspekte der Entwicklungsbiologie ist die funktionelle Genomanalyse, bei der die Untersuchung von Genen und ihrer Funktion *in vivo* in ausgewählten Modellorganismen stattfindet. So konnten in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durch chemische Mutagenese (ENU) und die anschließend schnelle phänotyp-assoziierte Genidentifizierung viele entwicklungsbiologische Prozesse aufgeklärt werden (Nüsslein-Vollhard und Wieschaus, 1980). Um die Funktion von Genen gezielt zu untersuchen, bedient man sich heute hauptsächlich Techniken, die die entsprechenden Genprodukte direkt inhibieren. In *Drosophila melanogaster* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* geschieht dies mit Hilfe der RNA-vermittelten Geninterferenz (RNAi) (Misquitta und Paterson, 1999; Fraser et al., 2000). Eine verwandte Methode wird in „morpholino-knockdown“-Experimenten angewendet, die in der Genomanalyse des Zebrabärlings *Danio rerio* Anwendung findet (Nascevius und Ekker, 2000). Einer der wichtigsten Modellorganismen ist nach wie vor die Maus *Mus musculus*. Die hohe Homologie ihres Genoms zu dem des Menschen *Homo sapiens*, und die vergleichbare Entwicklung im Uterus, ermöglichen einen direkten Vergleich mit dem menschlichen Genom und menschlichen Krankheitsbildern. In der Maus erfolgt die Genomanalyse primär durch das gezielte Einbringen von Mutationen. Dies geschieht mit Hilfe der sogenannten „gene-targeting“-Technologie, die eine stabile Integration der Mutation in das Genom erlaubt. Eine Voraussetzung für diese Technik ist die homologe Rekombination. Homologe Rekombination ermöglicht das gezielte Einbringen klonierter genomischer DNA-Fragmente im Austausch mit der sequenzidentischen endogenen DNA. In entsprechenden Mutagenesevektoren ist es somit möglich solche DNA-Fragmente als Flanken zu verwenden und mit ihnen Teile der endogenen DNA zu deletieren („Knock-Out“) oder auch zusätzliche Fragmente/Gene ins

Genom einzufügen („Knock-In“) (Capecchi, 1989 a und b; Joyner, 2000). Eine weitere Voraussetzung für die „gene-targeting“-Technologie ist die Pluripotenz embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) (Beddington und Robertson, 1989). ES-Zellen besitzen die Fähigkeit an der Entwicklung sämtlicher Gewebe und Organe eines Embryos teilzunehmen (Torres und Kühn, 1997). Injektionen von manipulierten ES-Zellen in Blastozysten erlauben die Herstellung von chimären Mäusen und die Generierung von Mäusen, die ausschließlich Abkömmlinge von ES-Zellen sind (Nagy et al., 1993; Wakayama et al., 1999; Hochedlinger, 2002). Gene-targeting in ES-Zellen erlaubt somit eine gezielte stabile Integration von Mutationen ins Genom und die anschließende Generierung einer mutanten Mauslinie.

1.2 Die *Fused toes (Ft)*-Mutante

1.2.1 Die Entstehung der *Ft*-Mutation

Die Mausmutante *Fused toes (Ft)* ist eine spontane Mutation, die bei dem Versuch eine transgene Mauslinie zu etablieren, entstanden ist. Ziel war es ein aktiviertes menschliches *Harvey-ras* Onkogen unter der Kontrolle des menschlichen β -Interferon Promotors in das Mausgenom zu integrieren. Obwohl Untersuchungen zeigten, dass das Transgen in der hergestellten Mauslinie nicht exprimiert wird, zeigten die Mäuse einen komplexen Phänotyp. Intensive Analysen identifizierten eine Deletion in der Region D des Mauschromosoms 8 als Ursache für den komplexen Phänotyp (van der Hoeven et al., 1994).

1.2.2 Der *Ft*-Phänotyp

Die *Ft*-Mutation verursacht schwerwiegende Missbildungen in einer Vielzahl von Geweben und Strukturen. Heterozygote *Ft*-Tiere weisen eine deutliche Syndaktylie der Vordergliedmaßen auf. Die distalen Phalangen der Zehen eins bis vier bzw. zwei bis vier zeigen hierbei sowohl Fusionen der Knochen (ossäre Syndaktylie) als auch einen Erhalt des interdigitalen Gewebes (kutane Syndaktylie) (van der Hoeven et al., 1994). Eine mögliche Ursache für Syndaktylie ist eine Fehlregulation des programmierten Zelltods. Die finale Form einer Gliedmaße wird durch programmierten Zelltod, Apoptose, erreicht. Die Expression von Zelltod-fördernden Signalen wie z.B. *Dickkopf* (Grotewold et al., 2002) und Bmp-Faktoren (Merino et al., 1999) in den interdigitalen Bereichen der Gliedmaße ist entscheidend für die Modellierung einzelner Zehen (Mori et al., 1995). Expressionsanalysen in *Ft*/+-Embryonen

zeigten unter anderem eine Fehlregulation von *Bmp-4*, einem bekanntem Apoptose-Signal, in der Gliedmaßenknospe, und boten somit molekulare Evidenz für den Verlust der Apoptoseregulation (Heymer et al., 1997).

Neben den Gliedmaßenfehlbildungen zeigen heterozygote *Ft*-Mäuse eine ausgeprägte Hyperplasie des Thymus (Volkman, et al. 1996). Normalerweise erreicht der Thymus einer Maus seine maximale Ausdehnung im Alter von 6 Wochen und degeneriert anschließend. In heterozygoten *Ft*-Tieren proliferiert der Thymus weiter und erfährt dabei eine enorme Größenzunahme. Da eine Degeneration der Thymusstruktur ausbleibt, zeigen heterozygote Tiere eine erhebliche Störung der Lungenfunktionen und sterben im Alter von 10-11 Monaten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass aus heterozygoten *Ft*-Mäusen isolierte Thymozyten gegenüber Cortison-induzierter Apoptose weit weniger empfindlich sind als wildtypische (van der Hoeven et al. 1994).

Der Phänotyp homozygoter *Ft*-Tiere ist deutlich ausgeprägter. In Homozygose sterben *Ft*-mutante Embryonen zwischen dem Tag E10.5 und E14.5, in Abhängigkeit ihres genetischen Hintergrundes. Auch in *Ft/Ft*-Embryonen findet man Fehlbildungen innerhalb der Gliedmaßenentwicklung. Im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren sind hier sowohl Vorder- als auch Hintergliedmaßen betroffen. Die Gliedmaßen zeigen eine Verlust distaler Phalangen, eine dorsoventrale Sydaktylie und eine starke Gewebewucherung im distalen Autopod. Expressionsanalysen zeigten eine Erweiterung der *Shh*-, *dHand*- und *Bmp-4*- Expression im anterior-distalen Autopod (Grotewold et al., 2002). Da *Shh* unter anderem als proliferationsförderndes Signal wirkt und *dHand* und *Bmp-4* Apoptose hemmend wirken (Duprez et al., 1998; Thomas et al., 1998; Krüger et al., 2001), wird der Gliedmaßenphänotyp in *Ft/Ft*-Embryonen vermutlich durch eine Kombination von verminderter Apoptose und gesteigerter Proliferation verursacht.

Heymer et al. (1997) konnten zeigen, dass neben der Gliedmaßenentwicklung ein weiterer wichtiger Aspekt der Embryonalentwicklung in *Ft/Ft*-Embryonen gestört ist, die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie. Dieser Prozess ist unter anderem verantwortlich für die genaue Anordnung der inneren Organe und die asymmetrische Entwicklung des Herzens (Shiratori und Hamada, 2006). Eines der ersten Ereignisse, das durch die Determinierung der Links-Rechts-Asymmetrie reguliert ist, ist die embryonale Rotation. Bei diesem nagerspezifischen Prozess dreht sich der Embryo im Uhrzeigersinn, wodurch er die typische embryonale Stellung einnimmt und sich in die embryonalen Membranen einwickelt. Als Folge dieser gerichteten Rotation wird der Schwanz des Embryos auf der rechten Schulter platziert. In *Ft/Ft*-Embryonen findet diese Rotation ungerichtet statt, so dass in einigen Fällen eine

Platzierung des Schwanzes auf der linken Schulter zu beobachten ist (Heymer et al., 1997). Auch die Entwicklung des Herzens ist betroffen: Normalerweise findet im Zuge der Herzentwicklung eine Drehung des primitiven Herzschlauches von links nach rechts statt, welche die spätere Position der Herzkammern und ihrer vaskulären Verbindungen definiert (Shiratori und Hamada 2006). In einigen homozygoten *Ft*-Embryonen erfolgt diese Drehung von rechts nach links und resultiert in einer spiegelbildlichen Herzanlage (Heymer et al. 1997). Desweiteren zeigten *Ft/Ft*-Herzen morphologische Veränderungen. Es konnte eine Erweiterung des Perikards, Septumdefekte und eine Verkürzung des Ausflusstraktes nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung Prof. Ulrich Rütter, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die Störung der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie konnte auf molekularer Ebene bestätigt werden. In wildtypischen Embryonen werden *Nodal* und *Leftb*, zwei Mitglieder der TGF β (Transforming Growth Factor- β)-Superfamilie, asymmetrisch auf der linken Seite des Embryos im lateralen Seitenplattenmesoderm exprimiert, wo sie die Determination der linken Körperhälfte einleiten (Shiratori und Hamada, 2006). In *Ft/Ft*-Embryonen findet man eine ektopische Expression beider Gene im rechten lateralen Seitenplattenmesoderm (Heymer et al., 1997).

Analysen der Neuralrohrmusterbildung in *Ft/Ft*-Embryonen zeigten massive Störungen in der Spezifizierung ventraler Neuronen. Es konnte eine Degeneration der Bodenplatte, dem ventralen Signalzentrum des Neuralrohres, aufgrund des Verlustes von *Shh* ab dem Stadium E10.5, nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ein Verlust von V3-Interneuronen und eine Zunahme von Motoneuronen beobachtet werden (Götz et al., 2005). Desweiteren zeigen *Ft/Ft*-Embryonen schwere Störungen kraniofacialer Strukturen und Missbildungen verschiedener Hirnregionen.

Der Phänotyp homozygoter *Ft*-Embryonen ist somit deutlich ausgeprägter als der heterozygoter *Ft*-Tiere und deutet auf eine Dosisabhängigkeit eines oder mehrerer *Ft*-Gene hin.

1.2.3 Der *Ft*-Locus

Die *Ft*-Mutation ist durch eine Transgenintegration in die Region D des Mausechromosoms 8 entstanden (van der Hoeven et al., 1994). Detaillierte Analysen des *Ft*-Locus zeigten, dass neben der Integration gleichzeitig eine Deletion von über 1.6Mb entstanden war (Abb.1.1; Peters et al., 2002). Innerhalb des deletierten Bereiches konnten sechs Gene identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um drei Mitglieder der *Iroquois* (*Irx*)-Familie von

Transkriptionsfaktoren *Irx3*, *Irx5* und *Irx6*, die zusammen den *IrxB*-Genkomplex bilden (Peters et al., 2000), und drei bis dahin unbekannte Gene *Fts*, *Fatso* (*Fto*) und *Fantom* (*Ftm*).

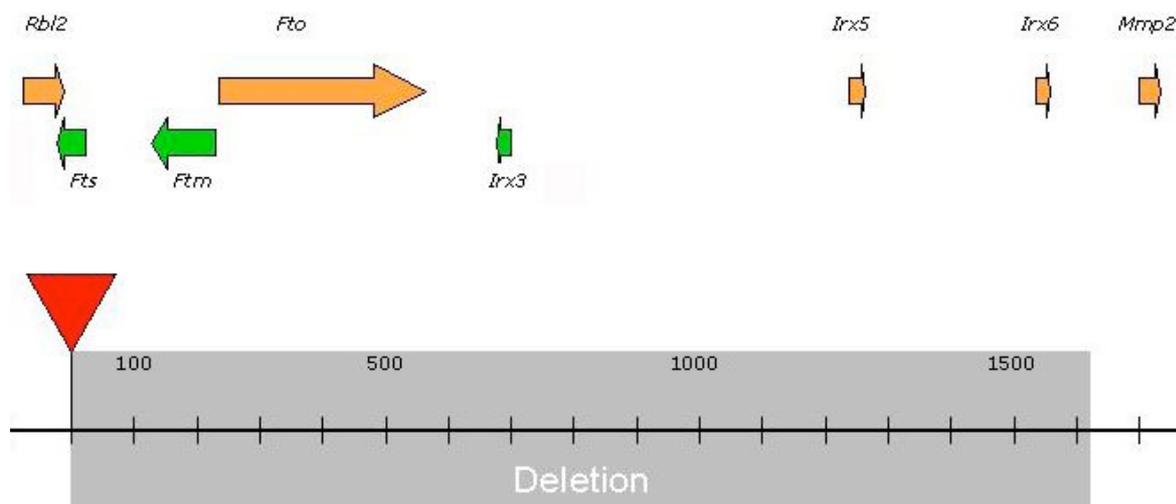


Abb. 1.1: Der *Ft*-Locus (modifiziert nach Peters, 2002)

Dargestellt ist die in der *Ft*-Mutation hervorgerufene Deletion und die ursprüngliche genomische Anordnung der deletierten Gene.

Deutlich zu sehen ist, dass die deletierte Region sowohl die Gene *Fts*, *Fto* und *Ftm* als auch die *Irx*-Gene *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* erfasst. Zu beiden Seiten sind zudem die „Nachbargene“ eingezeichnet. Hierbei handelt es sich um *Rbl2* (*Retinoblastoma like 2*) und um *Mmp2* (*Matrix Metalloproteinase 2*). Der graue Balken gibt die genaue Position des deletierten Bereiches mit einer ungefähren Größe von 1,6 Mb an. Das rote Dreieck markiert die Stelle der Transgenintegration. Die Pfeilrichtung gibt die Orientierung der Transkription der einzelnen Gene an.

Die *Irx*-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und gehören zu den Homöodomänenproteinen. In *Drosophila* beinhaltet der *Iroquois*-Genkomplex (*Iro-C*) die drei Homöoboxgene *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*). Während der Entwicklung von *Drosophila* reguliert der *Iro-C* die Entwicklung des peripheren Nervensystems und die Musterbildung der Augen- und Flügelimaginalscheiben (Gomez-Skarmeta und Modolell, 1996; McNeill et al., 1997; Grillenzoni et al., 1998).

Die Struktur und Organisation der *Irx*-Gene in Vertebraten ist evolutionär hoch konserviert (Gomez-Skarmeta und Modolell, 2002; Peters et al., 2000). So findet man in der Maus und im Menschen sechs *Irx*-Gene, die in zwei Genkomplexen organisiert sind. Der *IrxA*-Genkomplex beinhaltet die Gene *Irx1*, *Irx2* und *Irx4*, der *IrxB*-Genkomplex *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* (Peters et al., 2000). Ähnlich wie ihre Homologe in *Drosophila* besitzen die *Irx*-Gene in Vertebraten eine regulatorische Funktion in der Spezifizierung und Musterbildung in der frühen

Embryonalentwicklung und in der Entwicklung einzelner Organe. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die *Irx*-Gene *Xiro1*, *Xiro2* und *Xiro3* vermutlich an der Regulation proneuraler Gene, der Spezifizierung der Neuralplatte und der Musterbildung im Neuralrohr beteiligt sind (Bellefroid et al., 1998; Gomez-Skarmeta et al. 1998). Weitere Analysen zeigten außerdem, dass *Irx*-Gene für die Ausbildung der Mittelhirn-Hinterhirngrenze in *Xenopus* (*Xiro1*) und dem Zebrafisch (*ziro1* und *ziro7*) notwendig sind (Glavic et al, 2002; Itoh et al., 2002). Auch im Huhn konnten Erkenntnisse über die Funktion von *Irx*-Genen gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass *Irx3* die Position der Zona limitans intrathalamica (ZLI), einem Signalzentrum an der Grenze zwischen dem Dienzephalon und dem Telenzephalon, determinieren kann und eine Rolle in der dorsoventralen Musterbildung des Neuralrohrs spielt (Briscoe et al., 2000; Kobayashi et al., 2002). *Irx2* ist an der Formation der Mittelhirn-Vorderhirngrenze beteiligt (Gomez-Skarmeta und Modolell, 2002). Neben der Organisation neuronaler Gewebe, spielen die *Irx*-Gene auch eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung. Überexpressionsanalysen zeigten, dass *Irx4* die Expression kammer-spezifischer Gene beeinflusst (Bao et al., 1999). Über die Funktion der *Irx*-Gene in der Mausentwicklung ist bislang noch wenig bekannt. Wie auch im Huhn ist *Irx3* in der Maus an der dorsoventralen Musterbildung des Neuralrohrs beteiligt (Poh et al, 2002). „Knock-Out“-Experimente zeigten bisher jedoch wenig Erfolg: Der Verlust von *Irx4* oder *Irx2* zeigte nur milde oder gar keine Auswirkung auf die Entwicklung des Embryos (Bruneau et al., 2001; Lebel et al., 2003). Grund hierfür scheint die hohe Homologie zwischen den paralogenen Genen *Irx1* und *3*, *Irx2* und *5* und *Irx4* und *6* zu sein, die auf eine funktionelle Redundanz der *Irx*-Gene hindeutet.

Neben den *Irx*-Genen beinhaltet die *Ft*-Mutation drei neu identifizierte Gene, *Fts*, *Fto* und *Ftm*, deren Funktion unbekannt war. Das *Fts*-Gen kodiert für ein 32kDa großes Protein, welches Homologien zu Ubiquitin konjugierenden Enzymen aufweist (Lesche et al., 1997). *Fts*-Transkripte konnten ab dem Zeitpunkt E9.0 innerhalb der Embryonalentwicklung und in adulten Geweben (Niere, Gehirn und Testis) nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung des *Fts*-Gens in Mäusen zeigte jedoch keine phänotypischen Auswirkungen (Lesche, 1997). Das Gen *Fto* zeigt auf genomischer Ebene eine Ausdehnung von über 350kb, was ihm den Namen *Fatso*, was soviel wie Dickerchen bedeutet, einbrachte. Das putative Fto-Protein besitzt eine Größe von 58kDa (502 Aminosäuren), zeigt jedoch in computergestützten Sequenzanalysen keinerlei Homologie zu bisher bekannten funktionellen Proteindomänen. Nur eine Kernlokalisierungssequenz im N-Terminus deutet auf eine Lokalisation des Fto-Proteins im Zellkern hin, die durch den Nachweis der zellkernspezifischen Lokalisation verschiedener

Fto-Fusionsproteine in Zellkultur bestätigt werden konnte (Peters, 2002). *Fto*-Transkripte sind im Verlauf der Embryonalentwicklung ab E8.5 bis einschließlich E13.5 detektierbar. Zusätzlich wurden hohe Transkriptmengen in embryonalen Stammzellen und in fast allen adulten Geweben, außer dem Herzen und der Speicheldrüse, gefunden (Peters, 2002). Homologievergleiche offenbarten, dass *Fto*-Homologe in einer Vielzahl von Organismen vorzufinden sind, wie z.B. in der Ratte *Rattus norvegicus*, im Krallenfrosch *Xenopus laevis*, im Pufferfisch *Tetradon nigroviridis* und dem Zebrafisch *Danio rerio*. Homologe außerhalb der Vertebraten konnten nicht identifiziert werden, so dass es sich bei *Fto* wahrscheinlich um ein wirbeltierspezifisches Gen handelt. Die Analyse *Fto*-mutanter Tiere ist bis dato noch nicht abgeschlossen. Erste Untersuchungen zeigten bislang, dass *Fto*^{+/-}-Tiere fertil sind und keine phänotypischen Veränderungen aufweisen. *Fto*^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig, zeigen jedoch eine deutliche Wachstumsretardation (Stefanie Kuschel, mündliche Mitteilung). Das dritte neu identifizierte Gen innerhalb der *Ft*-Mutation, *Ftm*, ist Thema dieser Arbeit und wird im folgenden Abschnitt detaillierter vorgestellt.

1.2.4 *Ftm*

Das *Ftm*-Gen erstreckt sich über einen genomischen Bereich von ca. 100kb in der Region des Mauschromosoms 8 (Abb.1.2). Das resultierende *Ftm*-Transkript besitzt eine Größe von 7kb und kodiert ein Protein bestehend aus 1264 Aminosäuren und einem putativem Gewicht von 145kDa (Abb.1.3).

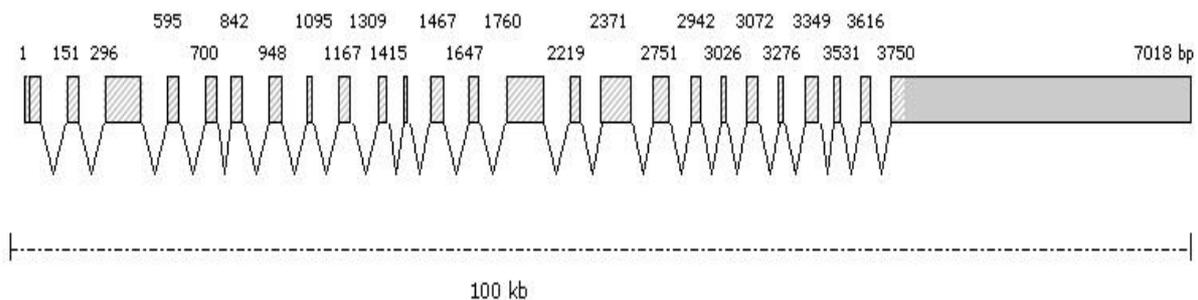


Abb. 1.2: Genomische Organisation *Ftm*-Gens

Dargestellt ist die genomische Organisation des *Ftm*-Gens. Deutlich zu sehen ist die Unterteilung der kodierenden Sequenz in 25 Exonstrukturen. Die Reichweite des Gens über 100 kb wird hier hauptsächlich durch die Summe aller Intronstrukturen bewirkt. Die schraffierten Bereiche kennzeichnen die Exonstrukturen, während die Verbindungslinien die Intronstrukturen andeuten sollen. Untranslatierte Bereiche wie der 5'- und der 3'-UTR sind grau unterlegt.

Expressionsanalysen zeigten, dass *Ftm*-Transkripte in den embryonalen Stadien E7.5 bis E16.5 vorhanden sind. In adulten Tieren konnten hohe Transkriptmengen in den Hoden, den Nieren, dem Gehirn, dem Pankreas und den Augen festgestellt werden.

Das Ftm-Protein zeigt insgesamt einen hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren und weist mehrere funktionelle Domänen auf (Abb.1.3). Im N-terminalen Bereich befinden sich drei aufeinanderfolgende coiled-coil Domänen, die diesem Bereich insgesamt eine α -helikale Struktur verleihen (Lupas, 1996). Zusätzlich weist dieser Bereich noch Homologien zu den coiled-coil Domänen einiger intermediärfilamentbindenden Proteine (Desmoplakin I und II) und Motor- bzw. Transportproteine (z.B. Myosin) auf. Coiled-coil Domänen sind oft an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und in einzelnen Fällen auch an der Ausbildung von Homopolymeren (Zhao et al., 2005). Im Anschluss an die drei coiled-coil Domänen folgt eine C2-artige Domäne. Zu dieser, ursprünglich in der Familie der Proteinkinase C entdeckten Domäne, sind mittlerweile verwandte C2-Domänen identifiziert worden, vor allem in phospholipid-bindenden Proteinen (Azzi et al., 1992). C2-Domänen konnte jedoch auch eine Rolle in der Bindung von intermediärfilamentbindenden Proteinen zugewiesen werden (Gallicano et al., 1998). Im C-terminalen Bereich des Ftm-Proteins befindet sich eine Domäne, die einen hohen Grad an Homologie zu der mit dem Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator-Protein interagierenden Domäne des RPGRIP (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein) aufweist. Diese Domäne ist für die Interaktion mit RPGR (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) notwendig (Boylan und Wright, 2000; Hong et al., 2001).

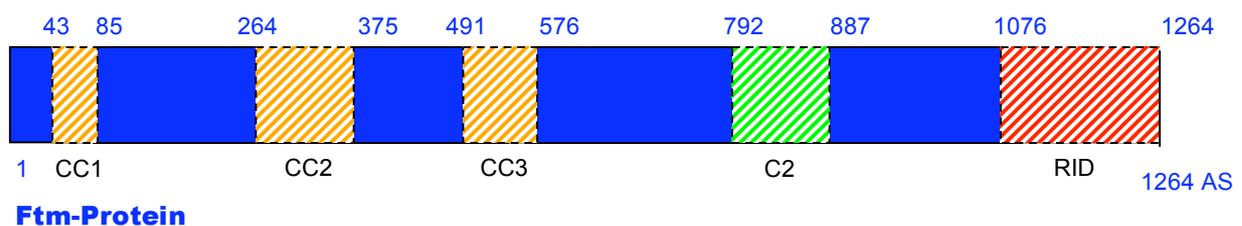


Abb. 1.3: Das Ftm-Protein

Dargestellt ist das 1264 Aminosäuren große Ftm-Protein. Deutlich zu erkennen sind die funktionellen Domänen: Im N-Terminus befinden sich drei coiled-coil Domänen (Proteininteraktionsdomänen) CC1 (AS 43-85), CC2 (AS 264-375) und CC3 (AS 491-576), im Zentrum eine C2-artige Domäne (Phospholipidbindungsdomäne) (C2, AS 792-887) und im C-Terminus eine vermeintliche RPGR-Interaktionsdomäne (RID, AS 1076-1264).

Wie das Ftm-Protein besitzt auch RPGRIP im N-terminalen Bereich drei aufeinanderfolgende coiled-coil Domänen gefolgt von einer C2-Domäne, was das Ergebnis einer vergleichenden

Analyse der Aminosäuresequenzen bestätigt. In dieser computergestützten Analyse konnte eine Ähnlichkeit zwischen dem Ftm-Protein und RPGRIP von 35% festgestellt werden (mündliche Mitteilung Dr. Renate Dildrop, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Tab.1). Nachfolgende Sequenzanalysen (durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. Renate Dildrop) gaben weiteren Aufschluss über Ftm.

Tab.1: Homologie der Ftm-Proteine

<i>Mus musculus versus</i>	% Identität
Homo sapiens	89
Danio rerio	54
Branchiostoma floridae	52
Strongylocentrotus purpuratus	48
Capitalla spec.	47
Lottia gigantea	46
Nematostella vectensis	47
Hydra magnipapillata	43
RPGRIP* (Maus)	35

Für den paarweisen Sequenzvergleich wurde der zentrale Bereich des Ftm-Proteins von Aminosäure 250 bis 930 verwendet. Das Multiple-Sequenz-Alignment ist in Abb.A1 in Anhang aufgeführt.

* Ftm-verwandtes Protein

Phylogenetische Untersuchungen offenbarten, dass RPGRIP ein Abkömmling von Ftm ist, der vermutlich durch Duplikation vor der Aufspaltung in die höheren Vertebratenklassen entstanden ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ftm in Spezies beginnend mit den *Cnidarien* bis hin zum Menschen vorhanden ist (Tab.1) und somit ein evolutionär hoch konserviertes Protein darstellt. Eine Ausnahme bilden hier die Arthropoden und Nematoden: In ihnen konnte kein Ftm-Homolog nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung Dr. Renate Dildrop).

1.3 Der Hh-Signalweg

Genetische Studien entwicklungsbiologisch relevanter Signalkaskaden haben gezeigt, dass nur eine geringe Anzahl evolutionär konservierter Signalwege notwendig ist, um die Entwicklung einer Vielzahl von Spezies zu steuern. Das räumliche und zeitliche Aktivieren und Inhibieren dieser Signalwege kontrolliert das Zellschicksal einzelner Zellen und ganzer Zellverbände. Obwohl die Funktion des Signalweges in verschiedenen Spezies unterschiedlich sein kann, deuten die meisten Experimente darauf hin, dass die wichtigsten Elemente des Signalweges – Ligand, Rezeptor, zytoplasmatisches Signal, Transduktions-

Maschinerie und Transkriptionsfaktoren – in der Evolution erhalten geblieben sind. Der Hh (Hedgehog)-Signalweg galt lange Zeit als ein solches Beispiel. Obwohl hier ein Großteil der beteiligten Komponenten während der Evolution unverändert geblieben ist, konnte erst kürzlich eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die scheinbar explizit für den Hh-Signalweg in Vertebraten notwendig sind (Huangfu und Anderson, 2006).

Die Hh-Familie der sekretierten Proteine reguliert verschiedene Entwicklungsprozesse in Vertebraten und Invertebraten (McMahon et al., 2003). Das *hh* (*hedgehog*)-Gen wurde als erstes in *Drosophila* entdeckt, wo ihm zunächst eine entscheidende Rolle in der Regulation der Segment-Polarität zugesprochen wurde (Nüsslein-Vollhard und Wieschaus, 1980). Spätere Analysen zeigten, dass das *hh*-Signal auch für die Musterbildung der Imaginalscheiben notwendig ist (Basler und Struhl, 1994; Mohler, 1998; Tabata et al., 1992). Wenig später konnten *hh*-Homologe in Vertebraten identifiziert werden, die eine Rolle in der Gliedmaßen-entwicklung und der Musterbildung im Neuralrohr, sowohl im Huhn als auch in der Maus, spielen (Echelard et al., 1993; Riddle et al., 1993; Roelink et al., 1994).

Auch im Menschen spielt der Hh-Signalweg eine wichtige Rolle. Studien haben gezeigt, dass ein Verlust oder eine Störung des Hh-Signalweges eine Vielzahl von angeborenen Krankheiten verursachen kann. Am häufigsten sind hierbei Holoprosenzephalie, Polydaktylie, kraniofaciale Missbildungen und Deformationen des Skeletts zu beobachten (McMahon et al., 2003). Zusätzlich konnten neueste genetische Studien einen Zusammenhang zwischen dem Hh-Signalweg und ziliassozierten Krankheiten, wie z.B. dem Bardet-Biedl-Syndrom, dem Kartagener-Syndrom und Retinitis Pigmentosa, zeigen (Pan et al., 2005). Außerdem konnte eine Erhöhung der Hh-Aktivität als Ursache für die Entstehung nahezu aller Basalzellcarzinome, einiger Medullablastome und Rhabdomyosarcome identifiziert werden (Pasca di Magliano und Hebrok, 2003).

1.3.1 Die Hh-Signaltransduktion

Die ersten intensiven Studien des Hh-Signalweges wurden in *Drosophila* durchgeführt. Mit Hilfe sogenannter genetischer „Screens“ konnten die einzelnen Komponenten des Hh-Signalweges identifiziert und die Abfolge der Signalweiterleitung entschlüsselt werden (Hooper und Scott, 2005). In *Drosophila* existiert ein Hh-Ligand, der an seinen Rezeptor Patched (Ptc), ein Transmembranprotein, bindet. In Abwesenheit des Hh-Liganden blockiert Ptc die nachfolgende Signalweiterleitung. Erst die Bindung des Hh-Liganden unterbindet

diese Repression und ermöglicht so die Weiterleitung des eingegangenen Hh-Signals (Abb.1.4 A,B). Smoothened (Smo), ein weiteres Transmembranprotein agiert unterhalb von Ptc in der Hh-Signalkaskade und gilt als positiver Mediator des Hh-Signals. In Abwesenheit des Hh-Liganden wird die Aktivität von Smo durch Ptc inhibiert und Smo verweilt in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma (Abb.1.4 A). Ob diese Inhibierung durch eine direkte Interaktion von Ptc und Smo oder durch weitere Proteinkomponenten bewerkstelligt wird, ist bis dato nicht geklärt (Huangfu und Anderson, 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Unterbindung der Ptc-Repression (durch die Bindung des Hh-Liganden) nicht nur die Aktivität von Smo erlaubt, sondern auch eine Anreicherung von Smo in der Plasmamembran bewirkt (Denef et al., 2000; Incardona et al., 2002; Abb.1.4 B). Die Funktion von Smo ist die Regulation des bifunktionellen Transkriptionsfaktors Cubitus interruptus (Ci). Als Konsequenz des eingehenden Hh-Signals bindet Smo das atypische Kinesinprotein Costal2 (Cos2) und die Serine-Threonine-Kinase Fused (Fu) und verhindert die Prozessierung von Ci. Ci wird im Zytoplasma modifiziert und kann anschließend als Transkriptionsaktivator (Ci^{Act}) der Hh-Zielgene agieren (Abb.1.4 B). In Abwesenheit des Hh-Signals bildet Ci einen Proteinkomplex mit Cos2, Fu und Suppressor of fused (Sufu) und wird proteolytisch prozessiert (Abb.1.4 A). Die dadurch entstandene kürzere Form des Ci-Proteins agiert als Repressor (Ci^R) und inhibiert die Transkription der Hh-Zielgene.

Die Aufschlüsselung der Hh-Signaltransduktion in Vertebraten zeigte, dass es in der Evolution zu einer Duplikation wichtiger Komponenten des Signalweges kam. So konnten sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch mehrere Homologe der Gene *Hh*, *Ptc* und *Gli* identifiziert werden. In der Maus konnten drei Hh-Homologe identifiziert werden: *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Desert hedgehog* (*Dhh*). Eine Rolle in der Embryonalentwicklung konnte bislang nur *Shh* und *Ihh* zugesprochen werden (Chiang et al., 1996; St-Jaques et al., 1999; Zhang et al., 2001). Im Zebrafisch konnten fünf Hh-Homologe gefunden werden (Huangfu und Anderson, 2006). Drei dieser Homologe, *sonic hedgehog* (*shh*), *echidna hedgehog* (*ehh*) und *tiggywinkle hedgehog* (*twhh*), spielen eine Rolle in der Musterbildung des Zebrafischembryos (Currie und Ingham, 1996; Ekker et al., 1995). Sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch wurden zwei Homologe des *Ptc*-Gens, *Ptc1* und *Ptc2* identifiziert. Detaillierte Funktionsanalysen in Maus und Zebrafisch zeigten, dass vornehmlich der *Ptc1*-Rezeptor an den Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt ist (Goodrich et al., 1997; Wolff et al., 2003; Koudijs et al., 2005). Von dem Ci-Protein konnten drei Homologe, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3*, in der Maus und im Zebrafisch nachgewiesen werden (Motoyama et al., 2003; Bai et al., 2004). *Gli1* und *Gli2* üben ihre Funktion vornehmlich als

Transkriptionsaktivatoren aus, während Gli3 vermutlich, wie Ci, als Transkriptionsaktivator oder Repressor agieren kann (Huangfu und Anderson, 2006).

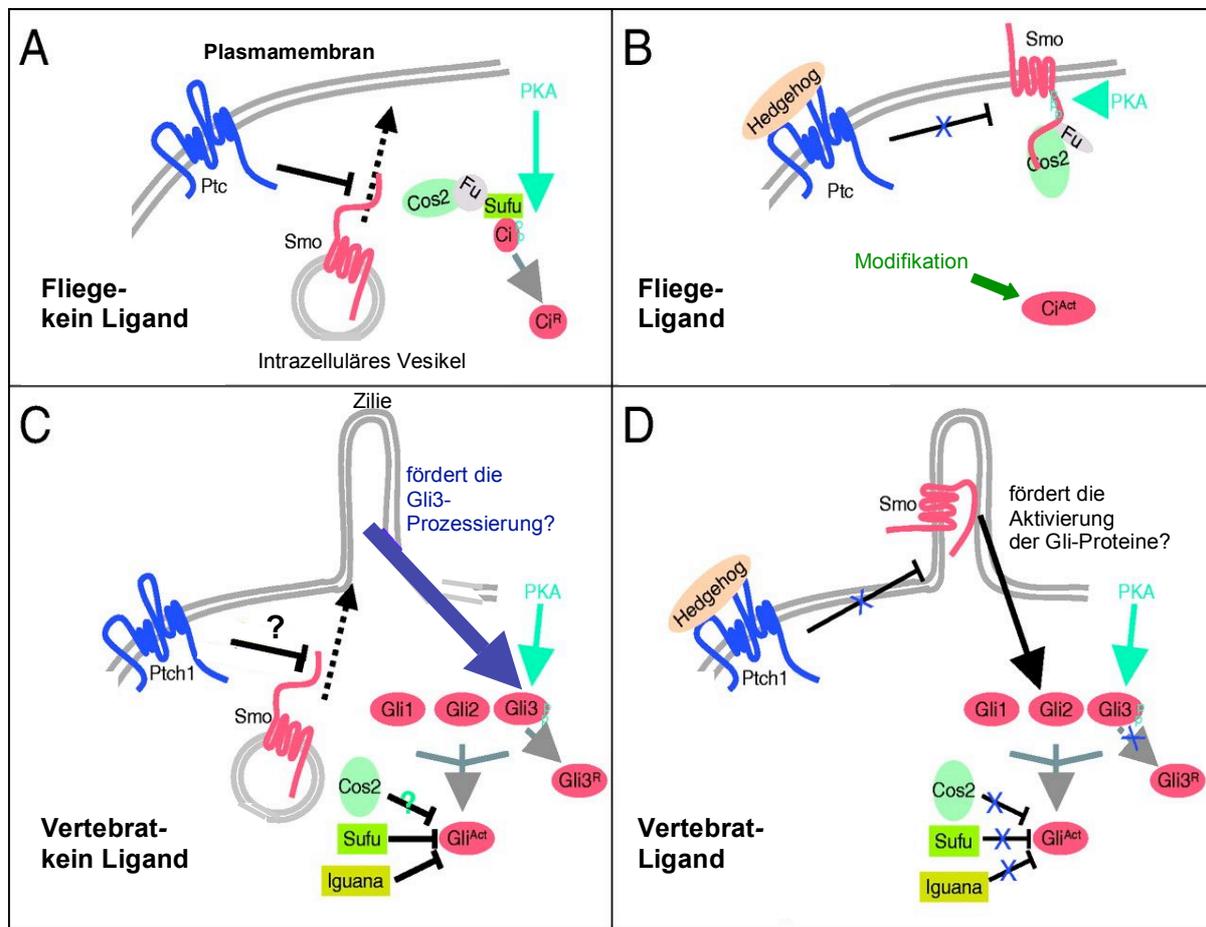


Abb. 1.4: Der Hh-Signalweg in *Drosophila* und Vertebraten (abgewandelt aus Huangfu und Anderson 2006)

Die Hedgehog (Hh)-Signaltransduktion in *Drosophila* (A,B) und in Vertebraten (C,D).

(A) In Abwesenheit des Hh-Liganden verhindert Ptc die Aktivität von Smo und dessen Lokalisierung an der Plasmamembran. Ci bildet einen Proteinkomplex mit Cos2, Fu und Sufu und wird in die Repressorform Ci^R prozessiert.

(B) In Anwesenheit des Hh-Liganden wird die Ptc-Repression unterbunden und Smo wird an der Plasmamembran angereichert. Dort lokalisiert bildet Smo einen Proteinkomplex mit Cos2 und Fu und verhindert somit die Prozessierung von Ci. Ci wird modifiziert und kann als Transkriptionsaktivator Ci^{Act} agieren.

(C) In Abwesenheit des Hh-Liganden verhindert Ptc1 die Akkumulation von Smo in der Zilie. Der Mechanismus dieser Inhibition ist bislang ungeklärt. Als Folge wird Gli3 in die Repressorform Gli3^R prozessiert. Es wird vermutet, dass die Zilie einen fördernden Effekt auf die Gli3-Prozessierung hat. Zusätzlich wird die Aktivierung der Gli-Proteine durch Sufu, Iguana (im Zebrafisch) und vermutlich auch Cos2 inhibiert.

(D) In Anwesenheit des Hh-Liganden wird die Ptc1-Repression von Smo unterbunden und Smo akkumuliert in der Zilie. Smo aktiviert anschließend die Gli-Proteine, so dass sie als Transkriptionsaktivatoren (Gli^{Act}) agieren können. Auch hier wird ein fördernder Effekt auf die Aktivierung der Gli-Proteine durch die Zilie vermutet. Gleichzeitig kommt es zur Inhibition der Gli3-Prozessierung und die inhibierende Wirkung von Cos2, Sufu und Iguana (im Zebrafisch) wird aufgehoben.

(p= Phosphorylierung; PKA= Protein Kinase A)

Trotz der Duplikation der Signalwegkomponenten (Hh, Ptc und Ci) ist das Grundprinzip des Signalweges evolutionär weitestgehend erhalten geblieben. Auch in Vertebraten wird in Abwesenheit des Hh-Liganden die Aktivität von Smo durch Ptc1 inhibiert und Smo verweilt in intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma (Abb.1.4 C). Ebenso ist in Vertebraten bislang ungeklärt, ob diese Inhibition durch eine direkte Interaktion von Smo und Ptc1 bewirkt wird. Als Konsequenz der Inhibition von Smo wird Gli3 in die Repressorform Gli3^R prozessiert, welche die Transkription der Hh-Zielgene reprimiert. Zusätzlich wird die Aktivierung unprozessierter Gli-Proteine durch Sufu, Iguana (im Zebrafisch) und vermutlich auch Cos2 inhibiert (Abb.1.4 C). Ungleich der Signaltransduktion in *Drosophila* spielen in der Signalweiterleitung des Hh-Signal in Vertebraten Zilien eine Rolle. Untersuchungen von Mausmutanten in denen Zilien abwesend sind, zeigten eine stark reduzierte Gli3-Prozessierung (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). In der Anwesenheit des Hh-Liganden wird Smo nicht mehr länger durch Ptc1 inhibiert. Dies ermöglicht die Akkumulation von Smo in der Zilie und die Aktivierung der unprozessierten Gli-Proteine zu Transkriptionsaktivatoren (Gli^{Act}) (Abb.1.4 D). Auch die Aktivierung der Gli-Proteine scheint an die Zilienstruktur gekoppelt zu sein. So zeigten Mausmutanten in denen Zilien abwesend sind einen Verlust der Gli2-Aktivität (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). Parallel zur Aktivierung der Gli-Proteine wird die Prozessierung von Gli3 zu Gli^R inhibiert. Ebenso wird die aktivierungsblockende Wirkung von Cos2, Sufu und Iguana (im Zebrafisch) aufgehoben (Abb.1.4 C). Das Resultat ist die Aktivierung der Hh-Zielgene durch die Gli-Aktivatoren Gli^{Act}.

1.3.2 Die Rolle von Shh in der Gliedmaßenentwicklung und der Musterbildung im Neuralrohr

In der Embryonalentwicklung der Vertebraten spielt der Hh-Signalweg unter anderem eine entscheidende Rolle in der Gliedmaßenentwicklung und der Musterbildung im Neuralrohr (Hui und Joyner, 1993; Chiang et al., 1996; Büscher et al., 1997; Poh et al., 2002). Die Entwicklung einer komplexen Struktur wie der Gliedmaße erfordert unter anderem die Musterbildung entlang dreier Achsen: 1) Die proximodistale Achse, die sich vom Körper bis zu den Fingerspitzen erstreckt. 2) Die dorsoventrale Achse, die Handrücken und Handinnenfläche definiert. 3) Die anterioposteriore Achse, die vom Daumen bis zum kleinen

Finger verläuft. Entlang der anterioposterioren Achse muss sowohl die Anzahl der Zehen als auch die Identität der einzelnen Zehen determiniert werden. Transplantationsexperimente im Huhn zeigten, dass das posteriore Mesenchym der frühen Gliedmaßenknospe für die Determination der Zehenanzahl und Zehenidentität verantwortlich ist (Niswander, 2003). Aufgrund dieser Fähigkeiten wurde dieses Signalzentrum fortan als Zone polarisierender Aktivität (ZPA) bezeichnet. Molekulare Analysen identifizierten das *Shh*-Protein als das entscheidende Signal in der ZPA, welches die Musterbildung entlang der anterioposterioren Achse bewerkstelligt. So konnte gezeigt werden, dass ektopische anteriore Expression von *Shh* die Entwicklung zusätzlicher Zehen bewirkt, und als Hauptgrund für die Entstehung polydaktyler Phänotypen angesehen werden kann (Johnson et al., 1997; Capdevila et al., 2001).

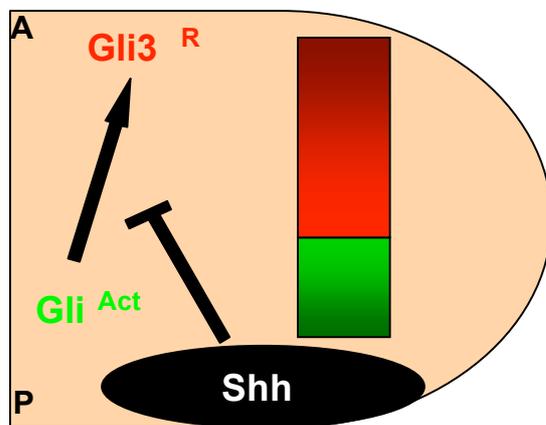


Abb. 1.5: Anterioposteriore Musterbildung in der Gliedmaße

Shh wird in hohen Konzentrationen in der ZPA (Zone polarisierender Aktivität) im posterioren Mesenchym der Gliedmaße exprimiert (schwarze Ellipse). *Shh* inhibiert die *Gli3*-Prozessierung und bewirkt somit die Ausbildung eines Gradienten von *Gli*-Aktivatoren (Gli^{Act}) und *Gli3*-Repressor ($Gli3^R$). Dieser Gradient erstreckt sich von posterior (P), wo vornehmlich hohe Konzentration der Gli^{Act} vorzufinden sind, nach anterior (A), wo hohe Konzentrationen des $Gli3^R$ lokalisiert sind.

Die hohe Konzentration von *Shh* in der ZPA bewirkt einen Gradienten von Gli^{Act} und $Gli3^R$ entlang der anterioposterioren Achse (Wang et al., 2000; siehe Abb.1.5). Die höchste Konzentration von Gli^{Act} sind hierbei im posterioren Mesenchym zu finden. Dementsprechend befindet sich die höchste Konzentration von $Gli3^R$ im anterioren Mesenchym (Abb.1.5). Genetische Analysen ließen den Rückschluss zu, dass die Etablierung des Gradienten von Gli^{Act} und $Gli3^R$ ausschlaggebend für die Musterbildung entlang der anterioposterioren Achse der Gliedmaße ist (te Welscher et al., 2002).

Manipulationen im Huhn und genetische Analysen in der Maus zeigten, dass die dorsoventrale Polarität des Neuralrohrs durch extrazelluläre Signale, die in sogenannten Signalzentren produziert werden, bewirkt wird (Yamada et al., 1991 und 1993; Goulding et al., 1993; Liem et al., 1995 und 1997; Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 1999 und 2000). Signale, die das dorsale Neuralrohr spezifizieren, haben ihren Ursprung im Ektoderm und werden anschließend im dorsalen Signalzentrum des Neuralrohrs, der Dachplatte, produziert.

Vornehmlich handelt es sich bei diesen Signalen um Mitglieder der TGF β -Superfamilie, wie z.B. Bmp-4 und Bmp-7 (Liem et al., 1995). Zahlreiche Studien zeigten, dass die initialen Signale, die das ventrale Neuralrohr spezifizieren, aus der Chorda dorsalis, einer zylindrischen mesodermalen Struktur, die unterhalb des Neuralrohr entlang der anterior-posterior Achse verläuft, stammen (Yamada et al., 1991 und 1993; Jessell und Melton, 1992; Jessell, 2000). Die Chorda dorsalis ist Ursprung zweier induktiver Signale: Einem sogenannten „short-range“-Signal, welches lokal die Induktion der Bodenplatte entlang der Mittellinie bewirkt und einem „longe-range“-Signal, welches für die Spezifizierung von Motoneuronen und ventralen Interneuronen notwendig ist (Ericson et al., 1996). Zahlreiche Analysen identifizierten Shh als das induktive Signal, welches initial in der Chorda dorsalis und nachfolgend in der Bodenplatte produziert wird (Yamada et al., 1993; Roelink et al., 1994). Genexpressionsanalysen im sich entwickelnden Neuralrohr identifizierten eine Vielzahl von Genen (Transkriptionsfaktoren), die in distinkten Domänen entlang der dorsoventralen Achse des Neuralrohrs exprimiert werden. Der Vergleich dieser Expressionsdomänen mit dem histologischen Wissen über das Neuralrohr legte die Vermutung nahe, dass diese Transkriptionsfaktoren vermutlich die unterschiedlichen Gruppen neuronaler Vorläuferzellen definieren (Ericson et al. 1992; Tsuchida et al., 1994; Burill et al., 1997; Ericson et al., 1997; Liem et al., 1997; Matise und Joyner, 1997). Manipulationsexperimente im Huhn zeigten, dass die Expression dieser Transkriptionsfaktoren abhängig von Shh ist. Die dorsoventrale Restriktion der Expressionsdomänen dieser Transkriptionsfaktoren konnte durch eine veränderte Einwirkung von Shh (Erhöhung und Reduktion) beeinflusst werden (Goulding et al., 1993; Liem et al., 1995; Ericson et al., 1996 und 1997). Zusätzlich zeigte sich, dass diese Beeinflussung in Abhängigkeit der angewandten Shh-Konzentration stattfindet (Ericson et al., 1996 und 1997). Diese und zahlreiche andere Analysen führten zu einem Modell der ventralen Musterbildung, welches sich in drei Schritte unterteilt (Abb.1.6.; Poh et al., 2002): Im ersten Schritt kontrolliert ein Konzentrationsgradient von Shh die Expression der musterbildenden Transkriptionsfaktoren in den neuronalen Vorläuferzellen. Man unterteilt diese Transkriptionsfaktoren in zwei Klassen: Klasse I-Gene inklusive *Pax6*, *Irx3*, *Dbx1* und *Pax7* werden durch unterschiedliche Konzentrationen von Shh inhibiert. Klasse II-Gene inklusive *Nkx2.1*, *Olig2*, *Nkx6.1* und *Nkx6.2* hingegen werden durch unterschiedliche Konzentrationen von Shh aktiviert.

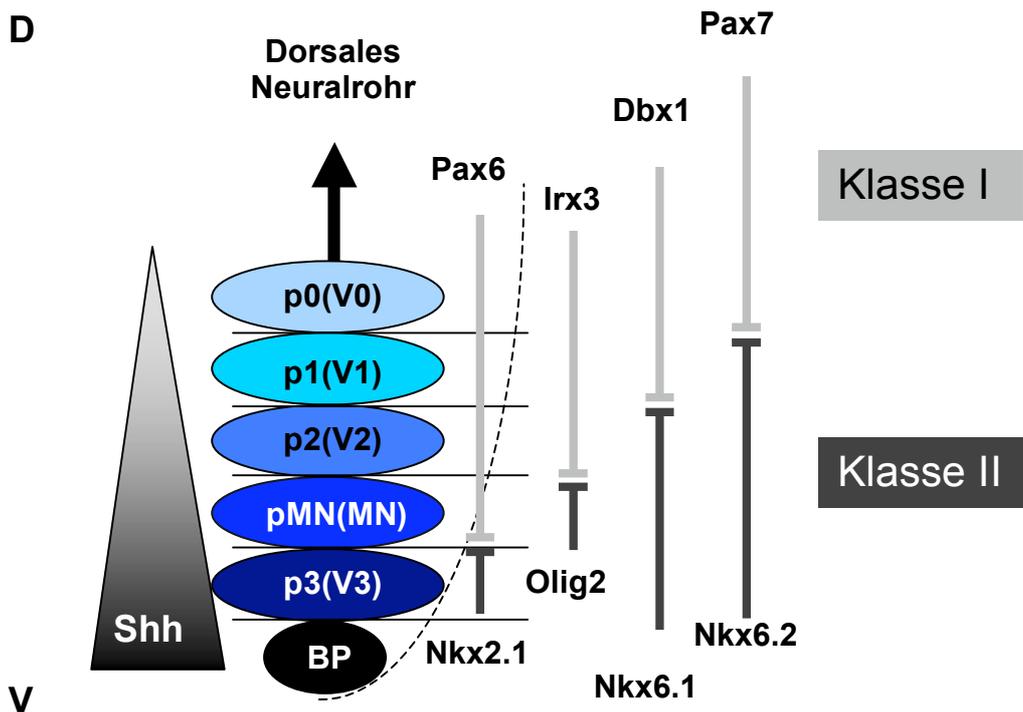


Abb. 1.6: Ventrale Musterbildung im Neuralrohr

Die Musterbildung im ventralen Neuralrohr erfolgt in drei Schritten: Im ersten Schritt bewirkt die Bodenplatte die Ausbildung eines Shh-Gradienten von ventral (V) nach dorsal (D). Innerhalb des Gradienten kommt es zur Aktivierung und Inhibierung musterbildender Transkriptionsfaktoren. Diese werden in zwei Klassen unterteilt: Klasse I-Gene (*Pax6*, *Irx3*, *Dbx1* und *Pax7*) werden durch unterschiedliche Konzentrationen von Shh inhibiert, und Klasse II-Gene (inklusive *Nkx2.1*, *Olig2*, *Nkx6.1* und *Nkx6.2*) werden durch unterschiedliche Konzentrationen von Shh aktiviert. Das resultierende überlappende Expressionsmuster dieser Faktoren definiert fünf unterschiedlich neuronale Vorläuferpopulationen (p): pMN sind die Vorläuferzellen der Motoneuronen (MN) und p0-p3 die Vorläuferpopulationen der ventralen Interneuronen V0-V3. Im zweiten Schritt stabilisieren reziproke Repressionen zwischen den Klasse I- und Klasse II-Genen die Grenzen dieser Vorläuferpopulation. Im dritten Schritt determiniert das Expressionsmuster der Klasse I- und Klasse II-Genen das neuronale Schicksal der Vorläuferpopulationen, durch die Expression spezifischer identitätsgebender Gene. MN exprimieren *Isl1*, V0 exprimieren *Evx1*, V1 exprimieren *En1*, V2 exprimieren *Chx10* und V3 *Sim1*.

Das unterschiedliche Überlappungsmuster der Expressionsdomänen bewerkstelligt die Unterteilung in fünf verschiedene Populationen an Vorläuferzellen: p3 sind die Vorläuferzellen für die ventralen Interneuronen (V)3; pMN sind die Vorläuferzellen der Motoneuronen (MN) und p2, p1 und p0 die Vorläuferzellen der V2-, V1- und V0-Interneuronen. Anschließend sorgen reziproke Repressionen zwischen den Klasse I- und Klasse II-Genen für die Verfeinerung und den Erhalt der etablierten Vorläuferpopulationen. Im letzten Schritt determiniert das Expressionsmuster der Klasse I- und Klasse II-Genen das neuronale Schicksal der Vorläuferzellen und führt zur Spezifizierung der Motoneuronen

(MN) und der verschiedenen ventralen Interneuronen V0-V3. Indikativ für diese Determinierung ist die Expression unterschiedlicher identitätgebender Gene. V3-Interneuronen exprimieren *Sim1*, Motoneuronen hingegen exprimieren unter anderem *Isl1*. Indikativ für V2-Interneuronen ist die Expression von *Chx10*, während V1-Interneuronen durch die Expression von *En1* und V0-Interneuronen durch die Expression von *Evx1* determiniert sind.

1.4 Die Struktur von Zilien und ihre unterschiedlichen Funktionen

Zilien sind hochspezialisierte Strukturen, die in Säugern typischerweise der apikalen Oberfläche der Zellen entwachsen. Obwohl sie nicht durch eine Membran vom Zytoplasma der Zelle getrennt sind, betrachtet man sie mittlerweile als eigenständige Kompartimente. Die Struktur, welche die Zilie vom Zytoplasma der Zelle abgrenzt, ist der Basalkörper (Abb.1.7). Der Basalkörper besitzt neun radial orientierte Mikrotubuli-Triplets, die aus drei Fasern (A-, B- und C-Fasern) aufgebaut sind. Die A- und B-Fasern erstrecken sich noch weiter nach distal und reichen in die sogenannte Transitionszone hinein. Sowohl der Basalkörper als auch die Transitionszone gelten als selektive Barriere zwischen der Zilie und dem Rest der Zelle (Katsanis et al., 2006). Distal der Transitionszone befindet sich das Rückgrat der Zilie, das Axonem (Abb.1.7). Das Axonem besteht im proximalen Bereich aus neun Mikrotubuli-Dublets. Hierbei unterscheidet man zwei Organisationsformen: Besitzen die neun Mikrotubuli-Dublets noch ein zusätzliches zentrales Paar, spricht man von einer 9+2-Struktur. Wenn sie hingegen kein zusätzliches Paar besitzen, spricht man von einem 9+0-Aufbau. Im distalen Bereich des Axonems hingegen, findet man nur neun einzelne Mikrotubuli-Fasern (Dutcher, 2003). Proteine, die für die Zilienstruktur und zilienassoziierte Prozesse notwendig sind, können nicht in der Zilie synthetisiert werden. Sie müssen sowohl in die Zilie als auch innerhalb der Zilienstruktur transportiert werden. Der hochspezialisierte Transport innerhalb der Zilie wird als Intraflagellar-Transport (IFT) bezeichnet. Molekulare Motorproteine, wie Kinesine und Dyneine, bewerkstelligen hierbei in Zusammenarbeit mit sogenannten IFT-Partikeln sowohl den anterograden als auch retrograden Transport entlang des Axonems (Abb.1.7). Detaillierte Analysen zeigten, dass der anterograde Transport nicht nur für die zilienspezifische Lokalisierung zahlreicher Proteine verantwortlich ist, sondern auch für die Zilienassemblierung. Ebenso konnte dem retrograden Transport eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zilienstruktur nachgewiesen werden (Rosenbaum und Witman, 2002). Die Grundstruktur der Zilie ist in der Evolution von den Protisten bis hin zu multizellulären Organismen weitestgehend erhalten geblieben.

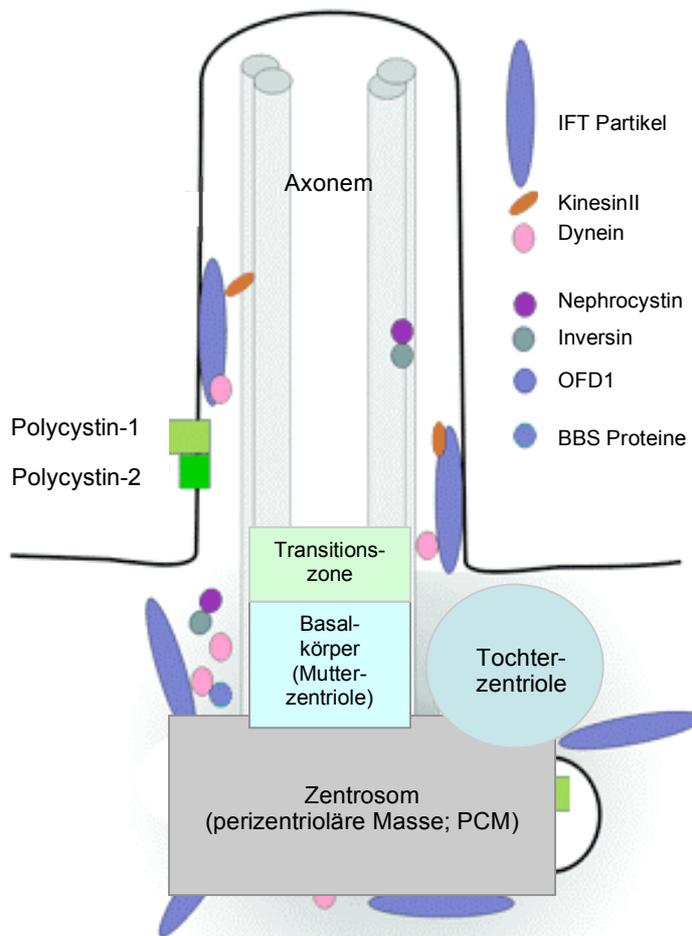


Abb. 1.7: Schematischer Aufbau einer Zilie (abgewandelt aus Pazour, 2004)

Der Grundbaustein für die Assemblierung einer Zilie ist das Zentrosom. Es beinhaltet zwei Zentriolen (Mutter- und Tochterzentriole), wovon die Mutterzentriole den Basalkörper der Zilie ausbildet. Die perizentrioläre Masse (PCM), die sowohl Zentrosom, Basalkörper und Tochterzentriole umgibt, besteht aus einem lockeren Tubulinverband, der eine Vielzahl von Basalkörperproteinen (wie z.B. BBS-Proteine, OFD1, Inversin, Nephrocystin) und IFT-Partikel beinhaltet. Distal vom Basalkörper folgt die Transitionszone und das Axonem (das Rückgrat der Zilie). Die Transitionszone bildet zusammen mit dem Basalkörper eine selektive Barriere zwischen der Zilie und dem Rest der Zelle. Innerhalb der Zilie ermöglichen Kinesine, Dyneine und IFT-Partikel den Transport von Proteinen. Die Zilie wird durch die Plasmamembran der Zelle nach außen abgegrenzt (schwarze Umrandung), in der sich verschiedene Rezeptormoleküle wie z.B. Polycystine (1 und 2) befinden.

Die Anwesenheit von 9+2-Organellen in nahezu allen Eukaryoten lässt die Vermutung zu, dass die 9+2-Struktur die ursprüngliche Form ist und das 9+0-Zilien evolutionär erst später entstanden sind (Cavalier-Smith, 2002; Mitchell, 2004). Lange Zeit glaubte man, dass die Anwesenheit des zentralen Mikrotubuli-Paares entscheidend für die Motilität von Zilien ist. Begründet wurde diese Ansicht durch die Präsenz von 9+2-Zilien in Geweben, in denen motile Zilien nachgewiesen wurden, wie z. B. dem Respirationstrakt und dem Ovidukt. Zusätzlich fand man 9+0-Zilien vornehmlich in Geweben und Strukturen, in denen Zilien sensorische Funktionen zugesprochen wurden, wie z.B. Photorezeptorzellen (Katsanis et al., 2006). Neueste Erkenntnisse zeigten jedoch, dass das zentrale Mikrotubuli-Paar nicht entscheidend für die Motilität von Zilien ist. So weisen motile Zilien, wie z.B. im Knoten der Maus, eine 9+0-Struktur auf. Diese Zilien generieren im Knoten einen nach links gerichteten Flüssigkeitsstrom, der das initiale Ereignis der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie darstellt. Durch diesen Flüssigkeitsstrom wird ein Signal (vermutlich ein Morphogen), auf die linke Seite des Knoten transportiert. Dort aktiviert es anschließend eine Signalkaskade, welche die linke Körperseite determiniert (Nonaka et al., 2002; Hirokawa et al., 2006).

Neben einer Funktion in der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie bewerkstelligen Zilien zudem den Mucus-Transport im Respirationstrakt, und sind an der mechanosensorischen Messung der Flüssigkeitsdurchflussrate in den Nierentubuli beteiligt (Badano et al., 2006). Molekulare und genetische Analysen deuten daraufhin, dass ein Polycystin-Komplex (inklusive Polycystin-1 und Polycystin-2) den Flüssigkeitsstrom innerhalb der Tubuli wahrnimmt und dieses Signal anschließend in Form einer Calcium-Ausschüttung an die Zelle weiterleitet (Hanaoka et al., 2000; Nauli et al., 2003). Zilien können aber ebenso als chemosensorische Antennen agieren. So bestätigte eine Vielzahl von Studien, dass Zilien eine Rolle in der Transduktion extrazellulärer Stimuli innehaben. Diese Stimuli können sowohl chemische Komponenten sein (wie z.B. Alkohole) als auch biologisch aktive Moleküle (Dwyer et al., 1998; Christensen et al., 2003). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die Funktion der Zilie als chemosensorisches Organ in Vertebraten eine unerwartet essentielle Rolle eingenommen hat. Genetische Analysen offenbarten, dass fundamentale Signalkaskaden wie die Hh-Signaltransduktion, die Wnt/Wingless-Signalweiterleitung und die PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor)-Signalübertragung an Zilien gekoppelt sind. So zeigten Mausmutanten, in denen der Intraflagellar-Transport (IFT) beeinträchtigt ist, eine drastische Reduktion der Hh-Signaltransduktion (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). Ebenso zeigen *OFD1* (Oral-Facial-Digital-Type1)-mutante Tiere eine Vielzahl von Missbildungen in Strukturen, in denen die Hh-Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt (Ansley et al., 2003; Stoetzel et al., 2006). Einer Vielzahl von Basalkörperproteinen, wie z.B. Proteine der BBS-Familie und Inversin (Inv), konnte außerdem eine essentielle Rolle für die Wnt-Signaltransduktion nachgewiesen werden (Ross et al., 2005; Simons et al., 2005; Torban et al., 2004). Die Anreicherung von PDGFR α , einer prototypischen Rezeptortyrosinkinase der PDGF-Familie, in den Zilien konfluenter Fibroblastenzellen lieferte das Indiz für die Zilienabhängigkeit der PDGFR-Signaltransduktion (Schneider et al., 2005). Die genaue Wirkungsweise der Zilien in diesen Signalkaskaden ist im Detail bislang kaum verstanden, eröffnet jedoch zahlreiche neue Ansatzpunkte zur Analyse der Signaltransduktion in Vertebraten.

1.5 Fragestellung

Der komplexe Phänotyp *Ft*-mutanter Tiere zeigte, dass ein oder mehrere *Ft*-Gene für entscheidende Prozesse der Embryonalentwicklung notwendig sind. Es blieb jedoch unklar welche Funktion die einzelnen *Ft*-Gene in den betroffenen Strukturen innehaben. Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die Funktion des *Ftm*-Genproduktes zu untersuchen. Eine Grundvoraussetzung hierfür war die Generierung einer *Ftm*-mutanten Mauslinie, welche die Analyse der phänotypischen sowie molekularen Konsequenzen des *Ftm*-Verlustes auf die Embryonalentwicklung ermöglicht. Die Analyse dieser Mauslinie sollte zum einen die Rolle von *Ftm* innerhalb der *Ft*-Mutation klären, und zum anderen die Funktion von *Ftm* während der Embryonalentwicklung aufdecken. Im Falle dass diese Analysen auf eine Beteiligung von *Ftm* an einer bekannten Signaltransduktion hinweisen, sollte eine solche Rolle bestätigt und näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die Lösungen mit Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage angesetzt. Bei Bedarf wurden die Lösungen, Gefäße und Geräte durch Autoklavieren bei 121°C, 2bar für 30min. sterilisiert. Lösungen wurden zudem auch durch Sterilfiltrieren sterilisiert. Die verwendeten Enzyme, Kit-Systeme und Chemikalien in der Qualität *pro analysis* wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia (Buckinghamshire, Großbritannien), Applichem (Darmstadt), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Biorad (München), Clontech (Heidelberg), Dianova (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), GibcoBRL Life Technologies (Karlsruhe), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Kodak (New Haven, USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Riedel-de Hâen (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Schleicher & Schüll (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Stratagene (Heidelberg). Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig, [α^{32} P] dCTP) bezogen.

2.1 Häufig verwendete Lösungen

Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE	-Merck #14277
Chloroform	Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)	
DEPC-H₂O	H ₂ O + 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gelöst; autoklaviert, 121°C; 2 bar; 30min.	
Ethidiumbromid	10mg/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	TE gesättigt
Phenol/Chloroform	3:1; TE gesättigt
Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS
PBS	4mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150mM NaCl pH 7.3 autoklaviert, 121°C, 2bar; 30min.
PBT	PBS +1% (v/v) Tween 20
TAE	40mM Tris/Acetat 2mM EDTA pH 8.2
TE	10mM Tris/HCl 1mM EDTA pH 8.0
Ethanol	70% in H ₂ O
Ethanol	100%

2.2 Bakterienstämme und Nährmedien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Derivate des *E. coli* Stammes K12 verwendet (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Eingesetzte Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Derivat	Verwendung
JM109 (recA1, lacZΔM15)	Standardwirt für konstruierte Plasmide; Klonierungen
BL21 (dcm ompT hsdS (r _B - m _B -) gal)	Standardwirt für Expressionsplasmide; Proteingewinnung

Als Kultivierungsmedien wurden folgende Medien nach Zugabe der entsprechenden Selektionsdroge verwendet:

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; 30min.
Selektionsmedium	50 µg/ml Ampicillin-Applichem #A0839 in LB-Medium

2.3 Vektoren und Oligonukleotide

Die folgenden Tabellen liefern einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Oligonukleotide:

Die in Tabelle 2.2 aufgelisteten Vektoren wurden für die Klonierungen von DNA verwendet.

Tab. 2.2: Verwendete Basisvektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Referenz
pGEM-T	Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pGEX-4T1	Klonierungsvektor zur Generierung von GST-Fusionsproteinen	Amersham

Tabelle 2.3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten klonierten oder amplifizierten Genomfragmente.

Tab. 2.3: Klonierte Genomfragmente

Bezeichnung	Basisvektor	kloniertes Genomfragment	Referenz
pFtm-GST	pGEX-4T1	Ftm: ~ 870bp großes PCR-Produkt (Primerpaar RID-for – RID-rev)	diese Arbeit
p1.3	pGEM-T	Ftm: ~ 980bp großes PCR-Produkt (Primerpaar F2-B2)	J. Vierkotten (2001); diese Arbeit

In der Tabelle 2.4 sind die verwendeten Oligonukleotide („Primer“) aufgeführt.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

<i>Gen/Verwendung</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>
<i>Ftm/</i> Genotypisierung	Ftm-for	GGCTCCCCTTTGTCAT
	Ftm-rev	CAGCTTTCCTTGTGTCTCTACTT
	Neo-for1	ACGAGTTCTTCTGAGGGGATC
<i>Ftm/</i> 5'Sonde	Ftm-F2	TGGAGTGCAGTGGAGAAAGATGCC
	Ftm-B2	GCTGATGCCAAACCAAACCTGGTC
<i>Shh/</i> Genotypisierung	Shh-1	GACCATGTCTGCACACTTAGGTTCC
	Shh-2	GAAGGCCAGGAGGAGAAGGCTCAC
	Shh-rev	CGCCCCCTCCCTATTTGCTAG
	Neo-for2	GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
<i>Gli3/</i> Genotypisierung	Xt-for	ACCCAGCAGGAGACTCAGA
	Xt-rev	AAACCCGTGGCTCAGGACAAG
	Neo-for2	GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
<i>Ftm/</i> Ftm-GST-Fusion	RID-for	AATGAATTCTGGGGGAAATGCAACAAGGGAAAGA
	RID-rev	AATGTCGACGGATAGAAAAATAAACAAACACAA
<i>Hprt/</i> Hprt-Standard	Hprt-for	CACAGGACTAGAACACCTGC
	Hprt-rev	GCTGGTGAAAAGGACCTC
<i>Ptc1/</i> Ptc1-Expression	Ptc1-for	CCAAAAGAAGAAGGCGCTAATGTT
	Ptc1-rev	AATCTGGGTCTGGCTGGGTTGA
<i>Gli1/</i> Gli1-Expression	Gli1-for	AGGTTGGGATGAAGAAGCAGTTGG
	Gli1-rev	GCCCGGAGATGTACAGCGAGAGTT

2.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials und der diversen späteren Verwendungszwecke wurden verschiedene Protokolle für die Isolierung von DNA angewendet.

2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Beide der hier beschriebenen Methoden gründen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979; Birnboim et al. 1983).

2.4.1.1 Plasmid-Mini-Isolation

Zuerst wurden 2ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert. 1,5ml dieser Übernachtskultur wurden anschließend abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Danach wurde die Kultur abzentrifugiert (3min.; 6000 Upm; Heraeus Biofuge 13) und das Bakteriensediment in 100µl kalter Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden die resuspendierten Bakterienzellen mit 200µl Lösung II alkalisch lysiert und in 150µl Lösung III neutralisiert. Der entstandene Niederschlag, bestehend aus Proteinen und Zellresten, wurde abzentrifugiert (10min.; 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13) und der klare plasmidhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Präzipitation der Nukleinsäuren wurde durch Zugabe von 1ml Ethanol (abs.), anschließender 20minütiger Inkubation bei –20°C und erneuter Zentrifugation (10min.; 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13) erzielt. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Nukleinsäure-Niederschlag mit 500µl Ethanol (70%ig) gewaschen und abermals zentrifugiert (5min.; 13000 Upm; Heraeus Biofuge 13). Das Zentrifugat wurde nach Absaugen des Überstandes kurz an der Luft getrocknet und in 25µl TE aufgenommen. Hiervon wurden 5µl für die folgende Analyse mittels Restriktionsspaltungen (siehe 2.5.1) eingesetzt und die Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch (siehe 2.5.3) aufgetrennt.

Lösung I	25mM Tris/HCl 10mM EDTA 100mg/ml RNase A pH 8,0
Lösung II	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III	294,5 g Kaliumacetat 110ml Eisessig auf 1l H ₂ O pH 5,5

2.4.1.2 Plasmid-Maxi-Isolation

Größere Mengen Plasmid-DNA (100µg – 1mg) wurden mit Hilfe des „QIAGEN-Plasmid-Kit“ („Maxi“ bis 500 µg – QIAGEN GmbH #12163) isoliert.

Zunächst wurde mit einem Teil der zuvor analysierten und aufgehobenen Übernachtskultur aus der „Mini-Plasmidisolation“ eine 100ml Kultur angeimpft. Diese wurde über Nacht auf einem Plattformschüttler (120 Upm) bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben. Danach wurde die an der Luft getrocknete Plasmid-DNA in einem angemessenen Volumen TE aufgenommen. Abschließend

wurde die DNA spektralphotometrisch quantifiziert (siehe 2.4.4) und zur Qualitätsüberprüfung restriktionsenzymatisch (siehe 2.4.6.1) und gelelektrophoretisch (siehe 2.5.3) analysiert.

2.4.2 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen

2.4.2.1 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellsuspensionen

Um DNA in größeren Mengen aus den ES-Zellen zu gewinnen, wurden diese zunächst bis zum Erreichen der Konfluenz auf 100mm-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 2.16.2.2), abzentrifugiert und in 500µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5ml Lysepuffer I und 60µl Proteinase K wurde die Suspension über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.4.4) mit anschließender Ethanol-Fällung. Der durch die Ethanol-Fällung entstandene voluminöse Niederschlag wurde an einer Pasteur-Pipette aufgewickelt, in 70%igem Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Die so gewonnene genomische DNA wurde abschließend in 300-500µl TE aufgenommen und konnte direkt in weiterführende Analysen eingesetzt werden .

Lysepuffer I	50mM Tris/HCl, pH 8 100mM EDTA, pH 8 100mM NaCl 0,5% (w/v) SDS
---------------------	---

Proteinase K 10mg/ml	Roche #1000144
-----------------------------	----------------

2.4.2.2 DNA Mikroextraktion aus 96-Loch Platten

Um die ES-Zell-DNA aus den 96-Loch-Platten isolieren zu können, wurde ein modifiziertes Protokoll von Ramires-Solis et al. 1992 verwendet.

Zunächst wurden die in den 96-Loch-Platten befindlichen ES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die ES-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 50µl Lysepuffer II pro Loch über Nacht bei 65°C in einer feuchten Kammer lysiert. Am nächsten Tag wurden die Platten zur DNA-Präzipitation mit 100µl eiskalter NaCl/Ethanol-Lösung pro Loch versetzt und 30min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet, die DNA jeweils dreimal mit 70%igen Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Die DNA wurde in 19µl 0,5fach TE resuspendiert, restriktionsenzymatisch gespalten (siehe 2.5.1) und für die Analysen per Filterhybridisierungen eingesetzt (siehe 2.6).

Lysepuffer II	10mM Tris/HCl, pH 8 10mM EDTA, pH 8 10mM NaCl 0,5% (w/v) Sarcosyl-Fluka #61743
NaCl/Ethanol	10ml Ethanol abs. + 150µl 5 M NaCl

2.4.3 Isolierung von DNA aus embryonalen Membranen

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

Lysepuffer	50mM Tris/HCl, pH 8.0 100mM EDTA, pH 8.0 100mM NaCl 1% (w/v) SDS
Proteinase K 10mg/ml	Roche #1000144

Gesättigte Kochsalzlösung
Isopropanol

2.4.4 Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung

Um die DNA in einer möglichst hohen Qualität zu erhalten, wurde genomische DNA, wenn möglich, mit Phenol/Chloroform aufgereinigt bzw. extrahiert. Hierzu wurde der DNA-Lösung 1 Volumen Phenol hinzugefügt. Die Phasen wurden 3min. lang durch Invertieren gemischt und anschließend zur Beschleunigung der Phasentrennung 5min. (3000 Upm, Heraeus 1.0 R) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase sowie die proteinhaltige Interphase

verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde anschließend mit einer 1:1-Lösung Phenol/Chloroform durchgeführt und abschließend nur mit Chloroform. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde zur Präzipitation mit 0,1 Volumen 3M NaAcetat und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt. Die so gewonnene DNA wurde daraufhin in 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in einem angemessenen Volumen TE aufgenommen.

2.4.5 RNA-Isolierung aus Embryonen und kultivierten Zellen

Frisches oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagertes Material wurde gewogen und mit 1ml TRIZOL-Reagenz pro 100mg Gewebe versetzt. Die Proben wurden im Polytron (Stufe 4, Kinematica AG, Luzern) homogenisiert und entsprechend den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Bei kultivierten Zellen wurde 1ml TRIZOL-Reagenz pro 10cm² der Kulturschalen verwendet und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Danach folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (siehe 2.4.4). Das RNA-Sediment wurde 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.

TRIZOL-Reagenz GibcoBRL #15596

Chloroform
Isopropanol

2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

2.4.6.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäuren DNA und RNA weisen innerhalb ihres Absorptionsspektrums ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm auf. Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann daher durch die Messung der Absorption bei 260nm in einem Spektralphotometer bestimmt werden. Die Messung der Extinktion E_{260} von Nukleinsäurelösungen gegen die entsprechenden Pufferlösungen in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm entspricht dabei folgenden Konzentrationen:

$1E_{260}$ doppelsträngige DNA = 50 $\mu\text{g/ml}$

$1E_{260}$ RNA oder einzelsträngige DNA = 40 $\mu\text{g/ml}$.

Der Grad der Verunreinigung der gemessenen Nukleinsäurelösung durch Proteine kann ebenfalls mit Hilfe dieser Methode festgestellt werden. Dabei sollte in gering verunreinigten Proben das Verhältnis E_{260}/E_{280} einem Wert von 1.8 bis 2.0 entsprechen.

2.4.6.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Eine Möglichkeit geringe Mengen an DNA (bis zu 5ng) zu quantifizieren bietet das Agarosegel. Hierzu wurde die zu bestimmende DNA-Lösung und eine DNA-Lösung mit bekannter Konzentration (Mengenreferenz) in einer Verdünnungsreihe auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.5.3). Als Mengenreferenz wurde einer der DNA-Längenstandards verwendet, so dass anhand eines Vergleichs der Bandenintensität die Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung abgeschätzt werden konnte.

2.5 Klonierungstechniken

2.5.1 Sequenzspezifische DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

In der Regel wurden die Restriktionsenzyme mit ihrem jeweiligen Reaktionspuffer und unter dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. Hierbei wurde in einem Standardreaktionsansatz bis zu 5µg DNA mit einer Enzymaktivität von 10 U innerhalb einer Stunde bei 37°C gespalten. Inkubiert wurde je nach eingesetzter DNA-Menge entweder in 20µl oder 50µl Gesamtvolumen. Nach der restriktionsenzymatischen Spaltung wurde der gesamte oder ein Teil des Reaktionsansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.3). Linearisierte Plasmide oder DNA-Fragmente wurden anschließend aus den Agarosegelen isoliert (siehe 2.5.4.).

2.5.2 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 1µl der alkalischen Phosphatase zugesetzt und für 30min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und darauf folgender Ethanol-Fällung

(siehe 2.4.4) oder durch eine Gelelektrophorese (siehe 2.5.3) und anschließender Gelextraktion (siehe 2.5.4) inaktiviert und gleichzeitig die DNA aufgereinigt.

2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Diese Methode beruht auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren innerhalb eines Agarosegels unter der Wirkung eines elektrischen Feldes. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt hierbei in Abhängigkeit der angelegten Spannung, der Molekülmasse, der Konzentration des verwendeten Agarosegels sowie der Pufferzusammensetzung. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuremoleküle wurde mit Gelen der Konzentrationen 0,8-2,0% gearbeitet. Als Gel- sowie Laufpuffer diente das TAE-Puffersystem. Je nach gewünschter Konzentration des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Anschließend wurde die Gellösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Interkalation in doppelsträngige DNA eine spätere Detektion dieser unter UV-Bestrahlung (254 nm) möglich macht. Dann konnte die fertige Gellösung in den vorbereiteten Gelträger gegossen werden. Nach dem Erkalten konnten die zu analysierenden Proben, die zuvor mit 0,2 Volumenteile DNA-Auftragspuffer versetzt wurden, auf das Gel geladen werden.

Zur späteren Größen- und Mengenabschätzung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden, ebenfalls mit DNA-Auftragspuffer versetzte, Längenstandards 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 -HindIII :

23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 bp
(Stratagene #201109)

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

2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche #1732676) isoliert. Das Prinzip dieses Kitsystems beruht auf der Bindung von DNA an der Oberfläche einer Kieselerdemembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Das aufzureinigende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell möglichst exakt unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert. Zum Schluss wird die isolierte DNA mit 50-100µl des mitgelieferten Elutionspuffers aus den Filtereinsätzen eluiert. Die Qualität und Konzentration der so erhaltenen DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5.3) überprüft.

2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Restriktionsfragmenten mit kohäsiven Enden mit entsprechenden Plasmidvektoren wurde mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 durchgeführt. Die Ligation wurde in einem 30µl Standardansatz durchgeführt, der 3µl 10X Ligasepuffer (GibcoBRL) und 2µl T4-Ligase (5U/µl, GibcoBRL) enthielt. Aufgereinigtes Plasmid und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 eingesetzt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 12 bis 16 Stunden bei 16°C. Im Anschluss wurde die eine Hälfte des Ligationsansatzes direkt für die Transformation von kompetenten Bakterienzellen (siehe 2.5.5) verwendet werden, die andere Hälfte konnte bei 4°C gelagert werden.

2.5.5 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

2.5.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen der Bakterienstämme JM 109 und BL21 erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990), wobei eine Steigerung der DNA-Aufnahmefähigkeit der Bakterienzellen (Kompetenz) durch die Behandlung mit einer eisgekühlten Salzlösung bewirkt wird.

Als erstes impft man mit einer Einzelkolonie eine 20ml-Vorkultur aus LB-Medium an. Diese Vorkultur wird über Nacht unter Schütteln auf einem Plattformschüttler (120 Upm) bei 37°C inkubiert und dient anschließend als Innokulum für eine 250ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Diese Hauptkultur wurde bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 0,93$

inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension für 10min. auf Eis inkubiert, 10min. bei 2500 x g (Heraeus, Megafuge 1.0R) und 4°C zentrifugiert und das Bakteriensediment in 80ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterienzellen in 20ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, mit DMSO (Final 7% (v/v)) versetzt und für weitere 10min. auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Bakterienzellen in 200µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

TB-Puffer 10mM PIPES
 55mM MnCl₂
 15mM CaCl₂
 250mM KCl
 pH 6,7

SOB-Medium 2% (w/v) Trypton-Applichem # A1553
 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt-Applichem # A1552
 10mM NaCl
 2,5mM KCl
 10mM MgCl₂
 10mM MgSO₄
 pH 6-7-7

2.5.5.2 Transformation

Um beliebige Plasmid-DNA in die kompetenten Bakterienwirtszellen (JM109 und BL21) einzuschleusen, wurden diese einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt. Dieser Vorgang, den man Transformation nennt, ermöglicht die Vermehrung eingeführter DNA mit Hilfe der bakterieninternen Replikationsmaschinerie.

Zur Transformation wurde ein 200µl-Aliquot, der bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterienzellen, zügig aufgetaut und mit der Plasmid-DNA (20-100ng) 15min. auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock von 45sec. bei 42°C wurde die Bakteriensuspension mit 800µl LB-Medium versetzt und für 45min. bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (3min.; 6000 Upm; Heraeus Biofuge 13) und das Bakteriensediment in 100µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension, unter Berücksichtigung der Antibiotika-Resistenz des transformierten Plasmids, auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die Zellkolonien für das Animpfen von primären Flüssigkulturen verwendet werden. Diese dienen der Analyse der Plasmid-DNA und dem späteren Animpfen größerer Flüssigkulturen, die zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA benötigt wurden (siehe 2.4.1).

Nährböden	1,5% (w/v) Bacto-Agar-Applichem #A0949 50 µg/ml Ampicillin-Applichem #A0839 80 µg/ml X-Gal-Applichem #A1007 0,2mM IPTG-Applichem #A1008 in LB-Medium
------------------	--

2.6 Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen (Hybridisierungstechniken)

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode ist eine Modifikation der Verfahren nach Southern (1975) sowie Church und Gilbert (1984). Hierbei werden gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Trägermembran übertragen, fixiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Aufgrund der sequenzspezifischen Hybridisierung dieser Sonden, können spezifisch DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe und Menge dargestellt werden.

2.6.1 Transfer von DNA-Fragmenten (Southern Blot)

Die zu analysierende DNA wurde zunächst über Nacht bei 37°C restriktionsenzymatisch gespalten (siehe 2.5.1) und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.5.3). Hiernach wurde das Gel dokumentiert und die DNA durch UV-Strahlung 90sec. lang „genickt“, d.h. sie wurde in leichter transferierbare, kleinere Fragmente gespalten. Das Gel wurde im Anschluß 2 mal 20min. in Transferpuffer alkalisch denaturiert und die DNA durch den in Abb. 1.3 dargestellten „Blot“ auf eine Nylonmembran transferiert (Applichem #RPN 3050S). Die verwendeten Filterpapiere (Whatmanpapiere) wurden zuvor in Transferlösung äquilibriert, die Nylonmembran zunächst in destilliertem Wasser und anschließend ebenfalls in Transferpuffer. Nach einem alkalischen Kapillartransfer von mindestens 4 Stunden wurde die Nylonmembran 20min. in Neutralisierungslösung inkubiert und zur DNA-Fixierung 1 Stunde bei 80°C in einem Ofen gebacken.

Transferlösung	0,4M NaOH 0,6M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5M Tris pH 7,0 1,0M NaCl

2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „Prime-It II Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene #300385). Mit diesem Kitsystem werden die radioaktiven Sonden nach dem „random priming“-Verfahren hergestellt. Hierbei erfolgt die Synthese der DNA-Fragmente, die als Matrize dienen, durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I unter Verwendung von Oligonukleotiden (Hexamere) mit statistisch verteilter Basenabfolge. Die Markierung erfolgt hierbei durch den Einbau von radioaktiven dNTPs. Hierzu wurden 25-50ng DNA-Fragment sowie 50 μCi [α - ^{32}P]dCTP (10mCi/ml) in einem den Herstellerangaben entsprechenden Reaktionsansatz eingesetzt. Die DNA wurde hierfür zunächst für 5min. denaturiert und nach Zugabe der Oligonukleotide, der dNTPs, des [α - ^{32}P]dCTP und dem Klenow-Fragment wurde der gesamte Ansatz 30min. bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte der Ansatz für die Filterhybridisierungen (siehe 2.6.3) eingesetzt werden.

2.6.3 Southern-Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zunächst zwischen zwei Plastiknetze gerollt und in einem verschließbaren Hybridisierungsglasrohr mit 2xSSC angefeuchtet. Anschließend wurden 500 μl Heringssperm-DNA in 1ml destilliertem Wasser bei 100°C denaturiert und zu 50ml Prähybridisierungslösung (vorgewärmt auf 65°C) hinzugefügt. Die Membran wurde anschließend mit 50ml des fertigen Prähybridisierungsmix versetzt und 1 bis 2 Stunden bei 65°C in einem Rollofen inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die radioaktive Sonde mit 500 μl Heringssperm-DNA und 1ml destilliertem Wasser versetzt und 5min. bei 100°C denaturiert. Nach Zugabe von 40ml Hybridisierungslösung wurde der fertige Hybridisierungsmix auf die Membran gegeben und über Nacht bei 65°C in einem Rollofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zum Entfernen der unspezifisch oder nicht-gebundenen radioaktiven Sonde nach folgenden Schema gewaschen:

5min.; Waschlösung I; Raumtemperatur

30min.; Waschlösung I; 65°C im Rollofen

30min.; Waschlösung II; 65°C im Rollofen

30min.; Waschlösung II; 65°C im Wasserbad-Schüttler

Um ein Austrocknen zu verhindern wurde die Membran anschließend in Plastikfolie eingeschweißt und für 24 bis 48 Stunden auf einer Bildplatte (BAS-IP MS 2025, Fuji) exponiert. Die Auswertung der Bildplatten erfolgte an einem computergestützten Lesegerät (Fluorescent Image Analyzer FLA-3000, Fuji).

Hybridisierungslösung / Prähybridisierungslösung	1M NaCl 50mM Tris-HCl pH 8,0 1% SDS 10% Dextran-Sulfat / (nicht in der Prähybridisierungslösung enthalten)
Hybridisierungsmix / Prähybridisierungsmix	40ml Hybridisierungslösung / 50ml Prähybridisierungslösung 500µl Heringssperm-DNA 1ml destilliertes Wasser radioaktive Sonde / (nicht im Prähybridisierungsmix enthalten)
Waschlösung I/II	2x SSC/0,5x SSC
2xSSC	1% SDS 0,3M NaCl 30mM NaCitrat pH7
Heringssperm-DNA (5mg/ml)	

2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR ist die *in vitro*-Vermehrung (Amplifikation) eines ausgewählten DNA-Fragmentes möglich. Dabei wird das zu amplifizierende Fragment durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) definiert, die an entgegengesetzten Seiten der Matrizen-DNA hybridisieren. Die Synthese des DNA-Fragmentes, die zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes führt, erfolgt mit einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase.

2.7.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermozykler (Primus 25) der Firma MWG durchgeführt. Alle Reaktionen wurden auf Eis angesetzt wobei dünnwandige 0,2ml-Reaktionsgefäße verwendet wurden. Die Einzelkomponenten wurden in folgendem 50µl-Standardreaktionsansatz eingesetzt:

2µl Vorwärts-Primer (10µM)
 2µl Rückwärts-Primer (10µM)
 1µl dNTP-Mix (10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dGTP, 10mM dCTP)
 5µl 10x-Reaktionspuffer (100mM Tris/HCL, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH 8.3)
 0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl)
 1µl DNA (ca. 500ng genomische DNA)
 38,5µl ddH₂O

Im Thermozykler erfolgte die PCR-Reaktion nach dem in Tabelle 2.5 beschriebenen Standardprogramm. Für die in Tabelle 2.4 und beschriebenen Oligonukleotide wurde ohne Ausnahme eine Primerhybridisierungs-Temperatur von 56°C gewählt.

Tab. 2.5: Standardprogramm für PCR-Reaktionen

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Vorgang</i>
94°C	2min.	Hitzenaturierung der DNA
94°C	30sec.	Hitzenaturierung der DNA
52-60°C (je nach Primerpaar)	30sec.	Hybridisierung der Primer
72°C	1min.	DNA-Synthese
72°C	7min.	finale DNA-Synthese
4°C	-	Reaktionsende

25-35x

Die hergestellten PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe 2.7.2) und anschließend in den pGEM-T Vektor (siehe 2.3) kloniert.

2.7.2 Reinigung von PCR-Produkten

Nach erfolgreicher PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.5.3). Anschließend wurde das PCR-Produkt aus dem Gel isoliert und in einer adäquaten Menge Elutionspuffer aufgenommen (siehe 2.5.4).

2.7.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das „Expand Reverse Transcriptase“-System (Roche#1785834) verwendet. Es wurden 100ng bis 2µg Gesamt-RNA und 25pmol *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 (siehe 2.7) wurde 1µl des 20µl-Ansatzes verwendet.

2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von in der PCR (siehe 2.7) 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.

2.9 *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.

2.9.1 „Whole-mount“ *in situ*-Hybridisierung (WISH)

Die Transkripte wurden im gesamten Embryo mittels einer „Whole-mount“ *in situ*-Hybridisierung oder per *in situ*-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten nachgewiesen. Dazu wurden folgende *in situ*-Hybridisierungssonden hergestellt

Tab. 2.6: *In situ*-Hybridisierungssonden

<i>Probe</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>RNA-Polymerase</i>	<i>Nummer im Plasmidstock *</i>
Irx3	HindIII	T7	299
Irx1	Bgl II	T3	165
Foxa2	Asp700	T7	113
Shh	HindIII	T3	29
Lmx1b	EcoRI	T3	118
Ptc1	NcoI	T3	228
Leftb	XhoI	T3	75
Pitx2	XbaI	T7	291

* Interne Numerierung des Plasmidbestandes am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.9.2 Synthese der komplementärer RNA-Sonden

Pro 20µl Ansatz wurden circa 1µg des zuvor linearisierten Plasmids, 2µl 10x Transkriptionspuffer (Roche #1465384), 2µl 10x DIG-Nukleotidmix (Roche #1277073), 1µl RNase Block, 2µl 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 2,5µl LiCl (4 M), 2µl EDTA (0,5 M) und 75µl Ethanol (abs.) zur Fällung der RNA zugegeben, durchmischt und für 30min. bei -20°C inkubiert. In Folge wurde der Ansatz zentrifugiert (10min.; 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 60µl 50% Formamid aufgenommen. Ein Aliquot der RNA-Sonde wurde gelelektrophoretisch (siehe 2.5.3) überprüft, der Rest konnte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.9.3 Vorbehandlung der Embryonen und Hybridisierung

Nach der Präparation der Embryonen (siehe 2.17.2) wurden sie kurz in PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Am folgenden Tag wurden sie für jeweils 10min. 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 10min. 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 10-20min. 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 5min. in PBT gewaschen und dann 20min. 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 (~1µg/ml) Hybridisierungsmix ausgetauscht und über Nacht bei 65°C inkubiert.

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

2.9.4 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 30min. mit Hybridisierungsmix, zweimal für 30min. mit Lösung I und einmal für 20min. mit Lösung I/MABT gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten mit vorgewärmten Lösungen bei 65°C. Im Anschluss wurde zweimal für 10min. mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen, bevor die Embryonen zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 2 bis 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.

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

Lösung I/MABT	50% (v/v) Lösung I 50% (v/v) MABT
----------------------	--------------------------------------

2.9.5 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 Waschschrte für jeweils 30min. mit NTMT und schließlich die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers. Die Färbereaktion musste beobachtet 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.

MABT	100mM Maleinsäure, pH 7.5 150mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X	
NTMT	100mM NaCl 100mM Tris/HCl, pH 9.5 50mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Tween-20 0,2mg/ml Levamisole	-Sigma #L9756
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP In NTMT	-Roche #1681451

2.9.5 *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 komplementärer RNA-Sonden möglich, die Expression mehrerer Gene, auf aufeinander folgenden Schnitten eines Präparates, zu analysieren.

Nach der Herstellung der Paraffindünnschnitte (siehe 2.11.1) wurde zunächst das Paraffin von den Präparaten entfernt. Dies geschah durch folgende Inkubationsschritte:

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

Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde nochmals 5min. in PBS gewaschen, für 15min. bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase genau 5min. in Glycin inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte für jeweils 5min. in PBS und eine Nachfixierung der Präparate für 20min. bei Raumtemperatur in PFA/Glutaraldehyd. Nach zweimaligem Waschen für je 5min. 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 10min. bei Raumtemperatur mit PBT gewaschen, zweimal für 15min. in 50% Formamid/2xSSC bei 65°C inkubiert und nochmals zweimal für 10min. in PBT gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit B-Blocklösung, 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 10min. mit PBT gewaschen, zweimal für 10min. 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:

<i>2 x 10sec.</i>	<i>H₂O bidest</i>
<i>jeweils 10sec.</i>	<i>50%, 70%, 90%, 96%, Ethanol</i>
<i>2 x 10sec.</i>	<i>Ethanol abs.</i>
<i>1min.</i>	<i>Xylol/Ethanol</i>
<i>3 x 5min.</i>	<i>Xylol</i>

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

Xylol/Ethanol	50% (v/v) Ethanol abs. 50% (v/v) Xylol
----------------------	---

Proteinase K

Glycin**PFA/Glutaraldehyd**

Hybridisierungsmix	2,5ml Formamid 1,25ml 20x SSC 50mg Blockreagenz 295ml bidestiliertes Wasser bei 65°C lösen 50µl 0,5 M EDTA 5µl Tween-20 50µl CHAPS (10%) 100µl Heparin (1mg/ml) 500µl Hefe – tRNA (10mg/ml)	-Roche #1096176
B-Blocklösung	2% Blockreagenz 10% Ziegenserum in PBT	-Roche #1096176
NTM	100mM Tris/HCl pH 9.5 100mM NaCl 50mM MgCl ₂	
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP In NTMT	-Roche #1681451
Entellan		-Merck #1.07961.0500

2.10 Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten und fixierten Zellen

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 waren an die benutzen Zweitantikörper verschiedene Fluorochrome, welche bei Anregung durch unterschiedliche Wellenlängen des UV-Lichtes fluoreszieren, gekoppelt.

2.10.1 Präparation und Fixierung der Embryonen

Die Embryonen wurden zum gewünschten Zeitpunkt wie in (2.17.2) beschrieben präpariert und für 1 bis 1^{1/2} 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.

2.10.2 Antikörperfärbung auf Kryostatschnitten

Die Präparate wurden auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet (ImmEdge Pen) und in einer Glasgondel für 10min. in PBT inkubiert. Im Anschluss 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 10min. in PBT in einer Glasgondel gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation des zweiten Antikörpers direkt auf den Objektträgern für mindestens 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Es folgten zwei finale Waschschrte für je 10min. 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.

Tab. 2.7: Verwendete Erstantikörper

<i>Name</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Bestellnummer</i>
Chx10	1:1000	J. Ericson	
Evx1	1:100	DSHB	99.1-3A2
Foxa2	1:200	DSHB	Foxa2
Irx3	1:5000	J. Briscoe	
MNR2	1:100	DSHB	81.5C10
Nkx2.1	1:100	DSHB	74.5A5
Pax2	1:200	Zymed	71-6000
Pax6	1:50	DSHB	Pax6
Shh	1:100	DSHB	5E1
acetyliertes-α-Tubulin	1:1000	Sigma	T6793
γ-Tubulin	1:1000	Sigma	T6557
Ftm	1:200	EMT*	-

* Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

Tab. 2.8: Verwendete Zweitantikörper

<i>Name</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Bestellnummer</i>
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-conjugiert Esel anti-Meerschweinchen	1:200	Dianova	706-165-148
Cy TM 3-conjugiert Esel anti-Ziege	1:200	Dianova	705-165-147
HRPO-conjugiert Ziege anti-Kaninchen IgG	1:20.000	Dianova	111-035-003

Mowiol 5g Mowiol in 20ml PBS lösen (Rühren, ü/N)
+ 10ml Glycerin (Rühren, ü/N)
15min. 12.000 rpm (Beckmann Zentrifuge J2-21), aliquotieren

2.10.3 Antikörperfärbung auf fixierten Zellen

Für die Antikörperfärbungen wurden die Zellen direkt auf Deckgläsern kultiviert, die vor dem Aussähen der Zellen in die 6cm-Zellkulturschalen gelegt worden sind. Die folgenden Schritte wurden vollständig innerhalb der Zellkulturschale durchgeführt. Zunächst wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen 3x1min. mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1h bei 4°C in 4%PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBT erfolgte eine 10 minütige Inkubation in Blockierlösung. Nach dem Abnehmen der Blockierlösung wurden ca. 200µl des ersten Antikörpers, welcher zuvor in Blockierlösung verdünnt wurde, auf die Deckgläser pipettiert für 2h 4°C inkubiert. Anschließend wurde der erste Antikörper vorsichtig zur weiteren Anwendung eingesammelt und die Zellen 5x für je 1min. in PBT gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörpers für mindesten 1h bei Raumtemperatur (im Dunkeln). Es folgten drei finale Waschschrte für je 1min. in PBT bevor die Deckgläser mit DAPI-versetztem Mowiol (eine Spatelspitze DAPI pro ml Mowiol) eingedeckelt werden konnten. Nachdem das Eindeckelmedium angetrocknet war, wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

Mowiol 5g Mowiol in 20ml PBS lösen (Rühren, ü/N)
+ 10ml Glycerin (Rühren, ü/N)
15min. 12.000 rpm (Beckmann Zentrifuge J2-21), aliquotieren

DAPI -Merck #1.24653

2.11 Histologische Techniken

2.11.1 Paraffindünnschnitte

Zur Herstellung von Paraffindünnschnitten wurden die Embryonen je nach Entwicklungsstadium 2 bis 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 14µm 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 (30-60min. 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.

2.11.2 Kryostatschnitte

Nach Fixierung und Gefrieren der Embryonen (siehe 2.17) wurden die 12 bis 16µm dicken Gefrierdünnschnitte auf einem Kryostat (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.

2.12 Isolierung von Proteinen

Der Lysepuffer wurde unmittelbar vor der Präparation frisch angesetzt. Alle Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C soweit nicht anders angegeben. Die frisch isolierten Embryonen wurden in Lysepuffer überführt und im Homogenisator (Kinematica AG, Luzern) zerkleinert. Das gewonnene Lysat konnte anschließend direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Lysepuffer	50mM HEPES pH 7,3 150mM KCl 4mM MgCl ₂ Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10ml)
-------------------	--

2.13 Westernblotanalysen

Das Western Blotting bezeichnet den Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran mit anschließender Immundetektion.

2.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die vertikale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wird zur Auftrennung von Protein-Gemischen verwendet. Um Proteine mit einem Molekulargewicht von 50 bis 300 kDa optimal aufzutrennen, werden 8 %ige Gele benutzt, zur Auftrennung von Proteinen zwischen 20 und 120 kDa 12 %ige Gele. Die Protein-Gemische werden mit einer entsprechenden Menge an Laemmlipuffer versetzt und 5min. bei 94°C denaturiert, wobei gleichzeitig die Disulfidbrücken der Proteine durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol und DTT reduziert werden. Nach dem Auftragen der Proben werden die Proteine im weitporigen Sammelgel konzentriert (ca. 20min. bei 20V). Anschließend werden die Proteine im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt (1-2h bei 35V). Als Längenstandard wurde ein Rainbowmarker (Amersham) verwendet.

Sammelgel für 10ml	6ml H ₂ O 2,5ml Sammelgelpuffer 1,5ml Acrylamidlösung 10 μ l TEMED 100 μ l 10% APS
Trenngel für 20ml	8,3ml H ₂ O 5ml Sammelgelpuffer 6,7ml Acrylamidlösung 15 μ l TEMED 80 μ l 10% APS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8,8
Acrylamidlösung	29,2 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid
Elektrophoresepuffer	25mM Tris 190mM Glycin 0,1 % SDS

Laemmlipuffer	5ml 1 M Tris; 5ml Glycerol; pH 6,8 1 g SDS; 250µl 1% Bromphenolblau 0,5 M Dithiotreitol (DTT)
----------------------	---

2.13.2 Proteintransfer („Blotten“)

Mit der Methode des Western-Blottings werden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PolyVDF-Membran übertragen. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgt durch Elektroblothing. Die PVDF-Membran und das daraufliegende Acrylamidgel wurden zwischen Lagen von Wattmanpapier (zu beiden Seiten jeweils neun) in die Blotapparatur gelegt. Die unteren Lagen des Wattmanpapiers wurden vorher in Anodenpuffer getränkt (die untersten drei in Anodenpuffer I, die anderen sechs in Anodenpuffer II) und die oberen in Kathodenpuffer. Dies ermöglicht die Leitung des Stroms innerhalb der Apparatur und einen optimalen Proteintransfer. Das „Blotten“ erfolgte anschließend für eine Stunde bei 120 mA (Bio-Rad Power Supply). Um einen erfolgreichen Transfer auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Membran nach dem Blotten zunächst mit Ponceau-S-Färbelösung behandelt.

Anodenpuffer I	0.3M Tris-Base, 20% Methanol, pH 10.4
Anodenpuffer II	25mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 10.4
Kathodenpuffer	25mM Tris-Base, 40mM - Aminokapronsäure, 20% Methanol, pH 9.4
Ponceau-S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % TCA (w/v) in destilliertem Wasser

2.13.3 Immunnachweis von Proteinen

Die Nitrozellulosemembran wurde kurz in TBST gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockinglösung geschüttelt. Das BSA bindet an die Nitrozellulosemembran und verhindert so ein unspezifisches Binden des zur Detektion verwendeten Antikörpers. In einem Roller wurde die Membran 60 bis 90min. mit 6ml TBST und Antiserum in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:5000 (abhängig von der Qualität des Antiserums) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für 5 bis 10min. mit TBST gewaschen. Mit dem zweiten Antikörper (IgG-horse-raddish-peroxidase-Konjugat, Dianova) wurde die Membran in 6ml TBST (Antikörper 1:20.000 verdünnt) eine Stunde

konstant gerollt. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit TBST wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet und anschließend mit der Entwicklungslösung („Enhanced Chemie Luminiscence (ECL) detection reagens“, Amersham) für 5min. inkubiert. Die Peroxidase des Zweit-Antikörpers katalysiert in dieser Zeit die Oxidation von Luminol, wodurch dieses in einen angeregten Zustand übergeht. Beim Rückgang in den Grundzustand wird die freie Energie als Licht abgegeben. Die Luminiszenz konnte anschließend auf einem Film (Fuji Medical X-Ray Film RX, Fuji) durch einige Sekunden bis Minuten Exposition detektiert werden.

TBST	10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20
Blockinglösung	TBST + 1% BSA

2.14 Proteindetektion

2.14.1 Silberfärbung

Zur Detektion von sehr geringen Proteinmengen (ca. 1ng pro Bande) wurde eine Silberfärbung mit einem modifizierten Protokoll nach Blum (Rabilloud et al., 1988) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für mindestens eine Stunde in Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde 2x20min. mit 30 % Ethanol sowie 1x20min. mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Konditionierung inkubiert man 1min. in Konditionierlösung. Danach wird 3x20sec. mit destilliertem Wasser gewaschen und das Gel 20min. in der Färbelösung eingelegt. Dabei werden Silberionen von den Proteinen gebunden. Nach drei weiteren Waschschritten à 20sec. mit destilliertem Wasser zur Entfernung der übrigen Silberionen erfolgt in einem Mechanismus ähnlich der Photographie die Reduktion der gebundenen Silberionen zu metallischem Silber durch die Entwicklungslösung. Die Reaktion wird durch eine starke pH-Änderung abgestoppt.

Fixierlösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Waschlösung	30 % Ethanol
Konditionierlösung	0,02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Färbelösung	0,2 % AgNO_3 0,02 % Formaldehyd
Entwicklungslösung	3 % Na_2CO_3

	0,05 % Formaldehyd 0,0005 % Na ₂ S ₂ O ₃
Stoplösung	0,5 % Glycin

2.14.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford kommt es zu einer Komplexbildung zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 und Proteinen. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine. Dabei kommt es zu einer Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm bewirkt. Pro Meßansatz werden bis zu 7,5µg einer Proteinlösung zu 1ml einer 1:5-Verdünnung der Farbstofflösung pipettiert. Anschließend misst man die Absorption bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wird über eine Eichgerade mit bekannten Mengen an BSA bestimmt.

Bradfordlösung	100mg Coomassie Blue G 250 werden in 50ml 95% (v/v) Ethanol und 100ml 85% (w/v) H ₃ PO ₄ gelöst, mit bidest. H ₂ O wird auf 1000ml aufgefüllt und filtriert.
-----------------------	---

2.15 Antikörpergenerierung

2.15.1 Herstellung von bakteriell exprimiertem Antigen

2.15.1.1 Expression des Fusionsproteins in *E.coli*

Für die Expression des Ftm-GST-Fusionsprotein wurden kompetente *E.coli* des Stammes BL21 mit dem Plasmid pFtm-GST durch Hitzebehandlung (45 Sekunden bei 42°C) transformiert. Als Vorkultur wurden anschliessend 50ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 180 U/min. geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 40ml der Übernachtskultur mit 500ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ nm von etwa 0,5 wachsen gelassen. Dann wurde die Expression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden wurden die Bakterien 15min. mit 4.000 U/min. bei 4°C im zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (4.000 U/min, 15min., 4°C, Heraeus Biofuge 13) wurde das Pellet bis zu seiner Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.15.1.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach der Lyse der Bakterien mittels Ultraschall wurde 1 % Triton X-100 zugegeben und anschließend zentrifugiert (12.000 U/min, 30min., 4 °C). 4ml Glutathion-Sepharose (PBS äquilibriert) wurden anschließend zum Überstand zugegeben und die Suspension 1 Stunde 4°C leicht geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit 5ml PBS und einmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde das gebundene Antigen in 1-ml-Fractionen mit Elutionspuffer eluiert. Die gereinigten Proteine konnten anschließend bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Lysepuffer	1x PBS Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 25ml)
Waschpuffer	50mM Tris pH 8,0
Elutionspuffer	50mM Tris pH 8,0 150mM NaCl 20mM Glutathion

2.15.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Die Immunisierung von Kaninchen und die anschließende Gewinnung der Seren wurde von der Firma Pineda-Antikörperservice (Berlin) durchgeführt.

2.15.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Isolierung spezifischer Antikörper aus dem jeweiligen Antiserum wurde eine Affinitätsreinigung mit dem an eine Matrix kovalent gekoppelten Antigen durchgeführt. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Antigen wird dabei genutzt, die Antikörper aus der komplexen Mischung des Antiserums reversibel zu adsorbieren. Die Elution der Antikörper erfolgt durch einen Konformationswechsel nach Absenken des pH-Werts.

Im ersten Schritt wird das Antigen kovalent über seine primären Aminogruppen an eine mit Bromcyan aktivierte Sepharose gekoppelt. 1 g aktivierte Sepharose wurden hierfür zunächst mit 10ml 1mM HCl und danach kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, um der Sepharose zugesetzte Additive zu entfernen. Anschließend erfolgte die Kopplung des Antigen über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation. Nach dem Waschen mit 15ml Kopplungspuffer werden die verbliebenen reaktiven Gruppen der Sepharose durch eine zweistündige Inkubation bei RT mit 20ml 0,1M Tris-HCl-Lösung pH 8,0 abgesättigt. Daraufhin wurde die

Affinitätssäule alternierend mit jeweils 5ml Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Dieser Zyklus wird fünf Mal wiederholt. Abschließend wurde die Säule mit 15ml PBS gewaschen und in PBS mit 0,05 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

Für die Affinitätsreinigung des Antiserums wurde dieses zuerst 1:3 mit PBS verdünnt. Die Bindung an die Affinitätssäule erfolgt anschließend durch Rotieren für 2 Stunden bei 4°C. Nach Waschen mit 30ml PBS wurden die gebundenen, spezifischen Antikörper bei pH 2,5 eluiert. Da die Antikörper bei saurem pH-Wert denaturieren, wurden die Eluate sofort mit 1 M Tris-HCl-Lösung pH 8,0 neutralisiert. Die konzentrierte Antikörperlösung wird abschließend mit Natriumazid versetzt und kann so langfristig bei 4°C gelagert werden.

Kopplungspuffer	100mM Na ₂ CO ₃ 500mM NaCl
Waschpuffer 1	100mM Natriumacetat pH 4,0 500mM NaCl
Waschpuffer 2	100mM Tris-HCl pH 8,0 500mM NaCl
Elutionspuffer	100mM Glycin pH 2,5 150mM NaCl

2.16 Zellkulturtechniken

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank der Firma Heraeus durchgeführt (Heraeus HeraSafe 12). Die Zellkultivierung erfolgte in speziellen Zellkulturgefäßen der Firmen Falcon, TPP und Nunc in einem begasteten Brutschrank (Heraeus HeraCell). Die Zellen wurden bei 7,5% (v/v) CO₂ und 37°C kultiviert.

2.16.1 Herstellung von Primärkulturen und verwendete Zelllinien

2.16.1.1 Embryonale Mausfibroblasten (MEF); (Primärkultur)

Embryonale Mausfibroblasten (MEF- Mouse Embryonic Fibroblasts) sind fibroblastenartige primäre Zellen, die zur Kultivierung von embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) verwendet werden. Die MEF-Zellen verhindern durch sekretierte Faktoren das spontane Differenzieren der ES-Zellen und sind somit ein notwendiger Faktor zur Erhaltung der Pluripotenz der ES-Zellen. Diese Fähigkeit nimmt aber mit zunehmendem Alter der MEF-Zellen ab, so dass die Verwendung von jungen Passagen erforderlich ist. Deswegen ist eine erneute Isolierung der MEF-Zellen in regelmäßigen Abständen notwendig.

Herstellung von MEF-Zellen:

Um eine spätere Kokultivierung mit ES-Zellen und der Selektionsdroge G418 (siehe 2.16.5.2) gewährleisten zu können, müssen die MEF-Zellen mindestens heterozygot für das Neomycin-Resistenzgen sein. Deshalb verpaart man hier transgene Männchen der Linie Tg8H, welche homozygot das Neomycin-Gen unter der Kontrolle des *TK*-Promoters tragen, mit wildtypischen Weibchen des NMRI Stammes. Die Embryonen wurden am Tag E13.5 aus den Uteri der Mäuse entnommen, unter der Sterilbank isoliert und in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Köpfe und die inneren Organe entfernt um den Anteil der Nicht-MEF-Zellen so gering wie möglich zu halten. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Embryonen in 10ml PBS aufgenommen und mit einer sterilen Schere zerkleinert. Diese Suspension wurde in einen sterilen 250ml-Erlenmeyerkolben überführt, dessen Boden mit ca. zwei Lagen steriler Glasperlen (\varnothing 2,85-3,3mm; Roth #A557.1) bedeckt war. Um die restlichen Zellverbände aufzulösen wurden 10ml Trypsin/EDTA hinzugefügt und unter leichtem Rühren bei 37°C 20min. inkubiert. Anschließend wurden weitere 15ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und erneut für 20min. bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Nach der letzten Inkubation wurde die Suspension auf zwei 50ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und jeweils mit MEF-Medium auf 50ml aufgefüllt. Um die genomische DNA der toten Zellen zu entfernen und damit ein späteres Zentrifugieren der MEF-Zellen zu erleichtern, wurden 200µl DNase I-Lösung hinzugefügt und für 15min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (800 Upm; 7min.; Heraeus Megafuge 1.0) und das Zellsediment in 50ml neuem MEF-Medium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine 150mm Zellkulturschale überführt (Zellen aus ca. 2 Embryonen/Schale) und inkubiert bis die Zelldichte konfluent war. Hierbei muss das MEF-Medium täglich gewechselt werden. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (1 Platte auf drei neue) und bis zur neuen Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und in 1ml Aliquots bis zu ihrer späteren Verwendung weggefroren (ca. 1 Schale/ml).

Trypsin/EDTA - GibcoBRL #45300-027

DNase I 10mg/ml - Roche #1284932

MEF-Medium 500ml DMEM-GibcoBRL #41965-039
 + 6ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) – GibcoBRL #14140-114
 + 6ml L-Glutamin.(200mM) – GibcoBRL #15140-114
 + 6ml NEAA (100mM) – GibcoBRL #11140-035
 + 6ml Na-pyruvat (100mM) – GibcoBRL #11360-039
 + 50ml Foetales Kälberserum (FCS) – PAA Laboratories #A15-080
 (hitzeinaktiviert 30min.; 56°C)

Herstellen von Zellschichtböden aus embryonalen Mausfibroblasten:

Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgt auf einem Ein-Zellschichtboden aus MEF-Zellen, die einen positiven Einfluss auf die Pluripotenz der ES-Zellen haben und zusätzlich als Nährzellen dienen. Dies erfordert die Herstellung von mitotisch inaktiven MEF-Zellen, welche durch die Behandlung mit Mitomycin C hergestellt werden. Mitomycin C verursacht Verknüpfungen zwischen den DNA-Strängen und verhindert somit die Zellproliferation.

Ein Aliquot der weggefrorenen embryonalen Mausfibroblasten wurde aufgetaut und auf zwei 150mm Kulturplatten aufgeteilt. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Mitomycin C-Behandlung. Hierzu wurden die Platten nach Zugabe von Mitomycin C (final 10µg/ml) in das Kultivierungsmedium (MEF-Medium) für 2,5 bis 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mindestens zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in MEF-Medium resuspendiert und in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät. Damit die ausgesäten MEF-Zellen eine Zellschicht am Boden bilden wurden sie abschließend über Nacht unter Normalbedingungen kultiviert.

Mitomycin C 1mg/ml – Sigma #M-0503

Trypsin/EDTA – GibcoBRL #45300-027

2.16.1.2 Mesenchymale Gliedmaßenzellen (MLCs); (Primärkultur)

Mesenchymale Gliedmaßenzellen (MLCs) wurden aus den Gliedmaßen einzelner Embryonen isoliert. Hierzu wurden die Gliedmaßen der frisch isolierten Embryonen abgetrennt und zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension zur Trennung der verbliebenen Zellverbände für 3 bis 5min. mit Trypsin/EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die vereinzelt Zellen wurden abzentrifugiert, in Kultivierungsmedium (MEF-Medium) aufgenommen und kultiviert.

2.16.1.3 Embryonale Stammzellen der Maus (E14.1); (Zelllinie)

Bei den verwendeten ES-Zellen handelt es sich um die ES-Zelllinie E14.1 (Kühn et al. 1991), die eine Sublinie der ES-Zelllinie ES 14 darstellt (Hooper et al. 1987) und von der 129/Ola-Mauslinie abstammen. Diese Zelllinie gilt als besonders robust und wurde auch schon mehrmals erfolgreich in Mutagenese-Ansätzen verwendet (z.B. Riethmacher et al. 1995; Tanaka et al. 1995) und zeigt zudem eine hohe Keimbahntransmission. Damit diese Eigenschaften und die Pluripotenz der ES-Zellen erhalten bleiben, wurden die Zellen auf einer

Schicht von MEF-Zellen kultiviert, die der spontanen Differenzierung entgegenwirken sollen. Zusätzlich wurde das ES-Medium mit ESGRO™ versetzt (leucemia inhibitory factor; final 10^3 U/ml) was ebenfalls der Differenzierung der ES-Zellen entgegenwirkt (Rossant, 2001). Ebenfalls wichtig für den Erhalt der Pluripotenz ist das Alter der Kultur. Dies erfordert das ständige Beobachten der Morphologie der einzelnen Kolonien einer Kultur. Die ES-Zellkolonien dürfen hierbei nicht zu dicht wachsen und nicht zu groß werden.

ES-Medium	500ml DMEM-GibcoBRL #41965-039 + 6ml Penicillin/Streptomycin (10^3 U/ml) – GibcoBRL #14140-114 + 6ml L-Glutamin.(200mM) – GibcoBRL #15140-114 + 6ml NEAA (100mM) – GibcoBRL #11140-035 + 6ml Na-pyruvat (100mM) – GibcoBRL #11360-039 + 600µl β-Mercaptoethanol (100mM)- Sigma #M7522 + 90ml Foetales Kälberserum (FCS)- PAA Laboratories #A15-080 (hitzeinaktiviert 30min.; 56°C)
ESGRO™ 10^7 U/ml	– Chemicon #ESG1107

2.16.2 Passagieren von Zellen

2.16.2.1 Passagieren von MEF-Zellen und MLCs

Das Passagieren der beiden Zellenarten erfolgte nach Trypsin/EDTA-Behandlung. Hierbei wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz 2 mal mit PBS gewaschen und mit einer der Kulturplatten angemessenen Menge (0,5 – 5ml) Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 3min. im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen mit frischem MEF-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt (siehe 2.16.3) und die Zellen in gewünschter Verdünnung auf die verschiedenen Kulturgefäße ausgesät.

2.16.2.2 Passagieren von ES-Zellen

Das Passagieren der ES-Zellen erfolgte unter Berücksichtigung des Erhalts der Pluripotenz. Eine Passage war unter diesen Gesichtspunkten etwa jeden zweiten Tag notwendig. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in ES-Medium aufgenommen und zum Auflösen sämtlicher Zellaggregate gründlich resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 1:4 oder 1:5 Verdünnung auf die verschiedenen Kulturgefäße ausgesät, die zuvor mit einer entsprechenden Anzahl MEF-Zellen bestückt und kultiviert worden waren.

2.16.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von Zellsuspensionen wurde durch einfaches Auszählen bestimmt. Dies geschah in einer NEUBAUER-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen gründlich resuspendiert und die Anzahl von 4 Großquadraten bestimmt. Anhand der folgenden Formel wurde die endgültige Zellzahl der Suspension berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times 10^4$$

2.16.4 Kryokonservierung und Auftauen von ES-Zellen

Kryokonservierung von ES-Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen trypsinisiert und in neuem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7min.; 800 Upm; Heraeus Megafuge 1.0R) und in 500µl Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit 500µl vorgekühltem Einfriermedium (2fach) versetzt, anschließend in ein Kryo-Röhrchen (Nunc #375353) transferiert und bei -80°C eingefroren. Nach 1 bis 2 Tagen wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen von ES-Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst zügig durch Inkubation bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 9ml ES-Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (7min.; 800 Upm; Heraeus Megafuge 1.0R) und in einem dem späteren Kulturgefäß angemessenen Volumen ES-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen je nach späterem Verwendungszweck in Konzentrationen von 1:3, 1:4 oder 1:5 ausgesät.

Einfriermedium (2fach konzentriert)	80% Foetales Kälberserum (FCS) – PAA Laboratories #A15-080 (hitzeinaktiviert 30min.; 56°C) 20% DMSO- Merck #1.02950.0500
--	--

2.17 Tierexperimentelle Methoden

2.17.1 Erzeugung von Chimären

Die Herstellung von ES-Zell-Chimären kann sowohl über Injektion von homolog rekombinanten genetisch veränderten ES-Zellklonen in Blastozysten als auch durch Aggregation der ES-Zellklone mit Morulae erfolgen (Übersicht bei Torres und Kühn, 1997). In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit der Methode der Blastozysten-Injektion gearbeitet, wobei folgende Mausstämme verwendet wurden:

Als Spendertiere wurden weibliche Mäuse des Stammes (B6D2)F1 mit C57Bl/6 Männchen verpaart. Zur Herstellung von scheinchwangeren Ammentieren wurden (B6C3H)F1 Weibchen mit vasktomierten NMRI Männchen verpaart.

2.17.1.1 Blastozysten-Injektion

Die Blastozysten-Injektion erfolgte nach den allgemeinen Standardbedingungen (Übersicht bei Hogan et al. 1994; Joyner, 2000). Hierfür wurden die Spendertiere bzw. Blastozysten-donoren nach erfolgreicher Verpaarung am Tag E3.5 der Embryonalentwicklung durch Strecken getötet. Anschließend wurden die Uteri aus den Tieren präpariert und in M2-Medium gewaschen. Die Embryonen im Blastozystenstadium wurden mit ca. 1ml/Uterus M2-Medium aus den Uteri ausgespült. Anschließend wurden die isolierten Blastozysten mit einer feinen Glaskapillare eingesammelt und in mehreren Tropfen M2-Medium gewaschen. Bis zur Injektion wurden die Blastozysten in einer „Tröpfchenkultur“, bestehend aus M16-Mediumstropfen überschichtet mit Öl, im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Injektion wurden die Blastozysten in einen mit Öl überschichteten Tropfen M2-Medium auf einem Injektionsobjektträger überführt. Nach Zugabe von ES-Zellen der identifizierten Klone wurden ca. 20 Zellen pro Blastozyste injiziert. Die Injektion wurde mit einem üblichen Mikromanipulator-Injektionsmikroskop-Kombination durchgeführt. Anschließend wurden die injizierten Blastozysten bis zum Uterus-Transfer wieder in einer Tröpfchenkultur im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

M2-Medium	- Sigma #M7167
M16-Medium	- Sigma #M7292
Öl Merck	- #1.7161.0500

2.17.1.2 Blastozysten-Transfer

Durch die Manipulation der Blastozysten erfahren diese eine Verzögerung in ihrer Entwicklung. Damit diese Verzögerung keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen hat, werden als Ammentiere Weibchen vom Tag E2.5 der Scheinschwangerschaft verwendet. Nach Anästhesie der Mäuse mit Xylazin/Ketamin durch intraperitoneale Injektion erfolgte unter Anwendung allgemein etablierter Methoden (Übersicht bei Hogan et al. 1994; Joyner, 2000) der Uterus-Transfer. Hierbei wurden bis zu 11 Blastozysten pro Uterushorn transferiert.

Nach dem Transfer und der anschließenden Wundversorgung wurden die noch narkotisierten Mäuse in ihren Käfig zurückgelegt und, um ein Auskühlen der Tiere zu vermeiden, in Zellstoff eingewickelt.

2.17.1.3 Identifizierung chimärer Tiere

Im Verlauf der folgenden Schwangerschaft wurden die Mäuse beobachtet und geborene Jungtiere auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Gemischtfarbige Jungtiere galten hierbei als chimär, d.h. die injizierten ES-Zellen haben zu der Entwicklung des Embryos beigetragen. Schwarze Jungtiere wurden als Wildtyp aussortiert. Die chimären Tiere werden nach Erreichen der Geschlechtsreife in die Zucht aufgenommen und auf Keimbahntransmission der ES-Zellen getestet. Erfolgreiche Transmission sollte nach Verpaarung mit C57Bl/6-Tieren zu Nachkommen führen, die heterozygot das veränderte Gen in sich tragen. Durch Geschwisterverpaarung kann dann eine homozygote F2-Generation produziert und somit ein Mausstamm mit der gewünschten Mutation hergestellt und etabliert werden.

2.17.2 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.

2.17.3 Identifizierung genetisch veränderter Tiere und Embryonen

Die Genotypisierung der Embryonen wurde mittels PCR (siehe 2.7) vorgenommen, um zwischen Wildtypen und heterozygoten bzw. homozygoten Embryonen unterschieden zu können. Hierzu wurde die genomische DNA aus den embryonalen Membranen isoliert (siehe 2.4.3) und für die diagnostische PCR-Amplifikation eingesetzt. Exemplarische PCR-Ergebnisse sind in Abb.A2 dargestellt.

2.17.4 Maushaltung

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

2.18 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.

2.19 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Rüdiger Riehl, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach den Angaben von Sulik et al. (1994) durchgeführt.

2.20 *In silico*-Analysen

Die Proteinsequenzen von OFD-1, Nephrocystinen (1, 2 und 4), BBS-Proteinen (1-10) IFT-Proteinen (20, 52, 88 und 172) aus der öffentlichen NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden in einer sogenannten BLAST-Suche untersucht. Hierbei wurde die jeweilige Proteinsequenz aus der Maus mit den translatierten DNA-Sequenzen des *Drosophila*-Genoms miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung der *Ftm*-mutanten Mauslinie

Eine Voraussetzung zur Generierung von mutanten Mauslinien ist die Herstellung heterozygoter ES-Zelllinien, die ein gezielt mutiertes Allel besitzen.

Durch die Transfektion der ES-Zellen mit dem Mutagenese-Vektor $pFtm^{neo/EGFP}$ sollte ein völliger Funktionsverlust des *Ftm*-Gens bewirkt werden (Vierkotten; 2001). Zusätzlich sollte ein EGFP-Fusionsprotein geschaffen werden, was die spätere Detektion des translatierten Proteinprodukts erleichtern soll (siehe Abb.3.1). Das EGFP-Gen ist eine Variante des wildtypischen GFP-Gens, die für eine höhere Expression und intensivere Fluoreszenz in Säugetierzellen optimiert wurde (Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992).

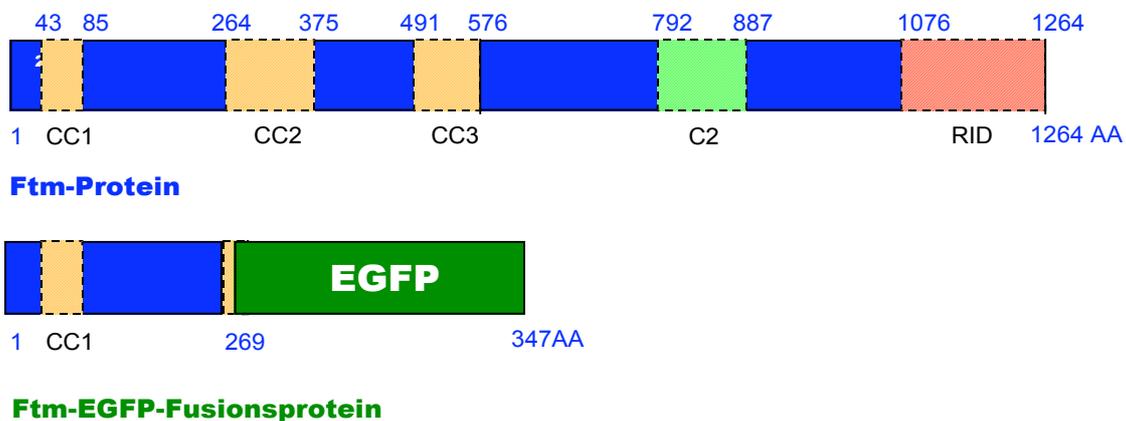


Abb. 3.1: Das erwartete Ftm-EGFP-Fusionsprotein im Vergleich zum Wildtyp-Protein

Das wildtypische Ftm-Protein besitzt mehrere funktionelle Domänen: Im N-Terminus befinden sich drei „coiled-coil“ Domänen (Proteininteraktionsdomänen) CC1 (AS 43-85), CC2 (AS 264-375) und CC3 (AS 491-576), im Zentrum eine C2-artige Domäne (Phospholipidbindungsdomäne) (C2, AS 792-887) und im C-Terminus eine vermeintliche RPGR-Interaktionsdomäne (RID, AS 1076-1264).

Das EGFP-Fusionsprotein besteht aus einem Ftm-Anteil (AS 1-269) und dem EGFP-Protein (AS 269-347). Deutlich zu sehen ist der Verlust fast aller funktionellen Domänen in diesem EGFP-Fusionsprotein. Nur die erste „coiled-coil“-Domäne (CC1) ist vollständig erhalten geblieben. Funktionelle Domänen sind farbig schraffiert.

Dieses Ftm-Fusionsprotein ist im Vergleich zum Wildtyp-Protein stark verkürzt und zeigt einen Verlust fast aller funktionellen Domänen (Abb. 3.1), so dass die Entstehung eines Null-Allels gewährleistet sein sollte.

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Vierkotten, 2001) konnte anhand erster Southernanalysen 6 ES-Zellklone (B9-6, C8-1, B6-2, B2-3, C3-3 und G10-4) als homolog rekombinante Kandidaten identifiziert werden. In erneuten Southernanalysen zeigten die

Klone B9-6 in B6-2 jedoch keine eindeutige Fragmentverteilung, so dass ausschließlich die Klone G10-4, C8-1, B2-3 und C3-3 als eindeutig homolog rekombinant anzusehen waren und anschliessend für die Herstellung chimärer Mäuse verwendet wurden. In der Regel wurden hierbei ca. zwanzig ES-Zellen pro Blastozyste injiziert und ca. neun injizierte und drei bis fünf Kontrollblastozysten pro Maus transferiert. Pro Klon wurden zwischen drei bis fünf Chimären generiert (Tab.3.1). Für die spätere Analyse der Mutation wurde aus den chimären Tieren eine mutante Mauslinie generiert. Dies ist möglich, wenn die heterozygot mutierten ES-Zellen zur Entwicklung der Keimbahnzellen der chimären Tiere beitragen. Diese chimären Tiere sind dann in der Lage, die eingebrachte Mutation an die Nachkommen zu vererben (Hogan, et al. 1994; Torres und Kühn 1997; Joyner, 2000). Die generierten *Ftm*-Chimären, welche die Geschlechtsreife im Alter von sechs bis acht Wochen erreicht hatten, wurden zur Erzeugung heterozygot mutanter Nachkommen in den C57Bl/6-Hintergrund gekreuzt. Diese Art der Verpaarung bietet eine eindeutige Erkennung des Nachwuchses: In Abhängigkeit des Gametenursprunges, ES-Zell- oder Blastozystenursprung, entstehen Nachkommen unterschiedlicher Fellfarbe (Joyner, 2000). Chimäre der Klone B2-3, G10-4 und C3-3 erzeugten nur Nachkommen mit schwarzer Fellfarbe, die auf einen Blastozystenursprung der Gameten zurückzuführen ist. Diese Klone konnten somit nicht an der Keimbahnentwicklung in den Chimären teilnehmen. Der Klon C8-1 hingegen zeigte erfolgreiche Keimbahntransmission, da zwei männliche chimäre Tiere Nachkommen mit brauner Fellfarbe, die durch einen ES-Zellenursprung der Gameten bewirkt wird, erzeugten.

Tab.3.1: Auflistung der verwendeten ES-Zellklone und daraus generierten Chimären

<i>Klon</i>	<i>Chimärenanzahl</i>	<i>Anzahl der Nachkommen</i>	<i>Erfolgreiche Keimbahntransmission</i>
B2-3	3	91	keine
C8-1	5	103	2
G10-4	3	82	keine
C3-3	4	112	keine

Anschließende Southern-Analysen und PCR-basierende Analysen genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien zeigten, dass diese Nachkommen (F1-Generation) eindeutig heterozygot für die *Ftm*-Mutation sind (siehe Abb.3.6).

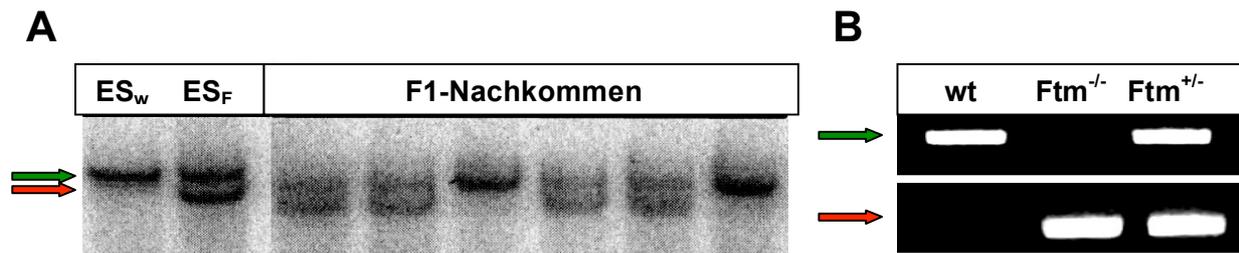


Abbildung 3.2: Exemplarische Darstellung der *Ftm*-Genotypisierung

A: Southernblotanalyse der F1-Nachkommen. Das wildtypische Allel besitzt eine Größe von 11kb (grüner Pfeil), das mutante Allel hingegen 9kb (roter Pfeil). Als Kontrolle dienten wildtypische ES-Zellen (ES_w) und ES-Zellen die heterozygot (ES_F) für die *Ftm*-Mutation sind.

B: Exemplarische *Ftm*-Genotypisierung durch PCR-Analysen. Der Nachweis des wildtypischen Allels (grüner Pfeil) und des mutanten Allels (roter Pfeil) wurde in getrennten PCR-Reaktionen durchgeführt. Dargestellt sind alle drei Genotypen.

3.2. Phänotypische Auswirkungen des *Ftm*-Verlustes

Die durch die Testkreuzungen erhaltenen heterozygoten *Ftm*-Tiere erwiesen sich als lebensfähig, fertil und zeigten keine offensichtlichen Fehlbildungen oder Störungen der normalen Mausentwicklung. Um die Auswirkungen des *Ftm*-Verlustes in Homozygose untersuchen zu können, wurden heterozygote Tiere miteinander verpaart und die Nachkommen (F2-Generation) untersucht. Das Fehlen von homozygoten Tieren in der F2-Generation (Abweichung vom erwarteten mendelschen 1:2:1-Verhältnis der einzelnen Genotypen) deutete auf eine embryonale oder frühe pränatale Letalität (kurz nach der Geburt) hin. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden definierte Embryonalstadien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert (E8.5 – E18.5) und die aus extraembryonalen Membranen gewonnene DNA mittels PCR-Analysen zur Bestimmung der einzelnen Genotypen verwendet (Abb.3.2). Hierbei zeigte sich, dass zu den untersuchten Zeitpunkten alle drei Genotypen in einer normalen mendelschen Verteilung gefunden werden konnten. Es handelt sich somit nicht um eine embryonale Letalität sondern um ein frühes pränatales Sterben homozygoter *Ftm*-Nachkommen. Mögliche Gründe für diese Letalität könnten die beobachteten Fehlbildungen der Lunge, des Herzens und des Gaumens sein (siehe 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3), oder eine Kombination dieser Veränderungen.

3.2.1 Missbildungen kraniofacialer Strukturen und Exenzephalie

Erste äußerliche Betrachtungen der *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigten schwere Missbildungen in der Entwicklung kraniofacialer Strukturen und des Gehirns (Abb.3.3 und 3.4). Zum Zeitpunkt E12.5 waren massive Wucherungen der Vorderhirnstrukturen (Exenzephalie) und eine Reduktion der Augenanlage im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb.3.3 A,B). In der späten Embryonalentwicklung (E18.5) manifestierte sich die Reduktion der Augenanlage in einem kompletten Verlust der Augen (Abb.3.3 C,D). Auch zu diesem Zeitpunkt, wenn auch weniger stark ausgeprägt, konnte eine Erweiterung des Vorder- und Mittelhirns beobachtet werden (Abb.3.3 C,D).

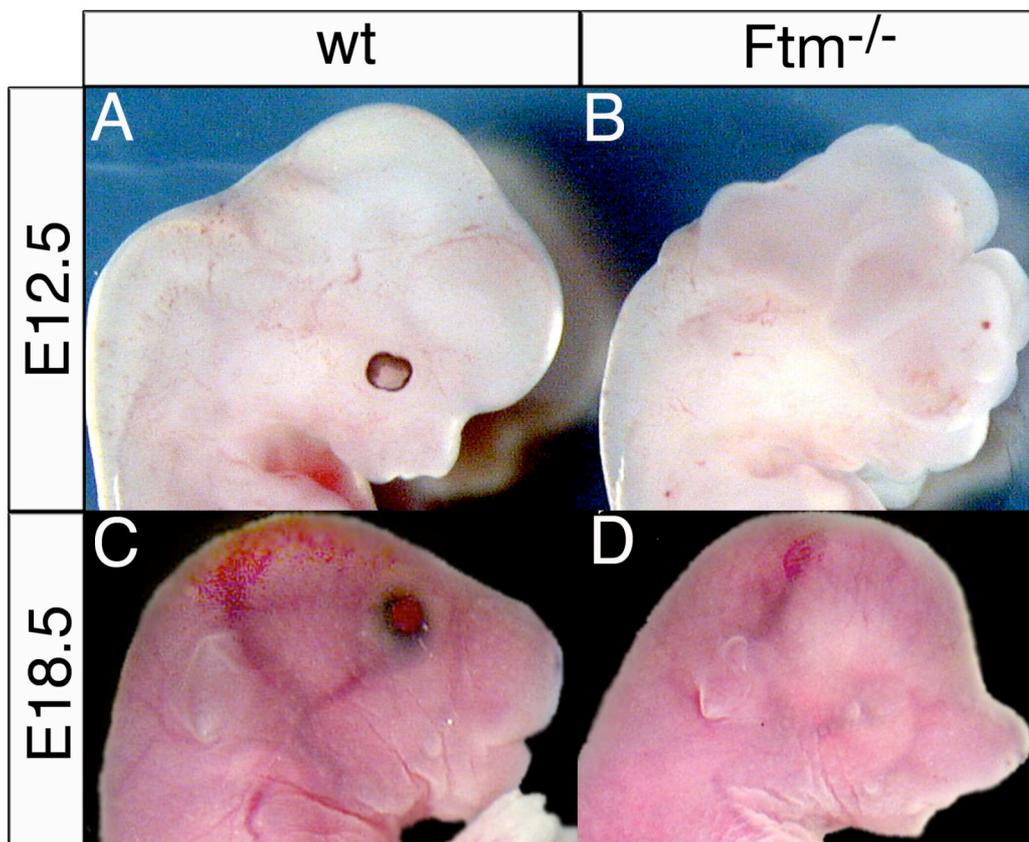


Abbildung 3.3: Missbildungen von Hirn- und kraniofacialen Strukturen (I)

A,B: Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryo zum Zeitpunkt E12.5. Deutlich zu erkennen ist die Reduktion der Augenanlage und die Wucherungen des Vorder- und Mittelhirnbereichs im *Ftm*^{-/-}-Embryo.
C,D: Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryo zum Zeitpunkt E18.5. Der *Ftm*^{-/-}-Embryo zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen Verlust der Augen, eine Erweiterung des Vorder- und Mittelhirnbereiches und eine Reduktion mandibularer Strukturen.

Neben den Fehlbildungen der Augen- und Hirnstrukturen konnten zusätzlich Missbildungen von kraniofacialen Strukturen zum Zeitpunkt E18.5 registriert werden (Abb.3.4). *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigten eine deutliche Reduktion mandibularer Strukturen (Unterkiefer) (Abb.3.3

D; Abb.3.4 B (schwarzer Pfeil)) und unfusionierte Maxillen (Oberkiefer) (Abb.3.4 B (blauer Pfeil)). Detaillierte Analysen durch Paraffindünnschnitte und HE-Färbungen zeigten, dass auch im Gaumenbereich die Fusion der Oberkieferstrukturen beeinträchtigt ist. Während der Entwicklung des Gaumens, kommt es zur Fusion zweier Gewebelappen entlang der Mittellinie des Embryos. Die Vollständigkeit dieses Prozesses ist an einer spezifischen Aussparung oberhalb der Fusionsebene auszumachen (Abb.3.4 C; grüner Pfeil). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen scheint diese Fusion auszubleiben. Die beiden Gaumenlappen verweilen links und rechts der Mittellinie (Abb.3.4 D, schwarze Pfeile), was zu der Ausprägung einer Gaumenspalte führt.

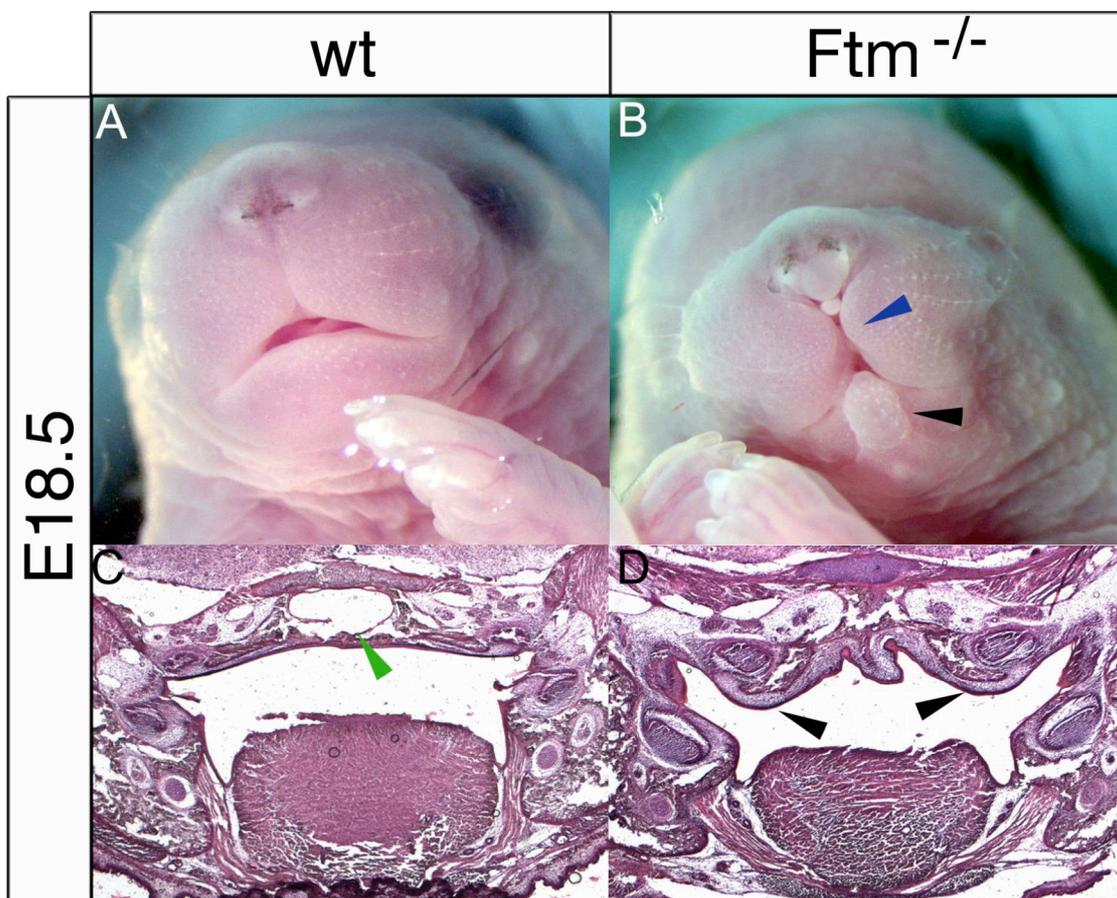


Abbildung 3.4: Missbildungen kraniofacialer Strukturen (II)

A,B: Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryo zum Zeitpunkt E18.5. Deutlich zu erkennen ist die Reduktion mandibularer Strukturen (schwarzer Pfeil) und die fehlende Fusion der Maxillen (blauer Pfeil).
 C,D: Histologische Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E18.5. Im wildtypischen Embryo (C) ist Aussparung, die indikativ für eine abgeschlossene Gaumenfusion ist, deutlich erkennbar (grüner Pfeil). Der *Ftm*^{-/-}-Embryo (D) zeigt unfusionierte Gaumenlappen (schwarze Pfeile), das Kennzeichen für eine Gaumenspalte.

3.2.2 Kardiale Fehlbildungen

Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung deuteten auf Fehlbildungen des Herzens in *Ftm*^{-/-}-Embryonen hin. Zum Zeitpunkt E10.5 konnte in 31% der analysierten Embryonen eine starke Vergrößerung des Perikards, einer Zellschicht, die das Herz ummantelt, festgestellt werden (Abb.3.5 A). Da eine solche Vergrößerung oft durch Fehlfunktionen des Herzens verursacht wird, wurden die Herzen der *Ftm*-mutanten Tiere zu verschiedenen embryonalen Stadien histologisch untersucht.

Beginnend mit dem Stadium E13.5 konnte in *Ftm*-mutanten Herzen eine unvollständige Separation des Ventrikels beobachtet werden. Das Ventrikel wird im Wildtyp durch das ventrikuläre Septum in zwei Kammern unterteilt (Abb.3.5 B,C). Das Septum wächst ab dem Stadium E10.5 ausgehend von der Mitte der posterioren Ventrikelwand nach anterior, wo es zur abschließenden Separation mit dem Kissen fusioniert. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen scheint das

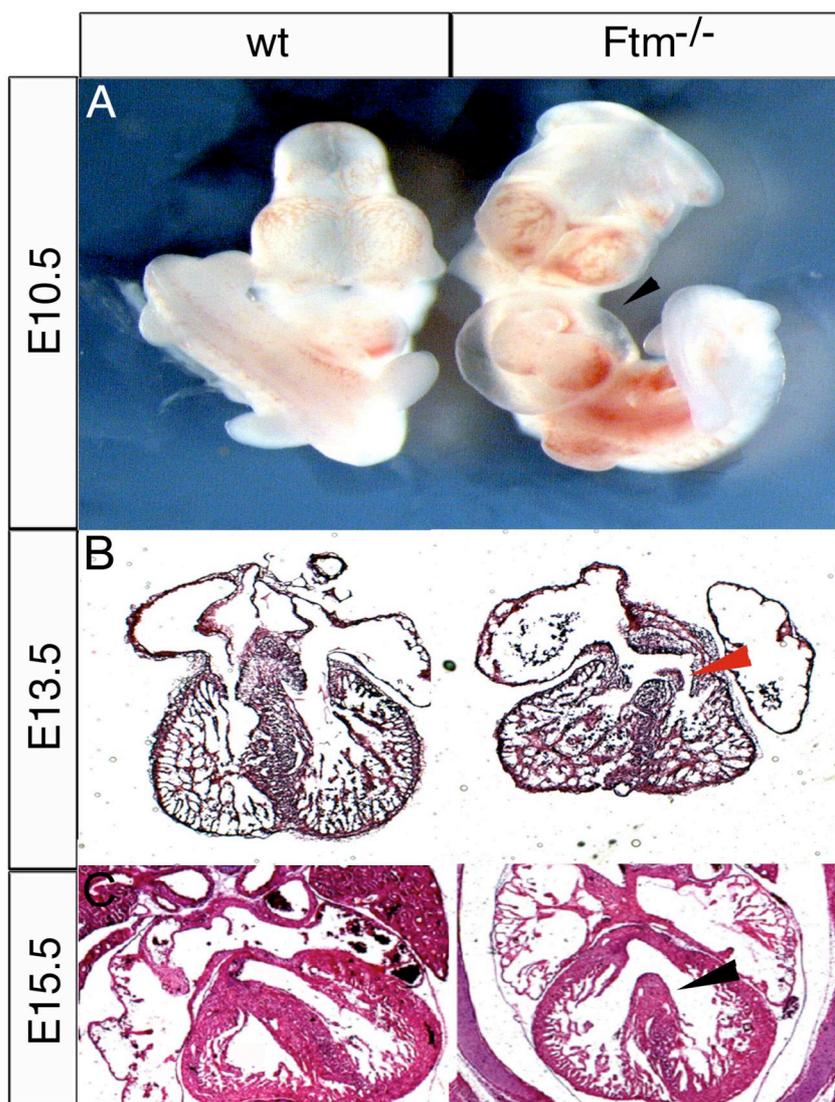


Abbildung 3.5:
Kardiale Fehlbildungen

A: Vergleich zwischen Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryo zum Zeitpunkt E10.5. Deutlich zu erkennen ist die starke Vergrößerung des Perikards in *Ftm*^{-/-}-Embryonen (schwarzer Pfeil).

B: Histologische Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E13.5. Der *Ftm*^{-/-}-Embryo zeigt ein unterentwickeltes ventrikuläres Septum, was zur unvollständigen Separation der Ventrikel führt (roter Pfeil).

C: Histologische Analyse von Wildtyp und- *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E15.5. Auch in diesem Stadium zeigt der *Ftm*^{-/-}-Embryo ein unterentwickeltes ventrikuläres Septum und dadurch eine unvollständige Separation des Ventrikels (schwarzer Pfeil).

Septum unterentwickelt und somit die Ursache für die unvollständige Separation zu sein. Um auszuschließen, dass die unvollständige Separation nur durch eine Wachstumsretardation des Septums verursacht wird, wurden Herzen zum Zeitpunkt E15.5 untersucht. Da auch in diesem Stadium eine unvollständige Separation des Ventrikels in *Ftm*^{-/-}-Embryonen zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass das unterentwickelte Septum nicht durch eine Wachstumsretardation verursacht wird.

3.2.3 Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie

Neben den bisher beschriebenen Veränderungen zeigte die Analyse früher Embryonalstadien, dass der Verlust des *Ftm*-Gens eine Störung der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie verursacht. Das erste Indiz für eine solche Störung war die Feststellung einer zufälligen Orientierung der embryonalen Rotation (Abb.3.6 A,B). Während der murinen Embryonalentwicklung kommt es zu einer spezifischen Rotation des Embryos, die zum Zeitpunkt E8.5 einsetzt. Durch diese Rotation dreht sich der Embryo und wickelt sich hierbei in die extraembryonalen Membranen ein. Als Konsequenz nimmt der Embryo die typische embryonale Haltung ein, und sein Schwanzende kommt auf der rechten Schulter des Embryos zum Liegen (Abb.3.6 A (grüner Pfeil)). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist die Kontrolle über die Drehrichtung verloren gegangen: In 54% der Embryonen befindet sich das Schwanzende nach Abschluss der Drehung auf der linken Schulter (Abb.3.6 B (roter Pfeil)). Zusätzlich zu der Rotation des Embryos ist auch die Drehung des Herzschlauches in *Ftm*^{-/-}-Embryonen gestört. Um nach der Fusion der beiden Herzanlagen das Herz in die spezifischen Kammern unterteilen zu können, vollzieht das Herz eine Drehung und bringt die zukünftigen arteriellen und ventrikulären Bereiche in Position. Diese Drehung geschieht im Wildtyp von rechts nach links (Abb.3.6 C (grüner Strich)). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen erfolgt auch diese Drehung zufällig: 23% der Embryonen zeigten eine Drehung von links nach rechts (Abb.3.5 D (roter Strich)). Um diese ersten äusserlichen Beobachtungen zu bestätigen, wurden Embryonen in älteren Stadien histologisch untersucht. Hierbei lag das Augenmerk auf der Orientierung der einzelnen inneren Organe, da deren Anordnung der genetischen Kontrolle der Links-Rechts-Asymmetrie unterliegt. Eines der Organe, das sich zur Untersuchung der Links-Rechts-Asymmetrie besonders gut eignet ist die Lunge. Die Lunge ist ein Organ endodermalen Ursprungs und fächert sich im Laufe der Organogenese in fünf Lungenlappen, vier rechte und einen linken, auf. Die Lappen R1-R3 befinden sich in der rechten Körperhälfte und die Lappen R4 und L1 in der linken (Abb.3.6 E). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen findet diese asymmetrische

Auffächerung der Lungenlappen nicht statt. In allen analysierten Embryonen unterteilt sich die Lunge nur noch in zwei symmetrische Lungenlappen (R1 und L1) (Abb.3.6 F; Tab3.2). Diese Symmetrie deutet auf eine „linke“ Identität beider Lungenlappen hin und wird dementsprechend auch „left-lung-isomerism“ genannt. Dieses Phänomen konnte in diversen Mutanten in denen die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie gestört ist (z.B. *Lefty1*^{-/-} (*Ebaf*) und *Shh*^{-/-}) beobachtet werden und basiert auf einer bilateralen Expression des Gens *Pitx2* (Meno et al., 1998; Tsukui et al., 1999; Liu et al., 2001).

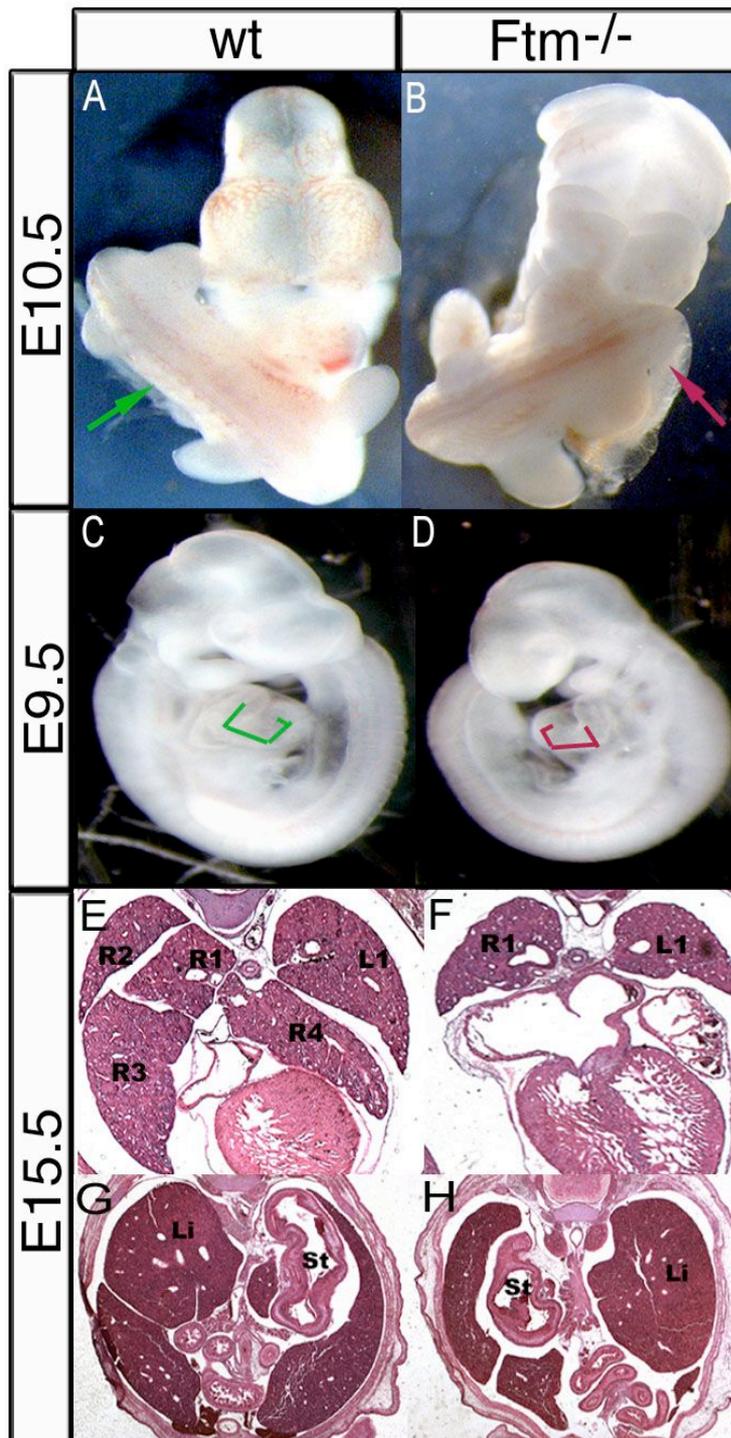


Abbildung 3.6: Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie

A, B: Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryo zum Zeitpunkt E10.5.

In wildtypischen Embryonen befindet sich nach Vollendung der embryonalen Drehung das Schwanzende auf der rechten Schulter des Embryos (A, grüner Pfeil). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen befindet sich das Schwanzende in 54% der Fälle auf der linken Schulter (roter Pfeil).

C, D: Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E9.5. Der *Ftm*^{-/-}-Embryo zeigt eine entgegengesetzte Orientierung der Herzdrehung (links nach rechts; D, roter Strich) im Vergleich zum Wildtyp, wo die Drehung von rechts nach links erfolgt (C, grüner Strich).

E, F: Histologische Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E15.5. Im Wildtyp fächert sich die Lunge in fünf Lungenlappen auf: vier rechte R1-R4 und einen linken L1. Im *Ftm*^{-/-}-Embryo findet nur eine symmetrische Auffächerung in einen rechten R1 und einen linken L1 Lungenlappen statt.

G, H: Histologische Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E15.5. Im Wildtyp befindet sich der Magen (St) in der linken Körperhälfte (G), während sich im *Ftm*^{-/-}-Embryo der Magen in einigen Fällen in der rechten Körperhälfte befand (H). Li kennzeichnet die Leberlappen.

Ebenso wie die Entwicklung der Organe ist auch ihre Position durch die Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie kontrolliert. So entwickelt sich z.B. der Magen in der linken Körperhälfte (Abb.3.6. G). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen konnte der Magen in einigen Fällen in der rechten Körperhälfte lokalisiert werden, was den Befund einer gestörten Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie weiter bekräftigt (Abb.3.6 H).

Die asymmetrische Position der Organ sowie ihre asymmetrische Entwicklung, wie im Falle der Lunge, obliegt einer strengen genetischen Kontrolle. Am Ende dieser Regulation wird eine asymmetrische Verteilung von Faktoren erzielt, welche die linke und rechte Körperhälfte determinieren und ihre Identität zuweisen. Zwei solcher Faktoren sind die Gene *Leftb* und *Pitx2*. Im wildtypischen Embryo werden *Leftb* und *Pitx2* exklusiv im linken lateralen Seitenplattenmesoderm exprimiert, wodurch sie die linke Körperhälfte determinieren (Abb.3.7 A,C; grüner Pfeil).

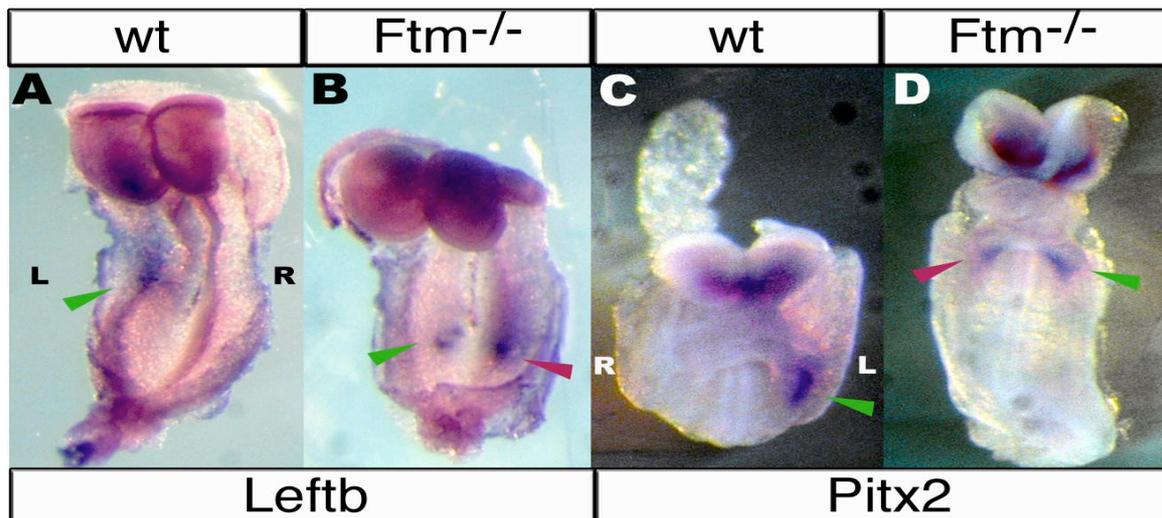


Abbildung 3.7: Molekulare Analyse der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie

A, B: WISH-Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E8.5. Im wildtypischen Embryo wird *Leftb* exklusiv im linken lateralen Seitenplattenmesoderm (grüner Pfeil) exprimiert, wohingegen im *Ftm*^{-/-}-Embryo eine bilaterale Expression zu beobachten ist (roter und grüner Pfeil).
 C, D: WISH-Analyse von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E8.5. Der *Ftm*^{-/-}-Embryo zeigt eine ektopische Expression von *Pitx2* im rechten lateralen Seitenplattenmesoderm (roter Pfeil), während sie im wildtypischen Embryo exklusiv nur im linken zu detektieren ist (grüner Pfeil). (R=rechts; L=links)

Im Einklang mit den morphologischen Befunden wurde in *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine bilaterale Expression beider Gene beobachtet. Neben der Expression im linken lateralen Seitenplattenmesoderm konnte auch eine ektopische Expression im rechten lateralen Seitenplattenmesoderm detektiert werden (Abb.3.7 B,D; rote Pfeile). Die Fehlregulation der Links-Rechts-Asymmetrie und das Vorhandensein einer beidseitigen „linken“ Identität konnte somit molekular bestätigt werden.

3.2.4 Polydaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen

Beginnend mit dem Stadium E12.5 der Embryonalentwicklung wurde in *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine Verbreiterung der Vorder- und Hintergliedmaßenanlage innerhalb der anterior-posterioren Achse beobachtet (Abb.3.8 A,B). In späteren Stadien wurde diese Veränderung als präaxiale Polydaktylie (Vervielfältigung anteriorer Zehenstrukturen) identifiziert (Abb.3.8). Hierbei konnten durch Knochen-Knorpel-Färbungen in den Vordergliedmaßen zwei bis drei zusätzliche Zehen beobachtet werden (Abb.3.8 C). Die Hintergliedmaßen wiesen nur einen zusätzlichen Zeh auf (Abb.3.8 D). Intensive Studien der Gliedmaßenentwicklung haben gezeigt, dass eine solche Polydaktylie oft durch ektopische Expression des Gens *Shh* und/oder ektopische Hh (Hedgehog)-Aktivität verursacht wird (siehe 1.3.2). In beiden Fällen kommt es zu einer Hochregulation der Hh-Zielgene *Ptc1* und *Glil* (Hui und Joyner, 1993; Yang et al., 1998).

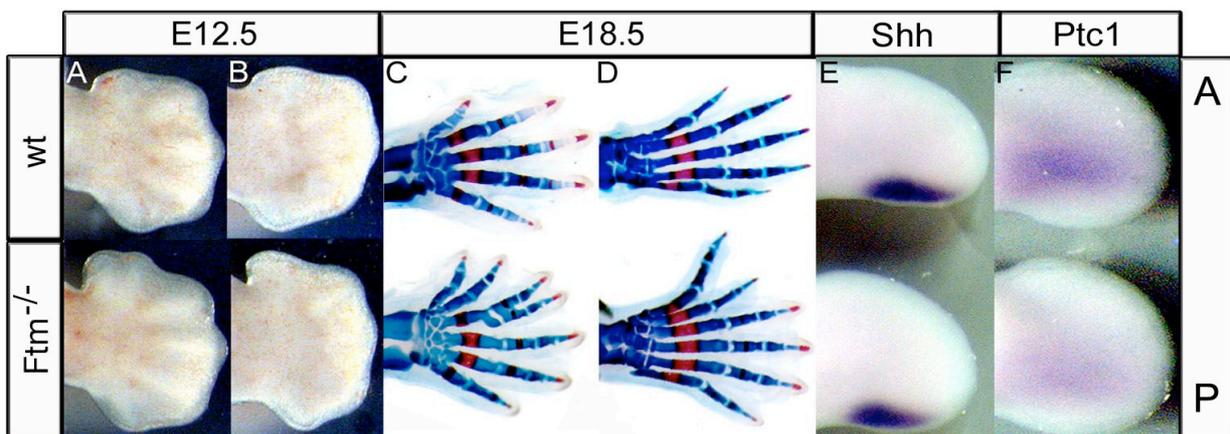


Abbildung 3.8:

***Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigen eine präaxiale Polydaktylie und eine Reduktion der *Shh* Signaltransduktion**

A, B: Vordergliedmaßen (A) und Hintergliedmaßen (B) von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E12.5. Sowohl die Vorder- als auch die Hintergliedmaßen der *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigen eine deutliche Verbreiterung der anterior-posterioren Achse.

C, D: Knochen/Knorpel-Färbungen der Vordergliedmaßen (C) und Hintergliedmaßen (D) von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E18.5. In der Vordergliedmaße von *Ftm*^{-/-}-Embryonen sind bis zu zwei und in den Hintergliedmaßen ein zusätzlicher Zeh zu beobachten.

E, F: WISH-Analysen von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E11.5. Die *Shh* Expression (E) in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist identisch zum Wildtyp, während die *Ptc1* Expression (F) deutlich reduziert ist.

A-P zeigt die Orientierung der anteriorposterioren Achse an.

Um zu überprüfen, ob eine solche Hochregulation auch der Grund für die Polydaktylie in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist, wurde die Expression von *Shh* und *Ptc1* zum Zeitpunkt E11.5 der Embryonalentwicklung untersucht. Die Analyse der *Shh*-Expression zeigte keinen Unterschied zwischen wildtypischen und *Ftm*^{-/-}-Embryonen: *Shh* wird in beiden Fällen im posterioren Mesenchym exprimiert. Eine ektopische *Shh*-Expression war nicht detektierbar

(Abb.3.8 E). Ebenso wenig konnte eine ektopische *Ptc1*-Expression gefunden werden. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *Ptc1* in der Gliedmaßenanlage von *Ftm*^{-/-}-Embryonen deutlich reduziert (Abb.3.8 F), was auf eine Reduktion der Shh-Signaltransduktion hinweist.

3.3 Die Auswirkungen des *Ftm*-Verlustes auf die Shh-Signaltransduktion

Um den Verdacht eines reduzierten Shh-Signalweges zu bestätigen, wurde die Expression des *Shh*-Gens im Neuralrohr in *Ftm*^{-/-}-Embryonen untersucht. *Shh* ist im Neuralrohr eine entscheidende Größe zur Spezifizierung der unterschiedlichen Neuronentypen und wird in zwei Strukturen der Chorda dorsalis und der Bodenplatte entlang der anteriorposterior Achse des Embryos exprimiert (siehe 1.3.2). Beginnend mit dem Zeitpunkt E8.5 konnten Unregelmäßigkeiten in der *Shh*-Expression in *Ftm*^{-/-}-Embryonen festgestellt werden (Abb.3.9 B; schwarzer Pfeil). Diese Unregelmäßigkeiten manifestieren sich im Stadium E10.5 in deutlichen Unterbrechungen der *Shh*-Expression entlang der anteriorposterior Achse (Abb.3.8 D; schwarzer Pfeil). Eine genauere Betrachtung zeigte, dass es sich um mehrfache Unterbrechungen der *Shh*-Expressionsdomäne handelt (Abb.3.9 D; schwarzer Pfeil). Die dorsale Position (dem Rücken zugewandt) dieser Unterbrechungen ließ vermuten, dass sich diese Expressionslücken in der Bodenplatte des Neuralrohrs befinden. Zusätzlich ist eine Reduktion der *Shh*-Expression in anterioren Hirnstrukturen zu vermerken (Abb.3.9 D; roter Pfeil).

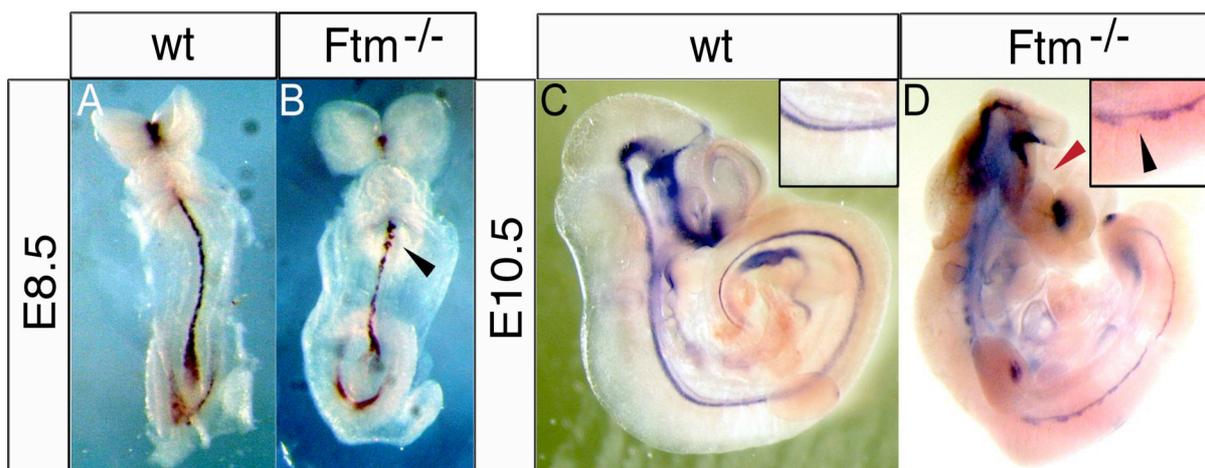


Abbildung 3.9: Analyse der *Shh*-Expression entlang der anteriorposterior Achse

A, B: WISH-Analyse der *Shh*-Expression von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E8.5. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen sind Unregelmäßigkeiten in der *Shh*-Expression zu beobachten (schwarzer Pfeil).
 C, D: WISH-Analyse der *Shh*-Expression von Wildtyp und *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum Zeitpunkt E10.5. *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigen deutliche Unterbrechungen der *Shh*-Expression in der Bodenplatte entlang der anteriorposterior Achse (schwarzer Pfeil, Detailausschnitt) und eine Reduktion der *Shh*-Expression in anterioren Hirnstrukturen (roter Pfeil).

Um diese Störung genauer definieren zu können, wurde die *Shh*-Expression und die ventrale Musterbildung im Neuralrohr mit Hilfe der Hybridisierungstechnik auf Paraffindünnschnitten (siehe 2.9.5) detaillierter untersucht.

3.3.1 Analyse der Neuralrohrmusterbildung

Initial wird *Shh* in der Chorda dorsalis exprimiert und induziert im Neuralrohr die Bodenplatte (siehe 1.3.2), welche anschließend ebenfalls *Shh* exprimiert. Die Induktion der Bodenplatte findet zum Stadium E8.5 statt. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Verlust der *Shh* Expression durch eine gestörte Induktion verursacht wird, oder die Expression erst nachträglich verloren geht, wurde beginnend mit dem Stadium E9.5 die *Shh* Expression in der Chorda dorsalis und im Neuralrohr untersucht. Schon zu diesem Zeitpunkt konnten Expressionsverluste des *Shh*-Gens in der Bodenplatte beobachtet werden (Abb.3.10 A,B). Die Analysen zum Zeitpunkt E10.5 und E11.5 zeigten das gleiche Resultat: *Shh* wird partiell nicht in der Bodenplatte exprimiert (Abb.3.10 C,D,E,F). Zusätzlich konnte eine starke Reduktion des *Shh* Zielgens *Ptc1* sowohl innerhalb des Neuralrohrs als auch im Mesenchym, welches die Chorda dorsalis umgibt, nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen für eine gestörte Induktion der Bodenplatte (Abb.3.10 G,H).

Die Bodenplatte ist ein essentielles Signalzentrum zur Musterbildung entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohrs. Um zu überprüfen, ob die Struktur der Bodenplatte selbst teilweise verloren gegangen ist, oder nur ihre Fähigkeit *Shh* zu exprimieren, wurden verschiedene Genexpressionen analysiert, die indikativ für die Existenz einer intakten Bodenplatte sind. Zwei solcher Gene sind *Foxa2* und *Lmx1b*. Die Expression beider Gene innerhalb der Bodenplatte ist in *Ftm*^{-/-}-Embryonen beeinträchtigt: in Übereinstimmung mit der *Shh*-Expression, kommt es stellenweise zu einem kompletten Verlust (Abb.3.10 I,J,K,L). Dies zeigt, dass in *Ftm*^{-/-}-Embryonen die Induktion der Bodenplatte gestört ist.

Ein Verlust der Bodenplatte und ein damit einhergehender Verlust der *Shh*-Expression wurde schon in anderen Mutanten beschrieben und hat schwerwiegende Konsequenzen auf die Musterbildung innerhalb des Neuralrohrs (Briscoe und Ericson, 2001). Besonders diejenigen Transkriptionsfaktoren, die durch verschiedene Konzentrationen innerhalb des *Shh*-Gradienten, der von der Bodenplatte produziert wird, reguliert werden, sollten hiervon betroffen sein (siehe 1.3.2). Der Transkriptionsfaktor *Irx3* gehört zu den Klasse I-Genen, deren Expression durch hohe Konzentrationen von *Shh* inhibiert wird (Briscoe und Ericson, 2001). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen konnte daher eine ventrale Erweiterung der *Irx3*-Expression beobachtet werden (Abb.3.10 O,P). Die Expression von *Irx1*, einem Marker dessen

Regulation wahrscheinlich nicht Shh unterliegt, scheint in *Ftm*^{-/-}-Embryonen unverändert (Abb.3.10 M,N).

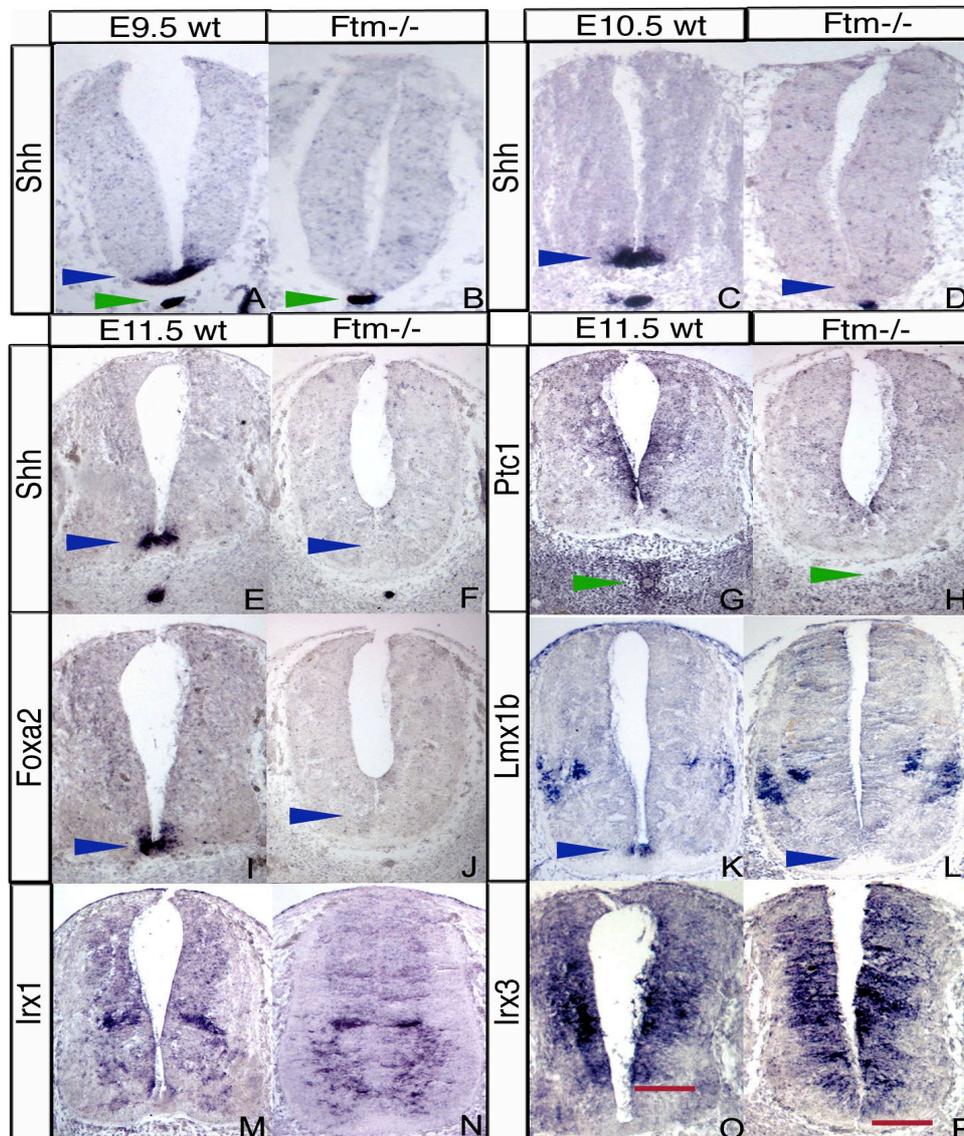


Abbildung 3.10: Musterbildung im Neuralrohr I

WISH-Analyse auf transversalen Paraffindünnschnitten.

A-F: In den Stadien E9.5 (A,B), E10.5 (C,D) und E11.5 (E,F) ist in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ein Verlust der *Shh*-Expression in der Bodenplatte zu beobachten. Die Expression in der Chorda dorsalis hingegen ist unverändert.

G,H: In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist eine deutliche Reduktion der *Ptc1*-Expression im Neuralrohr zu beobachten. Auch in dem Mesenchym, welches die Chorda dorsalis umgibt, ist eine Reduktion des *Ptc1*-Expression festzustellen.

I,J: Im Vergleich zum Wildtyp zeigen *Ftm*^{-/-}-Embryonen einen Verlust der *Foxa2*-Expression in der Bodenplatte.

K,L: In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist ein Verlust der *Lmx1b*-Expression in der Bodenplatte zu detektieren. Die Expression in den Interneuronen ist unbeeinträchtigt.

M,N: Die *Irx1*-Expression scheint unverändert zu sein in *Ftm*^{-/-}-Embryonen.

O,P: Die Expressionsdomäne von *Irx3* zeigt in *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine deutlich Expansion nach ventral.

Blaue Pfeile markieren die Bodenplatte, grüne Pfeile die Chorda dorsalis. Die roten Linien markieren Expressionsgrenzen.

Die weiteren Analysen der ventralen Musterbildung im Neuralrohr in *Ftm*^{-/-}-Embryonen wurden mit Hilfe von Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten (siehe 2.10) durchgeführt. Im Gegensatz zu der beobachteten *Shh*-Expression in *Ftm*^{-/-}-Embryonen, die nur streckenweise in der Bodenplatte verlorengegangen war, konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Proteins vollständig war. Ausschließlich in der Chorda dorsalis konnten *Shh* positive Zellen detektiert werden (Abb.3.11 A,B). Im Einklang mit den Hybridisierungsdaten konnte auch in dieser Analyse ein kompletter Verlust der *Foxa2*-Expression in mutanten Embryonen beobachtet werden (Abb.3.11 I,J). *Nkx2.2* positive Zellen, die Vorläuferzellen der V3-Interneuronen, sind im Wildtyp dorsal zur Bodenplatte positioniert (Abb.3.11 E). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist ihre Anzahl stark reduziert bis hin zu einem völligen Verlust (Abb.3.11 F). Die Expression von *MNR2* ist indikativ für Motoneuronen, welche normalerweise dorso-lateral zu der *Nkx2.2* Expressionsdomäne zu finden sind (Abb.3.11 C). Ähnlich wie die Expression von *Nkx2.2* ist auch die *MNR2*-Expression in *Ftm*^{-/-}-Embryonen reduziert. *MNR2* positive Zellen sind nur vereinzelt vorzufinden (Abb.3.11 D). *Chx10* ist ein Markergen für V2 Neuronen, und *Evx1* ist ein Markergen für V1 Neuronen. Beide Gene werden in lateralen Domänen im ventralen Neuralrohr exprimiert (Abb.3.11 G und K). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist die Expression von *Chx10* und *Evx1* nach ventral erweitert. Zusätzlich findet man positive *Chx10* und *Evx1* Zellen innerhalb der Mittellinie, dort wo normalerweise die Bodenplatte positioniert ist (Abb.3.11 H und L). *Pax6* gehört, wie auch *Irx3*, zu den Klasse I-Genen. In wildtypischen Embryonen wird die *Pax6*-Expression im ventralen Neuralrohr durch hohe *Shh*-Konzentrationen, die von der Bodenplatte ausgehen, inhibiert (Abb.3.11 M,O). Der Verlust der Bodenplatte und des dortigen *Shh*-Signals bewirkt in *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine ventrale Expansion der *Pax6* Expressionsdomäne (Abb.3.11 N,P). Neben *Pax6* ist auch *Pax2*, ein Marker für DI4 und DI6 Neuronen (dorsale Interneuronen 4 und 6), nach ventral expandiert. Neben den Defekten in der Musterbildung scheint auch die Morphologie des Neuralrohrs durch den Verlust von *Ftm* betroffen zu sein. Vergleicht man die Region in der sich normalerweise die Bodenplatte ausbilden würde, erkennt man eine deutlich Verdickung des Neuroepithels in *Ftm*^{-/-}-Embryonen. Zusätzlich scheint die Form des *Ftm*^{-/-}-Neuralrohrs rundlicher als die des wildtypischen Neuralrohrs. Diese Formveränderungen sind ebenfalls im Neuralrohr von *Shh*^{-/-}-Embryonen zu beobachten (Abb.3.12). Die Defekte in der Neuralrohrmusterbildung, speziell der Verlust der am weitesten ventral gelegenen Neuronen, bestärken die Vermutung, dass *Ftm* eine entscheidende Rolle innerhalb der *Shh*-Signaltransduktion hat.

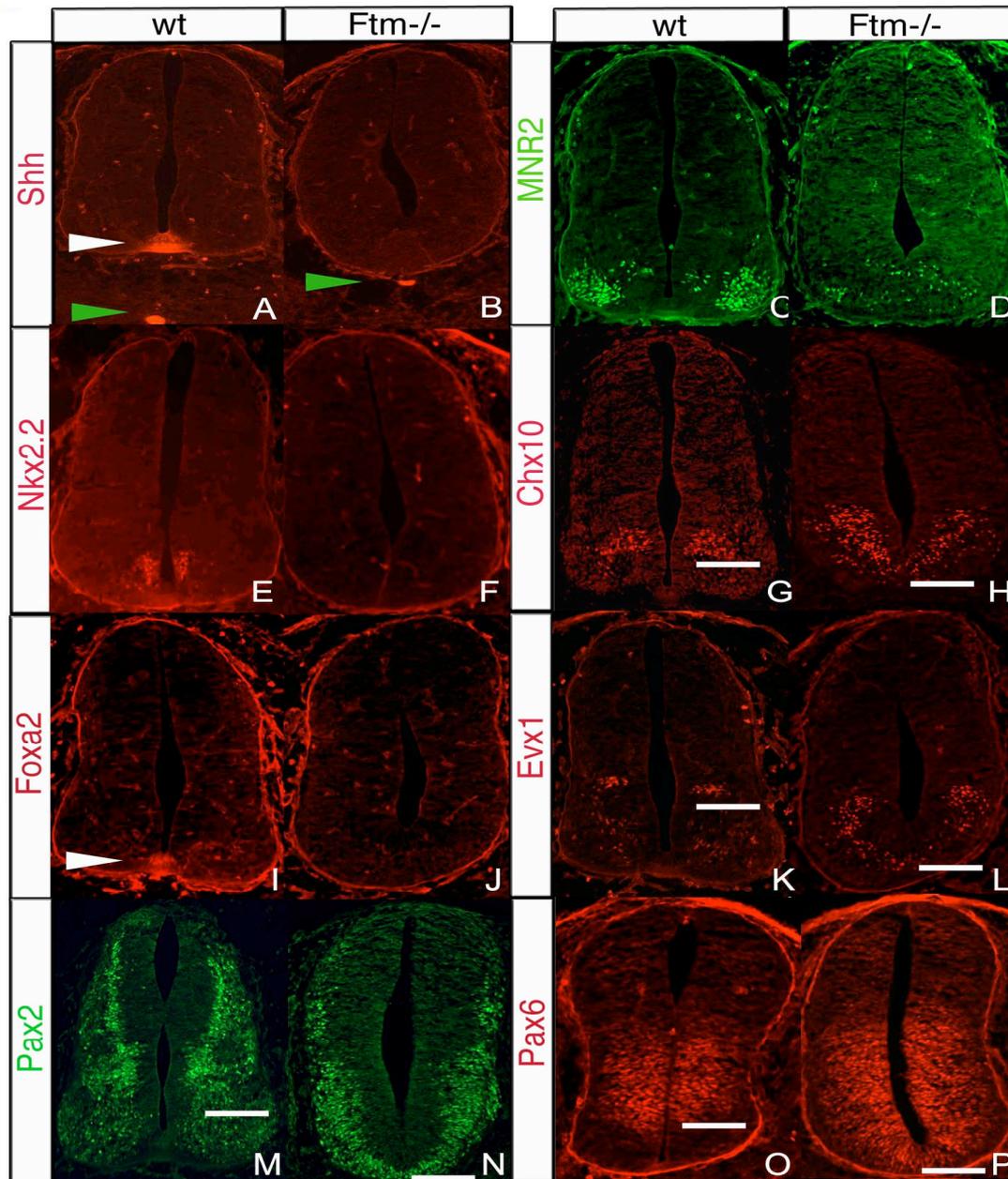


Abbildung 3.11: Musterbildung im Neuralrohr II

Antikörperfärbungen auf transversalen Kryostatschnitten zum Zeitpunkt E11.5.

A,B: *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigen einen kompletten Verlust der Shh-Expression in der Bodenplatte im Vergleich zum Wildtyp.

C,D: MNR2 positive Zellen (Motoneuronen) sind lateral zur Bodenplatte lokalisiert (C). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen sind diese stark reduziert (D).

E,F: Im Wildtyp wird Nkx2.2 dorsal zur Bodenplatte exprimiert (E). *Ftm*^{-/-}-Embryonen hingegen zeigen einen kompletten Verlust von Nkx2.2 positiven Zellen.

G,H: Im Vergleich zum Wildtyp sind Chx10 positive Zellen in *Ftm*^{-/-}-Embryonen nach ventral erweitert

I,J: Im Wildtyp ist Foxa2 indikativ für die Bodenplatte (I). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist Foxa2 nicht detektierbar (J).

K,L: Im Vergleich zum Wildtyp ist die Expression von *Evx1* in *Ftm*^{-/-}-Embryonen nach ventral erweitert

M-P: Im Wildtyp werden Pax2 und Pax6 im ventralen Neuralrohr inhibiert (M,O). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist die Expression beider Gene nach ventral expandiert (N,P).

Weißer Pfeile markieren die Bodenplatte, grüne Pfeile die Chorda dorsalis. Die weißen Linien markieren Expressionsgrenzen.

3.3.2 Epistatische Analysen

Die bisherigen Analysen sprechen eindeutig für eine Funktion von *Ftm* innerhalb des Hh-Signalweges. Um die Position innerhalb der Kaskade einordnen zu können, wurden *Ftm*-mutante Tiere mit Mutanten, in denen andere Komponenten des Signalweges ausgefallen sind, gekreuzt.

3.3.2.1 Analyse von *Ftm/Shh*-Mutanten

Das Shh-Protein ist der überwiegende Ligand der Hh-Signaltransduktion in der murinen Embryonalentwicklung (Chiang et al., 1996; siehe 1.3.1). Die Anwesenheit des Shh-Liganden ist das initiale Signal der Kaskade und reguliert somit die Aktivierung der Hh-Zielgene.

Für die erste epistatische Analyse wurden *Ftm*-mutante mit *Shh*-mutanten Tieren (Chiang et al., 1996) gekreuzt und die Musterbildung des Neuralrohrs in *Ftm/Shh*-Mutanten analysiert. Die Genotypisierung dieser Tiere erfolgte mit Hilfe von PCR-Analysen genomischer DNA, die aus extraembryonalen Membranen gewonnen wurde (siehe Anhang Abb. A2). Wie schon zuvor für *Ftm*^{-/-}-Embryonen beschrieben (Abb.3.11), ist eine Reduktion von MNR2 und Nkx2.2 exprimierenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb.3.12 A,B und D,E). Die Expression von Mash1, einem dorsalen Marker, zeigt eine leichte Erweiterung nach ventral (Abb.3.12 C,F). Ein kompletter Verlust der Hh-Signaltransduktion bewirkt im Vergleich zum Verlust von *Ftm* stärkere Veränderungen in der ventralen Musterbildung. So zeigen *Shh*^{-/-}-Embryonen einen völligen Verlust von MNR2 und Nkx2.2 exprimierenden Zellen (Abb.3.12 G,H). Die Expansion der Mash1-Expression ist ebenso verstärkt; Mash1 positive Zellen sind in der Mittellinie des Neuralrohrs anwesend, dort wo normalerweise die Bodenplatte gebildet wird (Abb.3.12. I). Vergleicht man die Morphologie des Neuralrohrs zwischen *Ftm*^{-/-}-Embryonen und *Shh*^{-/-}-Embryonen, so ist auch hier eine stärkere Ausprägung der morphologischen Veränderungen zu beobachten. Die ventrale Verdickung des *Shh*^{-/-}-Neuralrohrs gleicht der von *Ftm*^{-/-}-Embryonen, eine Erweiterung des Lumens sorgt aber für eine noch stärker ausgeprägte runde Form. Ein zusätzlicher Verlust von *Ftm*, zeigt keinerlei Auswirkung auf die veränderte Musterbildung im *Shh*^{-/-}-Neuralrohr (Abb.3.12 J-L). *Ftm*^{-/-};*Shh*^{-/-}-Embryonen zeigen einen kompletten Verlust von MNR2 und Nkx2.2 exprimierenden Zellen (Abb.3.12 J,K). Ebenso zeigt Mash1 eine starke Erweiterung nach ventral (Abb.3.12 L). Die starke rundliche Form des Neuralrohrs, die in *Shh*^{-/-}-Embryonen beobachtet wurde, scheint in *Ftm*^{-/-};*Shh*^{-/-}-Embryonen weniger stark ausgeprägt zu sein. In *Ftm*^{-/-};*Shh*^{-/-}-Embryonen ist im Vergleich zu *Shh*^{-/-}-Embryonen weder eine Abnahme noch eine Zunahme

der molekularen Veränderungen zu beobachten. Dies zeigt, dass *Ftm* und *Shh* in der gleichen Signalkaskade einzuordnen sind.

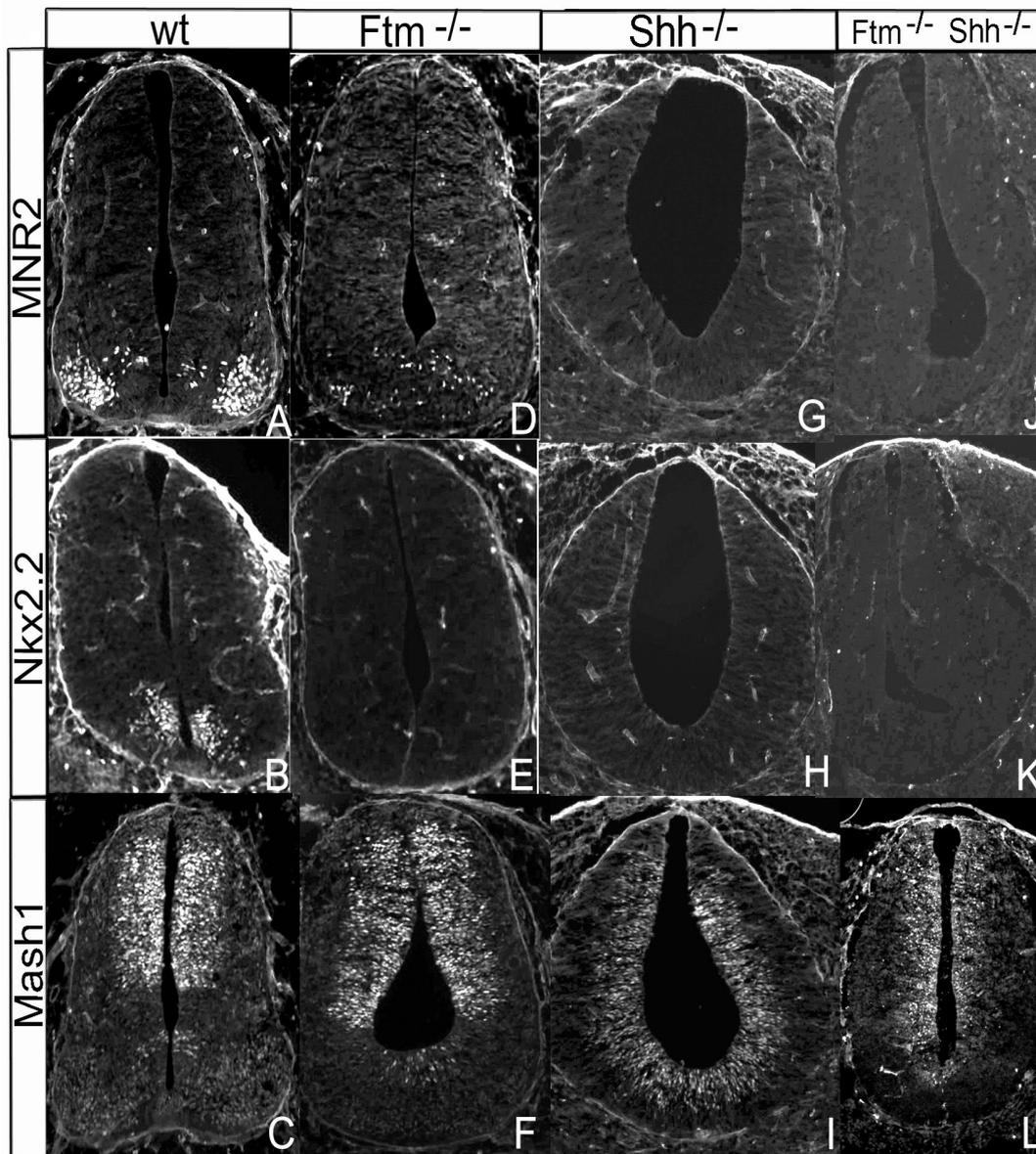


Abbildung 3.12: Musterbildung im Neuralrohr III

Antikörperfärbungen auf transversalen Kryostatschnitten.

A-C: Im Wildtyp wird MNR2 (A) in zwei Domänen lateral zu Nkx2.2 (B) exprimiert, Mash1 in dorsalen Regionen des Neuralrohrs (C).

D-F: In *Ftm*^{-/-}-Embryonen findet man eine starke Reduktion von MNR2 (G) und Nkx2.2 (H) exprimierenden Zellen. Die Expression von Mash1 zeigt eine leichte Erweiterung nach ventral (F).

G-I: In *Shh*^{-/-}-Embryonen ist ein kompletter Verlust von MNR2 (D) und Nkx2.2 (E) exprimierenden Zellen zu beobachten. Die Expression von Mash1 zeigt eine starke Expansion nach ventral (I).

J-M: Im Vergleich zu *Shh*^{-/-}-Embryonen bleibt der Verlust von MNR2 (J) und Nkx2.2 (K) exprimierenden Zellen in *Ftm*^{-/-};*Shh*^{-/-}-Embryonen erhalten. Auch die Mash1-Expression zeigt die gleiche ventrale Erweiterung wie in *Shh*^{-/-}-Embryonen (L).

3.3.2.2 Analyse von *Ftm*/*Gli3*-Mutanten

In der Shh-Signalkaskade leiten Transkriptionsfaktoren der Gli-Krüppelgenfamilie (Gli1, 2 und 3) das Signal innerhalb der Zelle weiter, wobei sie als Transkriptionsaktivatoren und Transkriptionsrepressoren agieren können (siehe 1.3.1; Huangfu und Anderson, 2006). Das ankommende Shh-Signal wird in ein relatives Verhältnis von Gli-Repressoren zu Gli-Aktivatoren umgesetzt, welches zur Musterbildung im Neuralrohr führt (Briscoe und Ericson, 2001).

Shh-mutante Embryonen zeigen, wie auch *Ftm*^{-/-}-Embryonen, einen Verlust ventraler Neuronen (z.B. Motoneuronen; siehe Abb.3.12), und diverser Interneuronen. In *Shh*/*Gli3*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Elimination von Gli3 die Defekte in der Musterbildung des Neuralrohrs die durch den Verlust von *Shh* entstanden sind, teilweise wieder aufhebt (Jacob und Briscoe, 2003). Um zu testen, ob auch in *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine Reduktion von *Gli3* eine Milderung des Neuralrohrphänotypen bewirken kann, wurden *Ftm*-mutante Tiere mit *Xt* mutanten Tieren, die ein Nullallel für *Gli3* besitzen (Hui und Joyner, 1993; Büscher et al., 1998), gekreuzt und die Musterbildung im Neuralrohr analysiert (Abb.3.11). Die Genotypisierung dieser Tiere erfolgte mit Hilfe von PCR-Analysen genomischer DNA, die aus extraembryonalen Membranen gewonnen wurde (siehe Anhang Abb. A2). Wie schon zuvor gezeigt wurde (Abb.3.11 und 3.12), zeigen *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine Reduktion von MNR2 und Nkx2.2 exprimierenden Zellen in Vergleich zum Wildtyp (Abb.3.13 A,B und D,E). Zusätzlich ist die Expression von Pax2, welches normalerweise durch Shh im ventralen Neuralrohr inhibiert wird, nach ventral expandiert (Abb.3.13 C,F). Reduziert man die Menge von Gli3 in *Ftm*^{-/-}-Embryonen, kommt es zu einer deutlichen Abschwächung dieser Fehlmusterung. In *Ftm*^{-/-};*Xt*^{+/+}-Embryonen steigt die Zahl von MNR2 und Nkx2.2 positiven Zellen im Vergleich zu *Ftm*^{-/-}-Embryonen an (Abb.3.13 G,H). Ebenso ist eine verminderte ventrale Expansion der Pax2-Expressionsdomäne zu beobachten (Abb.3.13 I). Eliminiert man *Gli3* vollständig in *Ftm*^{-/-}-Embryonen, bewirkt dies eine fast vollständige Regenerierung ventraler Neuronen. Die Anzahl von MNR2 und Nkx2.2 exprimierenden Zellen erreicht annähernd wildtypischen Standard. Zugleich ist Pax2 abwesend im ventralen Neuralrohr in *Ftm*^{-/-};*Xt*/*Xt* Embryonen (Abb.3.13 J-M).

Auch die Form der Expressionsdomänen ist wiederhergestellt: Während in *Ftm*^{-/-};*Xt*^{+/+}-Embryonen MNR2 und Nkx2.2 nur in einer Domäne in der Mitte des Neuralrohrs exprimiert wurden, bilden sich in *Ftm*^{-/-};*Xt*/*Xt*-Embryonen zwei laterale Domänen aus. Zusätzlich sind die morphologischen Veränderungen des Neuralrohrs in *Ftm*^{-/-};*Xt*/*Xt*-Embryonen aufgehoben.

Während *Ftm*^{-/-}-Embryonen und *Ftm*^{-/-};*Xt*^{+/+}-Embryonen eine Verdickung des ventralen Neuroepithels und eine abgerundete Form zeigen, sind diese Veränderungen in *Ftm*^{-/-};*Xt*^{Xt}-Embryonen nicht mehr zu beobachten. Die Dicke des ventralen Neuroepithels und die Form des Neuralrohrs entsprechen wildtypischen Embryonen.

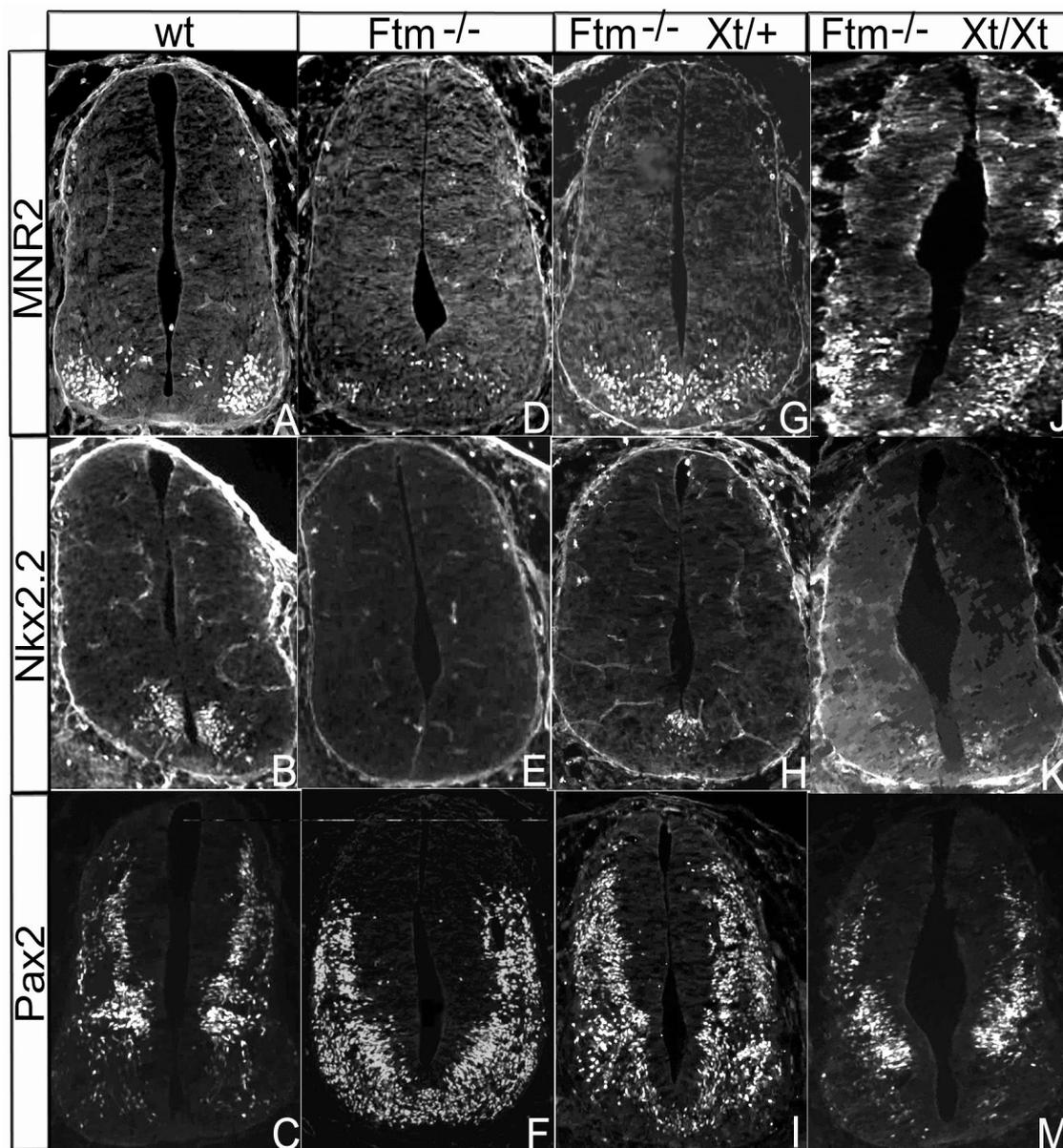


Abbildung 3.13: Musterbildung im Neuralrohr IV

Antikörperfärbungen auf transversalen Kryostatschnitten.

A-C: Im Wildtyp wird MNR2 (A) in zwei Domänen lateral zu Nkx2.2 (B) exprimiert, Pax2 in dorsalen Regionen des Neuralrohrs (C).

D-F: In *Ftm*^{-/-}-Embryonen findet man eine starke Reduktion von MNR2 (D) und Nkx2.2 (E) exprimierenden Zellen. Die Expression von Pax2 ist nach ventral expandiert (F).

G-I: Im Vergleich zu *Ftm*^{-/-}-Embryonen steigt in *Ftm*^{-/-};*Xt*^{+/+}-Embryonen die Anzahl von MNR2 (G) und Nkx2.2 (H) exprimierenden Zellen an. Zusätzlich ist die ventrale Expansion von Pax2 vermindert (I).

J-M: In *Ftm*^{-/-};*Xt*^{Xt}-Embryonen werden sowohl MNR2 (J) und Nkx2.2 (K) wie im Wildtyp in zwei lateralen Domänen exprimiert. Auch das Expressionsmuster von Pax2 ist wieder vollkommen hergestellt (M).

Die Defekte im ventralen Neuralrohr von *Ftm*^{-/-}-Embryonen können somit stufenweise durch eine Reduktion von *Gli3* abgeschwächt bzw. eliminiert werden. *Ftm* scheint somit oberhalb von *Gli3* in der Shh-Signalkaskade zu wirken.

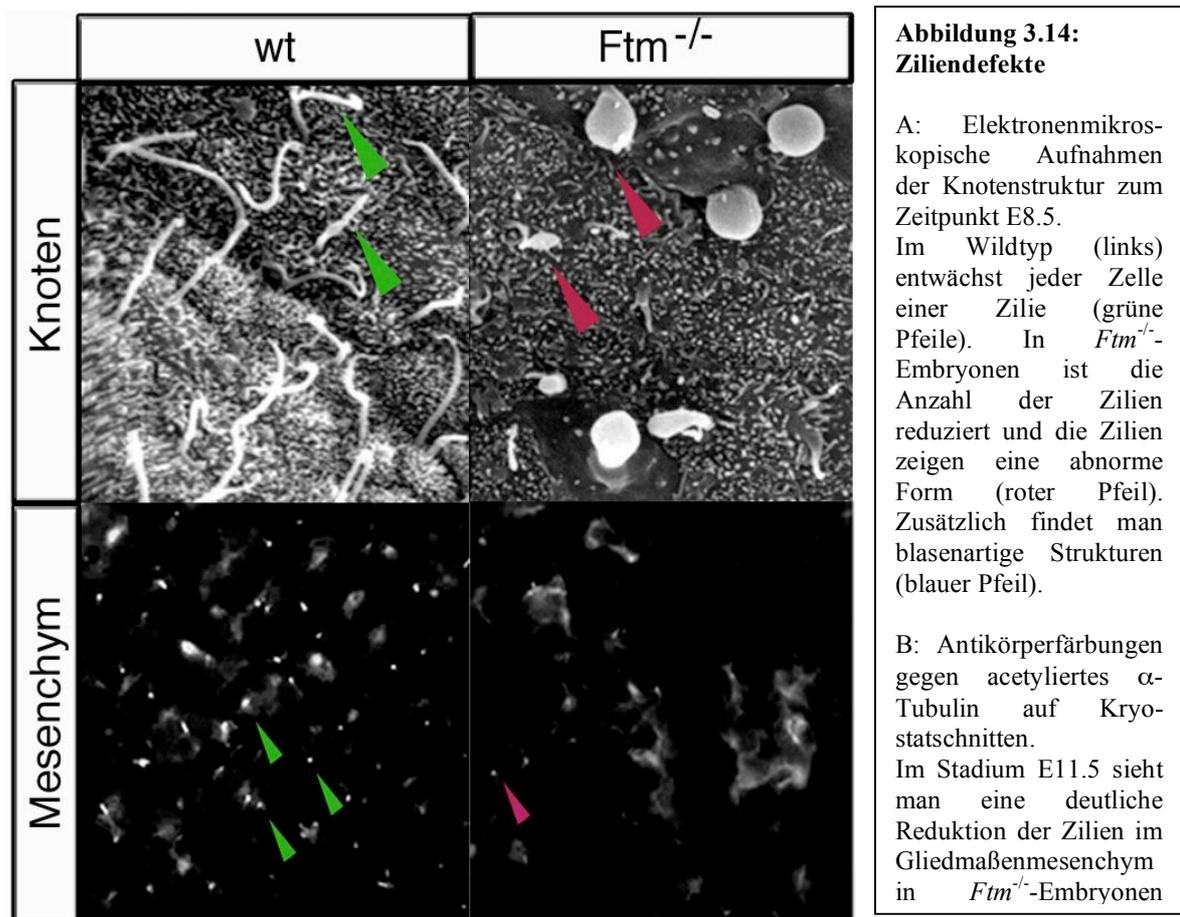
3.4 *Ftm* und Zilien

Zilien sind spezialisierte Strukturen und können auf verschiedene Art und Weise an Entwicklungsprozessen teilnehmen. Bewegliche Zilien im Knoten ermöglichen die ersten Schritte zur Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie. Unbewegliche Zilien können als Sensoren, und auch als spezialisierte Kompartimente dienen, wie z.B. in der Niere oder dem Neuralrohr (siehe 1.4; Scholey und Anderson, 2006). Defekte in der Funktion von Zilien oder deren Assemblierung und Aufrechterhaltung können zu drastischen Störungen der Embryonalentwicklung führen. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust oder eine Funktionsstörung von Zilien die Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie und die Shh-Signaltransduktion beeinträchtigt (Hirokawa et., 2006; Scholey und Anderson, 2006).

3.4.1 Ziliendefekte in *Ftm* mutanten Tieren

Die beobachteten Defekte in *Ftm*^{-/-}-Embryonen und die Homologie zu RPGRIP, einem Zilien assoziierten Protein (siehe 1.2.4), ließen die Vermutung zu, dass der Verlust von *Ftm* vielleicht auch die Funktion oder Assemblierung von Zilien beeinträchtigt. Um diesen Verdacht nachzugehen, wurden die Zilien in verschiedenen embryonalen Strukturen und Geweben analysiert. Als erstes wurden die motilen Zilien im Knoten untersucht. Hierzu wurden Embryonen des Stadiums E8.5 elektronenmikroskopisch untersucht (diese Untersuchung wurde mit Hilfe von Dr. Rüdiger Riehl, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt). Im Wildtyp besitzt jede Zelle innerhalb des Knotens eine einzelne Zilie, die deren Oberfläche entwächst (Abb.3.14 A links). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen hingegen ist eine Reduktion der Zilienanzahl zu beobachten (Abb.3.14 A rechts). Verbleibende Zilien zeigen eine deformierte Form (Abb.3.14 A rechts; roter Pfeil) und es lassen sich blasenartige Strukturen finden, bei denen es sich vermutlich ebenfalls um stark deformierte Zilien handelt (Abb.3.14 A rechts; blauer Pfeil). Primäre Zilien, die in fast allen Körperzellen anzufinden sind, wurden mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen acetyliertes α -Tubulin untersucht, welches das Axonem der

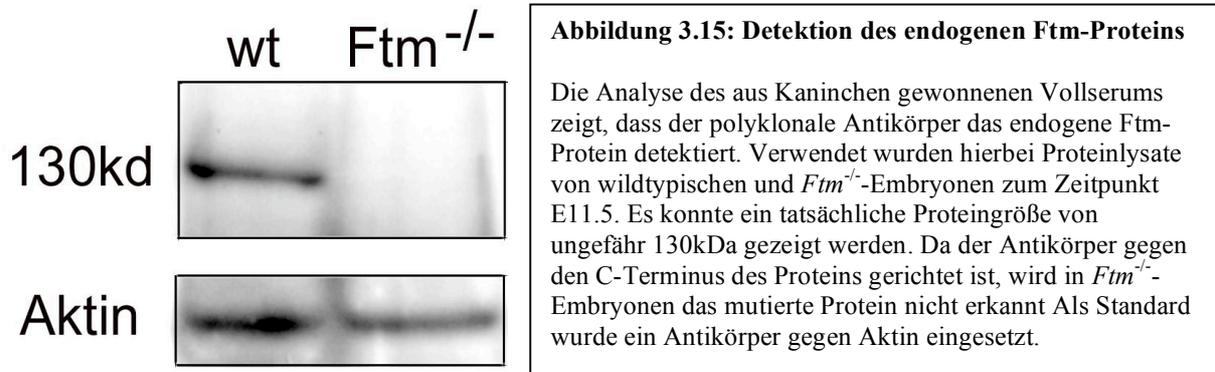
Zilie markiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch die Zilienanzahl der mesenchymalen Zellen innerhalb der Gliedmaßenknospe zum Zeitpunkt E11.5 in *Ftm*^{-/-}-Embryonen reduziert ist (Abb.3.14 B). Die reduzierte Anzahl von Zilien in *Ftm*^{-/-}-Embryonen deutet darauf hin, dass *Ftm* eine Funktion in der Zilienassemblierung oder in der Aufrechterhaltung der Zilienstruktur spielt.



3.4.2 Die Lokalisierung von *Ftm*

Um eine genaue Lokalisierung von *Ftm* gewährleisten zu können, wurde bei der Konstruktion des Mutagenesekonstruktes eine Fusion mit EGFP geschaffen. Die Analyse von *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigte jedoch keine GFP-Expression in *Ftm*^{-/-}-Embryonen. Grund hierfür scheint die geringe Expressionsstärke des *Ftm*-Proteins in Kombination mit einer wahrscheinlich veränderten Lokalisierung des mutanten Proteins zu sein. Um dennoch eine genaue Lokalisierung des *Ftm*-Proteins zu ermöglichen, wurde ein polyklonaler *Ftm*-Antikörper in Kaninchen hergestellt (siehe 2.15). Zur Immunisierung der Tiere wurde ein GST-*Ftm*-

Fusionsprotein generiert, welches den Bereich von Aminosäure 1060 bis 1264 (inklusive der vollständigen RID-Domäne) beinhaltet. Die Fähigkeit des erhaltenen Vollserums endogenes Ftm-Protein zu detektieren wurde zunächst in Westernblotanalysen gezeigt (Abb.3.15).



Die Verwendung des Vollserums erzeugte auf histologischen Schnitten jedoch starken Hintergrund, weswegen der Antikörper für die weitere Verwendung durch eine Affinitätsaufreinigung optimiert wurde (siehe 2.15.3).

In embryonalen Mausfibroblasten (MEFs; engl. Mouse Embrionic Fibroblasts) konnte unter Verwendung des affinitätsgereinigten Ftm-Antikörpers eine distinkte Lokalisierung von Ftm in primären Zilien gezeigt werden (Abb.3.16 A). Die Färbung zeigte eine Anreicherung an einem Zilienende. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Lokalisierung um das distale Ende des Axonems oder einer der proximalen Zilienstrukturen (Transitionszone, Basalkörper) handelt, wurde eine Doppelfärbung mit γ -Tubulin durchgeführt. γ -Tubulin markiert die perizentrioläre Masse (PCM), eine Tubulinanreicherung, die sich am proximalen Ende des Basalkörpers befindet. Die Färbungen gegen Ftm und die PCM zeigten ein überlappendes Muster. Ftm ist somit an der Zilienbasis, dem Basalkörper, lokalisiert (Abb.3.16 B).

Eine Lokalisation von Ftm in der Transitionszone (distaler Bereich der Zilienbasis) kann ausgeschlossen werden, da das überlappende Expressionsmuster von Ftm und γ -Tubulin eindeutig auf eine Anreicherung im proximalen Bereich der Zilienbasis zeigt. Neben der Lokalisation von Ftm in MEFs, konnte mit dem verwendeten Antikörper auch das humane Homolog zu Ftm (KIAA1005) in humanen embryonalen Fibroblasten (HEFs; engl. Human Embrionic Fibroblasts) detektiert werden. Dieses ist ebenfalls an der Zilienbasis positioniert (Abb.3.16 C). Neben der genauen Lokalisierung von Ftm, wurde auch die Verteilung, bzw. das Vorhandensein von Ftm in den verschiedenen Zilien unterschiedlicher embryonaler Strukturen untersucht. Ftm konnte an der Zilienbasis immotiler chemosensorischer Zilien im

Neuralrohr (Abb.3.16 D) und mesenchymaler Gliedmaßenzellen (Abb.3.16 E) gefunden werden.

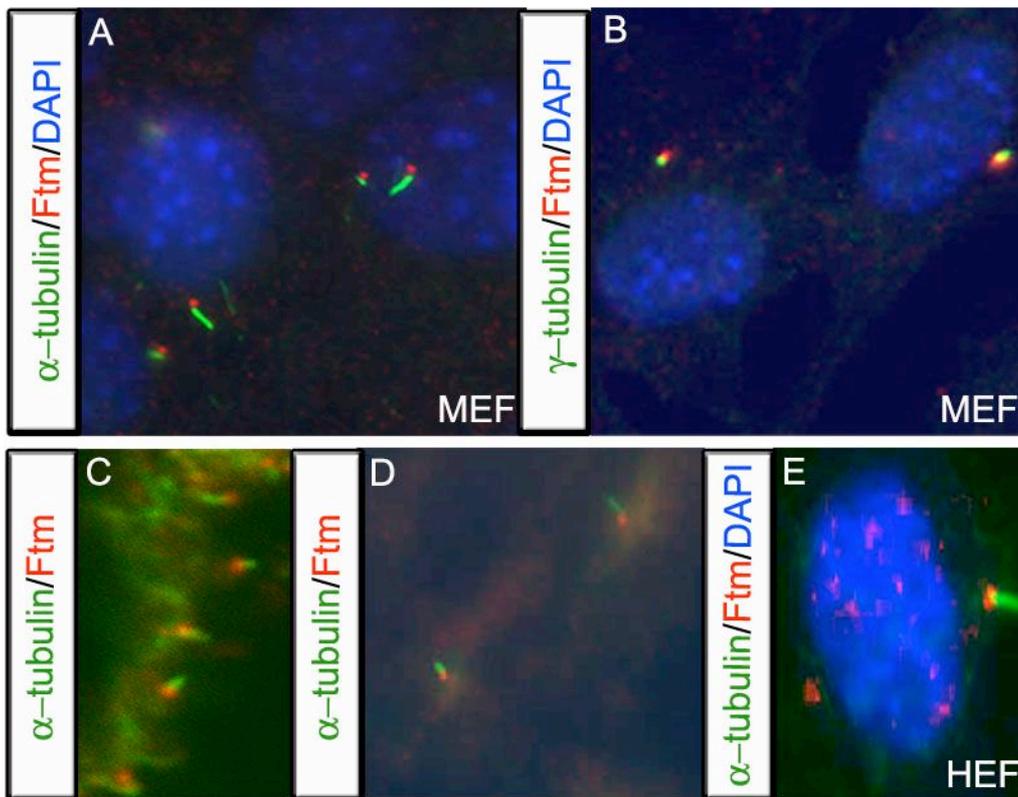


Abbildung 3.16: Lokalisierung von Ftm in Zellen und verschiedenen Geweben

A-C: Antikörperfärbungen auf fixierten Zellen. (A) Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen acetyliertes α -Tubulin (grün) und Ftm (rot) zeigten, dass Ftm an einem Zilienende lokalisiert ist. (B) Das überlappende Expressionsmuster von Ftm (rot) und γ -Tubulin (grün) identifizierte dieses Zilienende als den Basalkörper der Zilie.

D-F: Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten verschiedener Gewebe. Ftm (rot) ist in immotilen chemosensorischen Zilien im Neuralrohr (C) und in mesenchymalen Gliedmaßenzellen (D) (grün markiert acetyliertes α -Tubulin) nachweisbar. (E) Auch in humanen Fibroblasten ist das humane Ftm Homolog (rot) an der Zilienbasis lokalisiert (grün markiert acetyliertes α -Tubulin).

Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

3.5 Die Funktion von Ftm

3.5.1 Ftm hat einen direkten Einfluss auf die Shh-Signaltransduktion

Die Lokalisierung von Ftm am Basalkörper bekräftigt die Hypothese für eine Funktion von Ftm innerhalb der Shh-Signalkaskade, sowie für eine Rolle in der Zilienassemblierung und/oder Aufrechterhaltung. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass der Shh-Signalweg an Zilien gekoppelt ist (siehe 1.3.1). Defekte in der Zilienstruktur oder ein kompletter

Zilienverlust führen zu deutlichen Beeinträchtigungen bis hin zum Verlust der Shh-Signaltransduktion (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die Beeinträchtigung des Shh-Signalweges in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ein direkter Effekt des *Ftm*-Verlustes ist, oder ob es ein sekundärer Effekt ist, der durch eine reduzierte Zilienanzahl verursacht wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Fähigkeit wildtypischer und *Ftm*-mutanter Zellen untersucht unter definierten Bedingungen Zilien auszubilden. Hierzu wurden isolierte mesenchymale Gliedmaßenzellen (MLCs; engl. Mesenchymal Limb Cells) bis zur Konfluenz kultiviert und das Vorhandensein von Zilien mit Antikörperfärbungen gegen acetyliertes α -Tubulin nachgewiesen. Der Vergleich wildtypischer und *Ftm*-mutanter Zellen zeigte keinen Unterschied: Nach Erreichen der Konfluenz entwickelten beide Zelllinien eine vergleichbare

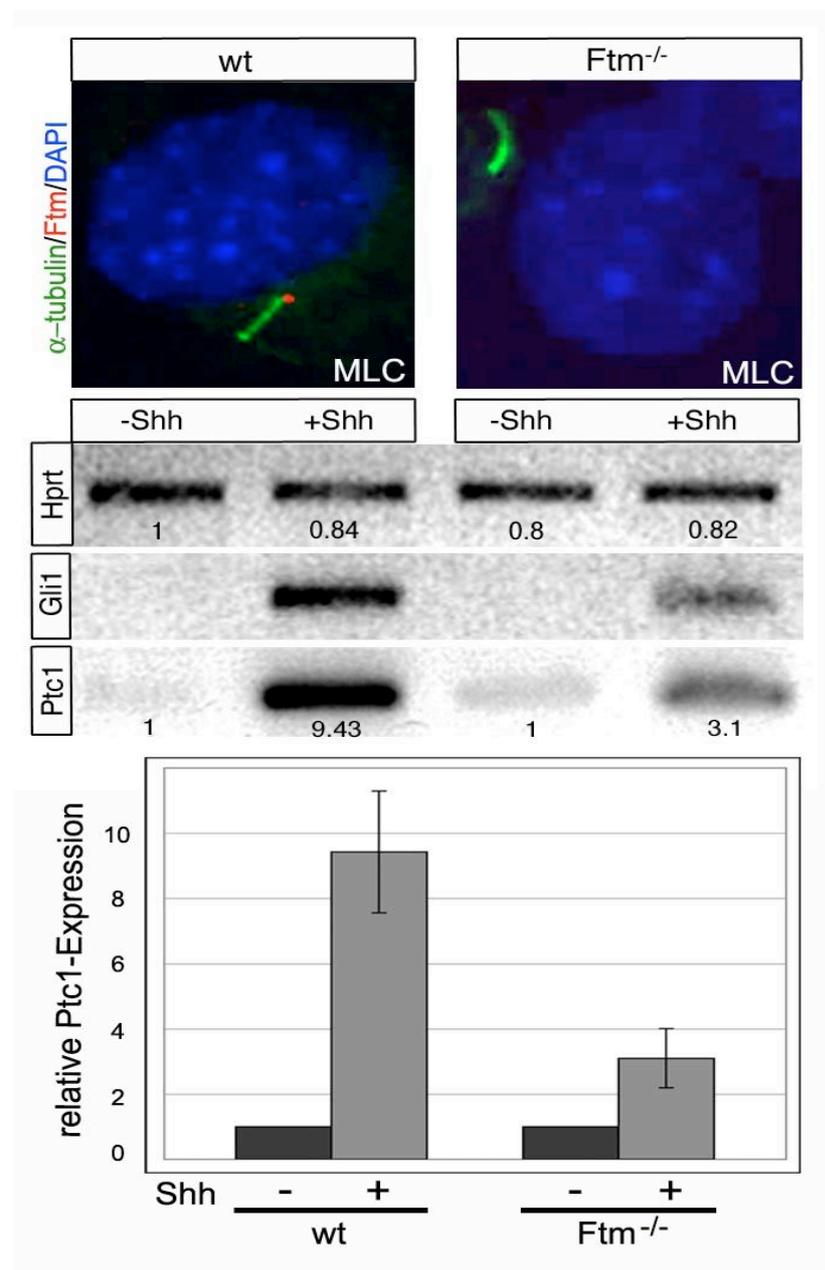


Abbildung 3.17:
Die Funktion von Ftm

Oben: Die Zilien in *Ftm*^{-/-}-MLCs und zeigen keinerlei Veränderungen im Vergleich zu wildtypischen MLCs. (grün = acetyliertes α -Tubulin; rot = Ftm; blau = DAPI).

Mitte: In wildtypischen MLCs konnte ein deutlicher Anstieg der *Gli1*- und *Ptc1*-Transkription gezeigt werden (nach 24stündiger Inkubation mit rekombinanten Shh-Protein). In *Ftm*^{-/-}-MLCs ist diese Transkriptionsinduktion deutlich reduziert. Die Normalisierung erfolgte gegen Hprt.

Unten: Eine quantitative Analyse der *Ptc1*-Expression zeigte in unabhängigen Experimenten (n=3), dass in wildtypischen MLCs eine Transkriptionerhöhung um den Faktor 9 (+/- 1.23) zu erzielen ist (nach Induktion mit rekombinanten Shh-Protein). In *Ftm*^{-/-}-MLCs konnte nur eine Transkriptionerhöhung um den Faktor 3 (+/- 0.91) erzielt werden. Die Induktion in *Ftm*^{-/-}-MLCs ist somit stark reduziert im Vergleich zu wildtypischen MLCs.

Anzahl von Zilien. Ein Verlust von *Ftm* scheint somit keinen Einfluss auf die Zilienassemblierung zu haben (Abb.3.17 oben). Um zu zeigen, dass die Beeinträchtigung des Shh-Signalweges in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ein direkter Effekt des *Ftm*-Verlustes ist, wurde die Fähigkeit der Signalweiterleitung in Zellkultur getestet. Wildtypische und *Ftm*-mutante Zellen wurden mit rekombinantem Shh-Protein inkubiert und die Fähigkeit der Signalweiterleitung anhand der Aktivierung der Zielgene *Ptc1* und *Gli1* gemessen. In wildtypischen Zellen zeigte die RT-PCR Analyse eine deutliche Erhöhung der *Ptc1*- und *Gli1*-Transkriptmenge nach 24stündiger Inkubation mit Shh-Protein im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb.3.17 Mitte). In *Ftm*-mutanten Zellen ist eine deutliche Störung in der Signalweiterleitung zu erkennen. Zwar findet eine Induktion der Zielgene *Ptc1* und *Gli1* nach Inkubation mit Shh-Protein statt, doch ist diese gegenüber den wildtypischen Zellen stark reduziert (Abb.3.17 Mitte). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Induktion von *Ptc1* in wildtypischen und *Ftm*-mutanten Zellen in mehreren unabhängigen Experimenten (n=3) ermittelt, die Bandenintensitäten gemessen, und die Werte miteinander verglichen (Abb.3.17 unten). In wildtypischen Zellen ist eine bis zu neunfache Erhöhung der Transkriptmenge nach Induktion zu erzielen. *Ftm*-mutante Zellen hingegen zeigen nur eine dreifache Transkripterhöhung. Diese Analyse zeigt, dass *Ftm* eine direkte Rolle in der Signaltransduktion des Shh-Signals spielt.

3.5.2 *Ftm* ist eine spezifische Komponente des zilienassoziierten Hh-Signalweges in Vertebraten

Phylogenetische Analysen zeigten, dass während der Evolution *Ftm* in nahezu allen Spezies erhalten geblieben ist. So lassen sich in vergleichenden Sequenzanalysen *Ftm*-Homologe in niederen Organismen, wie den *Cnidarien* bis hin zum Menschen wiederfinden. Eine bedeutende Ausnahme bilden hier jedoch die Arthropoden und Nematoden, da in ihnen keine *Ftm*-Homologe gefunden werden konnten (siehe 1.2.4). Neueste Untersuchungen zeigten, dass in höheren Vertebraten nahezu jede Zelle eine Zilie besitzt und dass wichtige Signaltransduktionen in Vertebraten an Zilien gekoppelt sind (siehe 1.3.1 und 1.4). Im Gegensatz dazu, ist die Anwesenheit von Zilien in Arthropoden (wie z.B. *Drosophila*) auf wenige Zelltypen begrenzt. Zu diesen Zelltypen gehören spezifische Neuronenzellen und die Keimzellen (Basto et al., 2006). Auch konnte in *Drosophila* bisher keine Verbindung zwischen Zilien und Signaltransduktionswegen gezeigt werden. Im Gegenteil: *Drosophila*-Mutanten, in denen Zilien abwesend sind, zeigen nur einen sehr milden Phänotypen und keine

Beeinträchtigung von Strukturen in denen z.B. der Hh-Signalweg essentiell ist (Basto et al., 2006). Vergleichende Sequenzanalysen zeigen, dass zusätzlich zu Ftm noch andere zilienassoziierte Proteine nicht im Proteom von *Drosophila* aufzufinden sind. (Tab.3.4).

Tab.3.4: Zilienassoziierte Proteine im Vergleich

<i>Protein</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Drosophila</i>
Ftm	+	-
OFD-1	+	-
Nephrocystine (1, 2 und 4)	+	-
BBS-Proteine (1-10)	+	+
IFT-Proteine (20, 52, 88 und 172)	+	+

So konnten keine *Drosophila*-Homologe von OFD-1 (Oral-Facial-Digital-Type-1) und Nephrocystinen (1, 2 und 4) gefunden werden, welche in Vertebraten für die Funktion chemosensorischer und mechanosensorischer Zilien verantwortlich sind (siehe 1.4). Homologe der BBS-Proteinfamilie (BBS1-10) und IFT-Proteine (IFT20, IFT52, IFT88 und IFT172) hingegen konnten in *Drosophila* nachgewiesen werden. Jedoch im Gegensatz zu Vertebraten scheinen IFT-Proteine in *Drosophila* keine Rolle in Signaltransduktionswegen innezuhaben (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). Diese Befunde sprechen für fundamentale Unterschiede sowohl im Aufbau als auch in der Funktion von Zilien zwischen Vertebraten und *Drosophila*. Ferner deuten sie auf eine spezifische Funktion von Ftm im ziliengekoppelten Hh-Signalweg der Vertebraten hin

4. Diskussion

4.1 Generierung der *Ftm*-Mauslinie

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Etablierung einer zielgerichteten Geninaktivierung durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ist eine der wichtigsten und meist angewandten Methoden zur Funktionsanalyse einzelner Gene. Durch die Inaktivierung einzelner Gene erfolgte die Identifikation vieler entwicklungsbiologisch wichtiger Faktoren und deren genaue Funktion innerhalb unterschiedlicher Signalkaskaden. Mittlerweile konnte mit Hilfe dieser Technik ein umfassendes Repertoire an mutanten Mauslinien erstellt werden (Lobe und Nagy, 1998).

In dieser Arbeit sollte die Funktion des *Ftm*-Gens während der Embryonalentwicklung analysiert werden. Die Grundvoraussetzung für diese Analyse war die Etablierung einer *Ftm*-mutanten Mauslinie. Zur Herstellung chimärer Tiere wurden Blastozysten mit Zellen der Klone G10-4, C8-1, B2-3 und C3-3, die in der vorangegangenen Diplomarbeit (Vierkotten, 2001) generiert worden sind, injiziert. Aus jedem der vier Klone ließen sich in diesen Transferexperimenten drei bis fünf chimäre Tiere generieren, die nach Erreichen der Geschlechtsreife zur Erzeugung heterozygot mutanter Nachkommen gekreuzt wurden. Diese Kreuzungen zeigten, dass die Chimären der Klone B2-3, G10-4 und C3-3 nicht an der Keimbahnentwicklung in den Chimären teilnehmen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die verwendeten ES-Zellklone sich nach der durchgeführten stabilen Transfektion nicht mehr in einem Zustand befanden, der es ihnen erlaubte an der Entwicklung aller Gewebe und Organe einer chimären Maus teilzunehmen (Pluripotenz). Der Klon C8-1 hingegen zeigte erfolgreiche Keimbahntransmission. Diese Nachkommen wurden zur anschließenden Zucht und Etablierung der *Ftm*-Mauslinie verwendet.

4.2 Die phänotypischen Auswirkungen des *Ftm*-Verlustes

Heterozygote *Ftm*-Tiere zeigten keine offensichtlichen Fehlbildungen oder Störungen der normalen Mausentwicklung und erwiesen sich als lebensfähig und fertil. Homozygote Tiere hingegen zeigten eine Vielzahl von Fehlbildungen in diversen Organen und Strukturen und erwiesen sich als pränatal letal. Die Auswirkungen des *Ftm*-Verlustes und die phänotypischen Veränderungen von Mutanten, in denen der Shh-Signalweg gestört ist, weisen deutliche Parallelen auf, die in den folgenden Abschnitten detaillierter beschrieben werden.

4.2.1. Missbildungen kraniofacialer Strukturen und des Gehirns

Ftm^{-/-}-Embryonen zeigen eine deutliche Reduktion der Augen und Missbildungen kraniofacialer Strukturen in Form von verkleinerten Mandibeln und der Ausbildung einer Gaumenspalte (siehe 3.2.1).

Die Entwicklung des Auges wird in der Maus im Stadium E7.5 eingeleitet und beginnt mit der Regionalisierung eines „Augenfeldes“ im Neuroektoderm. Dieser Bereich des Neuroepithels stülpt sich anschließend lateral zu beiden Seiten (nach links und rechts) aus, bis es Kontakt zum Oberflächenektoderm hat. Durch diesen Prozess wird das primäre Augenfeld in zwei sekundäre Augenfelder aufgespalten, was die Ausbildung von einem Augenpaar ermöglicht. Die Entwicklung der endgültigen Augenstruktur wird durch Wechselwirkungen zwischen dem Neuroektoderm und dem Oberflächenektoderm bewirkt. Die finalen Strukturen des Auges werden hierbei sowohl aus Bereichen des Neuroektoderms als auch aus Bereichen des Oberflächenektoderms gebildet (Bharti et al., 2005). Genetische Analysen in der Maus und Funktionsanalysen im Zebrafisch haben gezeigt, dass die frühe Regionalisierung und die Entwicklung proximaler Augenstrukturen abhängig von Shh sind (Bharti et al., 2005; Chiang et al., 1996; Ekker et al., 1995). Ein Verlust von Shh führt zu einem Verlust des Sehnervs, dessen Ursprung das proximale Neuroektoderm ist und zur Reduktion von pigmentierten Retinazellen (Bharti et al., 2005). In *Shh*^{-/-}-Embryonen findet zudem die Aufspaltung des primären Augenfeldes nicht mehr statt, wodurch sich nur ein Auge in der Mitte des Kopfes entwickelt (Cyclopia) (Chiang et al., 1996).

Auch in der Entwicklung kraniofacialer Strukturen spielt Shh eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass ein transienter Verlust von *Shh* im Huhn die Ausbildung einer Gaumenspalte verursacht (Hu und Helmes, 1999). Zusätzlich zeigen *Shh*^{-/-}-Embryonen ein reduziertes Wachstum des ersten Kiemenbogens, aus dem im Laufe der Entwicklung sowohl Teile der Mandibeln als auch der Maxillen entstehen (Yamagishi et al., 2006).

Die beobachteten Defekte der Augen und Missbildungen kraniofacialer Strukturen in *Ftm*^{-/-}-Embryonen könnten somit auch durch eine gestörte Shh-Signaltransduktion erklärt werden.

Der Verlust von *Ftm* führt ebenso zu massiven Störungen innerhalb der Gehirnentwicklung. Erste Untersuchungen zeigten eine deutliche Erweiterung des Vorderhirns (Prosenzephalon), welches unterteilt wird in anteriores Vorderhirn (Telenzephalon) und posteriores Vorderhirn (Dienzephalon) (siehe 3.2.1). Zusätzlich zeigten detaillierte Analysen der einzelnen Hirnstrukturen eine Verbreiterung des Neuroepithels im Mittelhirn (Mesenzephalon), was zu einer verengten mesenzephalischen Biegung führt (Gerhardt, 2005). Die Reduktion der *Shh*-

Expression in anterioren Hirnbereichen (siehe 3.2.1), sowie Vergleiche zu Mutanten in denen Komponenten des Shh-Signalweges betroffen sind, lassen die Vermutung zu, dass diese Veränderungen durch Störungen der Shh-Signaltransduktion verursacht werden.

So zeigen z.B. Mutanten in denen die Gene IFT88 (*Polaris*) und IFT152 (*Wimple*) betroffen sind eine ähnliche Erweiterung des Vorderhirns und eine ebenso verengte mesenzephalische Biegung (Liu et al., 2005). Molekulare Analysen einzelner Musterbildungsprozesse im Gehirn bekräftigten den Verdacht, dass eine gestörte Shh-Signaltransduktion die Ursache für die beobachteten phänotypischen Veränderungen ist: *Ngn2* (*Neurogenin-2*) ist ein Marker für dorsale Regionen des Telenzephalons und wird vermutlich positiv durch *Shh* reguliert (Fode et al., 2005). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist eine Reduktion der *Ngn2*-Expression zu beobachten (Gerhardt, 2005). *Dlx2* wird normalerweise im ventralen Teil des Thalamus, einer Struktur innerhalb des Dienzephalons, exprimiert. Diese Expression ist unter anderem abhängig von dem Shh-Signal aus der Zona limitans intrathalamica (ZLI), dem Organisationszentrum des Dienzephalons (Braun et al., 2003). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen konnte ein kompletter Verlust der *Dlx2*-Expression im ventralen Thalamus gezeigt werden (Gerhardt, 2005). Neben den Fehlbildungen im Vorder- und Mittelhirn konnte zudem noch eine gestörte Entwicklung der Hypophyse (Hirnanhangdrüse) in *Ftm*^{-/-}-Embryonen beschrieben werden (Gerhardt, 2005). Die Hypophyse ist eine endokrine Drüse, die sich im Hypothalamus des Dienzephalons entwickelt. Morphologisch und funktionell wird die Hypophyse in zwei Bereiche unterteilt: Die Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen), welche für die Hormonproduktion der Drüse verantwortlich ist, und die Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen), welche als Hormonspeicher fungiert. Die Adenohypophyse entwickelt sich aus der anterioren Hypophysenschleife, deren Entstehung und Musterbildung unter anderem durch Shh reguliert wird (Treier et al., 2000). Histologische und molekulare Analysen zeigten, dass es in *Ftm*^{-/-}-Embryonen zum kompletten Verlust der Adenohypophyse kommt, und nur die Neurohypophyse ausgebildet wird (Gerhardt, 2005). Dieser Verlust bestätigt die Vermutung, dass die Missbildungen der Hirnbereiche in *Ftm*^{-/-}-Embryonen durch eine gestörte Shh-Signaltransduktion bewirkt werden.

4.2.2. Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie und kardiale Fehlbildungen

Die zufällige Orientierung der embryonalen Rotation und der Herzdrehung, sowie die gestörte Asymmetrie der inneren Organe (siehe 3.2.3), zeigten, dass in *Ftm*^{-/-}-Embryonen die Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie beeinträchtigt ist. Die initialen Schritte dieser

Regulation finden im Knoten statt, einem Signalzentrum innerhalb des Primitivstreifens (Gilbert, 2000). Morphologische und histologische Untersuchungen zeigten, dass jede ventrale Zelle innerhalb des Knotens eine Zilie an der Oberfläche besitzt, die in den perinodalen flüssigkeitsgefüllten Raum des Knotens hineinragt (Sulik et al. 1994). Die Entdeckung, dass es sich bei diesen Zilien um motile Zilien handelt, führte zur Entwicklung des „*Nodal-flow*“-Modells (Afzelius 1999; Brueckner 2001; Hirokawa et al., 2006). In diesem Modell wird zunächst durch die Bewegungen der Zilien ein nach links gerichteter Flüssigkeitsstrom generiert (Afzelius 1999; Brueckner 2001; Nonaka et al. 2002; Burdine und Schier 2000; Schneider und Brueckner 2001; Hirokawa et al., 2006). Die Richtung dieses Flüssigkeitsstroms wird zum Einen durch die Drehbewegung der Zilien, die im Uhrzeigersinn verläuft, und zum Anderen durch die spezifische Ausrichtung der Zilie an der apikalen Oberfläche der Zilie bewirkt (Nonaka et al., 2005; Hirokawa et al., 2006). Diese gerichtete Strömung bewirkt die asymmetrische Verteilung spezifischer Faktoren (Morphogene) und ermöglicht somit den ersten Schritt der Links-Rechts-Asymmetrie auf molekularer Ebene (Hirokawa et al., 2006). Neueste Untersuchungen offenbaren, dass möglicherweise Shh eines dieser Morphogene ist. So konnte gezeigt werden, dass die Mikrovilli im Knoten Vesikel abschnüren, die hohe Konzentrationen von Shh beinhalten (Tanaka et al., 2005). Diese Vesikel, auch NVPs (engl. Nodal Vesikular Particles) genannt, werden durch den gerichteten Flüssigkeitsstrom zur linken Seite des Knotens transportiert, wo sie sich nach Kontakt mit der Knotenwand auflösen und Shh freilassen. Diese Anreicherung von Shh in der linken Hälfte des Knotens bewirkt einen von links nach rechts verlaufenden Shh-Gradienten innerhalb des Knotens (Tanaka et al., 2005). Anschließend bewirken hohe Konzentrationen von Shh einen intrazellulären Calciumausstoß in den Zellen der linken Knotenwand, was das initiale Signal zur Spezifizierung der linken Körperseite zu sein scheint (Tanaka et al., 2005; Cartwright et. 2006; Hirokawa et al., 2006).

Mutationen in den Genen KIF3a und KIF3b, die zur Superfamilie der Kinesine gehören (Yamazaki et al. 1995, Takeda et al. 1999), und Mutationen in IFT-Genen, wie z.B. IFT88 (*Polaris*) (Pazour et al., 2000; Murcia et al. 2000; Taulman et al., 2001) führen zu einem kompletten Verlust von Zilien. Beiden Gengruppen konnte eine Rolle in der Assemblierung von Zilien nachgewiesen werden, die den Verlust der Zilien in den Mutanten erklärt (Nonaka et al. 1998; Pazour et al., 2000; Taulman et al., 2001). KIF3a und KIF3b Mutanten zeigen einen Verlust des Flüssigkeitsstroms im Knoten, was in einer zufälligen Orientierung der Herzdrehung und der embryonalen Rotation resultiert. Zusätzlich zeigt der Links-Rechts-Marker *Leftb* eine bilaterale Expression (Meno et al. 1996; Nonaka et al. 1998). IFT88

(*Polaris*)-mutante Embryonen zeigen einen ähnlichen Phänotypen. Es wurden eine zufällig orientierte Herzdrehung, Defekte im Neuralrohr und embryonale Letalität festgestellt. Mutationen im *Lrd*-Gen, wie die spontane Mausmutante *inversus viscerum* (*iv*), zeigten, dass motile Zilien im Knoten präsent sind, jedoch eine Strömung im Knoten ausbleibt (Supp et al. 1997 und 1999; Okada et al. 1999). Das *Lrd*-Gen kodiert für das Motorprotein LR-Dynein und ist für die Dynein-abhängige Zilienmotilität unabdingbar. Homozygote Mäuse zeigen eine zufällige Determinierung der beiden Körperseiten und ebenso eine zufällige lokalisierte Expression (links oder rechts) der beiden Markergene *Leftb* und *Nodal* (Meno et al. 1996; Lowe et al. 1996). Mutationen im *DNAH5*-Gen, das für eine schwere Kette des Dyneins im Axonem kodiert, bewirken ebenfalls einen Verlust der Zilienmotilität. Zusätzlich zum Links-Rechts-Phänotypen sind in dieser Mutante Defekte in den Zilien des respiratorischen Traktes zu beobachten (Olbrich et al. 2002). Ein Verlust des Inversin (*Inv*)-Proteins bewirkt (Yokoyama et al. 1993; Morgan et al. 2001) eine deutliche Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit der Knotenzilien, welche zu einer turbulenten und insgesamt langsamer nach links gerichteten Strömung führt. Diese veränderte Rotationsgeschwindigkeit scheint für den *situs inversus* Phänotypen und eine zufällig orientierte embryonale Drehung verantwortlich zu sein (Okada et al. 1999).

Die Analyse *Ftm*-mutanter Embryonen zeigte eine verminderte Anzahl von motilen Zilien im Knoten und zum Teil eine veränderte Form dieser Zilien. In Korrelation zu den Analysen der beschriebenen anderen Mausmutanten kann davon ausgegangen werden, dass in *Ftm*^{-/-}-Embryonen die Generierung eines funktionellen „Nodal-Flows“ fehlschlägt. Ein verminderter oder ausbleibender Flüssigkeitsstrom bietet eine Erklärung für die zufällig orientierte embryonale Rotation und Herzdrehung, die in allen beschriebenen Mutanten gleichermaßen wiederzufinden ist. Auf molekularer Ebene zeigen *Ftm*^{-/-}-Embryonen eine bilaterale Expression der Markergene *Leftb* und *Pitx2*, die normalerweise nur im linken lateralen Seitenplattenmesoderm exprimiert werden (siehe 3.2.3). Vergleicht man dieses veränderte Expressionsmuster mit den anderen Mutanten in denen die Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie gestört ist, fallen essentielle Unterschiede auf. Mutanten in denen nur die Beweglichkeit der Zilien beeinträchtigt ist (wie z. B. *Lrd* und *Inv*) zeigen eine zufällige Expression von Markergenen im linken oder rechten Seitenplattenmesoderm, jedoch keine bilaterale Expression. Mutanten in denen die Zilienstruktur verlorengegangen ist zeigen hingegen eine bilaterale Expression, wie z.B. IFT88 (*Polaris*)- und KIF3a-Mutanten. Zilien können als chemosensorisches Organ eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung von Signalkaskaden spielen (siehe 1.4). Der komplette Verlust der Zilien innerhalb des Knotens

könnte somit Auswirkungen auf die Signalweiterleitung der initialen Schritte in der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie haben. *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigen keinen kompletten Verlust von Zilien im Knoten, die bilaterale Verteilung der Markergene deutet somit auf eine direkte Auswirkung des *Ftm*-Verlustes in der Signalweiterleitung hin. Wie zuvor dargelegt, zeigten die Analysen von Tanaka et al. (2005), dass Shh eine mögliche Funktion in den ersten Schritten der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie innehat. Somit könnte auch hier eine gestörte Hh-Signaltransduktion für die beobachteten Defekte in *Ftm*^{-/-}-Embryonen verantwortlich sein. Zusätzlich konnte sowohl IFT88 (*Polaris*) als auch KIF3a eine Rolle in der Shh-Signaltransduktion nachgewiesen werden (Huangfu et al., 2003), so dass auch in diesen Mutanten eine gestörte Hh-Signaltransduktion als Ursache für die bilaterale Expression von Markergenen nicht auszuschließen ist. Unklar bleibt jedoch, warum eine verminderte Shh-Signaltransduktion zur Aktivierung der „linken“-Gene auf beiden Seiten der Links-Rechts-Achse führt. Tanaka et al. (2005) beschreiben in ihrer Analyse, dass hohe Shh-Konzentrationen im linken Teil des Knotens eine intrazelluläre Calcium-Ausschüttung induzieren. Diese Calciumanreicherung soll für die Aktivierung der Gene, welche die linke Körperhälfte determinieren, verantwortlich sein (Tanaka et al., 2005; Hirokawa et al., 2006). In *Shh*^{-/-}-Embryonen hingegen konnte, wie auch in *Ftm*^{-/-}-Embryonen, eine bilaterale Genexpression „linker“-Gene gezeigt werden, sowie morphologisch die Ausbildung zwei identischer linker Lungenlappen (Chiang et al., 1996; siehe 3.2.3). Die genetischen Analysen sprechen somit für eine repressive Wirkung von Shh auf die Initialisierung der linken Signalkaskade.

Die Analyse von Mutanten, in denen die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie gestört ist, und die Untersuchungen zahlreicher Patienten mit Herzdefekten zeigte, dass die Entwicklung des Herzens an die Determinierung der Links-Rechts-Achse gekoppelt ist (Ramsdell, 2005; Bisgrove et al., 2003; Morelli et al., 2001). Diese Untersuchungen offenbarten, dass Patienten und Mausmodelle mit Heterotaxie zusätzlich nahezu immer kongenitale Herzdefekte aufweisen (Ramsdell, 2005). Grund hierfür ist die Verbindung zwischen der gerichteten Herzdrehung und der anschließenden morphologischen Entwicklung des Herzens. Zum Beispiel definiert die Drehung des primitiven Herzschauches die spätere Position der Herzkammern und ihrer vaskulären Verbindungen (Shiratori und Hamada, 2006). Molekulare Analysen zeigten, dass die asymmetrische Expression von Genen der Links-Rechts-Signalkaskade entscheidend für die Drehung des primitiven Herzschauches ist. Eine bilaterale Expression der Gene *Leftb* und *Pitx2* bewirkt eine zufällige Orientierung der Herzdrehung (Essner et al., 2000; Bisgrove und Yost, 2001). Die zufällige Drehung des

Herzschlauches in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist somit auf die bilaterale Expression von *Leftb* und *Pitx2* zurückzuführen (siehe 3.2.3). Zusätzlich deuten die Erkenntnisse aus anderen Mausmodellen und Patienten darauf hin, dass die Defekte des Herzens (Perikarderweiterung und unterentwickeltes Septum) in *Ftm*^{-/-}-Embryonen sekundäre Effekte sind, die aufgrund des Verlustes der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie zu Tage treten (Ramsdell, 2005; Bisgrove et al., 2003; Morelli et al., 2001).

4.2.3. Gestörte Musterbildung im ventralen Neuralrohr und präaxiale Polydaktylie

Die beobachteten Defekte in *Ftm*-mutanten Tieren entlang der Mittellinie des Embryos, wie z.B. die zufällige Orientierung der Herzdrehung, die Ausbildung zwei identischer linker Lungenlappen, die Ausprägung einer Gaumenspalte und die gestörte Musterbildung im ventralen Neuralrohr, werden im Allgemeinen unter dem Begriff Mittelliniendefekte zusammengefasst. Molekulare und genetische Analysen zeigten, dass der Großteil dieser Defekte durch Störungen in der Hh-Signalkaskade bewirkt werden (Chiang et al., 1996; Tsukui et al., 1999). Auch die Ausbildung zusätzlicher anteriorer Zehen (präaxiale Polydaktylie) ist durch eine Fehlregulation von *Shh* zu erklären. So konnte gezeigt werden, dass ektopische anteriore Expression von *Shh* die Entwicklung zusätzlicher Zehen bewirkt, und als Hauptgrund für die Entstehung polydaktyler Phänotypen angesehen werden kann (Johnson et al., 1997; Capdevila et al., 2001; siehe 1.3.2). Der Verlust von *Ftm* scheint somit auch hier einen direkten Einfluss auf die *Shh*-Signaltransduktion zu haben. Um diese These zu bekräftigen, wurden die Effekte des *Ftm*-Verlustes auf die Musterbildung des ventralen Neuralrohrs untersucht (siehe 3.3.1). Dieser empfindliche Musterbildungsprozess wird durch *Shh* reguliert, so dass das Neuralrohr im Allgemeinen als eines der besten Systeme angesehen wird, um qualitative und quantitative Effekte auf die *Shh*-Signaltransduktion zu untersuchen (Briscoe und Ericson, 2001; Jacob und Briscoe, 2003; siehe 1.3.2). Erste Expressionsanalysen im Neuralrohr von *Ftm*^{-/-}-Embryonen offenbarten einen stellenweisen Verlust von *Shh* und der Bodenplattenmarker *Foxa2* und *Lmx1b* entlang der anterioposterioren Achse des Embryos. Die *Shh*-Expression in der Chorda dorsalis hingegen erschien unverändert und deutete auf eine gestörte Induktion der Bodenplatte hin. Auf der Proteinebene konnte ein kompletter Verlust von *Shh* in der Bodenplatte gezeigt werden. Zusätzliche Analysen zeigten zudem eine reduzierte Anzahl von Motoneuronen und einen kompletten Verlust der V3-Interneuronen, eine sogenannte Ventralisierung des Neuralrohrs, welche auf den Verlust des *Shh*-Signals aus der Bodenplatte zurückzuführen ist. *Ftm* kann somit eine entscheidende

Funktion in der Signalweiterleitung von Shh zugesprochen werden. Erste epistatische Analysen offenbarten, dass der zusätzliche Verlust von *Ftm* in *Ftm*^{-/-};*Shh*^{-/-}-Embryonen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu *Shh*^{-/-}-Embryonen bewirkt (siehe 3.3.2.1). Dieser Befund schließt die Möglichkeit aus, dass *Ftm* in einem möglichen parallelen Signalweg auf Shh-Zielgene wirkt. Shh und *Ftm* sind somit Komponenten der selben Signalkaskade.

Vergleiche mit anderen Mutanten, in denen die Shh-Signalweiterleitung gestört ist, zeigten deutliche Parallelen zwischen dem Verlust von *Ftm* und dem Verlust von Genen, die am Intraflagellar-Transport in Zilien beteiligt sind. Ein nahezu identischer Phänotyp wurde in IFT-mutanten Embryonen beschrieben. Ein Verlust von IFT88 (*Polaris*) oder IFT172 (*Wimple*) führt zu einem stellenweisen Verlust von *Shh* in der Bodenplatte und zu einer reduzierten Anzahl von Motoneuronen und V3-Interneuronen (Huangfu et al., 2003). Die Analyse von IFT88 (*Polaris*)/Gli3- und IFT172 (*Wimple*)/Gli3-Mutanten zeigte, dass eine Aufhebung der Gli3-Funktion in IFT88 (*Polaris*)- und IFT172 (*Wimple*)-mutanten Embryonen eine Milderung der Musterbildungsdefekte im Neuralrohr bewirkt. So konnte eine Erhöhung in der Anzahl von Motoneuronen und V3-Interneuronen nachgewiesen werden (Huangfu et al., 2003). Den selben Effekt zeigt eine stufenweise Reduktion von Gli3 in *Ftm*^{-/-}-Embryonen. In Abhängigkeit der reduzierten Gli3-Menge (*Ftm*^{-/-};*Xt*^{+/+}-Embryonen oder *Ftm*^{-/-};*Xt*/*Xt*-Embryonen) konnte auch hier eine Erhöhung in der Anzahl von Motoneuronen und V3-Interneuronen bis hin zur vollständigen Regeneration der Expressionsdomänen detektiert werden. Desweiteren bewirkte die Gli3-Reduktion auch eine Abmilderung der morphologischen Veränderungen des Neuralrohrs (siehe 3.3.2.2).

Diese Parallelen deuten auf eine Funktion von *Ftm* oberhalb von Gli3 in der Hh-Signalkaskade hin, wie sie auch für IFT-Proteine postuliert wird (Huangfu et al., 2003; Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). Zusätzlich kann eine ähnliche Funktionsweise von IFT-Proteinen und *Ftm* vermutet werden. Biochemische Untersuchungen offenbarten, dass Mutationen in IFT-Genen (z.B. IFT88 (*Polaris*)) einen negativen Einfluss auf die Gli3-Prozessierung haben. In Westernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Prozessierung von Gli3-190 in IFT88 (*Polaris*)-mutanten Tieren kommt. Dementsprechend ist in IFT88 (*Polaris*)-mutanten Tieren eine Mengenerhöhung des unprozessierten Gli3-Proteins (Gli3-190) und eine starke Reduktion der Menge an Gli3-Repressorform (Gli3-90) nachzuweisen (Haycraft et al., 2005). Zusätzlich zeigen IFT88 (*Polaris*)^{-/-}-Embryonen eine reduzierte Aktivität der Gli-Aktivatoren und demzufolge eine verminderte Shh-Signalweiterleitung (Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005; May et al.,

2005). So zeigten Analysen der Shh-Signaltransduktion in IFT88 (*Polaris*)-mutanten mesenchymalen Gliedmaßenzellen (MLCs; engl. Mesenchymal Limb Cells) einen kompletten Verlust der Aktivierung von Hh-Zielgenen. Weitere Untersuchungen in MLCs offenbarten, dass dieser Verlust durch fehlende Gli2-Aktivatorfunktion verursacht wird (Haycraft et al., 2005). Detaillierte Untersuchungen der ventralen Neuralrohrmusterbildung identifizierten Gli2 als den Hauptaktivator der Hh-Zielgene im Neuralrohr (Ding et al., 1998). Genetische und epistatische Analysen von *Shh*- und *Gli3*-Mutanten Analysen zeigten zudem, dass das dominierende ventralisierende Signal im Neuralrohr die Gli3-Repressorform ist (Jacob und Briscoe, 2003). Die Ventralisierung des IFT88 (*Polaris*)^{-/-}-Neuralrohrs (Verlust ventraler Neuronen) ist somit auf fehlende Gli2-Aktivatorfunktion und verbleibende Gli3-Repressor Aktivität zurückzuführen. Die Regenerierung ventraler Neuronen durch eine Aufhebung der Gli3-Funktion in IFT88 (*Polaris*)- und IFT172 (*Wimble*)-mutanten Embryonen bestätigt diesen Erklärungsansatz. Die Musterbildungsdefekte in *Ftm*^{-/-}-Embryonen lassen sich auf gleiche Weise erklären. Auch hier konnte eine Beeinträchtigung der Shh-Signaltransduktion in isolierten MLCs gezeigt werden. Die Shh-induzierte Aktivierung der Hh-Zielgene ist in *Ftm*^{-/-}-MLCs deutlich reduziert, und deutet auf eine verminderte Aktivität der Gli-Aktivatoren hin. Ob es sich hierbei vornehmlich auch um einen Aktivitätsverlust des Gli2-Aktivators handelt, wie im Falle von IFT88 (*Polaris*)-mutanten Zellen, oder ob zusätzlich noch andere Gli-Aktivatoren (z.B. Gli1) betroffen sind, ist bis dato noch nicht geklärt. Um zu überprüfen, ob *Ftm* ebenfalls einen Einfluss auf die Prozessierung von Gli3 hat, wurde das Verhältnis von Gli3-190 zu Gli3-83 in *Ftm*^{-/-}-Embryonen mittels Westernblotanalysen untersucht (durchgeführt von Dr. Baoling Wang, Department of Genetic Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, USA; Wang et al., 2000; siehe Anhang Abb.A3). Diese Untersuchungen zeigten eine deutliche Erhöhung der Menge an unprozessierten Gli3-Protein in *Ftm*^{-/-}-Embryonen, die zu einer drastischen Erhöhung des Verhältnisses von Gli3-190 zu Gli3-83 führt. Im Gegensatz zu IFT88 (*Polaris*)^{-/-}-Embryonen geht die Erhöhung der unprozessierten Gli3-Menge in *Ftm*^{-/-}-Embryonen jedoch nicht mit einer Erniedrigung der Menge an Gli3-Repressor einher. Die Menge an Gli3-Repressor in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist vergleichbar mit wildtypischen Embryonen. Der Verlust von *Ftm* führt somit zu einer Erhöhung der totalen Menge an Gli3-Protein. Analysen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR zeigten zusätzlich, dass die erhöhte Menge von Gli3-Protein auf eine erhöhte *Gli3*-Transkription zurückzuführen ist. Vorherige Arbeiten konnten zeigen, dass die *Gli3*-Transkription durch *Shh* negativ reguliert wird (Marigo et al., 1996). Die erhöhte *Gli3*-

Expression in *Ftm*^{-/-}-Embryonen korreliert somit mit einer Beeinträchtigung der Shh-Signaltransduktion.

Nichtsdestotrotz kann die Ventralisierung des *Ftm*^{-/-}-Neuralrohrs, in Korrelation zu IFT88 (*Polaris*)^{-/-}-Embryonen, auf eine reduzierte Aktivität von Gli-Aktivatoren, und eine, in diesem Falle, unveränderte (wildtypische) Menge von Gli3-Repressor zurückgeführt werden. Auch hier bekräftigt die Regenerierung ventraler Neuronen durch eine Aufhebung der Gli3-Funktion in *Ftm*^{-/-}-Embryonen das vorgeschlagene Modell zur Entstehung der Musterbildungsdefekte, die durch einen Verlust von *Ftm* verursacht werden.

Im Gegensatz zur Musterbildung im Neuralrohr, wo Gli-Aktivatoren (Gli1 und Gli2) eine essentielle Funktion besitzen, scheint die Musterbildung in der sich entwickelnden Gliedmaße nahezu unabhängig von deren Funktion zu sein. So zeigen Mutationen im *Gli1*- und *Gli2*-Gen keinen Effekt auf die Gliedmaßenentwicklung (Niswander, 2003). Ein Verlust von *Gli3* hingegen bewirkt eine dramatische Veränderung in der Anzahl der Zehen, die gebildet werden, und in der Identität, die den einzelnen Zehen zugewiesen wird (Niswander, 2003). Detaillierte Analysen identifizierten die Gli3-Repressorform (Gli3-83) als entscheidende Größe in der Regulation dieser Prozesse. Ein kompletter Verlust von Gli3-83 verursacht eine stark ausgeprägte Polydaktylie, die zur Ausbildung von bis zu drei zusätzlichen Zehen führt. Parallel kommt es zu einem kompletten Verlust der Zehenidentitäten (Niswander, 2003). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen und IFT88 (*Polaris*)-mutanten Embryonen ist die Ausprägung der Polydaktylie deutlich milder. Der Verlust von *Ftm* oder IFT88 (*Polaris*) verursacht nur die Ausbildung von ein bis zwei zusätzlichen Zehen (siehe 3.2.4; Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005). Zusätzlich zeigten Knochen-Knorpel-Färbungen der *Ftm*^{-/-}-Gliedmaßen zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (E18.5), dass die Identität einzelner Zehen trotz des *Ftm*-Verlustes erhalten bleibt (siehe 3.2.4). Wie schon erwähnt, führt der komplette Verlust von Gli3-83 zu einer stark ausgeprägten Polydaktylie, so dass die Ausbildung zusätzlicher Zehen in IFT88 (*Polaris*)-mutanten Embryonen auf eine verminderte Menge an Gli3-83, die durch eine reduzierte Gli3-Prozessierung verursacht wird, zurückzuführen ist. Die Analyse der Gli3-Prozessierung in *Ftm*^{-/-}-Embryonen hingegen offenbarte eine wildtypische Menge von Gli3-83 (siehe Anhang Abb.3). Der polydaktyle Phänotyp von *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist somit auf eine reduzierte Repressoraktivität zurückzuführen und nicht auf eine Reduktion der Repressormenge. Mögliche Ursachen für die verminderte Aktivität von Gli3-83 könnten Probleme in der Modifikation des Proteins sein, oder ein indirekter Effekt der äquivalenten Mengen an Gli3-Repressor (Gli3-83) und unprozessiertem Gli3 (Gli3-190). So könnte ein

kompetitives Konkurrieren von Gli3-83 und Gli3-190 um die gleiche Promotorbindungssequenz der Hh-Zielgene einen Aktivitätsverlust von Gli3-83 erklären.

4.2.4 Der Vergleich zur *Ft*-Mutante

Die genaue Charakterisierung des *Ft*-Locus identifizierte sechs Gene die durch die *Ft*-Mutation deletiert worden sind (Peters et al., 2002). Drei Mitglieder der *Iroquois* (*Irx*) Familie von Transkriptionsfaktoren *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* (*IrxB*-Genkomplex) und drei bis dahin unbekannte Gene *Fts*, *Fatso* (*Fto*) und *Fantom* (*Ftm*). Die Funktion der einzelnen Gene während der murinen Embryonalentwicklung war jedoch gänzlich unbekannt, und erschwerte die Interpretation der verschiedenen Defekte, die durch die *Ft*-Mutation hervorgerufen werden. Zwar gab die Analyse spezifischer Genexpressionsmuster Hinweise auf mögliche Funktionen der betroffenen Gene, doch konnte nie ausgeschlossen werden, dass nicht der Verlust eines anderen *Ft*-Gens die Missbildungen in der entsprechenden Struktur verursacht. So deuteten die distinkten Expressionsmuster der *Irx*-Gene auf eine Funktion in der Entwicklung der Gliedmaßen und eine Rolle in der Musterbildung des Neuralrohrs hin (Grotewold, 2001; Götz et al. 2005). Erst die Generierung von Mutanten, in denen nur eines der *Ft*-Gene betroffen ist, brachte Auskunft über die Funktion einzelner *Ft*-Gene. Während die Inaktivierungen von *Fts* und *Fto* (*Fatso*) keine offensichtlichen embryonalen Fehlbildungen verursachen, deutet die Vielzahl der beobachteten Veränderung in *Ftm*^{-/-}-Embryonen darauf hin, dass ein Großteil der Veränderungen, die in *Ft*-mutanten Tieren vorkommen, auf den Verlust von *Ftm* zurückzuführen ist. Hierzu gehören die Defekte in der Entwicklung des Herzens und des Gehirns, die Missbildungen kraniofacialer Strukturen und der Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie, sowie anteilig Störungen in der Entwicklung der Gliedmaßen und in der Musterbildung des Neuralrohrs (siehe 3.2.5). Zusätzlich konnte eine Varianz in der Ausprägung der phänotypischen Veränderungen in *Ftm*^{-/-}-Embryonen festgestellt werden (Tab.4.1). Die Begründung hierfür liegt wahrscheinlich in der Natur der betroffenen Prozesse. So bewirkt ein Verlust über die Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie eine zufällige Orientierung der Herzdrehung und der embryonalen Rotation, aber keine komplette Umkehr. Gleichermäßen kann die Induktion einiger Prozesse auch von Schwellenwerten abhängig sein, die entsprechend nur in einigen Fällen unterschritten werden und somit keine 100% Penetranz der phänotypischen Veränderungen bewirken.

Tab.4.1: Übersicht der phänotypischen Veränderungen in *Ftm*-mutanten Tieren

	<i>Exenzephalie</i>	<i>Perikard- vergrößerung</i>	<i>Entgegengesetzte Herzdrehung</i>	<i>Entgegengesetzte Schwanzdrehung</i>		
E10.5	9 / 9	3 / 9	2 / 9	5 / 9		
E11.5	3 / 4	1 / 4	1 / 4	2 / 4		
%		31	23	54		
		<i>Augen- missbildungen</i>	<i>Kraniofaciale Fehlbildungen</i>	<i>Herz- missbildungen</i>	<i>Symmetrische Lungenlappen</i>	<i>Polydaktylie</i>
E12.5	4 / 4	3 / 4	4 / 4	4 / 4	na*	4 / 4
E13.5	1 / 5	5 / 5	5 / 5	3 / 5	na*	5 / 5
E15.5	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
E16.5	3 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5	5 / 5	5 / 5
E18.5	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
%	77	94	100	83	100	100

*na= nicht analysiert

Ein detaillierter Vergleich der einzelnen Veränderungen in *Ftm*- und *Ft*-mutanten Tieren zeigt jedoch, dass wahrscheinlich sowohl spezifische Teilaspekte als auch ganze Fehlbildungen bestimmter Strukturen in *Ft/Ft*-Embryonen, auf den Verlust anderer *Ft*-Gene zurückzuführen sind (Tab.4.2). *Ft/Ft*-Embryonen zeigen im Vergleich zu *Ftm^{-/-}*-Embryonen z.B. im Herzen zusätzliche Fehlbildungen des Ausflusstraktes. Mögliche Kandidaten für die Verursachung dieses Defekts sind die *Irx*-Gene, da ihnen eine Rolle in der Herzentwicklung des Herzens zugesprochen wird (Bao et al., 1999). Auch die Zunahme der Defekte kraniofacialer Strukturen und der Missbildungen im Gehirn deutet auf eine Beteiligung anderer *Ft*-Gene an der Ausprägungsstärke dieser Veränderungen hin. So könnte der Verlust von *Irx3*, welches für die Determinierung der Zona limitans intrathalamica, einem Signalzentrum an der Grenze zwischen dem Dienzephalon und dem Telenzephalon, verantwortlich ist, eine Verstärkung der Hirnmissbildungen in *Ft/Ft*-Embryonen erklären (Kobayashi et al., 2002). In der Entwicklung des Neuralrohrs zählt *Irx3* zu den Klasse I-Genen und definiert durch die reziproke Inhibierung mit *Olig2* die Grenze zwischen Motoneuronen und V2-Interneuronen (siehe 1.3.2; Briscoe et al., 2000). In *Ftm^{-/-}*-Embryonen konnte eine Reduktion der Motoneuronen gezeigt werden. Die Zunahme von Motoneuronen im Neuralrohr von *Ft/Ft*-Embryonen scheint somit durch die fehlende *Irx3*-Funktion bedingt zu sein (Götz et al., 2005). Die größten Unterschiede zwischen den beiden Mutanten bestehen jedoch im unterschiedlichen Zeitpunkt ihrer Letalität und in den Auswirkungen auf den programmierten Zelltod (Apoptose). *Ft*-mutante Tiere zeigen eine deutliche Fehlregulation der Apoptose, die in *Ftm^{-/-}*-Embryonen nicht zu beobachten ist. In heterozygoten *Ft*-Tieren verursacht diese

Fehlregulation eine Syndaktylie der Vordergliedmaßen und die Hyperplasie des Thymus. In homozygoten *Ft*-Tieren resultiert die Fehlregulation der Apoptose in einer Syndaktylie der Vorder- und Hintergliedmaßen. Molekular konnte diese Fehlregulation durch eine veränderte *Bmp4*-Expression bestätigt werden (Heymer et al., 1997; Grotewold, 2001).

Tab.4.2: Gegenüberstellung der phänotypischen Veränderungen von *Ftm*^{-/-}-Embryonen und *Ft*-mutanten Tieren/Embryonen

	<i>Ftm</i> ^{-/-}	<i>Ft/Ft</i>	<i>Ft/+</i>
Entwicklung des Gehirns	Exenzephalie	Exenzephalie (stark ausgeprägt)	
Augenentwicklung	Reduktion oder Verlust der Augen	na	-
Kraniofaciale Strukturen	Gaumenspalte, reduzierte Mandibeln	Diverse Missbildungen	-
Herzentwicklung	Septumdefekte, vergrößertes Perikard	Septumdefekte, vergrößertes Perikard, verkürzter Ausflusstrakt	-
Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie	Bilaterale Genexpression, entgegengesetzte Herz- und Schwanzdrehung, Heterotaxie	Bilaterale Genexpression, entgegengesetzte Herz- und Schwanzdrehung	-
Musterbildung im Neuralrohr	Verlust der Shh-Expression, Dorsalisierung	Verlust der Shh-Expression, Zunahme von Motoneuronen	-
Gliedmaßenentwicklung	Präaxiale Polydaktylie	Präaxiale und dorsoventrale Polydaktylie, Syndaktylie	Syndaktylie
Apoptose	-	Syndaktylie der Gliedmaßen	Thymus-hyperplasie
Letalität	Kurz nach der Geburt	E10.5 – E14.5	-

Auch hier kommt wiederum *Irx3* als Kandidatengen in Frage, da dessen Expressionsmuster in Korrelation zu den beobachteten Gewebefusionen steht (Grotewold, 2001). Die Ursache für die Ausbildung der Thymushyperplasie in *Ft/+*-Tieren ist bislang unklar. Im Gegensatz zum Verlust aller *Ft*-Gene, der zu einer embryonalen Letalität zwischen E10.5 und E14.5 führt, sterben *Ftm*^{-/-}-Embryonen erst kurz nach der Geburt. Grund für die pränatale Letalität sind wahrscheinlich die Missbildungen des Herzens, der Lunge und des Gaumens. Die unvollständige Separation der ventrikulären Kammern in *Ftm*^{-/-}-Herzen führt zu einer Vermischung von arteriellem und venösem Blut. Diese Vermischung resultiert in einem

insgesamt niedrigeren Sauerstoffgehalt des Blutes und somit in einer Hypoxie (Sauerstoffunterversorgung) des Organismus. Verstärkt wird dieser Effekt vermutlich durch das stark verminderte Lungenvolumen, welches durch die Ausbildung von nur zwei anstelle von fünf Lungenlappen bewirkt wird. Zusätzlich ist es fraglich, ob neugeborene *Ftm*^{-/-}-Tiere in der Lage sind genügend Nahrung aufzunehmen, da sie eine Reduktion der Mandibeln und eine Gaumenspalte aufweisen. Eine ineffiziente Nahrungsaufnahme führt, aufgrund des bestehenden Energiebedarfs des Neugeborenen, zu einem Aufbrauchen der geringen pränatal angelegten Glykogen-Reserven der Leber. Hält diese Unterversorgung an kommt es zur Entwicklung einer Hypoglykämie, die schon nach einigen Stunden zum Tod der Tiere führen kann (Calogero et al., 1999). Der Grund für die embryonale Letalität homozygoter *Ft*-Tiere bleibt unklar. Möglicherweise ist diese Letalität auf die verstärkten Herzdefekte zurückzuführen, die wahrscheinlich schon in frühen Embryonalstadien eine Unterversorgung des Embryos bewirken.

4.3 Die Funktion von *Ftm*

4.3.1 Die Rolle von *Ftm* in der zilienassoziierten Hh-Signaltransduktion

Die Parallelen zwischen IFT-mutanten Tieren und *Ftm*^{-/-}-Embryonen deutet auf eine ähnliche Funktionsweise innerhalb des zilienassoziierten Hh-Signalweges hin. IFT-Proteine sind sowohl für den anterograden und retrograden Molekültransport innerhalb der Zilie als auch für die Zilienassemblierung verantwortlich (siehe 1.4). Die Transportfunktion der IFT-Proteine und der Nachweis einer Akkumulation unmodifizierter Gli-Proteine im distalen Bereich der Zilie führten zu der Vermutung, dass IFT-Proteine eine Rolle bei Lokalisierung der Gli-Proteine innehaben (Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005). Neben den IFT-Proteinen sind zusätzlich Motorproteine, wie Kinesine und Dyneine, an der Realisierung des Intraflagellar-Transports beteiligt. Zusätzlich gibt es Evidenz für eine Regulation des Intraflagellar-Transports durch Basalkörperproteine. So konnte gezeigt werden, dass BBS-Proteine an der Koordination der Kinesinmotorproteine beteiligt sind (Scholey und Anderson, 2006). Es wäre also denkbar, dass *Ftm* eine ähnliche regulatorische Funktion am Basalkörper ausübt und dadurch Einfluss auf die Lokalisation der Gli-Proteine hat.

Überexpressionsexperimente zeigten, dass unmodifizierte Gli-Proteine im distalen Axonem der Zilie akkumulieren. Die prozessierte Form des Gli3-Proteins (Gli3-83) hingegen akkumuliert im Nukleus und ist in der Zilie nicht nachweisbar (Haycraft et al., 2005). Die

Modifikation der Gli3-Proteine ist somit an die Zilienstruktur gekoppelt. Die Abwesenheit von Gli3-83 in der Zilie zeigt, dass die Modifikation der Gli-Proteine nicht innerhalb des Axonems stattfindet und favorisiert den Basalkörper als möglichen Ort für Proteinmodifikationen. Ftm könnte somit auch eine direkte Funktion in der Modifikation der Gli-Proteine am Basalkörper innehaben.

Die Zilie ist eine hochorganisierte Organelle, stellt aber kein abgeschlossenes Kompartiment dar. Funktionsanalysen in *Chlamydomonas* offenbarten jedoch, dass der Basalkörper und die Transitionszone eine selektive Barriere zwischen dem Zilienaxonem und dem Rest der Zelle bilden. Neben Störungen in der Zilienassemblierung konnte in IFT-Mutanten gezeigt werden, dass die Akkumulierung spezifischer Genprodukte distal des Basalkörpers ausbleibt (Cole et al., 2003). Diese fehlende Akkumulierung zeigt, dass IFT-Proteine an der Barrierenfunktion des Basalkörpers beteiligt sind und somit bei der Selektion der Moleküle, welche die Zilie betreten. Ein Protein, das bekanntermaßen zur Ausübung seiner Funktion die Basalkörperbarriere passieren muss, ist Smoothened (Smo), eine Komponente der Hh-Signalkaskade. So konnte gezeigt werden, dass in der Anwesenheit des Shh-Liganden Smo im distalen Axonem der Zilie akkumuliert (siehe 1.3.1; Corbit et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2006). Eine Störung der Proteinselektion am Basalkörper könnte die Anreicherung von Smo in der Zilie beeinträchtigen und somit die verminderte Shh-Signalweiterleitung durch den Funktionsverlust von IFT-Proteinen und Ftm erklären. Erste Zellkulturexperimente bekräftigen diese Vermutung. So konnte in *Ftm*-mutanten MEFs bislang keine Shh-induzierte Akkumulation von Smo im Axonem der Zilie nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung Ulrich Dirks; Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Trotz den augenscheinlichen Parallelen zwischen der Funktion von IFT-Proteinen und der Funktion von Ftm lassen sich dennoch klare Unterschiede in den ihrer Konsequenzen eines Funktionsverlustes erkennen.

Die Reduktion der Menge der Gli3-Repressorform (Gli3-83) und die gleichzeitige Zunahme an unprozessiertem Gli3 (Gli3-190) in IFT88 (*Polaris*)-mutanten Embryonen, deutet auf eine Funktion von IFT88 (*Polaris*) in der Gli3-Prozessierung hin. Der Verlust von Ftm scheint die Effizienz der Gli3-Prozessierung nicht zu beeinflussen. Die Quantifizierung der beiden Gli3-Formen in *Ftm*^{-/-}-Embryonen zeigte zwar auch eine Zunahme an unprozessiertem Gli3 (Gli3-190), die Menge der Gli3-Repressorform (Gli3-83) hingegen war unverändert und entsprach dem wildtypischen Niveau (siehe Anhang Abb.3). Die phänotypischen Veränderungen in den Gliedmaßen von *Ftm*^{-/-}-Embryonen deuten jedoch auf eine verminderte Aktivität des Gli3-

Repressors hin (siehe 3.2.4). Zusätzlich verursacht der Verlust von *Ftm* eine Erhöhung der Gesamtmenge an Gli3-Protein. Die Erhöhung der Gli3-Proteinmenge korreliert mit der erhöhten Gli3-Transkript, die in *Ftm*^{-/-}-Embryonen beobachtet wurde (siehe Anhang Abb.3). Detaillierte Analysen der Wechselwirkungen zwischen Shh und Gli3 zeigten, dass Shh einen negativen Einfluss auf die Expression von Gli3 hat (Schweitzer et al., 2000; Wang et al., 2000). Die erhöhte Gli3-Transkriptmenge in *Ftm*^{-/-}-Embryonen ist somit eindeutig auf eine verminderte Shh-Signaltransduktion zurückzuführen.

Die Analyse der Hh-Zielgenaktivierung in mesenchymalen Gliedmaßenzellen (MLCs), durch Inkubation mit Shh-Protein, zeigte, dass der Verlust von *Ftm* eine deutliche Verminderung der Shh-Signalweiterleitung bewirkt (siehe 3.5.1). Im selben Versuchsansatz zeigen IFT88 (*Polaris*)-mutante MLCs hingegen einen kompletten Verlust der Shh-Signaltransduktion (Haycraft et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied liefert die unterschiedliche Funktion von IFT-Proteinen und *Ftm* in der Zilienassemblierung. In *Ftm*^{-/-}-MLCs konnte das Vorhandensein von Zilien mit Hilfe von Antikörperfärbungen gegen acetyliertes α -Tubulin nachgewiesen werden. Die Verminderung der Shh-Signaltransduktion in *Ftm*^{-/-}-MLCs ist somit eine direkte Konsequenz des *Ftm*-Verlustes. In IFT88 (*Polaris*)-mutanten MLCs hingegen konnten keine Zilien mit Antikörperfärbungen gegen acetyliertes α -Tubulin detektiert werden (Haycraft et al., 2005). Die Überexpression von Gli2 in IFT88 (*Polaris*)-mutanten MLCs bewirkt keine Aktivierung der Hh-Zielgene und deutet somit auf einen direkten Einfluss von IFT88 (*Polaris*) auf die funktionelle Gli2-Aktivität hin. Die Aktivität von Gli1 hingegen ist durch den Verlust von IFT88 (*Polaris*) nicht direkt beeinträchtigt. Überexpression von Gli1 führt zur einer Aktivierung der Hh-Zielgene, die mit wildtypischen Zellen vergleichbar ist (Haycraft et al., 2005). Der komplette Verlust der Shh-Signalweiterleitung in IFT88 (*Polaris*)-mutanten MLCs nach Inkubation mit Shh-Protein lässt sich somit nur durch die direkten Auswirkungen auf den Shh-Signalweg (Verlust der Gli2-Aktivität) und dem zusätzlichen Verlust einer intakten Zilienstruktur erklären.

Der Vergleich zwischen IFT-Proteinen und *Ftm* verdeutlicht, dass, im Gegensatz zu IFT-Proteinen, die sowohl an der Shh-Signaltransduktion als auch an der Zilienassemblierung teilhaben, die Funktion von *Ftm* auf die Shh-Signaltransduktion beschränkt ist, und *Ftm* eindeutig als neue Komponente des Shh-Signalweges einzuordnen ist.

4.3.2 *Ftm* als Kandidatengen für menschliche Syndrome

Vergleichende Sequenzanalysen haben gezeigt, dass *Ftm* eine hohe Homologie zu RPGRIP (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein) aufweist. Hierbei konnte eine

Ähnlichkeit zwischen dem Ftm-Protein und RPGRIP von 35% festgestellt werden (mündliche Mitteilung Dr. Renate Dildrop; siehe 1.2.4; Tab.1). Nachfolgende phylogenetische Sequenzanalysen (durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. Renate Dildrop) offenbarten zudem, dass RPGRIP ein Abkömmling von Ftm ist, der vermutlich durch Duplikation vor der Aufspaltung in die höheren Vertebratenklassen entstanden ist. Mutationen im RPGRIP-Gen konnten als Ursache für das menschliche Syndrom Retinitis pigmentosa, einer Degeneration der Photorezeptorzellen im Auge, identifiziert werden (Mavlytotov et al., 2002; Pawlyk et al., 2005). RPGRIP ist am Basalkörper spezialisierter Zilien in Photorezeptorzellen lokalisiert. Diese sogenannten Verbindungszilien bilden die Verbindung zwischen dem äußeren und inneren Segment der Photorezeptorzelle und sind für den Molekülaustausch zwischen den beiden Segmenten verantwortlich. Genetische und biochemische Analysen zeigten, dass RPGRIP, durch eine direkte Interaktion, RPGR (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) an den Basalkörper der Verbindungszilie verankert. Diese Interaktion erwies sich zudem als notwendig für die Stabilität der Verbindungszilie und den retroflagellaren Transport entlang dieser Zilienstruktur (Boylan und Wright, 2000; Hong et al., 2001; Zhao et al., 2003). Ein Verlust von RPGRIP verursacht sowohl im Menschen als auch in der Maus die Degeneration der Photorezeptorzellen (Retinitis pigmentosa). Dementsprechend wird vermutet, dass RPGRIP für die Aufrechterhaltung der Verbindungszilie notwendig ist (Pawlyk et al., 2005). In *Ftm*^{-/-}-Embryonen wurde eine reduzierte Anzahl an Zilien und teilweise eine veränderte Zilienform beobachtet (siehe 3.4.1). *Ftm*-mutante Zellen (MEFs und MLCs) hingegen zeigen keine Reduktion der Zilienanzahl, so dass eine Funktion von Ftm in der Zilienassemblierung ausgeschlossen werden kann. Die reduzierte Anzahl und die veränderte Zilienform, die in *Ftm*^{-/-}-Embryonen beobachtet wurde, scheint somit ein sekundärer Effekt des *Ftm*-Verlustes zu sein. So könnte ein vollständig funktionierender, ziliengekoppelter Signalweg, in diesem Falle die Shh-Signaltransduktion, für die Aufrechterhaltung der Zilienstruktur notwendig sein.

Biochemische Analysen haben gezeigt, dass sowohl RPGRIP als auch KIAA1005, das humane Ftm-Homolog, eine direkte Interaktion mit Nephrocystin-4 eingehen (Roepman et al., 2005). Ein Verlust von *Nephrocystin-4* verursacht im Menschen die Ausbildung polyzystischer Nieren, eine sogenannte Nephronophthisis. Im Falle des Nephrocystin-4-Verlustes spricht man von einer Nephronophthisis Typ-4 (NPHP4). Die Interaktion des humanen FTM-Proteins und Nephrocystin-4 ist somit das erste Beispiel für eine Beteiligung von Ftm an menschlichen Syndromen. Zusätzlich zu Retinitis pigmentosa und NPHP4 konnte eine Vielzahl anderer menschlicher Syndrome auf einen Verlust oder eine Funktionsstörung

von Basalkörperproteinen zurückgeführt werden, wie z.B. das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) und das Oral-Facial-Digital-Type-1 (OFD1) Syndrom. Die Ausprägung des BBS konnte bislang auf den Funktionsverlust von zehn Proteinen zurückgeführt werden, die dementsprechend BBS1-10 genannt worden sind. BBS-Proteine teilen eine Vielzahl von Eigenschaften miteinander. So zeigte ihre gemeinsame Lokalisation am Basalkörper diverser Zilien, dass das Bardet-Biedl-Syndrom durch eine Fehlfunktion von Zilien verursacht wird. Die genaue Funktion von BBS-Proteinen ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch eine Beteiligung von BBS-Proteinen an mikrotubuliassoziierten Transportprozessen vermutet (Stoetzel et al., 2006; Ansley et al., 2003). Ein Verlust von *BBS-6* bewirkt in Zellkultur das vermehrte Vorkommen von multinuklearen und multientrosomalen Zellpopulationen, und deutet auf eine zusätzliche Funktion von BBS-Proteinen in der Zytokinese hin (Kim et al., 2004). Obwohl bereits zehn BBS-Loci im menschlichen Genom identifiziert worden sind, existiert eine Vielzahl von BBS-Patienten, die nicht auf eine Mutation der bereits bekannten BBS-Gene zurückzuführen ist (Stoetzel et al., 2006). Somit kommen andere Basalkörperproteine, inklusive *Ftm*, als zusätzliche Kandidaten für die Ausprägung des Bardet-Biedl-Syndroms in Frage. Ein Funktionsverlust des OFD-1-Protein bewirkt im Menschen Malformationen kraniofacialer Strukturen und Veränderungen der Gliedmaßen. Zusätzlich zeigen OFD-1-Patienten polyzystische Nieren. Analysen im entsprechenden Mausmodell zeigten, dass in *OFD-1*^{-/-}-Embryonen die Assemblierung der beweglichen Zilien im Knoten und der mechanosensorischen Zilien in der Niere fehlschlägt. Dieser Befund deutet auf eine Rolle von *OFD-1* in der Ziliogenese hin. Die Lokalisation von OFD-1 am Basalkörper verschiedener Zilien bekräftigt diesen Verdacht (Romio et al., 2004). Zusätzlich konnte in *OFD-1*^{-/-}-Embryonen eine Störung in der Neuralrohrmusterbildung und ein verändertes Genexpressionsmuster in der frühen Gliedmaßenknospe festgestellt werden. Diese Defekte implizieren, dass *OFD-1*, neben der Funktion in der Ziliogenese, ebenso eine Funktion in der Signaltransduktion innehat (Ferrante et al., 2006). Die phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *BBS*- und *OFD-1*-mutanten Tieren (bzw. BBS- und OFD-1-Patienten) und *Ftm*^{-/-}-Embryonen, legen die Vermutung nahe, dass Basalkörperproteine im Allgemeinen eine ähnliche Funktionsweise besitzen. *Ftm* kann somit als Kandidatengruppe bei der Ausbildung menschlicher Syndrome angesehen werden.

4.3.3 *Ftm* ist eine vertebratenspezifische Komponente des Hh-Signalweges

Phylogenetische Analysen zeigten, dass *Ftm* in Spezies beginnend mit den *Cnidarien* bis hin zum Menschen vorhanden ist (siehe 1.2.4; Tab.1) und somit ein evolutionär

hochkonserviertes Protein darstellt. Eine Ausnahme bilden hier die Arthropoden und Nematoden: In ihnen konnte kein Ftm-Homolog nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von Zilien ist in Arthropoden (wie z.B. *Drosophila melanogaster*) auf wenige Zelltypen (spezifische Neuronenzellen und die Keimzellen) begrenzt (Basto et al., 2006). Zusätzlich zeigen *Drosophila*-Mutanten, in denen Zilien abwesend sind, nur einen sehr milden Phänotyp, so dass eine Funktion von Zilien für Signaltransduktionskaskaden in Invertebraten nahezu ausgeschlossen werden kann (Basto et al., 2006). Unterstützt wird dieser Verdacht durch die Tatsache, dass selbst IFT-Proteinen, die eindeutig für die zilienassoziierten Shh-Signaltransduktion in Vertebraten notwendig sind, keine Funktion in Signaltransduktionen in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden konnte (Han et al., 2003; Sarpal et al., 2003). Zusätzlich zu Ftm konnten auch die Homologe anderer Basalkörperproteine nicht in *Drosophila melanogaster* gefunden werden (siehe 3.5.2; Tab.3.4). Homologe von OFD-1 (Oral-Facial-Digital-Type-1) und Nephrocystinen, welche in Vertebraten für die Funktion chemosensorischer und mechanosensorischer Zilien verantwortlich sind, waren nicht im Genom von *Drosophila melanogaster* nachweisbar. Unter den untersuchten Proteinen gehört auch Nephrocystin-4, das als Interaktionspartner des humanen Ftm-Proteins (KIAA1005) identifiziert wurde (Roepman et al., 2005). Proteine der BBS-Familie (BBS1-10) und IFT-Proteine (IFT20, IFT52, IFT88 und IFT172) hingegen sind in *Drosophila* anwesend.

Der Vergleich zwischen Vertebraten und *Drosophila* deutet auf fundamentale Unterschiede sowohl im Aufbau als auch in der Funktion von Zilien hin. Die Abwesenheit von Ftm und anderer Basalkörperproteine (inklusive des Ftm-Interaktionspartners Nephrocystin-4) im Genom von *Drosophila*, zeigt dass das Basalkörperproteom von Vertebraten und Invertebraten keineswegs identisch ist. In *Drosophila* gibt es zudem bislang keinen Hinweis auf eine Funktion von Zilien in Signaltransduktionen. Die Unterschiede im Basalkörperproteom könnten somit die Ursache für die funktionellen Unterschiede von Zilien in Vertebraten und Invertebraten sein. Die Verlagerung des Hh-Signalweges an die Zilienstruktur der Vertebratenzelle, hat vermutlich die Rekrutierung zusätzlicher Basalkörperproteine, inklusive Ftm, zur Ausbildung einer funktionellen Einheit erfordert. Ftm ist bislang die erste identifizierte, vertebratenspezifische Komponente des zilien-assoziierten Hh-Signalweges, und eröffnet neue Möglichkeiten die Unterschiede zwischen Signaltransduktionen in Vertebraten und Invertebraten zu studieren.

5. Zusammenfassung

Das *Ftm*-Gen wurde in der spontanen Mausmutante *Fused toes (Ft)*, die durch eine Deletion von sechs Genen verursacht wird, identifiziert. *Ft*-mutante Tiere zeigen einen komplexen Phänotyp, was auf eine Beteiligung der *Ft*-Gene an entwicklungsbiologisch wichtigen Prozessen hindeutete. Um die Funktion von *Ftm* charakterisieren zu können, wurde eine *Ftm*-mutante Mauslinie generiert und die Konsequenzen eines *Ftm*-Verlustes während der Embryonalentwicklung analysiert. Heterozygote *Ftm*-Tiere zeigten keine offensichtlichen Fehlbildungen. Homozygote Tiere hingegen offenbarten eine Vielzahl von Fehlbildungen und erwiesen sich als pränatal letal. Ein kompletter Verlust von *Ftm* führt zu massiven Störungen innerhalb der Entwicklung des Gehirns, kraniofacialer Strukturen und der Gliedmaßen. Zusätzlich konnte ein Verlust der Regulation der Links-Rechts-Asymmetrie und Missbildungen im Herzen nachgewiesen werden. Diese phänotypischen Veränderungen ähneln Mutanten, in denen der Shh-Signalweg gestört ist, und deuteten auf eine Funktion von *Ftm* in der Shh-Signaltransduktion hin. Mit Hilfe von molekularen und biochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *Ftm* eine verminderte Shh-Signalweiterleitung bewirkt, und dass *Ftm* oberhalb von Gli3 in der Shh-Signalkaskade zu positionieren ist. Untersuchungen zur Lokalisierung des *Ftm*-Proteins offenbarten zudem, dass *Ftm* sich am Basalkörper von Zilien befindet. Da die Shh-Signaltransduktion in Vertebraten an Zilien gekoppelt ist, gab dies weitere Evidenz für eine Funktion von *Ftm* innerhalb der Shh-Signalkaskade. *Ftm* ist in Spezies beginnend mit den *Cnidarien* bis hin zum Menschen vorhanden und stellt somit ein evolutionär hoch konserviertes Protein dar. Eine Ausnahme bilden hier die Arthropoden, wie z.B. *Drosophila*. In ihnen konnte kein *Ftm*-Homolog nachgewiesen werden. Dieser Befund korreliert mit der Tatsache, dass der Hh-Signalweg in *Drosophila* nicht an Zilien gekoppelt ist. *Ftm* ist somit die erste identifizierte, vertebratenspezifische Komponente des zilienassoziierten Hh-Signalweges, und eröffnet neue Möglichkeiten die Unterschiede zwischen Signaltransduktionen in Vertebraten und Invertebraten zu studieren.

Desweiteren deuten die phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *Ftm*^{-/-}-Embryonen und mutanten Tieren (bzw. Patienten), in denen andere Basalkörperproteine betroffen sind, auf eine ähnliche Funktionsweise von Basalkörperproteinen im Allgemeinen hin. *Ftm* kann somit zusätzlich als Kandidatengen bei der Ausbildung menschlicher Syndrome angesehen werden.

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AS	Aminosäure
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
b	Basen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
Ci	Curie (Einheit der Zerfallsaktivität)
cm	Zentimeter
cpm	Radioaktiver Zerfall pro Minute
D	Tag
d	Desoxy
Da	Dalton
D. rerio	Danio rerio
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphatgemisch
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	N-Ethyl-N-Nitroso-Harnstoff
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
E _x	Extinktion bei x nm Wellenlänge
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo- (10 ³)
l	Liter

μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)
cm	Centimeter
M	Molar (mol/L)
Mb	Megabasenpaare
MEF	Mausembryo Fibroblasten
min.	Minute
MLC	Mesenchymale Gliedmaßenzellen
mm	Millimeter
Mol	Mol (6,023 x 10 ²³ Teilchen)
n	nano- (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
OD	Optische Dichte
³² P	Radioaktives Phosphorisotop der Atommasse 32
p	pico (10 ⁻¹²)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Transformationspuffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>z.B.</i>	zum Beispiel

6.2 Literaturverzeichnis

Afzelius, B.A. (1999). Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 283-286.

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., Mah, A.K., Johnsen, R.C., Cavender, J.C., Lewis, R.A., Leroux, M.R., Beales, P.L., Katsanis, N. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*. 425(6958): 628-33.

Ausmeier, K. Dissertation (2000). Physikalische Kartierung des *Fused toes* Lokus und funktionelle Analyse des *Iroquois 3 (Irx3)* Gens in der Maus. Fachbereich Biologie, Universität Hannover.

Azzi, A., Boscoboinik, D., Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208: 547-557.

Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., Katsanis, N. (2006). The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 7: 125-148.

Bai, C.B., Stephen, D., Joyner, A.L. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev. Cell.* 6(1):103-15.

Bao, Z.Z., Bruneau, B.G., Seidman, J.G., Seidman, C.E., Cepko, C.L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science*. 283(5405): 1161-1164.

Basler, K. und Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature*. 368(6468): 208-14.

Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A. und Raff, J.W. (2006). Flies without Centrioles. *Cell*. 125:1375-1386.

Beddington, R.S.P. und Robertson, E.J. (1989). An assesment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105: 733-737

Bellefroid, E.J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J.B., Papalopulu, N. (1998). Xiro3 encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *EMBO J.* 17(1): 191-203.

Bharti, K., Nguyen, M.T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., Arnheiter, H. (2006). The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res.* 19(5): 380-94.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7: 1513-1522

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

Bisgrove, B.W. und Yost, H.J. (2001). Classification of left-right patterning defects in zebrafish, mice, and humans. *Am. J. Med. Genet.* 101(4): 315-23.

Bisgrove, B.W., Morelli, S.H., Yost, H.J. (2003). Genetics of human laterality disorders: insights from vertebrate model systems. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 4: 1-32.

Boylan, J.P. und Wright, A.F. (2000). Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2085-2093.

Braun, M.M., Etheridge, A., Bernard, A., Robertson, C.P., Roelink, H. (2003). Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain. *Development.* 130(23): 5579-87.

Briscoe, J. Sussel., L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessel, T., Rubenstein, J., Ericson., J. (1999). Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neural identity by graded Sonic hedgehog signaling. *Nature.* 398: 622-627.

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. und Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:43-49.

Brueckner, M. (2001). Cilia propel the Embryo in the Right Direction. *Am. J. Med. Genet.,* 101: 339-344

Bruneau, B.G., Bao, Z.Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C.T., Berul, C.I., Kass, D.A., Kuroski-de Bold, M.L., de Bold, A.J. (2001). Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression.

Burdine, R.D. und Schier, A.F. (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes. Dev.* 14(7): 763-76.

Burill, 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(22): 4493-503.

Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J. und Rüter, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by *Gli3* in mouse limb development. *Mech. Dev.* 62: 175-182.

Büscher, D., Grotewold, L., und Rüter, U. (1998). The *XtJ* allele generates a *Gli3* fusion transcript. *Mamm. Genome.* 9: 676-678.

Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein *Hmg1* does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* 22(3): 276-80.

Capdevila, J. und Izpisua Belmonte, J.C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 87-132.

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

Cartwright, J.H., Piro, N., Piro, O., Tuval, I. (2006). Embryonic nodal flow and the dynamics of nodal vesicular parcels. *J. R. Soc. Interface.* (in Druck)

Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(Pt 2): 297-354.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 (5148): 802-805

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 383: 407-413.

Christensen, S.T., Guerra, C.F., Awan, A., Wheatley, D.N., Satir, P. (2003). Insulin receptor-like proteins in *Tetrahymena thermophila* ciliary membranes. *Curr. Biol.* 13(2): R50-2.

Church, G.M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1991

Cole, D.G. (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 4: 435-442.

Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 437: 1018-1021.

Currie, P.D. und Ingham, P.W. (1996). Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature*. 382(6590): 452-5.

Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell*. 102(4): 521-31.

Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., Hui, C.C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development*. 125: 2533-2543.

Duprez, D., Fournier-Thibault, C., Le Douarin, N. (1998). Sonic hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development*. 125: 495-505.

Dutcher, S.K. (2003). Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 4(7): 443-51.

Dwyer, N.D., Troemel, E.R., Sengupta, P., Bargmann, C.I. (1998). Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell*. 93(3): 455-66.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, AP. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 75(7): 1417-30.

Ekker, S.C., Ungar, A.R., Greenstein, P., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Moon, R.T., Beachy, P.A. (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr. Biol*. 5(8): 944-55.

Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T.M., Yamada, T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science*. 256(5063):1555-60.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T.M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*. 87(4):661-73.

Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*. 90(1):169-80.

Essner, J.J., Branford, W.W., Zhang, J., Yost, H.J. (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by pitx2 isoforms. *Development*. 127(5): 1081-93.

Ferrante, M.I., Zullo, A., Barra, A., Bimonte, S., Messaddeq, N., Studer, M., Dolle, P., Franco, B. (2006). Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat. Genet.* 38: 112-117.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J., Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* 14(1): 67-80.

Fraser, A.G., Kamath, R.S. Zipperlein, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408: 325-330

Gallicano, G.I., Kouklis, P., Bauer, C., Yin, M., Vasioukhin, V., Degenstein, L., Fuchs, E. (1998). Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J. Cell. Biol.* 143: 2009-2022.

Gerhardt, C. Diplomarbeit (2005). Analyse der ZNS-Veränderungen in Ftm-negativen Mäusen. Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc.

Glavic, A., Gomez-Skarmeta, J.L., Mayor, R. (2002). The homeoprotein Xiro1 is required for midbrain-hindbrain boundary formation. *Development*. 129(7): 1609-21.

Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 277(5329): 1109-13.

Götz, K., Briscoe, J. und Rüther, U. (2005). Homozygous Ft embryos are affected in floor plate maintenance and ventral neural tube patterning. *Dev. Dyn.* 233: 623-630.

Gomez-Skarmeta, J.L. und Modolell, J. (1996). Araucan and caupolican provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.*10(22):2935-45.

Gomez-Skarmeta, J.L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J., Mayor, R. (1998). Xiro, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* 17(1):181-90.

Gomez-Skarmeta, J.L. und Modolell, J. (2002). Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12(4):403-8.

Goulding, M.D., Lumsden, A., Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development.*117(3): 1001-16.

Grillenzoni, N., van Helden, J., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A. (1998). The iroquois complex controls the somatotomy of *Drosophila notum* mechanosensory projections. *Development.* 125(18):3563-9.

Grotewold, L. Dissertation (2001). Molekulare Mechanismen der Gliedmaßenentwicklung: Analyse der Fused toes Mausmutante und des Dickkopf-1 Gens. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Grotewold, L. und Rüther U. (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J.* 21(5):966-75.

Han, Y.G., Kwok, B.H. und Kernan, M.J. (2003). Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr Biol.*13:1679-1686.

-
- Hanaoka**, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., Germino, G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*. 408(6815): 990-4.
- Hasty**, P., Rivera-Perez, J. und Bradley, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5586-5591
- Hasty**, P., Rivera-Perez, J., Chang, C., Bradley, A. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4509-4517
- Haycraft**, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., Yoder, B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1; e53.
- Heymer**, J., Kuehn, M. und Rüther, U. (1997). The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant Ft suggests a function in the establishment of handedness. *Mech. Dev.*, 66: 5-11.
- Heymer**, J. und Rüther, U. (1999). Syndactyly of Ft/+ mice correlates with an imbalance in Bmp4 and Fgf8 expression. *Mech. Dev.*, 88: 173-181.
- Hirokawa**, N., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*. 125: 33-45.
- Hochedlinger**, K. und Jeanisch, R. (2002). Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 415: 1035-1038
- Hogan**, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hong**, D.H., Yue, G., Adamian, M., Li, T. (2001). Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J. Biol. Chem.*, 276: 12091-12099.

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesh-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326: 292-295

Hooper, J.E. und Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(4):306-17.

Hu, D. und Helmes, J.A. (1999). The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*. 126(21): 4873-84.

Huangfu, D. und Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 11325-11330.

Huangfu, D. und Anderson, K.V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development*. 133: 3-14.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson K.V. Hedgehog signaling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. (2003). *Nature*. 426: 83-87.

Hui, C.C. und Joyner, A.L. (1993). A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat. Genet.* 3: 241-246.

Incardona, J.P., Gruenberg, J., Roelink, H. (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr. Biol.* 12(12): 983-95.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.

Itoh, M., Kudoh, T., Dedekian, M., Kim, C.H., Chitnis, A.B. (2002). A role for iro1 and iro7 in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development*. 129(10): 2317-27.

Jacob, J. und Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* 4: 761-765

Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1(1): 20-9.

Jessell, T.M. und Melton, D.A. (1992). Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell.* 68(2): 257-70.

Johnson, R.L. und Tabin C.J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell.* 90(6): 979-90.

Joyner, A.L. (2000). *Gene Targeting: A practical approach* 2nd ed. Oxford University Press Inc.

Katsanis, N. (2006). Ciliary proteins and exencephaly. *Nat. Genet.* 38(2):135-6.

Kim, J.C., Ou, Y.Y., Badano, J.L., Esmail, M.A., Leitch, C.C., Fiedrich, E., Beales, P.L., Archibald, J.M., Katsanis, N., Rattner, J.B., Leroux, M.R. (2005). MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J. Cell Sci.* 118: 1007-1020.

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(1): 83-93.

Koudijs, M.J., den Broeder, M.J., Keijser, A., Wienholds, E., Houwing, S., van Rooijen, E.M., Geisler, R., van Eeden, F.J. (2005). The zebrafish mutants dre, uki, and lep encode negative regulators of the hedgehog signaling pathway. *PLoS Genet.* 1(2):e19.

Krüger, M., Mennerich, D., Fees, S., Schäfer, R., Mundlos, S., Braun, T. (2001). Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development.* 128: 743-752.

Kühn, R., Rajewsky, W., Müller, W. (1991). Generation and analysis of Interleukin-4 deficient mice. *Science*. 254: 707-710

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-5.

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., Hui, C.C. (2003). The Iroquois homeobox gene *Irx2* is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice. *Mol. Cell. Biol.* 23(22): 8216-25.

Lesche, R. Dissertation (1997). Molekulare und funktionelle Analyse des Ft1-Gens in der Maus. Fachbereich Biologie, Universität Hannover.

Lesche, R., Peetz, A., van der Hoeven, F., Rütther, U. (1997). Ft1, a novel gene related to ubiquitin-conjugating enzymes, is deleted in the Fused toes mouse mutation. *Mamm. Genome*. 8: 879-883.

Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. 82(6): 969-79.

Liem, K.F. Jr., 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(1): 127-38.

Liu, A., Wang, B., Niswander, L.A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*. 132: 3103-3111.

Liu, C., Liu, W., Lu, M.F., Brown, N.A., Martin, J.F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development*. 128, 2039-2048.

Lobe, C.G. und Nagy, A. (1998). Conditional genome alterations in mice. *BioEssays*, 20: 200-208

Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbbeck, P., Kuehn, M.R. (1996). Conserved left-right Asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus *Nature*, 381: 158-161

Lupas, A. (1996). Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.*, 266: 513-525

Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A., Tabin, C.J. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev. Biol.* 180(1): 273-83.

Matise, M.P. und Joyner, A.L. (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(20): 7805-16.

Mavlyutov, T.A., Zhao, H., Ferreira, P.A. (2002). Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1899-1907.

May, S.R., Ashique, A.M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., Peterson, A.S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev. Biol.* 287: 378-389.

McMahon, A.P., Ingham, P.W., Tabin, C.J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53: 1-114.

McNeill, H., Yang, C.H., Brodsky, M., Ungos, J., Simon, M.A. (1997). Mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* 11(8):1073-82.

Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H., Hamada, H. (1998). Lefty-1 Is Required for Left-Right Determination as a Regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*, 94: 287-297

-
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., Hamada, H. (1996).** Left-right asymmetric expression of the TGF β -family member *lefty* in mouse embryos. *Nature*, 381: 151-155
- Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A.N., Hurle, J.M. (1999).** The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126: 5515-5522
- Misquitta, L. und Paterson, B.M. (1999).** Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1451-1456
- Mitchell, D.R. (2004).** Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. *Biol Cell*. 96(9): 691-6.
- Morelli, S.H., Young, L., Reid, B., Ruttenberg, H., Bamshad, M.J. (2001).** Clinical analysis of families with heart, midline, and laterality defects. *Am. J. Med. Genet.* 101(4): 388-92.
- Morgan, D., Goodship, J., Essner, J.J., Vogan, K.J., Turnpenny, L., Yost, H.J., Tabin, C., Strachan, T. (2001).** The left-right determinant *inversin* has highly conserved ankyrin repeat and IQ domains and interacts with calmodulin. *Hum. Genet.*, 110: 377-384
- Mohler, J. (1998).** Requirements for *hedgehog*, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics*. 120(4): 1061-72.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S. Irie, H., Takigawa, T., Shiota, K. (1995).** Programmed cell death in the interdigital tissue of the mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.*, 242: 103-110.
- Motoyama, J., Milenkovic, L., Iwama, M., Shikata, Y., Scott, M.P., Hui, C.C. (2003).** Differential requirement for *Gli2* and *Gli3* in ventral neural cell fate specification. *Dev. Biol.* 259(1):150-61.

Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., Woychik, R.P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (orp) disease gene is required for left-right axis determination. *Development*, 127: 2347-2355.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 90: 8424-8428

Nasevicius, A. und Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.*, 26: 216-220

Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E., Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33(2): 129-37.

Niswander L. (2003). Pattern formation: old models out on a limb. *Nat. Rev. Genet.* 4: 133-143.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*; 95: 829-837.

Nonaka, S., Shiratori, H., Saiyoh, Y., Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*, 418: 96-99

Nüsslein-Vollhardt, C. und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287: 795-801

Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell*, 4: 459-468.

Olbrich, H., Häffner, K., Kispert, A., Völkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zarilawa, M., Noone, P.G., Knowles, M., Mitchison,

H.M., Meeks, M., Chung, E.M.K., Hildebrandt, F., Sudbrak, R., Omram, H. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nature Genetics*, 30: 143-144

Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3365-3377.

Pasca di Magliano, M. und Hebrok, M. (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer.* 3(12): 903-11

Pawlyk, B.S., Smith, A.J., Buch, P.K., Adamian, M., Hong, D.H., Sandberg, M.A., Ali, R.R., Li, T. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 3039-3045.

Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., Cole, D.G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell. Biol.* 151(3):709-18.

Pazour, G.J. (2004). Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(10): 2528-36

Peters, T. Dissertation (2002). Die Fused toes Mausmutation – Identifizierung und Charakterisierung der Kandidatengene. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R., Rütger, U. (2002). The Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mammalian Genome*, 13: 186-188

Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., Rütger, U. (2000). Organization of mouse iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.*, 10: 1453-1462.

Poh, A., Karunaratne, A., Kollé, G., Huang, N., Smith, E., Starkey, J., Wen, D., Wilson, I., Yamada, T., Hargrave, M. (2002). Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int. J. Dev. Biol.* 46(4): 597-608.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). Primary Structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111 (2): 229-233

Rabilloud, T., Carpentier, G., Tarroux, P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*. 9(6):288-291.

Ramires-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wims, M., Wallace, J.D., Zheng, H., Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextractions: a method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.* 201: 331-335

Ramsdell, A.F. (2005). Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination. *Dev. Biol.* 2005 288(1): 1-20.

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 75(7): 1401-16.

Riethmacher, D., Brinkmann, V., Birchmeier, C. (1995). A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (3): 855-859

Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. 81: 445-455.

Roepman, R., Letteboer, S., Arts, H., van Beersum, S., Lu, X., Krieger, E., Ferreira, P., Cremers, F. (2005). Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:18520-18525.

Romio, L., Fry, A.M., Winyard, P.J., Malcolm, S., Woolf, A.S., Feather, S.A. (2004). OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(10): 2556-68.

Rosenbaum, J.L. und Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(11): 813-25.

Ross, J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., Tan, P.L., Phillips, H.M., Leroux, M.R., Henderson, D.J., Murdoch, J.N., Copp, A.J., Eliot, M.M., Lupski, J.R., Kemp, D.T., Dollfus, H., Tada, M., Katsanis, N., Forge, A., Beales, P.L. (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat. Genet.* 37(10):1135-40.

Rossant, J. (2001). Stem Cells from the Mammalian Blastocyst (concise review). *Stem Cells* 19: 477-482; AlphaMed Press

Sarpal, R., Todi, S.V., Sivan-Loukianova, E., Shirolkar, S., Subramanian, N., Raff, E.C., Erickson, J.W., Ray, K., Eberl, D.F. (2003). Drosophila KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr Biol.* 13:1687-1696.

Schneider, H. und Brueckner, M. (2001). Of Mice and Men: Dissecting the Genetic Pathway That Controls Left-Right Asymmetry in Mice and Humans. *Am. J. Med. Genet.*, 97: 258-270

Schneider, L., Clement, C.A., Teilmann, S.C., Pazour, G.J., Hoffmann, E.K., Satir, P., Christensen, S.T. (2005). PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* 15(20): 1861-6.

Scholey, J.M. und Anderson, K.V. (2006). Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell.* 125: 439-442.

Schweitzer, R., Vogan, K.J., Tabin, C. J. (2000). Similar expression and regulation of Gli2 and Gli3 in the chick limb bud. *Mech. Dev.* 98: 171-174.

Shiratori, H. und Hamada, H. (2006). The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development*. 133(11): 2095-104.

Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., Walz, G. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* 37(5): 537-43.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 98: 503-517

St-Jaques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes. Dev.* 13(16): 2072-86.

Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., Jalk, N., Vicaire, S., Sarda, P., Hamel, C., Lacombe, D., Holder, M., Odent, S., Holder, S., Brooks, A.S., Elcioglu, N.H., Silva, E.D., Rossillion, B., Sigaudy, S., de Ravel, T.J., Lewis, R.A., Leheup, B., Verloes, A., Amati-Bonneau, P., Megarbane, A., Poch, O., Bonneau, D., Beales, P.L., Mandel, J.L., Katsanis, N., Dollfus, H. (2006). BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat. Genet.* 38: 727.

Sulik, K., Dehart, D.B., Iangaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gestel, K., Schoenwolf, G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dyn.*, 201: 260-278.

Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature*. 389: 963-966.

Supp, D.M., Brueckner, M., Kuehn, M.R., Witte, D.P., Lowe, L.A., McGrath, J., Corrales, J., Potter, S.S. (1999). Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development*, 126: 5495-5504.

Tabata, T., Eaton, S., Kornberg, T.B. (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes. Dev.* 6(12B): 2635-45.

Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Hirokawa, N. (1999). Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by *kif3A*^{-/-} mice analysis. *J. Cell. Biol.* 145: 825-836.

Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the *NF-IL6* gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell.* 80 (2): 353-361

Tanaka, Y., Okada, Y., Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature.* 435(7039):172-7.

Taulman, P.D., Haycraft, C.J., Balkovetz, D.F., Yoder, B.K. (2001). Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol. Biol. Cell.* 12(3):589-99.

te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., Zeller, R. (2002). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of *GLI3*. *Science.* 298(5594) :827-30.

Thomas, T., Kurihara, H., Yamagishi, H., Kurihara, Y., Yazaki, Y., Olson, E.N., Srivastava, D. (1998). A signaling cascade involving endothelin-1, *dHAND* and *Msx1* regulates development of neural-crest-derived arch mesenchyme. *Development.* 125: 3005-3014.

Torban, E., Kor, C., Gros, P. (2004). Van Gogh-like2 (*Strabismus*) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends. Genet.* 20(11): 570-7.

Torres, R.M. und Kühn, R. (1997). Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 76(9): 4350-4.

Treier, M., Gleiberman, A.S., O'Connell, S.M., Szeto, D.P., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Rosenfeld, M.G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. Genes Dev. 12(11): 1691-704.

Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T.M., Pfaff, S.L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. Cell. 79(6):957-70.

Tsukui, T., Capdevila, J., Tamura, K., Ruiz-Lozano, P., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Magallon, J., Chandraratna, R.A., Chien, K., Blumberg, B., Evans, R.M., Belmonte, J.C. (1999). Multiple left-right asymmetry defects in *Shh*(^{-/-}) mutant mice unveil a convergence of the *shh* and retinoic acid pathways in the control of *Lefty-1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 96: 11376-11381.

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M. G., Kyewski, B., Rüther, U. (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). Development. 120: 2601-2607.

Viethen, C. Diplomarbeit (2006). Molekularbiologische und physiologische Analysen des Herzens von *Ftm*-mutanten Mäusen. Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vierkotten, J. Diplomarbeit (2001). Untersuchungen zur Inaktivierung der Mausegene *Fto* und *Ftm* in murinen embryonalen Stammzellen. Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 615-619

Volkman, A., Döffinger, R., Rütter, U., Kyewski, B. A. (1996). Insertional mutagenesis affecting programmed cell death leads to thymic hyperplasia and altered thymopoiesis. *J. Immunol.* 156: 136-145.

Wakayama, T., Rodriguez, I., Perry, A.C.F., Yanagimachi, R., Mombaerts, P. (1999). Mice cloned from embryonic stem cells. *PNAS.* 96 (26): 14984-14989

Wang, B., Fallon, J.F., Beachy, P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell.* 100: 423-434.

Wolff, C., Roy, S., Ingham, P.W. (2003). Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.* 13(14): 1169-81.

Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., Jessell, T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell.* 64(3): 635-47.

Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T., Jessell, T.M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell.* 73(4): 673-86.

Yamagishi, C., Yamagishi, H., Maeda, J., Tsuchihashi, T., Ivey, K., Hu, T., Srivastava, D. (2006). Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. *Pediatr. Res.* 59(3): 349-54.

Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., Hirokawa, N. (1995). KIF3A/B: a heterotrimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membran organelle transport. *J. Cell. Biol.* 130: 1387-1399

Yang, Y., Guillot, P., Boyd, Y., Lyon, M.F., McMahon, A.P. (1998). Evidence that preaxial polydactyly in the Doublefoot mutant is due to ectopic Indian Hedgehog signaling. *Development.* 125: 3123-3132.

Yokoyama, T., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Montgomery, C.A., Elder, F.F.B., Overbbeck, P. (1993). Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation

Zhang, X.M., Ramalho-Santos, M., McMahon, A.P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell*. 106(2): 781-92.

Zhao, Y., Hong, D.H., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., Godzik, A. und Li, T. (2003). The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 100: 3965-3970.

7. Anhang

250 300

Maus KENEIELSLLQLREQQATDQRSNIRDNVETIKLHKQVLEKSNALSVEGKFIQLQE KQRTLRI SHDALMANGDEL
Mensch KENEIELSLLQLREQQATDQRSNIRDNVEMIKLHKQVLEKSNALSAMEGKFIQLQE KQRTLRI SHDALMANGDEL
Zebrafisch RREFEESLLQVREQQASGQRLTIKDNVEMIKLQKLLSEKANTLAVLEGRFLQQQE SMKTLKASHDAALLKVDG
LanzettfischKDAEHEEELLRMREQMAAGORGSIOENVDMIRLQRELEKATKLTAMQAKYTNLEE NLRTVKGSHDQVLEMDGL
Seeigel KELDHEEVLLRLKEQMSAGORSNIQENVDMIKLQREVEKESOKLAALAQYATLQE NLHTVKTSHDAVIAEMEDL
Capitella RETEYEEEDILKIKQQLSQGQRNIQENIDVIRLQREVKDKSTKLSQIQAOQFONVEE KLHTVKTSHDQVLYEMDLL
Lottia RETEFQDDMAKIQQMTFEDHRMTMKENVDI IKLQREISTKSSKLEIELESRYHTLEE KIHIIKSNRDELLEMEMESL
Seeanemone NELEHQEELNRARDQLTGMQRGNLQENVELIKLQDVKDKMTKLQAVQAKYOSLEE NLAKVKISHSOVLDEMDSL
Hydra KELKHEEEIQKLRSSENKNQKTVIKENVELIKLQREVEKEIATLQNLQSKYGNLEE MMNKVKVSHDQVLEEMESL
Maus RPRGRIP EQRSSSECT QKAAELRASIKENVELIRLKKLLQERN TSAATEAQLTRVQEAAYEDLLQKNQIGLDTAHNAFLSQVNEL

350 400

NKQLKEQRLKCCSLEKQLHSVRFSEERRVEELQDRINDLEKERELLKENYDKLYNSAFSAHEEQWKLKEQOMKVQIA QLETTALKSDLTDKTE
MRQLKEQRLKCCSLEKQLHSMKFSERRIEELQDRINDLEKERELLKENYDKLYNSAFSAHEEQWKLKEQOLKVQIA QLETTALKSDLTDKTE
HRQLKEERLKSQLEQTITSRALHHRHLELQERIQDLEKERDLLKENCDKLVSAFQVSDQEQWRTREQQLKVQIA QLETTALKSDLTADKNO
REHLKAEQNRVLRQLNDLQKQATAHRTIIELOQERVADLEKENDIIEKANTQLOMSAFDAERERQHRATEFKLRVQIA QLEAATLKSDLHEKND
NRKLHQSQAQSLTLQTELKQGSNLORNISELQERITDTENEKDIILREANEKLLNSAFDAERERQYRANEKQLKQIA QLEAATLKGDLDNDKNT
NNQLKEEQDRMSLQNELKASSLSQRALVVEYQERVADLERECEILKEANEKLVTSAFDLERERERWRQREGALKVQVA QLEAATLKADVGEKGS
NVQLKEEQNKVLTQNLQIRNFSAKERKIFESEKVKAAERENEILKEANEKLVSSAFDLERERERWRQREGALKVQVA QLEAATIKADLGEKGS
NTKLKEEQTKNMLKNEMKSKGIAEKSMTEQVQLITDLKAENEILKEANEKLVNSAFQVSDQEQHRNRVYRQEQVEIE QLEAATLNSDLKKEKNE
TSKLKNEQLKNTMLQNELNQGNISSKKTLDQKEEQINDLKAEVQLLKEAHEKLLHSTFDLEKDRFRSKEKQYQIKIA QLEAATIKCDVSEKNE
KAELSSESKAVSLRTOQLGDVSLQITLKEFQVRVEDLEKERKLLSDSYDRLLLENMLDSSHQPLDSSHQPHWSTELTGKQLPPPQVCPLEDMQGT

450

VLDKLTERTDQNEKLVQENR . DLQLOCLQKQRLHELOSRLKFFNOESDINADLSEALLLIKAQKEQKNGDLSFLEKVDKSKINKDLDRSMKELO
ILDRLKTERDQNEKLVQENR . ELQLOYLEQKQQLDELKRIKLYNQENDINADELSEALLLIKAQKEQKNGDLSFLVKVSEINKDLERSMRELO
ILDKIKAEARDVNEENTQENK . QLQLRYLEQKQOLEEIKDRMKFFTKESIDAELSEALMLIKVRRSQSGELGFLEKVEEDVKVDVERSLEKLO
VLDRVTLERSQNDKMRQEQ . NLQIQYYSTKQELDELQKMQFFTKESAVDFQLEEAALVLIKTRKERGSQNLDFLEKVEEEKSRDLQQRMVRLQ
LLDKLNEEREEYEKLOKQENR . DMQVKYAVRQKQLEELQEKMKFFTKESAVDWNEMEEALILVKKRKRERTQDLDFLEKVDDEINRDMKIOMGGLQ
ILDKLTSERDNYDELQEEHR . DMRIKYFQLKQEFDDLKDKMSFFTKESAVDFQLEEEALMLVQRKEKANQDLDFLEKVDHLKNEDYEKMKVEMQ
IIDKYSYERDSKLESEL . ESQINYYQVKEQFDDLQEKMKFFTKESAVDFSEIEEALVLIKQRKQKNIKQPDFLQOVVDEKDKDYKKNLLELO
ILDKLTSEERGKAEKVEEELR . QLRVQHYTLKEQYDDLREKMKFFTKESAVDFQLEEEALVLIKQRKEKGSQDLDFLEKVDDEIGKDVKKHQELM
IIDKLTSERDISELSKRQLR . DLQVKYFELQENYNNLMKMKFFSNESVDFNEIQEALFLIKTRKEKESQDLDFLDKAENQIDKDLRKEIQQLN
ALEETKVRQATNKAAQDGKLFQDQTDILYQHEQEEESLQSTATVASSPEELCELAQAQPTLLPQTDQRESE PKAQDE NDLSQVLSLELO

500 550

ATHAETVQELEKTRNMLIMQHKINKDYQMEVETVTKMENLQODYELKVEQYVHLLDIRAARIKLE AQLKDIAYGTKQYKFKP
ATHAETVQELEKTRNMLIMQHKINKDYQMEVEAVTRKMENLQODYELKVEQYVHLLDIRAARIKLE AQLKDIAYDTKQYKFKP
ATYAETVQELEKTRNMLIIQHKINKDYQAEVEAVNRMMDDLKLEYELKSEKLAQLLDMRAAKIRKLE AQLKDIAYGKTHVFRP
AEHADTVNELEKTRNMLIIQHRINKDYQTEVESVSKRMEDLREYETKLEEYAKLLDIRAARIKLE RQLRDVAYGKQYKFKP
AEHADTVNELEKTRNMLLQNKINRDYQEVDSSTRRLLEDYKQYETKLDYEAQLLDIRAARIKLE RQMKDVAYGKQYKFKMAD
VEHADTVNELEKTRNMLIVQHKINKDYQVEVEAVTRKMENLRELFETRLOQFAQLLDIRAARIKLE AQLRDVAYGKQYTIKPK
AEYAETVHELEKTRNMLIVQHKINKDYQEVDSFNQKMDDEFKKEYEMKLEEARLLDIRAARIKME NQMKDVAYGTRQYKIQV
AAHADTVNELEKTRNMLIIQHKINKDYKTEVDRVTRKMPDDKKEYDLKMHYAEALLDIRAARIKLE SOLKDIAYGKQYKIKK
VSHAETVRELEKTRNMLVLQHNINKDYQKEVEITTKMEELKRECDIRKEYAEALLDIRAARIKLE SOLKDIAYGKQYKIKK
VSHAETVLELEKTRDMLLQKINMICYQEELEATLTKADRENDRHEEKLERLNHLDFKNSRIKOLEGILRSHGLPTSEQLKDVAYGTLPPSLCL

600 650

.EIMPDDSVDEFDETIHLERGENLFEIHKVTFSSSEVLRASGDKELVTFCTYAFYDFELQTPPIVRGLYPEYNFTSQYLHVHNDLFLQYIQKN
.EIMPDDSVDEFGETIHLERGENLFEIHKVTFSSSEVLQASGDKEPVTFCTYAFYDFELQTPPVVHGLHPEYNFTSQYLHVHNDLFLQYIQKN
.DETSDDVDFEFGTVQLTRGENLLEIHLGKGFQFSPEAVESLKDKDPSTFCTYAFYDFELQSTPVVHGRPDYFSSQYLVRVDDLFLNLYLHTS
TEEEEEVEVEEIDETVHLERGENLFEIHKVTFSSSEVLQASGDKEPVTFCTYAFYDFELQTPPVVHGRPDYFSSQYLVRVDDLFLNLYLHTS
IAPDEDD . YEEVDESILKERGQNLMEIHKVTFSSSEVLQASGDKEPVTFCTYAFYDFELQSTPVVHGRPDYFSSQYLVRVDDLFLNLYLHTS
AHDE . ILGAEVNEHVELENGQNLFEIHRVRLQNPDALKHLGDEEPSVTFCTWEFFFEYEQSTPVMKGPKIDFEFTSQYIVKVDLFLHLYLQKE
GDD . TESTMDFDETVALERQNLFEIHKVTFSSSEVLQASGDKEPVTFCTWEFFFEYEQSTPVCGRPRPVDFFTSQYIVKVDLFLHLYLQKE
DDTL . ESEYEEVDSLELBERGQNVFEIHKVTFSSSEVLQASGDKEPVTFCTWEFFFEYEQSTPVLKGMPLFNFTSQYLVRVDDLFLHLYLQKE
DDTLDEDDDDGDAEFQLERGENIFEIHFQKAYITKDGLEKFNSEPSFTLSYEFFFEHELOTPPLAFGINVDFNHTSTYKVKVDLFLHLYLQKE
EPLAAHRGDDEVDMSL . LHPSENLFELHVHQAFLTPAALTOAGDQPTTFCTYAFYDFETHCTPLSTGPPLYDFFTSQYVVQADYLLHLYLQGT

700 750

TVTLELHQAHSTDYETIACQLRFHEILEK . SGRIFCTTSLVGTG . GD . . IPNFGTVEYWFRLRVPMDQAIRLYRERAKALGYITSSFKKPEKM
TTTLEVHQAYSTYETIACQLRFHEILEK . SGRIFCTASLIGTK . GD . . IPNFGTVEYWFRLRVPMDQAIRLYRERAKALGYITSSFKKPEKM
STTVEIQLAEGLSFRTVLAGSIRLNLQVGS . DE . . IQVFGSLEWYWLKLVPMQDAIRLYRERAKALGYITSSFKKPEKM
STTLEVHQAMGLDYTTLAVCQLKFRDLDKQGRIFNTTYLTGPE . G VNFPGTVEYWFRLRVPMDQALRLFRERAKALGYIAANERATQ
ATTLEVHQAIQGFERTIACQLKFRDLDKQGRIHGSQVLVGS . SGRTDVITYGTFWVRLRVPMDQALRLFRERAKALGYIASNQRNTQ
SCTLELHQSFQDYNVTGACQLNLEILDRSHGRVHGNTANLIGVS . GDNTPGVNFGVYWFRLRVPMDQAMRLYKERSKALGYIDSNRNTQ
TCTLELHQSFQDYNVTGACQLNLEILDRSHGRVHGNTANLIGVS . GDNTPGVNFGVYWFRLRVPMDQAMRLYKERSKALGYIDSNRNTQ
STLVELHRAFQDFKTIACQLRFRDLDKSHGRVHGNTANLIGVS . TEGTEIASMEYWFRLRVPMDQAIRLYRERAKALGYITSSFKKPEKM
PMLVEFHQAQGFYRTIACQLRFRDLDKSHGRVHGNTANLIGVS . RNKEIAIVEFWVRLRVPMDQALRLYKERSKALGYITSSFKKPEKM
SVRLDLHQAMASEYHVLATGWISLQVLTGVE . RVHGLATLAGAG . GE DLGVLEYWMLCLPLKPSLQACNKRKKAQAYLSVSVLGAR

QLSSQQAATTAQISPAESTDGNLNLHVTVRCC TGLQSRASYLQPHAYV VYKFFDFPDHDTAIVPSSNDPQFDDHMCFFVPMNMDLDRYLKSES
 QLSLQQAPKTAQLSSTDSTDGNLNLHITIRCCNHLQSRASHLQPHYV VYKFFDFADHDTAIPSSNDPQFDDHMYFFVPMNMDLDRYLKSES
 .AFSVPAP SSSSLMNGDLNELSISIHSCNLKPKGPHTQPSPIVYKLYDFPDHDTPIIPCTTEPQFEDHMVFPMTMNSNLDAFLRSEA
 .QALQVLDES .TAPRAKD . . NVNDLHIRVVRCSDLTARRDGVQPSPYV VYKFFDFPDHDTDIIMSSSSPQFNDHKTYVPVMDMQLDLYLKSAH
 .QALSNLKQTGEEPTRDRDENINELTVKVICSDVKARREGIQPNPYI IYRFFDFNDHDTTTRVRSNTPEINDMQTYVPVTPDLDRYLRTET
 QALKALDEDAKRPPDNVNQLMISIKRCSNLQTRREGVQPSAYCVYKFFDFPEHDTSIIPGSNTPLFNDHKIYPLPMTLDDKYLKSSST
 DQLQALDEAARGRPMDNVNQLMISIKRCSNLQTRREGVQPSAYCVYKFFDFPEHDTSIIPGSNTPLFNDHKIYPLPMTLDDKYLKSSST
 KALENASHGAEKAPLD .INELDVHIIIRCTGVKANNEAVQPSPYAVYKFFDFADHDTKIIPSSNMPEFNDVKTFFVPMTELDQYLRAAV
 DQLENPTNQSLRD . . SSINELLITIKQCQQLIPKNKDVQPSYCVYKFFDFADHDTDIVSHSNPQFHDRIFFVPMTELDNYLKNSS
KVQSNESRSETWAPQNELRVEITRCCGLRSRRLGRQPSPYVMYRFFTFPDHDTIIPASSNPYFKDQALFPVLVTSDLDOYLAREA

900

LSFYVFDSDTQENIYMGKVVNPLISLAHDKCISGIFELMDK .EKHAAGTIQVILKWKFTYLPPS
 LSFYVFDSDTQENIYIGKVVNPLISLAHDCISGIFELTDH .QKHPAGTIHVILKWKFAYLPPS
 LVVVVFDLDDVENQLYLKARVPLVSLAHDKTTITGLFELTDP .AGLPSGQINVTLKWSFTYLPPS
 LELYVFDLDDPEETAYLGRANVPLISLAHDKAIKGVFELKRT .DNSVNGTVEVHLRWQYAYLPP
 LDFYVFDLDDPEDTAYLGVAKVPLISLVNKNPKMGTFFEL .RN .NEGANGTIDVMIRWQYTYMAPK
 LNVYIFDDTDADDSSYLGLVKVPLIPLAHDKPKVKSFELLHK .DGSSNGTIDLKQWFAYMPPK
 LKIFVFDLDDPEDETSYIGEVDIPLLSLANGKNIEGPFDLKNA .DGTNSGIELDLHWQYSYLPK
 LEVYVFDLDDPDVAAYLGVANVPLITLANDKPIKGTFFLHKA .SGSENGTVDVFLRWRYTYLPAS
 LEVYVFDLDDDLTSLYIGLASIPLITLTDQKPLKGFELTSGVDGSLTGIIEVSLSWQYTYLPAS
 LSVYVFDLDDPEPGSYLGRAQVPLPLAQNKSIKGFNLTDS .GEKSNKSIKVLQDWKSHYLAPE

Abb.A1: Multiples-Sequenzalignment von Ftm-Proteinen

Die folgenden Sequenzen wurden aligned: Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Lanzettfisch (*Branchiostoma floridae*), Seeigel (*Srongylocentrotus purpuratus*), Capitella (*Capitella spec.*), Lottia (*Lottia gigantea*), Seeanemone (*Nematostella vectensis*), Hydra (*Hydra magnipapillata*) und das Ftm-verwandte Protein RPGRIP (Maus). Sequenzidentitäten sind grau unterlegt. Die Sequenzen des menschlichen Ftm-Proteins und der murinen Ftm- und RPGRIP-Proteine wurde der öffentlichen NCBI-Datenbank entnommen. Die Sequenzen der anderen Ftm-Homologe wurden aus sogenannten DNA-Contigs (inklusive partieller EST-Sequenzen) generiert.

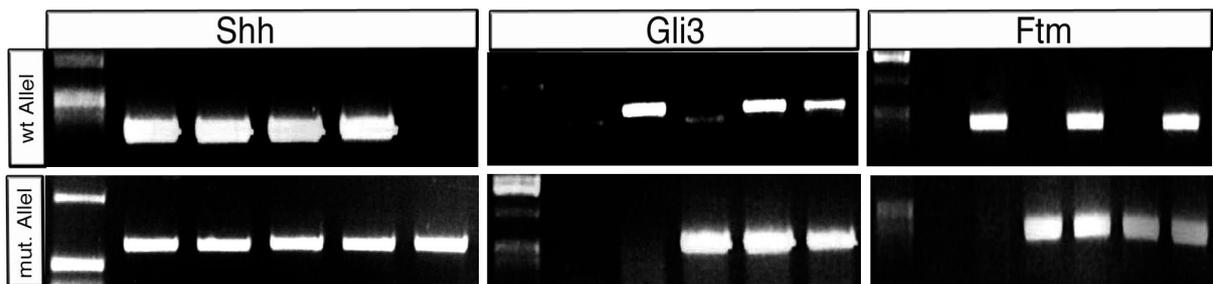


Abb.A2: Genotypisierung

Abgebildet sind exemplarische PCR-Nachweise der *Shh*-, *Gli3*-, und *Ftm*-Allele (wildtypisch und mutiert). Die verwendeten Primer sind in 2.3 aufgeführt. Zwischen den folgende Fragmentgrößen konnte unterschieden werden: Links *Shh*: wildtypisches Allel 300bp (oben), mutiertes Allel 600bp (unten); Mitte *Gli3*: wildtypisches Allel 300bp (oben), mutiertes Allel 580bp (unten); Rechts *Ftm*: wildtypisches Allel 450bp (oben), mutiertes Allel 350bp (unten).

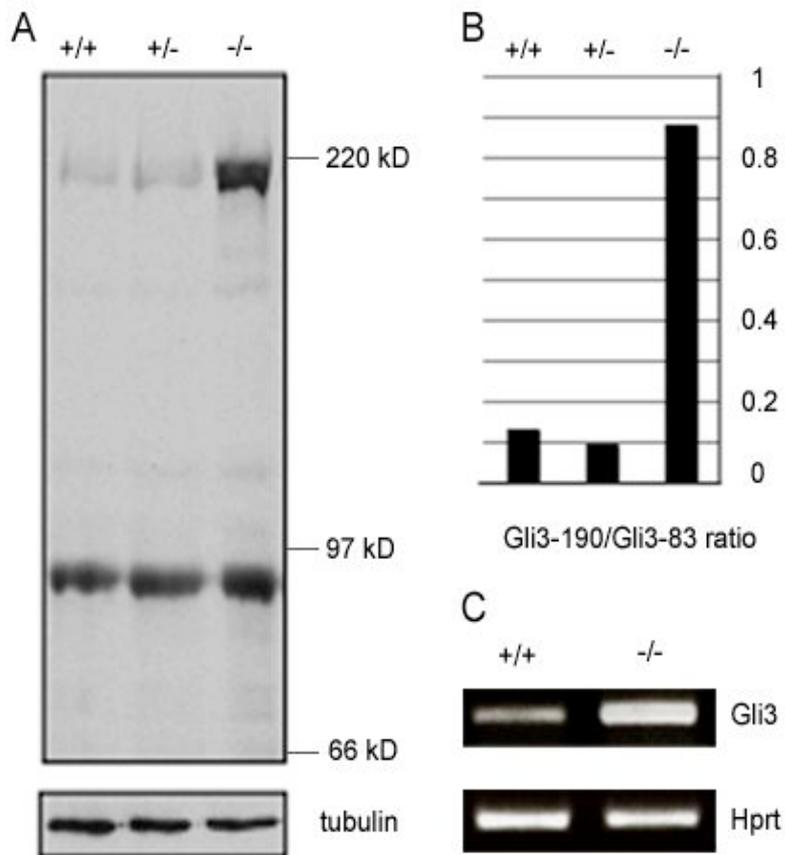


Abb.A3: Die Effekte des *Ftm*-Verlustes auf Gli3

A: In wildtypischen und *Ftm*^{+/-}-Embryonen wird Gli3-190 fast vollständig zu Gli3-83 prozessiert. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen sind äquivalente Mengen von Gli3-190 und Gli3-83 nachzuweisen.

B: Wildtypische und *Ftm*^{+/-}-Embryonen zeigen ein Gli3-190 zu Gli3-83 Verhältnis von 0.1 bis 0.2. In *Ftm*^{-/-}-Embryonen beträgt das Verhältnis annähernd 0.9.

C: Die RT-PCR Analyse der Gli3-Expression zeigt zum Zeitpunkt E11.5 eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge in *Ftm*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Die Normalisierung erfolgte mit Hprt-PCR.

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 11.12.2006

(Jeanette Vierkotten)