

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Spemann/Mangold Organisatorgene

Doris Bengel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. Univ.-Prof. Dr. M. Götz

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

3. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 02.03.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.09.2009 angenommen.

IT IS NOT BIRTH, MARRIAGE OR DEATH,
BUT GASTRULATION, WHICH IS TRULY THE
MOST IMPORTANT TIME IN YOUR LIFE.

LEWIS WOLPERT, 1986

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Frühe Embryonalentwicklung der Maus.....	2
2.2	Gastrulation.....	3
2.3	Organisatorregion der Maus	5
2.4	<i>Foxa2</i> - ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Musterbildung des Mausembryos.....	7
2.5	Die Links-Rechts-Achsenbildung des Mausembryos.....	8
2.6	Herzentwicklung der Maus.....	10
2.7	Entwicklung der Extremitäten	12
2.8	Zilien.....	14
2.9	Zentrosomen	15
2.10	Basalkörper	17
2.11	Aufbau eines primären Ziliums	19
2.12	Intraflagellarer Transport.....	21
2.13	Ciliopathien.....	22
2.14	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Identifizierung neuer Entoderm und Spemann/Mangold Organisator Gene	25
3.1.1	Vergleich des Genexpressionsprofil in <i>Wildtyp</i> und <i>Foxa2</i> ^{-/-} Gastrulationsembryonen	25
3.1.2	Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierungsscreen (WISH)	29
3.1.3	Gene mit spezifischem Expressionsmuster.....	30
3.1.4	Gene mit entodermalen Expressionsmuster.....	33
3.1.5	Gene mit einer Expressionsdomäne im Primitivknoten	35
3.1.6	Analyse neuer definitiver entodermaler Marker	38
3.2	Die molekulare und funktionelle Analyse von <i>Pitchfork</i> , einem neuen Organisatorgen.....	40
3.2.1	Bioinformatische Analyse.....	40
3.2.2	Generierung zweier affinitätsaufgereinigter Antikörper gegen <i>Pitchfork</i>	42
3.2.3	Analyse der zwei unterschiedlichen <i>Pitchfork</i> Isoformen	43

3.2.4	Die coiled-coil Domäne von Pitchfork ist für die Kernlokalisation verantwortlich.	44
3.2.5	Pitchfork hat eine reprimierende Funktion im Nukleus.....	46
3.2.6	Analyse der subzellulären Lokalisation von Pitchfork.....	48
3.2.7	Generierung des Pitchfork ^{lacZ/+} Allels.....	50
3.2.8	Haploinsuffizienz von <i>Pitchfork</i> führt zur männlichen Infertilität.....	51
3.2.9	Analyse des Pitchfork- lacZ-Reporterallels.....	52
3.2.10	<i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} Embryonen entwickeln postaxiale Polydaktylie.....	54
3.2.11	<i>Pitchfork</i> reguliert während der Embryonalentwicklung die Links-Rechts-Asymmetrie im Herzen.....	58
3.2.12	<i>Pitchfork</i> reguliert die Anzahl der primären Zilien und damit die Links-Rechts-Asymmetrie im Primitivknoten.....	62
3.2.13	<i>Pitchfork</i> reguliert die Mikrotubuliarchitektur in den primären Zilien des Primitivknotens.....	65
3.2.14	Überexpression von <i>Pitchfork</i> führt zu Apoptose, zerstört das Mikrotubuligerüst und führt zu mitotischen Defekten <i>in vitro</i>	66
3.2.15	Endogenes Pitchfork akkumuliert während der Ziliogenese.....	69
3.2.16	Endogenes Pitchfork lokalisiert nur während der Zentrosomen zu Basalkörper-Konvertierung in der Ziliogenese.....	72
3.2.17	Pitchfork Vesikel transportieren <i>Shh</i> -Moleküle zur Plasmamembran.....	75
3.2.18	Pitchfork ist in den mikrotubuli-abhängigen Transport zur Plasmamembran involviert.....	77
3.2.19	Pitchfork reguliert den Abbau des primären Ziliums.....	79
3.2.20	Pitchfork ist in ES-Zellen exprimiert und reguliert den Abbau des primären Ziliums.....	81
3.2.21	Pitchfork reguliert den Abbau des Basalkörpers vom Zilium.....	82
3.2.22	Identifizierung von neuen Pitchfork Protein-Protein Interaktionspartnern.....	83
4	Diskussion.....	85
4.1	Identifizierung neuer Spemann/Mangold-Organisatorgene.....	85
4.2	Das Expressionsmuster innerhalb des sich entwickelnden Darms wird regional dynamisch reguliert.....	86
4.3	Reguliert <i>Foxa2</i> ein Netzwerk durch die Aktivierung von Genen in der Organisatorregion und den daraus entstehenden Derivaten?.....	87
4.4	Die Funktion von Pitchfork während der Ziliogenese.....	88

4.5	Die Funktion von Pitchfork beim Aufbau und Abbau des Ziliums.....	90
4.6	Regulieren Pitchfork und Odf2 durch wechselseitige Interaktion die Umwandlung des Zentrosoms zum Basalkörper?	92
4.7	Wie beeinflusst Pitchfork den intraflagellaren Transport?.....	93
4.8	Reguliert Pitchfork durch den Auf- und Abbau des Ziliums entwicklungsbiologische Prozesse?.....	94
4.9	Ist Pitchfork ein direktes Zielgen von Sonic Hedgehog?	95
4.10	Wie beeinflusst Pitchfork den Shh-Signalweg?.....	96
4.11	Die Rolle von Pitchfork in Ciliopathien.....	98
5	Material und Methoden.....	99
5.1	Material	99
5.1.1	Ausstattung	99
5.1.2	Verbrauchsmaterial	101
5.1.3	Reaktionssysteme (Kits)	102
5.1.4	Chemikalien	102
5.1.5	Puffer und Lösungen.....	104
5.1.6	Immunhistochemische Färbung	108
5.1.7	Enzyme und Reaktionssysteme	108
5.1.8	Antikörper und Seren.....	109
5.1.9	Vektoren und BACs.....	109
5.1.10	Oligonukleotide	110
5.1.11	Southern-Proben	111
5.1.12	Molekulargewicht-Marker	111
5.1.13	Bakterien und Kulturmedien.....	112
5.1.14	Zelllinien, Kulturmedien und Zellkulturlösungen	112
5.1.15	Mauslinien	114
5.2	Methoden	114
5.2.1	Zellkultur	114
5.2.1.1	ES-Zellkultur	114
5.2.1.1.1	Behandlung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) mit MitomycinC (MMC).....	114
5.2.1.1.2	Auftauen von ES-Zellen	115
5.2.1.1.3	Passagieren von ES-Zellen	115

5.2.1.1.4	Einfrieren von ES-Zellen.....	115
5.2.1.1.5	Homologe Rekombination von ES-Zellen	116
5.2.1.1.6	Transformation von ES-Zellen durch Elektroporation.....	116
5.2.1.1.7	Picken von ES-Zellklonen.....	117
5.2.1.1.8	Einfrieren von ES-Zellklonen auf 96-Lochplatte	117
5.2.1.1.9	Generieren von Pitchfork+/- Zellen.....	118
5.2.1.2	Herstellen von primären Fibroblasten aus Vorderextremitäten (PLC)	118
5.2.1.3	Ausbilden von Zilien in Fibroblasten und mitotische Synchronisation der Zellen	118
5.2.1.4	Transfektion von HEK293T und NIH3T3 Zellen.....	119
5.2.1.5	Klonierung des Pitchfork-knock-in-Konstruktes	119
5.2.2	Molekularbiologie.....	120
5.2.2.1	Plasmid- und BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Präparation	120
5.2.2.1.1	Plasmidpräparationen mit Hilfe der QIAGEN Plasmid Kits.....	120
5.2.2.1.2	BAC-Minipräparation nach Copeland.....	120
5.2.2.2	Genomische DNA-Isolierung im 96-Lochplatten-Format	121
5.2.2.3	RNA-Präparation.....	121
5.2.2.4	Auftrennung von DNA/RNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese.....	121
5.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	122
5.2.2.6	Herstellen von cDNA mittels reverser Transkription	122
5.2.2.7	Ligation	123
5.2.2.8	Transformation von Bakterien	123
5.2.2.8.1	Elektroporation	123
5.2.2.8.2	Chemische Transformation	124
5.2.2.9	Homologe Rekombination in Bakterien.....	124
5.2.2.10	Sequenzierung	124
5.2.2.11	Restriktionsverdau genomischer DNA für die Analyse mittels Southern-Blot.....	126
5.2.2.12	Southern Blot.....	126
5.2.2.12.1	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.....	126
5.2.2.12.2	Blotten	127
5.2.2.12.3	Hybridisierung	127
5.2.2.13	<i>In vitro</i> -Transkription von markierten RNA-Proben	129
5.2.2.13.1	Linearisierung der Plasmide	129
5.2.2.13.2	Amplifikation mittels PCR.....	130

5.2.3	Biochemische Methoden.....	131
5.2.3.1	Extraktion von Proteinen.....	131
5.2.3.1.1	Proteinextraktion aus Zelllysat	131
5.2.3.1.2	Zellkompartiment-Proteinextraktion mittels CellLytic™NuClear™ Extraction-Kit (Sigma, NXTRACT)	131
5.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonic acid (BCA)-Test	132
5.2.3.3	StrepII-tag-Affinitätsaufreinigung	132
5.2.3.4	Western-Blot	133
5.2.3.5	Luciferase-Reporter-Assay.....	135
5.2.4	Embryologie.....	136
5.2.4.1	Herstellung tetraploider Embryonen	136
5.2.4.2	Herstellung von ES-Zell-generierten-Embryonen mittels tetraploider Aggregation.....	136
5.2.4.3	Isolierung von Embryonen und Organen	137
5.2.4.4	X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)-Färbung.....	137
5.2.4.5	Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	137
5.2.4.6	Immunofärbungen	139
5.2.4.6.1	Whole-mount-Immunofärbungen.....	139
5.2.4.6.2	Zellkultur-Immunofärbungen	139
5.2.4.6.3	Immunofärbungen auf Kryoschnitten.....	140
5.2.5	Histologie.....	140
5.2.5.1	Paraffinschnitte.....	140
5.2.5.2	Kryoschnitte	141
5.2.6	Mikroskopie	141
5.2.6.1	Bildanalyse am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop	141
5.2.6.2	Bildanalyse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Olympus FV1000 ..	141
5.2.6.3	Bildanalyse am Zeiss Lumar V12 Stereomikroskop.....	142
6	Literaturverzeichnis.....	143
7	Anhang	150
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	150
7.2	Tabellen	151
7.2.1	Übersicht der analysierten Gene mittels whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	151
7.2.2	Proteininteraktom von Pitchfork.....	155

7.3	Abbildungsverzeichnis.....	157
8	Publikationen.....	160
9	Curriculum vitae	161
10	Danksagung	162

1 Zusammenfassung

Die Organisatorregion des Embryos ist eine hoch spezialisierte und transiente Struktur, die in allen Vertebraten zu finden ist und den grundlegenden Körperbauplan des Embryos festlegt. Seit der Entdeckung im Jahre 1924 durch Hans Spemann und Hilde Mangold war es das Ziel vieler Studien, die molekulare Natur des Organisators zu beschreiben. *Foxa2* ist ein wichtiges Organisationsorgan. Um die Biologie und die Funktion des Organisators besser zu verstehen, war es das Ziel dieser Arbeit neue *Foxa2* Zielgene und Organisationsorgane zu identifizieren. Dazu wurde das Genexpressionsprofil von *Wildtyp* und *Foxa2* $-/-$ Embryonen miteinander verglichen und eine große Anzahl an signifikant herunterregulierten Genen identifiziert. Das Expressionsmuster von 314 unbekannt Genen wurde in einem *in situ* Hybridisierungsscreen analysiert. Davon zeigten 10 Gene (3,1%) ein Expressionsmuster in der Organisatorregion des Embryos. Bisher waren nur 49 Gene bekannt, die in dieser hoch spezialisierten Region exprimiert sind. Wir konnten diese Liste um 20% erweitern und spekulieren nun, wie diese Gene ein *Foxa2*-abhängiges molekulares Programm des Spemann/Mangold Organisators regulieren. Wir analysierten eines dieser unbekannt Genen *1700027A23rik* (*Pitchfork*) molekular und funktionell. *Pitchfork* ist unter den Chordaten hoch konserviert und nur in Regionen exprimiert, die für die Musterbildung des Embryos wichtig sind, wie in den monoziliären Zellen des Primitivknotens, in der Bodenplatte des Neuralrohres und in der apikalen Ektodermalzone der sich formenden Extremitäten. Haploinsuffizienz von *Pitchfork* führt zu duplizierten und gespaltenen Zilien im Primitivknoten, zu Infertilität, postaxialer Polydaktylie und zu Defekten in der Links-Rechts-Asymmetrie, die einen embryonal letalen Herzdefekt verursachen. *Pitchfork* akkumuliert in Vesikeln, während des Auf- und Abbaus von Zilien und ist während der ersten Schritte der Ziliogenese mit Zentrosomen und Basalkörpern assoziiert. Primär ziliäre *Pitchfork*^{lacZ/+} Zellen können beim Wiedereintritt in den Zellzyklus das Zilium nicht abbauen, was zu einer Überreplikation von Zentriolen und zu multiziliären Zellen führt. *Pitchfork* interagiert physisch mit β -Tubulin, mikrotubulären Motorproteinen, zentrosomalen und Basalkörper-Proteinen, was eine Funktion im mikrotubuliabhängigen Transport impliziert. Durch die funktionelle und molekulare Analyse dieses neuen Gens konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der mikrotubuliabhängige vesikuläre Transport für die Umwandlung der Basalkörper zu Zentrosomen in primären Zellen eine Rolle spielt. *Pitchfork* interagiert ebenso mit Proteinen, die in menschliche Ciliopathien involviert sind, was eine Beteiligung an der Entstehung von Krankheiten impliziert. Durch die Analyse von *Pitchfork* ergibt sich nun die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen menschlichen Ciliopathien und den molekularen Ursachen besser verstehen zu können.

2 Einleitung

2.1 Frühe Embryonalentwicklung der Maus

Die Maus ist in der Grundlagenforschung ein beliebter Modellorganismus und eignet sich vor allem deswegen, da der Lebenszyklus von der Befruchtung bis zum geschlechtsreifen Tier bei nur neun Wochen liegt. Diese für Säugetiere sehr kurze Zeitspanne macht das Mausmodell interessant, um die menschliche Entwicklung und menschliche Krankheitsbilder genauer verstehen zu können. Die Entwicklung der Maus beginnt mit der Befruchtung der Eizelle. Nach der Befruchtung wandert diese im Eileiter (Ovidukt) entlang und anschließend wird auch die Meiose abgeschlossen, das zygotische Genom aktiviert und die maternale RNA abgebaut. Das Ei, das nun als Zygote bezeichnet wird, wird von einer äußeren Schutzhülle umgeben, der *Zona pellucida*, die aus Mucopolysacchariden und Glycoproteinen besteht. Die Zygote teilt sich bis zum 8-16 Zellstadium und führt zu einer Bildung einer kompakten Zellkugel, der Morula. Dreieinhalb Tage nach der Befruchtung wird der Embryo Blastozyste genannt. Diese besteht aus zwei unterschiedlichen Zellpopulationen. Die inneren Zellen der Blastozyste bilden die innere Zellmasse (ICM), aus der der spätere eigentliche Embryo entsteht und aus der auch embryonale Stammzellen gewonnen werden können (Martin, 1981). Die zweite Zellpopulation bildet das Trophektoderm, das extraembryonale Strukturen wie z.B. die Plazenta ausbildet. Die ICM der Blastozyste beginnt sich am Tag E3,5-4,5 (E = embryonaler Tag) zu teilen. Aus der Schicht an der Oberfläche, die mit der flüssigkeitsgefüllten Höhle der Blastozyste in Kontakt steht, entwickelt sich das primitive Entoderm, das an der Bildung der extraembryonalen Strukturen beteiligt ist (Fig. 1A). Die übrige innere Zellmasse entwickelt sich zu dem Epiblasten, der den späteren Embryo ausbildet. Am Tag E3,5-4,5 löst sich nun die Blastozyste von der *Zona pellucida* und nistet sich in die Gebärmutter ein. Die Postimplantationsphase beginnt am Tag E5,5 (Fig. 1B). Zu diesem Zeitpunkt umhüllt das viszerale Entoderm, welches später extraembryonales Gewebe wie z.B. den Dottersack ausbildet, den Epiblasten und das extraembryonale Ektoderm. Signale im extraembryonalen Ektoderm initiieren nun die Ausbildung der antero-posterioren Achse im Epiblasten. Dadurch wird Nodal im proximalen Epiblasten induziert und durch eine autoregulatorische Aktivierung an die distale Spitze des Epiblasten weitergeleitet. Dort werden durch Nodal distale viszerale entodermale (DVE) Markergene aktiviert, wie z.B. *Hex*, *Cer1*, *Lefty*. Nun werden die ersten morphologischen Veränderungen sichtbar, wenn das DVE in anteriore Richtung wandert (Beddington und Robertson, 1999). Das DVE bildet eine

Verdickung am distalen Ende des Embryos, welches nun, wenn es den anterioren Teil des Embryos erreicht hat, anteriores viszerale Entoderm (AVE) genannt wird (Srinivas et al., 2004) (Fig. 1C). Im AVE werden sekretierte Moleküle, wie die zwei Nodal-Antagonisten *Cer1* und *Lefty* exprimiert. *Cer1* inhibiert aber nicht nur Nodal, sondern auch BMP-Signale (Belo et al., 1997, Piccolo et al., 1999). Durch die inhibierenden Signale im AVE wird verhindert, dass der Primitivstreifen sich anterior ausbilden kann. Im Gegenzug sind Signale wie Nodal und *Wnt3* im posterioren Epiblasten exprimiert und induzieren am Tag E6,5 die Bildung des Primitivstreifens auf der posterioren Seite des Embryos (Beddington und Robertson, 1999; Perea-Gomez et al., 1999, Perea-Gomez et al., 2002).

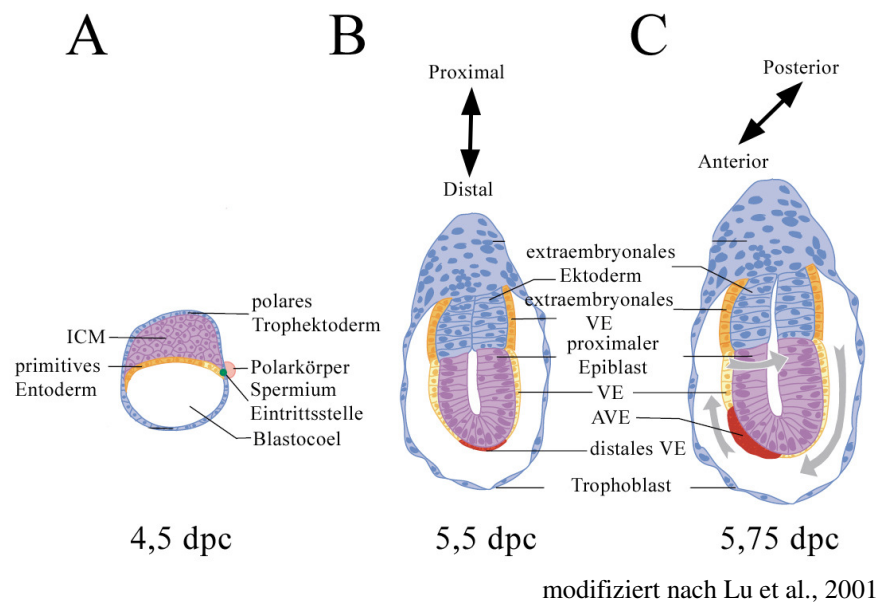


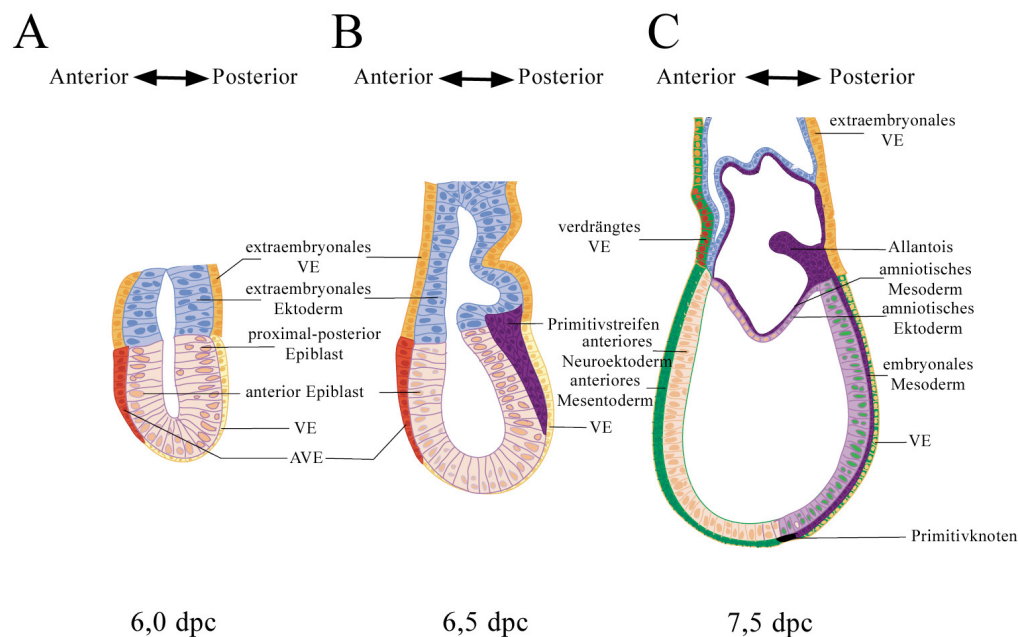
Fig. 1: Frühe Embryonalentwicklung der Maus

Am Tag E4,5 hat sich die Blastozyste von der *Zona pellucida* losgelöst. Das polare Trophektoderm interagiert mit dem maternalen Uterus und der Embryo nistet sich in der Gebärmutter ein (E5,5). Das distale viszerale Entoderm (rot gekennzeichnet) wird nun als Verdickung am distalen Ende des Epiblasten sichtbar. Am Tag E5,75 beginnt das distale VE sich in Richtung der zukünftigen anterioren Seite des Embryos zu bewegen und wird nun als anteriores viszerales Entoderm bezeichnet. AVE=anteriores viszerales Entoderm, ICM=innere Zellmasse, VE=viszerales Entoderm

2.2 Gastrulation

Mit der Gastrulation beginnt der wohl einschneidendste Schritt der frühen Mausentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt werden die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm gebildet (Übersichtsartikel von Beddington und Robertson, 1999). Am Tag E6,0 besitzt der

Embryo lediglich einen embryonalen und einen extraembryonalen Teil, der von viszeralem Entoderm umgeben ist (Fig. 2A). Die Gastrulation wird nun um den Tag E6,5 damit eingeleitet, dass epitheliale Zellen aus dem Epiblasten eine epithelial-mesenchymale Transition am posterioren Ende des Embryos durchwandern und in die meist posterior gelegene Region einwandern. Durch diese morphologische Differenzierung entsteht eine transiente Struktur, die als Primitivstreifen (PS) bezeichnet wird und die anatomische posteriore Achse des Embryos festlegt. Diese Struktur ist der erste mikroskopische und morphologische Hinweis auf eine Achsenbildung im Embryo (Fig. 2B). Zellen wandern nun in den PS ein und werden entweder in mesodermales oder in entodermales Gewebe integriert. Studien zur anatomischen Kartierung, sog. „fate-maps“ konnten zeigen, dass Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den PS einwandern auch zu unterschiedlichen Zellpopulationen beitragen. So konnte gezeigt werden, dass Zellen, die zu Beginn der Gastrulation in den PS einwandern (Tag E6,5-7,0) einen Großteil der entodermalen und mesodermalen Zellen des Kopfes und des Herzens bilden. Dagegen wandern ab dem Tag E7,5 dann hauptsächlich Zellen aus dem PS in entodermale und mesodermale Zellen in den Hinterdarm ein. Am Tag E7,5 wird der Embryo nicht mehr vom viszeralem Entoderm umhüllt und der PS erstreckt sich nun über die gesamte posteriore Seite des Mausembryos (Fig. 2C). Am distalen Ende des Embryos ist der Primitivknoten jetzt als charakteristische Struktur zu erkennen. Diese Region wird als Organisatorregion bezeichnet und ist für die weitere Musterbildung des Embryos verantwortlich.



modifiziert nach Lu et al., 2001

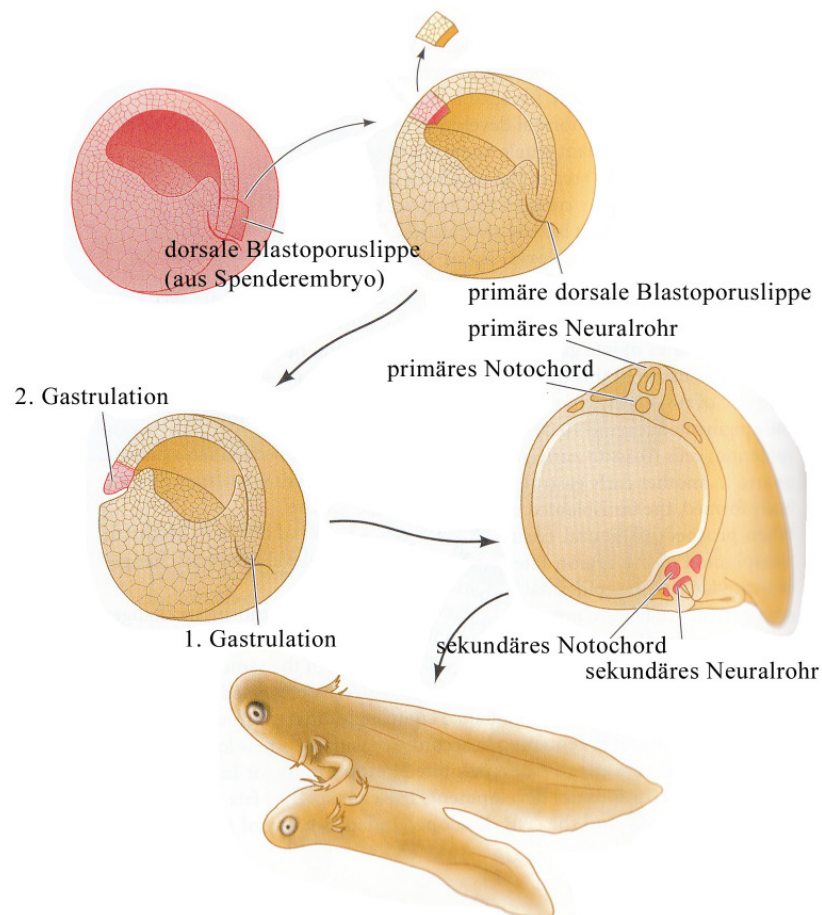
Fig. 2: Gastrulation in der Maus

Am Tag E6,0 ist durch das AVE die antero-posteriore Seite des Embryos bereits festgelegt. Am Tag E6,5 beginnt der Primitivstreifen an der posterioren Seite des Embryos sich in distaler Richtung zu verlängern. Zellen aus dem Epiblasten durchwandern eine epithelial-mesenchymale Transition und werden entweder zu definitivem Entoderm, welches das viszerale Entoderm verdrängt, oder werden zu mesodermalen Zellen, die eine dritte Zellschicht zwischen Epiblastzellen und definitivem Entoderm ausbildet. Am Tag E7,5 hat das definitive Entoderm das viszerale Entoderm, welches den Embryo umschließt, nahezu verdrängt. Der Primitivknoten wird als Struktur am distalen Ende des Embryos sichtbar. AVE=anteriores viszerales Entoderm, VE=viszerales Entoderm, DE=definitives Entoderm

2.3 Organisatorregion der Maus

Die Organisatorregion eines Embryos ist eine hoch spezialisierte und transiente Struktur, die in allen Vertebraten zu finden ist. Diese Struktur wurde ursprünglich im Jahre 1924 von Hans Spemann und Hilde Mangold durch Transplantationsexperimente entdeckt, die damit die Entwicklungsbiologie grundlegend reformiert haben (Spemann und Mangold, 1924). In diesen Experimenten transplantierten sie die dorsale Urmundlippe eines dunkel pigmentierten Wassermolches (*Triturus taeniatus*) in ventrale Regionen eines nicht pigmentierten Wassermolches (*Triturus cristatus*) (Fig. 3). Das transplantierte Gewebe induzierte die Gastrulation und eine vollständige zweite Dorsalseite mit einer klar differenzierten antero-

posterioren und dorso-ventralen Achse. Aufgrund dieser induzierten zusätzlichen Achse wurde die dorsale Urmundlippe als Organisatorregion bezeichnet.



modifiziert nach Gilbert, siebte Auflage, 2003

Fig. 3: Transplantationsexperimente von Hans Spemann/Hilde Mangold

1924 transplantierten Hans Spemann und Hilde Mangold die dorsale Blastoporuslippe eines dunkel pigmentierten Wassermolches in ventrale Regionen eines nicht pigmentierten Wassermolches. Der transplantierte Embryo durchwanderte sowohl an der dorsalen als auch ventralen Seite die Gastrulation, bildete ein primäres und sekundäres Neuralrohr und Notochord und entwickelte sich zu einem siamesischen Zwilling mit einer klar differenzierten antero-posterioren und dorso-ventralen Achse entwickeln.

In anderen Modellorganismen konnten äquivalente Strukturen detektiert werden, so wird z.B. im Zebrafisch diese Region „shield“ (Shih und Fraser, 1996) genannt und im Hühnchen als „Hensensche“ Knoten (Waddington, 1993) bezeichnet und befindet sich am vorderen Ende des Primitivstreifens, wie auch der Primitivknoten in der Maus (Beddington, 1994). Dass diese Organisatorregion innerhalb der Vertebraten so hoch konserviert ist zeigt, dass diese Region essentiell für die Musterbildung im Embryo während der Gastrulation ist. Kinder et al. 2001 konnten zeigen, dass der Maus Organisator aus einer dynamischen Zellpopulation

besteht, die je nach Stadium der Gastrulation zu unterschiedlichen Zelltypen des Embryos beiträgt. So bildet der Organisator während der frühen Gastrulation einen Teil des am meist anterior liegenden definitiven Entoderms und der Prächordalplatte (PCP) am Tag E6,5 aus und wird schließlich zum Organisator während der mittleren Gastrulation und trägt zum Notochord, dem ADE und axialem Mesoderm bei, wenn der PS Richtung distaler Spitze des Mausembryos wandert. Schließlich wird der Organisator während der späten Gastrulation als Primitivknoten am Tag E7,5 sichtbar und trägt zur Bildung des Notochords und der Bodenplatte in dem am meisten posterior gelegenen Teil des Embryos teil (Kinder et al., 2001). Obwohl die Organisatorregion nun schon vor 80 Jahren entdeckt und seit etwa 20 Jahren molekular untersucht wurde, sind bisher nur wenige Gene bekannt, die in dieser hoch spezialisierten Region exprimiert sind und für die Musterbildung des Mausembryos eine essentielle Funktion haben.

2.4 *Foxa2* - ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Musterbildung des Mausembryos

Ein für die Gastrulation wichtiges und organisatorspezifisches Gen ist *Foxa2* (*forkhead box transcription factor a2*, früher bekannt als *HNF3 β* (*hepatocyte nuclear factor 3 beta*). *Foxa2*, ebenso wie die zwei anderen Familienmitglieder *Foxa1* und *Foxa3*, gehören zur Familie der Fox-Transkriptions-Faktoren, die sich durch eine konservierte forkhead box DNA Bindungsdomäne auszeichnet. Mitglieder der Familie gehören alle zur Klasse der Helix-Turn-Helix Proteine. Die Expression von *Foxa2* beginnt im Mausembryo am Tag E6,5 im Organisator und dem anterioren viszeralem Entoderm (Sasaki et al., 1993, Ang et al., 1993, Monaghan et al., 1993). Wenn die Gastrulation voranschreitet ist *Foxa2* in den Zellpopulationen des späteren Organisators und dem Primitivknoten und den aus dem Organisator gebildeten Derivaten, dem anterioren Mesoderm, Notochord, DE und FP exprimiert. Das *Foxa2* für die Zellpopulationen absolut essentiell sind, zeigt, dass in den *Foxa2*^{-/-} Embryonen diese Strukturen nicht gebildet werden und diese Embryonen aufgrund von Achsendefekten zwischen Tag E7,5 und E9,5 sterben (Ang et al., 1994, Weinstein et al., 1994). Zusätzlich hat *Foxa2* noch die Funktion im VE den Primitivstreifen in distale Richtung zu verlängern, eine Funktion, die in den *Foxa2*^{-/-} mutanten Embryonen durch die Technik der tetraploiden Aggregation wieder hergestellt werden kann, indem das mutante VE durch *Wildtyp* (WT) VE ersetzt wird (Dufort et al., 1998). Hierbei werden *Foxa2*^{-/-} ES-Zellen mit tetraploiden *Wildtyp*-Embryonen aggregiert und in pseudoschwangere Weibchen transferiert.

Bei diesen Experimenten tragen die ES-Zellen zu dem Epiblasten bei, die tetraploiden Zellen dagegen nur zu extraembryonalen Gewebe, wie z.B. der Plazenta, aber auch zum viszeralem Entoderm (Nagy et al., 1990; Kaufman et al., 1990). Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle dieses Transkriptionsfaktors in Vertebraten ist, dass es *Foxa2* organisatorspezifische Homologe sowohl im Zebrafisch (*foxa2/axial* Strahle et al., 1993, *monorail* Mutante Norton et al., 2005) als auch im *Xenopus* (*pintallavis* Ruiz et al., 1992) und im Hühnchen (Ruiz et al., 1995) gibt. Umso erstaunlicher ist es, dass trotz dieser wichtigen Funktion von *Foxa2* nur zwei direkte Zielgene im frühen Embryo bekannt sind, nämlich *Shh* (Epstein et al., 1999, Jeong et al., 2003) und *Otx2* (Kimura-Yoshida et al., 2007).

2.5 Die Links-Rechts-Achsenbildung des Mausembryos

Die Links-Rechts-Achse wird als letzte der drei Körperachsen determiniert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Achse erst ausgebildet werden kann, wenn die antero-posteriore und dorso-ventrale Achse bereits ausgebildet ist (Okada et al. 2005). Die Links-Rechts-Asymmetrie des Embryos wird am Tag E7,75 im Primitivknoten festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt besteht der Primitivknoten aus zwei spezialisierten Zelltypen. Zum Einen aus den monoziliären „Pit“-Zellen und zum Anderen aus den „Crown“-Zellen, die die „Pit“-Zellen hufeisenförmig umschließen (Fig. 4A). Die „Pit“-Zellen der Organisatorregion zeichnen sich durch ein spezialisiertes Zilium mit einer „9+0“-Mikrotubulstruktur aus (Fig. 4B). Diese Zilien sind motil und rotieren alle im Uhrzeigersinn mit einer Geschwindigkeit von 600 Umdrehungen/min (Nonaka et al., 1998). Dadurch entsteht eine Bewegung, die der „nodal flow“ genannt wird (Nonaka et al., 1998; Hirokawa et al. 2006). Dieser „nodal flow“ spielt aber nur für eine kurze Zeit in der Entwicklung eine große Rolle. Diese Bewegung startet im ein- bis zwei Somitenstadium und endet im 6-Somitenstadium. Tanaka et al., 2005 konnten zeigen, dass Vesikel, die mit wichtigen Signalmolekülen, wie z.B. *Shh* und Retinolsäure gefüllt sind, an die Plasmamembran an die Basis des Ziliums transportiert werden. Die Vesikel werden entlang der Zilien transportiert und durch die gerichtete Bewegung der Zilien in eine Richtung auf die linke Seite des Primitivknotens geschleudert. Als Folge davon wird ein Morphogen, wahrscheinlich Nodal, von rechts nach links transportiert und initiiert damit die Links-Rechts-Achsendeterminierung. Das Signal wird in das linke laterale Plattenmesoderm transportiert, was anhand der asymmetrischen Genexpression von Genen, wie z.B. *Cerberus2* sichtbar wird (Fig. 4C). Durch die Induktion des einseitigen Signals wird im Embryo die Symmetrie gebrochen, wodurch z.B. die

rechtsseitige Drehung des Herzens, die viszerale Organogenese oder die unterschiedlichen Gehirnhälften entstehen können.

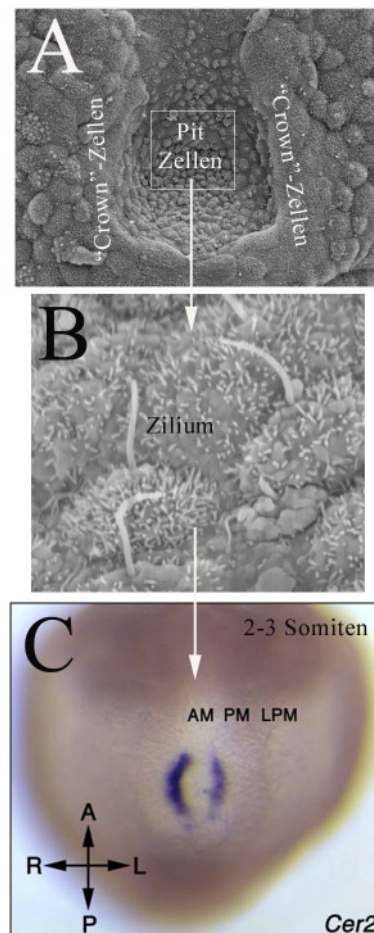


Fig. 4: Primäre Zilien im Primitivknoten legen Links-Rechts-Achse des Embryos fest

Im Primitivknoten der Maus besitzt jede Zelle ein primäres Zilium. Diese Zilien sind motil und erzeugen durch ihre Bewegung einen Fluß, den sog. „nodal flow“, der Morphogene zu einer Seite des Embryos transportiert, wodurch Gene, wie z.B. *Cer2* asymmetrisch exprimiert werden.

Dass der „nodal flow“ essentiell für die Festlegung der Links-Rechts-Achse ist, zeigen verschiedene Mausmutanten, die keine oder nur unbewegliche Zilien in der Organisatorregion besitzen und demzufolge keinen „nodal flow“ aufbauen können. Diese Mutanten haben alle eine abnormale Links-Rechts-Musterbildung (Okada et al 1999) wie z.B. die *iv/iv* (*inversus viscerum*) Mutante, die immotile Zilien besitzt und bei der die Links-Rechts-Achse nicht eindeutig festgelegt ist. Mausmutanten, bei denen die Zilien im Primitivknoten fehlen, weisen dagegen einen Links-Isomerismus auf. Bei diesen Mutanten ist der intraflagellare Proteintransport gestört oder unterbrochen, wie z.B. bei der *polaris* Mutante (IFT88; Yoder et

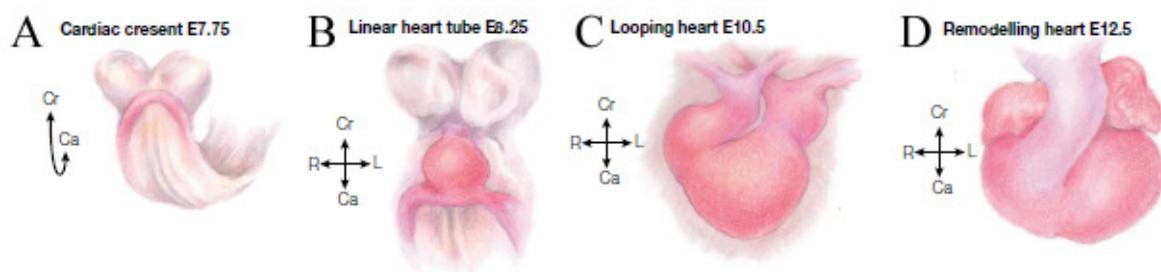
al., 2002), der *wimple* Mutante (Wim, IFT172, Huangfu et al., 2003) und Mutanten der Kif3 Proteine (Huangfu and Anderson, 2005; Nonaka et al., 1998). Durch eine artifizielle Bewegung kann die Richtung des „nodal flows“ geändert werden, was sich in der Umkehrung der Links-Rechts-Achse äußert (Nonaka et al., 1998). Daran kann gezeigt werden, dass der „nodal flow“ an sich direkt für die Links-Rechts-Achse des Embryos verantwortlich ist. Studien im Zebrafisch haben gezeigt, dass ein ähnlicher Mechanismus auch in anderen Vertebraten für die Links-Rechts-Determinierung vorhanden ist. Das Äquivalent im Zebrafisch, der Kupffersche Vesikel (Essner et al 2002, Essner et al. 2005; Kramer-Zucker et al 2005), besitzt ebenso motile Zilien, die eine gerichtete Bewegung in diesen Vesikeln erzeugen. Zebrafischmutanten, bei denen die Zilien in dieser Region nicht funktionsfähig sind zeigen ebenso wie die Mausmutanten Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie dieser Embryonen (Essner et al 2005, Kawakami et al 2005, Kramer-Zucker et al 2005).

2.6 Herzentwicklung der Maus

Die Entwicklung des Herzens ist eine erstaunliche und präzise Aneinanderreihung von molekularen und morphogenetischen Ereignissen. Schon kleine Veränderungen in dem straff durchorganisierten Bauplan des Herzens kann katastrophale Auswirkungen haben, die sich in angeborenen Herzfehlern äußern, von denen viele letale Folgen haben. Angeborene Herzfehler bei Kindern ist die häufigste Diagnose unter allen angeborenen „Fehlbildungen“. Sie kommen bei etwa acht bis zehn Kindern von 1.000 Neugeborenen vor. Bei Frühgeborenen ist der Anteil derer mit einem Herzfehler etwa doppelt so hoch, und auch bei Totgeburten ist die Anzahl der Herzfehler um das 3-7-fache erhöht ist. Obwohl die Entstehung dieser angeborenen Herzfehler nun schon seit Jahrzehnten analysiert wird, ist bis heute nur sehr wenig über die Gene bekannt, die zu diesen Fehlbildungen führen. So ist es essentiell, durch Mutationen in der Maus Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, die in die Entstehung und Entwicklung des Herzens involviert sind.

Die ersten Herzvorläuferzellen können in der Maus im Stadium E7,75 detektiert werden. Diese Zellen bilden ein halbmondförmiges Epithelium an der kranial und kranio-lateralen Grenze des Embryos aus (Fig. 5A). Die Vorläuferpopulation wächst in kranialer und lateraler Richtung, bis zur Grenze der embryonalen und extra-embryonalen Region des Embryos. Im nächsten Schritt wandern nun die Vorläuferzellen Richtung ventral, um ein schlauchförmiges Rohr zu bilden. Dieses Rohr ist mit endothelialen Zellen ausgekleidet und wird mit myokardialem Epithel ummantelt (Fig. 5B). Der Embryo befindet sich nun im Stadium E8,25

und besitzt schon einen Einfluß- und einen Ausflußtrakt, wobei der Einflußtrakt kaudal und der Ausflußtrakt kranial von dem schlauchförmigen Herz liegt. Nun beginnt das Herz sich in einem komplexen Vorgang spiralförmig nach rechts zu drehen. Dabei wird der Einflußtrakt, zusammen mit dem Atrium nach dorsal und kranial gedreht, so dass dieser nun über den sich entwickelnden Ventrikeln liegt (Fig. 5C). Das Herz im Stadium E10,5 besitzt nun zwei sich formende Ventrikel, ein gemeinsames Atrium, einen Einfluß- und Ausflußtrakt und Vorläufer der Mitralklappen. Nun beginnt die Umgestaltung des Herzens. Die beiden Herzkammern werden in einen linken und einen rechten Ventrikel getrennt und ein linkes und rechtes Atrium entsteht. Das Herz ist nun voll ausgebildet und funktionsfähig (Fig. 5D).



modifiziert nach Harvey et al., 2002

Fig. 5: Herzentwicklung in der Maus

Die ersten Herzvorläuferzellen werden im Stadium E7,75 sichtbar (A). Sie wandern zunächst in kranio-lateraler Richtung aus, anschließend in ventrale Richtung, um ein schlauchförmiges Rohr zu bilden (B). Im Stadium E10,5 beginnt sich das Herz spiralförmig nach rechts zu drehen (C). Im Stadium E12,5 ist die Umgestaltung des Herzens vollendet und voll funktionsfähig. Das embryonale Herz besitzt nun zwei Ventrikel und Atrien und einen Einfluß- und Ausflußtrakt (D). Cr=Kranial; Ca=Kaudal

Es konnte gezeigt werden, dass viele angeborene Herzfehler durch defekte Zilien, die in Defekten der Links-Rechts-Asymmetrie resultieren, entstehen (Hamada et al., 2002, Wright et al., 2002). Ein solcher Phänotyp ist der double outlet right ventricle (=DORV). Diese Fehlbildung wird durch eine gestörte Drehung der Ausflußbahn des Herzens gebildet, was in zwei Ausgängen aus der rechten Herzkammer resultiert. Dadurch entspringt die Aorta ebenso wie die Lungenschlagader (Arteria pulmonalis) ausschließlich oder überwiegend aus dem rechten Ventrikel des Herzens und es besteht ein Ventrikelseptumdefekt. Weitere Herzphänotypen, die durch Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie hervorgerufen werden, sind z.B. rechtsventrikuläre Hypoplasie, defekte arterioventrikuläre Verbindungen oder Abnormalitäten der conotrunkalen und rechtsventrikulären Entwicklung (Icardo und Sanchez

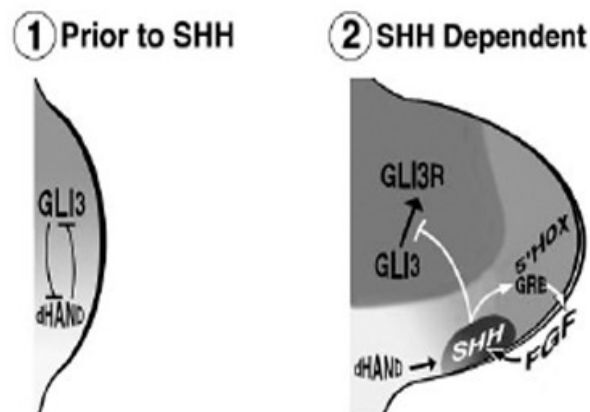
de Vega, 1991). Homozygote *Pitx2*^{-/-} Mäuse zeigen nun ähnliche Herzdefekte, wie sie auch in menschlich angeborenen Herzfehlern zu finden sind (Liu et al., 2002). Der Homeoboxtranskriptionsfaktor *Pitx2* spielt eine wichtige Rolle in der Morphogenese der Links-Rechts-Asymmetrie während der Entwicklung (Capdevila et al., 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass *Pitx2* ein direktes Zielgen von *Nodal* ist (Shiratori et al., 2001), welches asymmetrisch durch den „nodal flow“ auf der linken Seite des Embryos exprimiert wird, wodurch die linke Seite des Embryos determiniert wird. Durch dieses Beispiel wird deutlich, wie eng die korrekte Funktionsweise der Zilien des Primitivknotens mit der Entwicklung eines funktionsfähigen Herzens verbunden ist. Deswegen ist es essentiell neue Gene zu identifizieren, die in diesen primären Zilien exprimiert sind und einen Einfluß auf die Herzentwicklung haben könnten.

2.7 Entwicklung der Extremitäten

Die Musterbildungen in der Embryonalentwicklung kann man besonders gut anhand der Wirbeltiergliedmaßen untersuchen, da die Wirbeltierextremität zum einen ein gutes Modell bietet um zelluläre Wechselwirkungen innerhalb einer Struktur zu analysieren und zum anderen die Bedeutung der interzellulären Signale für die Entwicklung aufgeklärt werden kann. Die Wirbeltierextremität hat drei Entwicklungsachsen: die proximo-distale Achse, die sich vom Extremitätenansatz bis zur Spitze erstreckt, die antero-posteriore Achse, die parallel zur Längsachse des Körpers verläuft (vom Daumen zum kleinen Finger) und die dorso-ventrale Achse, die den Handrücken von der Handfläche unterscheiden lässt. Die Wirbeltiergliedmaßen entwickeln sich aus Extremitätenknospen, die vor allem aus zwei Zelltypen bestehen: mesenchymale Mesodermzellen und nach außen abgrenzende epitheliale Ektodermzellen. Der größte Teil der Extremität entwickelt sich aus dem mesenchymalen Kern. Die Extremitätenknospe ist in mehrere Zonen unterteilt. Die Wachstumszone (Progress zone) befindet sich dicht an der Spitze der Knospe und besteht aus einer Schicht aus sich schnell teilenden und undifferenzierten Zellen. Diese Zone wird nach außen hin von einer Verdickung des Ektoderms abgegrenzt, der sog. apikalen Ektodermleiste (AER). Erst wenn Zellen die Wachstumszone verlassen, beginnen diese zu differenzieren. Diese Regionen sind wichtige Organisationszentren für die Entwicklung der Extremitätenachsen. Ein wichtiges Signalmolekül ist Shh, welches die Proliferation und die antero-posteriore Musterbildung der Extremitäten kontrolliert. Shh ist in der polarisierenden Region exprimiert (ZPA) und hält diese dadurch aufrecht, indem es mit der AER Region wechselseitig interagiert. In der AER

sind ebenfalls wichtige Moleküle exprimiert, wie z.B. die FGFs (*Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf17*). *Fgfs* sind für das Auswachsen der Extremität in proximo-distaler Richtung verantwortlich. Für die Musterbildung der Extremität ist die wechselseitige Interaktion von *Fgf* und *Shh* notwendig. So ist *Fgf* für die Aufrechterhaltung der *Shh* Expression in der ZPA während der Extremitätenelongation verantwortlich. *Shh* dagegen gewährleistet die Expression von *Fgf* in der AER Region. Durch diese positive Rückkopplungs-Schleife zwischen *FGF* und *Shh* wird die Musterbildung der Extremitäten gewährleistet.

Aber auch die Expression von *Shh* wird in der ZPA-Domäne kontrolliert. Der bHLH Transkriptionsfaktor *dHAND* ist zunächst in der gesamten Wachstumszone der sich entwickelnden Extremität exprimiert. Sobald aber das Auswachsen der Finger beginnt, wird die Expression auf den posterioren mesenchymalen Teil der wachsenden Extremität durch den Transkriptionsfaktor *Gli3* reprimiert, wodurch die ZPA-Domäne determiniert wird (Fig. 6,1). Nun aktiviert *dHAND* die *Shh* Expression in der polarisierenden Region (Fig. 6,2). Dadurch verhindert *Shh* die Prozessierung von *Gli3* in die reprimierende Form Gli3R. Gleichzeitig reguliert *Shh* zusätzlich die Aktivierung von *Gremlin* und dem 5`*HoxD* Gen im distalen Mesenchym. *Gremlin* aktiviert *FGFs*, wodurch die positive Rückkopplungsschleife zwischen *Fgf4* und *Shh* zustande kommt.



modifiziert nach te Welscher et al., 2002

Fig. 6: Musterbildung der Extremitäten in der Maus

Bevor das *Shh* Signal aktiviert wird, regulieren die Antagonisten *Gli3* und *dHAND* sich gegenseitig (1). *dHand* ist für die Aktivierung des *Shh* Signals in der Polarisierungszone verantwortlich. *Shh* wiederum inhibiert die Prozessierung von *Gli3* in die reprimierende Form Gli3R und aktiviert die Gene *Gremlin* (*Gre*) und 5`*HoxD* (5`*Hox*) im distalen Mesenchym. *Gremlin* aktiviert daraufhin *FGF*, wodurch die positive Rückkopplungsschleife zwischen *Fgf4* und *Shh* zustande kommt.

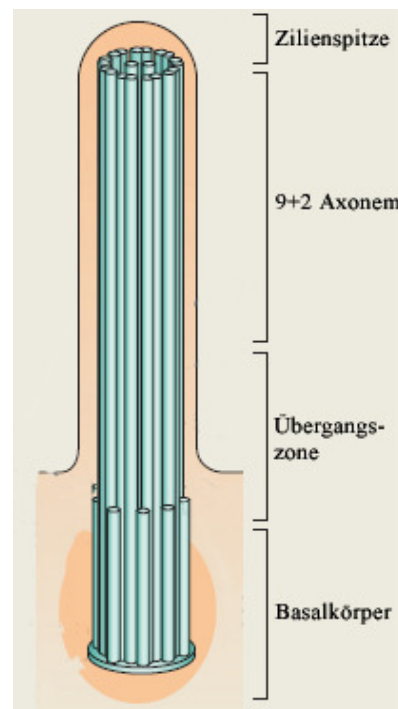
2.8 Zilien

Nahezu alle Zilien von Eukaryonten weisen eine ähnliche Struktur auf und sind hoch konserviert. Das Interesse an Zilien ist in den letzten Jahren stark gestiegen, seitdem man weiß, dass durch defekte Zilien eine Reihe von schwerwiegenden Krankheiten entstehen können. Es gibt eine große Varianz an unterschiedlichen Zilien-Typen. So gibt es allein beim Menschen vier verschiedene ziliäre Subtypen, die mit menschlichen Krankheiten, wie z.B. Taubheit, Blindheit, Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie oder polyzystische Nierenerkrankungen, assoziiert werden: Motile „9+2“-Zilien, die z.B. im Atmungstrakt oder in ependymalen Zellen vorkommen, nicht-motile „9+2“-Zilien, die ein Kinozilium von Haarzellen im Gehörgang bilden, sowie nicht-motile „9+0“-Zilien, die renale Monozilien darstellen und motile „9+0“-Zilien, die im Primitivknoten zu finden sind. Jedoch bestehen alle Zilien aus einem zentralen Mikrotubuli-Bündel, dem Axonem, das von neun Mikrotubulidubletts gebildet wird, die ein Einzel-Mikrotubuli Paar in der Mitte umgeben. So entsteht die charakteristische „9+2“-Struktur. Eine Ausnahme sind die primären Zilien in der Primitivknotenregion der Maus. Diesen Zilien fehlt das zentrale Einzel-Mikrotubuli-Paar in der Mitte, was zu einer „9+0“-Mikrotubuli Struktur in diesen Zilien führt. Ein Dublett-Mikrotubulus besteht aus einem A- und einem B-Tubulus, wobei der A-Mikrotubulus ein Mikrotubulus aus 13 Protofilamenten ist und der B-Tubulus nur 10 Protofilamente enthält. Diese zusammengefassten Bündel von Mikrotubuli werden von einer Plasmamembran zylinderartig umgeben.

Genauso wie bei der Muskelkontraktion geschieht die Bewegung der Zilien durch eine Bewegung des Axonems durch das Übereinandergleiten von Filamenten. Diese Filamente, die aus Mikrotubulidubletts bestehen, sind parallel angeordnet und weisen die gleiche strukturelle Polarität auf, da ihre Plus-Enden alle an der äußeren Spitze des Axonems liegen. Die Krümmung des Axonems kommt durch Kräfte zustande, die das Übereinandergleiten der Dublett-Mikrotubuli im gesamten Axonem antreiben, so dass die Wellenbewegung ohne Dämpfung entlang des Axonems fortpflanzt.

Die Plus-Enden der Mikrotubuli ragen zur Spitze des Ziliums. Das Zilium ist aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (Fig 7). Am Fuße des Ziliums befindet sich der Basalkörper. Dieser ist eine spezialisierte Zentriole, die von einer perizentriolaren Matrix umgeben ist. An den Basalkörper schließt sich die Übergangszone an, in der die mikrotubuläre Tripletstruktur des Basalkörpers in die axonemale mikrotubuläre Dublettstruktur umgewandelt wird. Dort werden auch die Mikrotubulidubletts an der Membran verankert und auch die IFT-Proteine, die für den Auf- und Abbau des Ziliums notwendig sind, sammeln sich dort an. Im distalen

Teil des Ziliums erscheint nun die charakteristische mikrotubuläre Dublettstruktur, die als „9+2“- oder als „9+0“-Struktur sichtbar wird (Fliegauf et al., 2007).



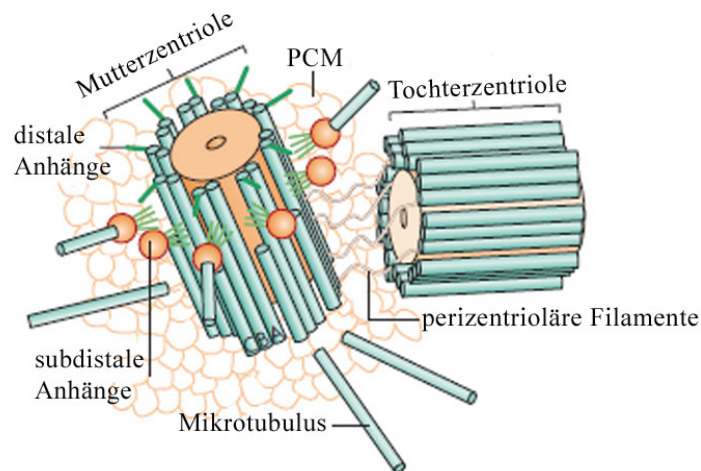
modifiziert nach Fliegauf et al., 2007

Fig. 7: Aufbau des Ziliums

Das Zilium ist aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Am Fuße des Ziliums befindet sich der Basalkörper, der das Zilium an der Plasmamembran verankert. An den Basalkörper schließt sich die Übergangszone an, in der die mikrotubuläre Tripletstruktur des Basalkörpers in die axonemale mikrotubuläre Dublettstruktur umgewandelt wird. Im distalen Teil des Ziliums erscheint die charakteristische mikrotubuläre Dublettstruktur, die z.B. als „9+2“-Struktur sichtbar wird.

2.9 Zentrosomen

Ein Zentrosom besteht aus zwei Zentriolen, die von einer perizentriolaren Matrix umgeben sind (Fig. 8). Die Zentriolen sind zylinderförmige Strukturen von 170x500nm, die sich in jedem Zellzyklus während der S-Phase duplizieren. Dabei wächst aus jeder Mutterzentriole eine Tochterzentriole aus, die zu einer vollständigen Zentriole heranwächst. Eine Zentriole besteht aus 9 Mikrotubulitriplets und ist entlang der proximo-distalen Achse polarisiert. Die Mutterzentriole besitzt zusätzlich noch subdistale und distale Anhänge, die es ihr ermöglichen sich an zytoplasmatischen Mikrotubuli anzuheften und an der Zellmembran anzudocken, wenn die Zentriole zum Basalkörper umfunktioniert wird.



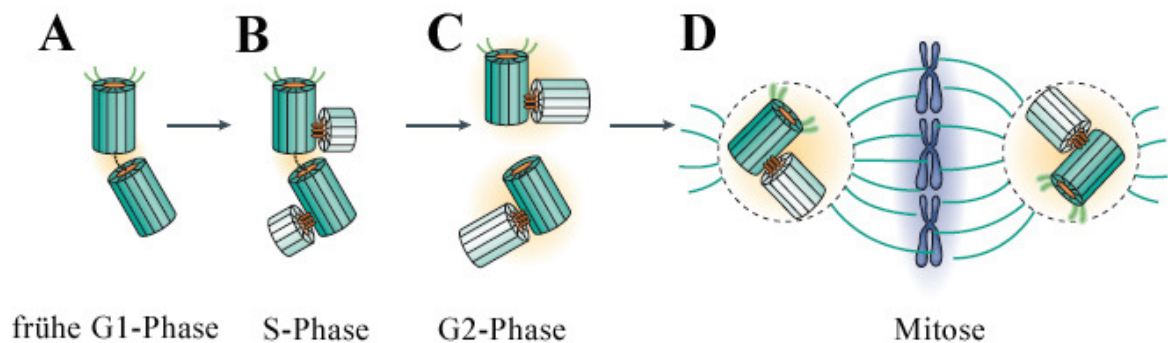
modifiziert nach Bettencourt-Dias und Glover, 2007

Fig. 8: Aufbau eines Zentrosoms

Schematische Darstellung eines Zentrosoms. Ein Zentrosom setzt sich aus einer Mutterzentriole und einer Tochterzentriole zusammen. Die Zentriolen werden von der perizentriolären Matrix umhüllt und von perizentriolären Filamenten miteinander verbunden. Die Zentriolen bestehen aus Mikrotubulidubletts, aus A-Tubuli und B-Tubuli. An der Mutterzentriole befinden sich Anhänge, die es ihr ermöglichen, sich in einen Basalkörper umzuwandeln und an die Plasmamembran anzudocken.

Zentriolen sind an der Bildung des MTOC („microtubuli organizing centre“) beteiligt. Die Aufgabe des MTOC ist es, ein Zentrum für die Zusammenlagerung der zytosolischen Mikrotubuli zu bieten und das Wachstum zu starten. Das MTOC besteht in der Regel aus einem Paar von Zentriolen, die von perizentriolären Material umgeben sind. Zwei Proteine spielen beim Wachstum der Mikrotubuli am MTOC eine wichtige Rolle: γ -Tubulin und Perizentrin. Eine weitere Funktion des MTOC, neben der Organisation der Mikrotubuli, ist es die Bildung der mitotischen Spindel zu kontrollieren. Bei der Mitose verdoppelt sich zunächst das Zentrosom, während sich die zytosolischen Mikrotubuli auflösen. Anschließend wandern die Tochterzentrosomen an ihre neuen Positionen in der Nähe des Zellkerns. Hier entwickeln sie sich zu Zentren der Astral- und Spindel-Mikrotubuli, die später die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilen. Eine weitere Aufgabe des MTOC ist es die Polarität der zellulären Mikrotubuli zu bestimmen. So weisen die Minus-Enden der Mikrotubuli stets zum MTOC oder Basalkörper hin, während die Plus-Enden distal in der Nähe der Zellmembran oder an der Spitze der Zilien sind. In der mitotischen Spindel liegen die Minus-Enden der Mikrotubuli an den Polen, während sich die Plus-Enden am Äquator der Zelle befinden und dort den

Kontakt zu den Chromosomen herstellen. Die Zentriolen spielen bei der Mitose eine bedeutende Rolle. Sie befinden sich in einem Zyklus, in der sie ihre Struktur und Anzahl ständig verändern (Fig. 9). Der Zentriolenzyklus beginnt in der Interphase (Fig. 9A). Denn zu Beginn der S-Phase verdoppeln sich die Zentrosomen, bleiben jedoch bis zum Beginn der Mitose als Paar miteinander verbunden (Fig. 9B). In der Prophase trennen sich nun die zwei Zentriolen-Paare und wandern zu entgegengesetzten Seiten des Zellkerns, wodurch die Polarität der sich teilenden Zelle bestimmt wird (Fig. 9C). Bereits zu Beginn der Zentrosomen-Wanderung werden Astral- und Pol-Mikrotubuli gebildet. Nachdem die Zentrosomen nun ihr Ziel erreicht haben, hat sich die Kernmembran aufgelöst und die an den gegenüberliegenden Polen der Zelle befindlichen Zentrosomen sorgen für die korrekte Anordnung der Chromosomen im mitotischen Apparat (Fig. 9D). Nach Ablauf der Mitose bilden sich aus den Zentrosomen die MTOC der Tochterzellen, die mit dem Aufbau der zytosolischen Mikrotubuli der Interphase beginnen.



modifiziert nach Bettencourt-Dias und Glover, 2007

Fig. 9: Der Zentrosomenzyklus

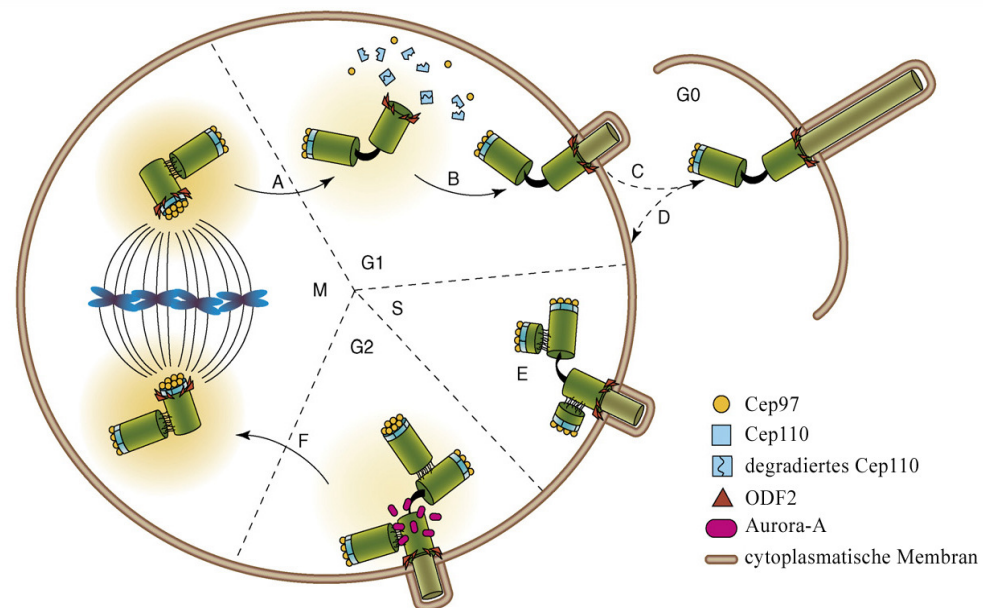
Mutterzentriolen sind dunkelgrün, Tochterzentriolen sind hellgrün dargestellt. Nach dem Verlassen der Mitose, in der frühen G1-Phase, verlieren die Zentriolen in einem Zentrosom ihre orthogonale Konfiguration. In der späten G1-Phase bzw. S-Phase beginnen die Zentriolen sich zu verdoppeln. Die beiden Zentriolen, die zuvor ein Zentrosom gebildet haben, trennen sich nun und in der späten G2-Phase haben sich die neuen Tochterzentriolen voll ausgebildet. Beim Übergang der G2-Phase zur Mitose trennen sich nun die zwei Zentrosomen, die nun von einer perizentriolaren Matrix umgeben werden (PCM; gelb markiert) und dienen nun als MTOC.

2.10 Basalkörper

Zentriolen bzw. Zentrosomen fungieren in der Mitose als MTOC. Wenn eine Zelle den Zellzyklus verlässt, trennt sich die Mutter- von der Tochterzentriole und die Mutterzentriole

konvertiert zu einem Basalkörper und wandert zur Membran (Bettencourt-Dias und Carvalho-Santos 2007). So sind Basalkörper ebenfalls zylindrische Strukturen von ca. 0,4µm Länge und 0,2µm Dicke. Sie bestehen aus neun Mikrotubulitriplets, wobei jedes Triplet aus einem A-Mikrotubulus aus 13 Protofilamenten, einem B-Mikrotubulus aus 10 Protofilamenten und einem C-Mikrotubulus zusammengesetzt ist. Die A- und B-Tubuli der Basalkörper setzen sich in das Axonem hinein fort, wohingegen die C-Tubuli nur bis zur Übergangszone zwischen Basalkörper und Axonem reichen.

Eine proliferierende Zelle besitzt ein Zentrosomenpaar, welches sich in der S-Phase dupliziert, damit die Zentrosomen als MTOC bei der Zellteilung agieren können. Eine Zelle kann den Zellzyklus jedoch auch verlassen. Dabei wird die Mutterzentriole zu einem Basalkörper umgewandelt. Der erste Schritt der Umwandlung beginnt damit, dass Cep110 und Cep97 von der Mutterzentriole abgebaut werden. Die Mutterzentriole wird nun zur Plasmamembran rekrutiert und kann sich dort mithilfe von Odf2 verankern. Sie wurde nun zum Basalkörper umgewandelt und dient als Basis für das Zilium, welches in distaler Richtung auswächst. Wenn die Zelle nun wieder in den Zellzyklus eintritt, beginnen die Zentriolen sich mit Hilfe von Cep110 zu verdoppeln. In der G2-Phase ist das Auswachsen der neuen Tochterzentriolen vollendet. Durch Aurora A werden tubuläre Deacetylasen aktiviert, die die stabilisierten Mikrotubuli des Axonems destabilisieren und damit den Abbau des Ziliums initiieren. Der Basalkörper wird nun von der Plasmamembran gelöst, und wieder zur Zentriole umfunktioniert. Die Zentrosomenpaare trennen sich zum Ende der G2-Phase und können nun in der Mitose wieder als MTOC fungieren. (Fig. 10)



modifiziert nach Bettencourt-Dias und Carvalho-Santos, 2007

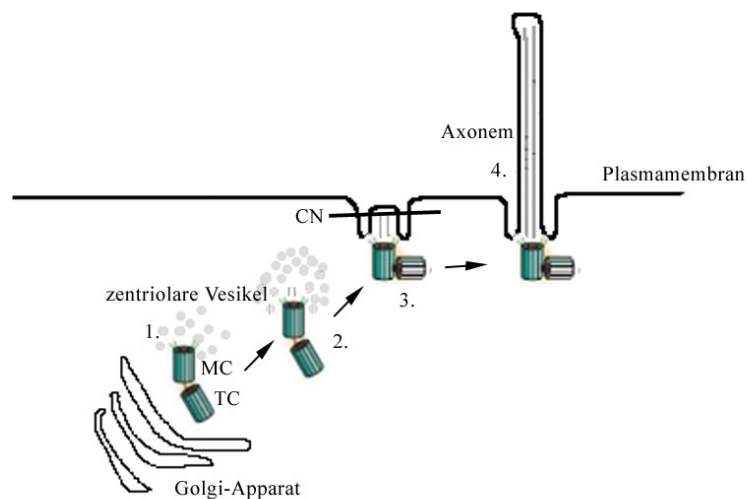
Fig. 10: Konvertierung eines Zentrosoms zum Basalkörper

In mitotischen Zellen besitzt eine Zelle zwei Zentrosomen als Spindelpole, bestehend aus je einer Mutter- und einer Tochterzentriole (grüne zylinderartige Struktur), die von einer perizentriolaren Matrix (gelb markiert) umgeben werden. Bei einer Zelle, die sich in der G1-Phase befindet und den Zellzyklus verlassen wird, um ein Zilium auszubilden, werden Cep110 (blauer Kasten) und Cep97 (gelber Punkt) von der Mutterzentriole abgebaut, mithilfe von ODF2 (rotes Dreieck) konvertiert die Mutterzentriole zum Basalkörper und verankert sich an der Plasmamembran. Nun kann ein Zilium ausgebildet werden. Die Zelle kann die G0-Phase auch wieder verlassen und das Zilium wird wieder abgebaut. In der S-Phase verdoppeln sich die Zentrosomen, dabei ist für die Biogenese der Tochterzentriole Cep110 wichtig. Beim Abbau des Ziliums ist Aurora A (pinkes, ovale Struktur) für die Aktivierung der Tubulin Deacetylasen wichtig, um den Abbau des Ziliums und die Konvertierung des Basalkörpers zum Zentrosom zu initiieren.

2.11 Aufbau eines primären Ziliums

Schon im Jahre 1962 untersuchte Sorokin den molekularen Mechanismus des Aufbaus eines Ziliums und unterteilte diesen in vier Schritte (in Pedersen et al., 2008 in einem Übersichtsartikel beschrieben). Zunächst werden im ersten Schritt zentriolare Vesikel aus dem Golgi-Apparat entlassen, die sich am distalen Ende der Mutterzentriole dort anordnen, wo das Axonem auszuwachsen beginnt. Nun beginnt die Zentriole sich in einen Basalkörper umzuwandeln. Dazu werden die Vesikel eingeschnürt und die Zentriole bildet Anhänge aus, um sich später in der Membran verankern zu können. Im zweiten Schritt werden nun sekundäre zentriolare Vesikel zu dem wachsenden Axonem rekrutiert, während dieser in

Richtung Membran transportiert wird. Im dritten Schritt der Ziliogenese erreicht das membran-umgebene Axonem nun die Zellmembran und die ziliäre Membran fusioniert mit der Zellmembran, wobei aus distaler Sicht betrachtet ein Halsketten-ähnliches Muster erscheint. Der Basalkörper verankert sich mit den Anhängen in der Zellmembran und nun ist es dem Zilium möglich, mit Hilfe des intraglagellaren Transport sich in distaler Richtung zu verlängern und ein Zilium auszubilden (Fig. 11). Wie wichtig die Verankerung des Basalkörpers an die Plasmamembran ist, zeigt sich daran, wenn die Anhänge der Mutterzentriole fehlen, wie z.B. bei *Odf2*^{-/-} F9 Zellen (Ishikawa et al., 2005). Zellen, in denen keine Anhänge an der Mutterzentriole vorhanden sind, können keine primäre Zilien ausbilden. Auch Cep164 spielt beim Aufbau des Ziliums eine wichtige Rolle. Cep164 ist ebenfalls ein Basalkörperanhangsprotein und wichtig für die Verankerung des Ziliums an die Plasmamembran. So konnte in Epithelzellen gezeigt werden (Graser et al., 2007), dass Cep164 für die Verankerung des Basalkörpers an die Plasmamembran verantwortlich ist. Zellen können aber nicht nur Zilien aufbauen, sondern dieses auch wieder abbauen und in den Zellzyklus wieder eintreten. Allerdings ist der Mechanismus, wie der Basalkörper wieder von der Plasmamembran losgelöst wird bisher nur rudimentär verstanden.



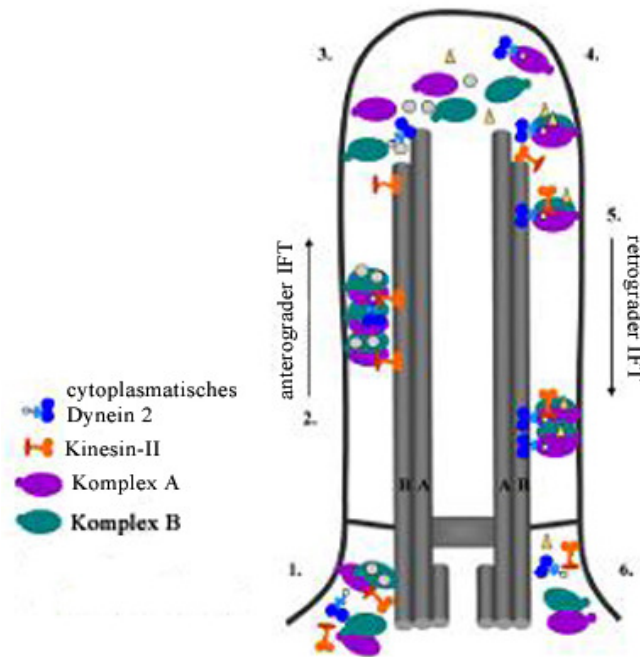
modifiziert nach Pedersen et al., 2008

Fig. 11: Schematisches Modell der vier Schritte für den Aufbau eines Ziliums

Im ersten Schritt werden aus dem Golgi-Apparat zentriolare Vesikel entlassen, die sich an das distale Ende der Mutterzentriole anheften. Im zweiten Schritt werden sekundäre zentriolare Vesikel zu dem wachsenden Axonem rekrutiert. Das Axonem wird nun in Richtung Plasmamembran transportiert. Im dritten Schritt fusioniert das membran-umgebene Axonem mit der Plasmamembran. Im vierten Schritt kann nun das Axonem in distaler Richtung auswachsen. MC=Mutterzentriole, TC=Tochterzentriole, CN=ciliary neckles (halskrausen-ähnliches Muster)

2.12 Intraflagellarer Transport

Zilien können entstehen, aber auch wieder abgebaut werden. Während des Wachstums eines Ziliums werden an das distale Ende des Flagellums axonemale Untereinheiten angefügt, um das Zilium zu verlängern. Da die Synthese der axonemalen Proteine im Zellkörper räumlich sehr weit von der Wachstumszone des Ziliums entfernt ist, löst die Zelle dieses logistische Problem mit Hilfe des intraflagellaren Transports (IFT). Beim IFT werden flagellare Membranproteine in Vesikel verpackt und vom Golgi-Apparat zur Basis des Flagellums transportiert. Da die Proteine auch wieder zurückgebracht werden müssen, spaltet sich der intraflagellare Transport in einen anterograden (der durch Motorproteine der Kinesin-Familie gewährleistet wird) und in einen retrograden (dessen Funktion Dyneine übernehmen) auf. So bestehen die IFT Partikel aus zwei Subkomplexen, den IFTA Komplex, der beim retrograden Transport eine Rolle spielt und dem IFTB Komplex, der beim anterograden Transport involviert ist. Beim anterograden Transport spielt die Kinesin-2-Familie eine wichtige Rolle (Fig. 12). Beim Kinesin-2-Motorkomplex werden zwei Subtypen unterschieden: Der heterotrimere Komplex, der aus zwei 90 und 85 kDa großen Motor-Untereinheiten und einer nicht bewegungsfähigen Untereinheit, dem Kinesin-Associated-Protein (KAP) gebildet wird (Scholey, 2003). Beim Mensch und in der Maus werden die zwei Motor-Untereinheiten des Kinesin-2-Komplexes als Kif3a und Kif3b bezeichnet. Wie wichtig diese beiden Proteine sind zeigt sich dadurch, dass Knock-out-Mäuse nicht lebensfähig sind, da sie im Primitivknoten keine Zilien ausbilden können, was zu Heterotaxien führt (Marszalek et al., 1999, Nonaka et al. 1998, Takeda et al., 1999). Für den retrograden Transport des IFT ist eine Isoform des zytoplasmatischen Dynein2 zuständig (Rosenbaum und Witman, 2002). Bisher wurden vier verschiedene Untereinheiten des zytoplasmatischen Dynein-2-Komplex identifiziert und charakterisiert (Rompolas et al., 2007)



modifiziert nach Pedersen et al., 2008

Fig. 12: Der intraflagellare Transport

Der intraflagellare Transport besteht aus dem anterograden IFT und dem retrograden IFT. Zunächst werden IFT-Partikel an der Basis des Basalkörpers lokalisiert. Der mit Kinesin II assoziierte Komplex A bindet an den Komplex B und wird an die Mikrotubuli transportiert. Dort wird die Fracht an die Spitze des Ziliums mittels des anterograden Transporters gebracht, zyttoplasmatisches Dynein II übernimmt die Fracht und transportiert diesen retrograd zum Zellkörper.

Wie wichtig der intraflagellare Transport für die Entwicklung ist, zeigt sich in vielen Ciliopathien (siehe unten), die in den letzten Jahren molekular untersucht worden sind. Da der intraflagellare Transport einen Einfluß auf den Shh-Signalweg hat, konnte in einer IFT88 (Polaris/Tg737) Mutante gezeigt werden (Yoder et al., 2002). Mäuse homozygot für dieses intraflagellare Protein sind nicht lebensfähig und zeigen dramatische Phänotypen, wie z.B. Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie, ein offenes Neuralrohr und Defekte in der Musterbildung, sowie präaxiale Polydaktylie.

2.13 Ciliopathien

In den letzten 10 Jahren wurde als Ursache für viele menschliche Krankheiten defekte Zilien und Basalkörper verantwortlich gemacht. Mittlerweile sind mehrere Duzend sogenannter

Ciliopathien bekannt, wie z.B. primäre ziliäre Dyskinesien, das Karthagener-Syndrom, Situs Inversus, Hydrozephalien, polyzystische Leber- und Nierenerkrankungen, Unfruchtbarkeit und verschiedene Formen von retinaler Degeneration. Aber auch Mutationen in ziliären Proteinen können sich in menschliche Krankheiten auswirken. So führen z.B. Proteine, die für den Aufbau oder die Struktur eines Ziliums notwendig sind zu verschiedenen menschlichen Syndromen, wie z.B. das Bardet-Biedl-, Alstrom-, Meckel-Gruber und das OFD-(oral-facial digital) Syndrom, welche zu polyzytischem Nierenversagen, retinaler Degeneration, Anosmie, Polydaktylie und zu Störungen in der Links-Rechts-Asymmetrie führen können. Aber Ciliopathien können auch zu Phänotypen führen, die nicht direkt in Verbindung mit Zilien gebracht werden, wie z.B. Fettleibigkeit und mentale Retardierung. In den letzten Jahren wurden einige Krankheitsgene molekular genauer untersucht.

So wurde sowohl im Menschen als auch in der Maus *OFDI* molekular genauer analysiert. Mutationen in dem *OFDI* Gen kann zu polyzystischer Nierenerkrankung Abnormalitäten im Gesicht und an den Extremitäten führen. Es konnte gezeigt werden, dass *OFDI* am Basalkörper lokalisiert ist und für den Aufbau eines Ziliums verantwortlich ist. Durch die Mutation nun in *OFDI* konnte gezeigt werden, dass Mutationen an Proteinen, die am Basalkörper lokalisiert sind, in defekten Zilien resultieren und damit nicht mehr funktionsfähig sind. Gerade im Fall von *OFDI* konnte zudem ein Bezug zum Hedgehog-Signalweg hergestellt werden, denn ein Vergleich mit Mutationen im *Gli3* Gen (Greig Cephalopolysyndactyly und das Pallister-Hall-Syndrom) zeigen in den Patienten einen ähnlichen Phänotyp wie in den *OFDI* defizienten Mäusen. So konnte auch gezeigt werden, dass Phänotypen, die mit Holoprosenzephalie in Verbindung gebracht werden, mit einer Mutation im *OFDI* und *Gli2* Gen assoziiert werden (Mo et al., 197, Vieira et al., 2005).

Das Zilien für polyzystische Nierenerkrankungen und retinaler Degeneration verantwortlich gemacht werden, ist detailliert untersucht worden, aber dass Zilien auch einen Einfluß auf andere Gewebe und Zelltypen während der Embryonalentwicklung haben, ist neu und wird erst seit kurzer Zeit analysiert. Für diese Analysen sind Mausmutanten unersetzlich, da man mit ihnen den Einfluß der Zilien während der Entwicklung untersuchen kann. So konnte von Huangfu und Kollegen gezeigt werden, dass die *wimple* (*wim*) und *flexo* (*fxo*) Mutante, welche ein offenes Neuralrohr, Gehirndefekte und Abnormalitäten an den Extremitäten besitzen, durch Mutationen in den IFT172 und IFT88/Polaris Proteinen verursacht werden. Die Phänotypen sind charakteristisch für Defekte im *Shh*-Signalweg. Durch die Mutantanalyse wurde zum ersten Mal deutlich, dass ein intakter intraflagellarer Transport und molekulare Motorproteine, wie z.B. Kif3a für den *Shh*-Signalweg wichtig sind. Das gilt

damit auch für den Rezeptor *Patched1* und den Aktivator *Smoothend*. Von dem transmembranen Protein *Smo* weiß man zudem, dass dieses Protein auch am Zilium lokalisiert ist, dass Organell welches für den *Shh*-Signalweg in Vertebraten wichtig ist. Ein weit verbreiteter Phänotyp in vielen Ciliopathien sind Defekte in der Entwicklung der Extremitäten, die sich in verschiedenen Polydaktylien oder Syndaktylien äußern. In den ektodermalen und mesenchymalen Zellen der Extremitäten befinden sich sensorische Zilien, was daraufhin deutet, dass dort morphogenetische Signale transportiert werden. In der *Polaris*-Mutante konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *Gli3* nicht mehr prozessiert werden kann, wodurch die Defekte in den Extremitäten zustande kommen.

Die Beispiele zeigen, dass es unerlässlich ist, weitere Proteine in Mausmutanten mit ziliären Phänotypen zu identifizieren, um die molekularen Ursachen der menschlichen Ciliopathien weiter zu entschlüsseln.

2.14 Zielsetzung der Arbeit

Während der Gastrulation werden die drei Keimblätter, Mesoderm, Entoderm und Ektoderm gebildet und der grundlegende Körperbau des Embryos festgelegt. Der Spemann/Mangold-Organisator wurde zwar schon vor 80 Jahren identifiziert, jedoch ist bis heute noch nicht vollkommen verstanden wie der Organisator den Embryo auf molekularer Ebene musterbildet. Der Transkriptionsfaktor *Foxa2* ist ein wichtiges Organisationsgen. Bisher sind allerdings nur wenige Zielgene bekannt, die die Organisationsfunktion bestimmen. Durch die Identifizierung von neuen *Organisator/Foxa2* Zielgenen sollte es gelingen, Einblicke in die molekularen Mechanismen der Organisationsentstehung zu gewinnen. Eines dieser potentiellen Zielgene, ein bisher völlig unbekanntes Gen, wurde im Laufe dieser Arbeit molekular und funktionell im Detail analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Entoderm und Spemann/Mangold Organisator Gene

3.1.1 Vergleich des Genexpressionsprofil in *Wildtyp* und *Foxa2*^{-/-} Gastrulationsembryonen

Der Transkriptionsfaktor *Foxa2* ist ein wichtiges Organisationsgen und unter den Vertebraten hoch konserviert. Die Organisationsregion ist eine dynamische Zellpopulation von Zellen, die Zellen des anterioren definitiven Entoderm (ADE), der Prähordalplatte (PCP), dem Notohord (NC), dem Primitivknoten, dem anterioren viszeralem Entoderm (AVE) und dem anterioren Mesoderm ausbilden können (Kinder et al., 2001). *Foxa2* ist nun in dieser Organisationsregion exprimiert, wie z.B. während der Gastrulation in der Maus im frühen Organisator, dem AVE, und im anterioren Epiblasten. Später ist *Foxa2* im Primitivknoten und Organisationsderivaten, wie z.B. dem anterioren Mesoderm (AME), dem NC, dem ADE und der Bodenplatte (Floorplate; FP) exprimiert (Sasaki und Hogan, 1993; Burtscher und Lickert, 2009). In der Bodenplatte sind aber auch andere wichtige Signalmoleküle exprimiert, wie z.B. *Shh* (*Sonic Hedghog*) welches unter anderem für die Ventralisierung des Neuralrohrs verantwortlich ist. Über die Entstehung des Entoderms und der Organisationsregion, sowie über die Zielgene von *Foxa2* ist nur sehr wenig bekannt. Daher ist es essentiell weitere Zielgene des Transkriptionsfaktors zu analysieren, um die Entwicklung des Entoderms und die Organisationsregion und damit die Musterbildung des Embryos besser verstehen zu können. Um neue Gene, die in diesen Prozessen involviert sind zu identifizieren, wurde die unterschiedliche Genexpressionen von *Wildtyp* Embryonen und *Foxa2*^{-/-} Mutanten im gastrulierenden Embryo (E7,5) verglichen. Um diese Fragestellung analysieren zu können, wurde die Technik der tetraploiden Aggregation verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich eine große Menge an *Foxa2*^{-/-} Mutanten, die aus ES-Zellen gewonnen werden, in geringer Zeit zu generieren. *Foxa2* hat im frühen Embryo zwei wichtige Funktionen: Zum einen im viszeralem Entoderm den Primitivstreifen zu verlängern und zum anderen entodermale Strukturen und den Primitivknoten auszubilden und damit indirekt die Musterbildung des frühen Embryos zu steuern. Bei der Methode der tetraploiden Aggregation werden nun *Foxa2*^{-/-} ES-Zellen mit fluoreszierenden tetraploiden *Wildtyp*-Embryonen aggregiert (Vintersten et al., 2004) und in pseudoschwangere Weibchen transferiert. Bei

diesen Experimenten tragen die ES-Zellen zum gesamten Embryo bei, die tetraploiden Zellen dagegen nur zu extraembryonalen Gewebe, wie z.B der Plazenta, aber auch zum viszeralem Entoderm (siehe Tamplin et al., 2008, Fig. 1). Die Embryonen wurden am Tag E7,5 präpariert und um zu kontrollieren, dass nur ES-Zellen zur Generierung des Epiblasten beigetragen hatten, wurden die Epiblastzellen anhand einer negativen UV Fluoreszenzfarbe überprüft. In unserem Experiment hatte diese Technik den entscheidenden Vorteil, dass die Funktion von *Foxa2* im extraembryonalen viszeralem Entoderm nicht gestört ist, der Primitivstreifen sich also am posterioren Ende Richtung distaler Spitze des Embryos entwickeln kann und somit die Funktion von *Foxa2* ausschließlich im Embryo analysiert werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die im Vergleich zur natürlichen Zucht sehr schnelle Generierung von *Foxa2*^{-/-} Embryonen. Mit Hilfe dieser Technik wurde nun der embryonale Teil von 100 *Foxa2*^{-/-} Gastrulationsembryonen im Stadium E7,5 gesammelt (pro Experiment je 50 Embryonen) und parallel zusätzlich auch die gleiche Menge an *Wildtyp*-Embryonen, ebenfalls im Stadium E7,5. Von den Embryonen wurde anschließend RNA isoliert, daraus cDNA mit einem T7-Promotor mittels reverser Transkription synthetisiert, anschließend mittels Polymerasen cRNA synthetisiert und schließlich ein Affymetrix-Gen-Chip MOE430v2 mit einem Gesamt-Genom Datensatz (39,000 Transkripte) hybridisiert. Dieses Microarray Experiment wurde mit zwei Replikaten (für je *Wildtyp* und *Foxa2*^{-/-} Embryonen) wiederholt. Ein drittes Replikat von Mutanten und *Wildtyp*-Embryonen wurde für eine unabhängige quantitative Validierung der unterschiedlichen Genexpressionslevel verwendet. Die Microarray-Daten wurden nun normalisiert und gefiltert, indem die *Foxa2*^{-/-} Chips mit den *Wildtyp*-Chips miteinander verglichen wurden (d.h. sowohl für *Wildtyp* als auch für mutante Embryonen vier Vergleiche). Es wurde nur die Genexpression als reduziert betrachtet, nämlich die, in der *Foxa2*^{-/-} Mutanten, verglichen mit *Wildtyp*-Embryonen, in zwei von vier Vergleichen statistisch signifikant herunterreguliert waren ($p \leq 0,01$). Unsere Hypothese war nun, dass auf dem *Foxa2*^{-/-} Chip direkte oder indirekte Zielgene zu finden sein müssten. Zusätzlich sollten Gene differentiell herunterreguliert sein, welche in Regionen exprimiert sind, die in den *Foxa2*-Mutanten fehlen, d.h. Gene, die in Organisatorregionen oder im Entoderm exprimiert sind. Daher sollten auch die Zielgene, welche positiv von *Foxa2* reguliert werden, in den herunterregulierten Genen zu finden sein. Eine zweite Möglichkeit ist es auch in diesem Genpool solche Gene zu finden, die in entodermalen Regionen oder in der Organisatorregion exprimiert sind und dadurch in Mutanten, denen dieses Gewebe fehlt deshalb nicht vorhanden sind. Um unsere Annahme zu kontrollieren, führten wir eine Qualitätskontrolle in den herunterregulierten Genen durch. Unsere Annahme wurde bestätigt, indem eine Anzahl von

validierten Zielgene, die in Organisatorregionen, wie dem Primitivknoten und dem NC, im AME und ADE exprimiert sind, identifiziert werden konnte (Tab. 1). So war auf den Genchips ein validiertes Zielgen von *Foxa2*, nämlich *Foxa1* reduziert. Dieser Transkriptionsfaktor, der auch zu der Familie der Fox-Transkriptionsfaktoren gehört, ist ebenfalls in der AME und DE Region exprimiert (Sasaki et al., 1993; Ang et al., 1993; Monaghan et al., 1993). Dieses Ergebnis stimmt auch mit den publizierten Daten überein, nämlich, dass die Expression von *Foxa1* in *Foxa2*^{-/-} Embryonen (Ang et al., 1994), aber auch *Foxa2* negativen differenzierten ES-Zellen (Duncan et al., 1998) herunterreguliert ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Gen *Brachyury (T)* in *Foxa2*^{-/-} Embryonen, welches im Primitivstreifen, im Primitivknoten und AME am Tag E7,5 exprimiert ist, reduziert ist (Wilkinson et al., 1990). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass in *Foxa2*^{-/-} Embryonen, entstanden durch tetraploide Aggregation, die *T*-Expression im Primitivknoten und AME spezifisch herunterreguliert war, allerdings nicht im Primitivstreifen, sondern nur in den Regionen, in denen *Foxa2* exprimiert ist, d.h. im anterioren Primitivstreifen, im Primitivknoten und im NC (Dufort et al., 1998). Ein anderes Gen, *Foxd4* (früher bekannt als *Fkh-2*), war in unserem Datensatz am stärksten herunterreguliert. Auch hier konnte bereits gezeigt werden, dass in *Foxa2*^{-/-} Embryonen die *Foxd4*-Expression in der axialen Mittellinie der Embryonen am Tag E8,5 fast verschwunden ist, ebenso wie im anterioren Neuroektoderm (ANE). Wir konnten die fehlende Expression von *Foxd4* im Primitivknoten und AME am Tag E7,5 in *Foxa2*^{-/-} Mutanten ebenfalls bestätigen (Tamplin et al., 2008). Aber unter den herunterregulierten Genen konnten auch bekannte DE Markergene identifiziert werden, wie z.B. *Sox17* (Kanai-Azuma et al., 2002), *Trh* (Hou et al., 2007, McKnight et al., 2007) und *Cer1* (Biben et al., 1998), was die publizierten Daten bestätigte, in denen gezeigt werden konnte, dass die Expression von *Cer1* in *Foxa2*^{-/-} Mutanten im Epiblasten reduziert war (Hallonet et al., 2002). Zusammenfassend wurde unsere Annahme und unser Datensatz dadurch bestätigt, dass zum einen bekannte Zielgene identifiziert werden konnten und zum anderen Gene identifiziert werden konnten, die in Regionen exprimiert sind, die in *Foxa2*^{-/-} Embryonen fehlen. Durch die Tatsache, dass auch viele Organismorgene unter den bereits bekannten Zielgenen von *Foxa2* zu finden waren, lag die Vermutung nahe, noch weitere in diesem Datensatz zu finden, ebenso wie entodermale Marker, da die Anzahl der bereits bekannten definitiv entodermalen Gene in dem Datensatz ebenfalls sehr hoch war.

Expressionsdomäne	Gensymbol	Microarray (MOE430v2)	Reduziertes Expressionsmuster in <i>Foxa2</i> ^{-/-} Mutanten (gezeigt durch <i>in situ</i> Hybridisierung)
PK oder NC	<i>Foxd4</i>	-3,74	Tamplin et al., 2008; Kaestner et al., 1995
PK oder NC	<i>Foxa1</i>	-1,56	Ang et al., 1994
PK oder NC	T	-0,78	Ang et al., 1994; Weinstein et al., 1994; Dufort et al., 1998
PK oder NC	<i>Foxa2</i>	-0,87	
PK oder NC	<i>Shh</i>	-1,43	Ang et al., 1994; Weinstein et al., 1994; Dufort et al., 1998; Hallonet et al., 2002
PK oder NC	<i>Car3</i>	-1,55	
PK oder NC	<i>Chrd</i>	-1,49	
PK oder NC	<i>Tmprss2</i>	-0,63	
PK oder NC	<i>Dynlrb2</i>	-0,69	
DE	<i>Sox17</i>	-0,87	
DE	<i>Cer1</i>	-1,87	Hallonet et al., 2002
DE	<i>Foxa2</i>	-0,87	
DE	<i>Foxa1</i>	-1,56	Ang et al., 1994
DE	<i>Trh</i>	-0,79	
DE	<i>Shh</i>	-1,43	Ang et al., 1994; Weinstein et al., 1994; Dufort et al., 1998; Hallonet et al., 2002
DE	<i>Gprc5c</i>	-1,64	
DE	<i>Cyp26a1</i>	-0,40	
DE	<i>Tmprss2</i>	-0,63	

Tab.1: Bekannte entodermale und Organisatorgene, deren Expression in *Foxa2*^{-/-} Mutanten signifikant herunterreguliert sind

Zusammenfassung der Gene, die im Primitivknoten (PK), im Notochord (NC) und dem definitiven Entoderm (DE) exprimiert sind und deren Expression als statistisch signifikant in *Foxa2*^{-/-} Embryonen im Stadium E7,5 herunterreguliert sind

(Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. Janet Rossant durchgeführt. Dr. Heiko Lickert aggregierte und präparierte die *Wildtyp* und mutanten Embryonen, isolierte die RNA und hybridisierte die Genchips mit dieser RNA. Mitarbeiter aus dem Rossant Labor wiederholte diesen Versuch mit einem zweiten Affymetrix Genchip U74Av2. Die Resultate beider Genchips wurden parallel bioinformatisch ausgewertet. Meine Arbeit begann mit der Auswertung der Daten und die daraus resultierenden Experimente dieses Projektes wurden von mir durchgeführt. Die Resultate dieser Kollaboration wurden in dem Fachjournal *BMC Genomics* mit mir als Co-Erstautor veröffentlicht (siehe Tamplin et al., 2008).)

3.1.2 Whole-mount *in situ* Hybridisierungsscreen (WISH)

Um neue entodermale und organisatorspezifische Zielgene des Transkriptionsfaktors *Foxa2* zu identifizieren, haben wir die Expressionsdomänen neuer Gene mittels WISH analysiert. So war unsere Annahme, dass zellautonom regulierte Zielgene des Transkriptionsfaktors *Foxa2* in den gleichen Expressionsdomänen wie *Foxa2* exprimiert sein sollten. Aus diesem Grund wählten wir 232 Gene aus (siehe Anhang 6.3.1.), die in den *Foxa2*^{-/-} Mutanten im Vergleich zu *Wildtyp*-Embryonen signifikant herunterreguliert waren. Unsere Wahl fiel auf Gene, die in ihrer Funktion komplett unbekannt waren und zusätzlich Gene, die mindestens 1,5-fach signifikant herunterreguliert waren. Es wurden nun die Expressionsdomänen von 232 Genen mittels whole-mount *in situ* Hybridisierungen im Stadium E7,5- E9,5 analysiert (Fig. 13). In 28% der Fälle (Fig. 13.2; n=65), konnte kein Expressionsmuster in den Embryonen detektiert werden, da die Gene entweder zu diesem Zeitpunkt zu schwach exprimiert sind oder aus technischen Gründen, wie z.B. das Hybridisierungssonden nicht sensitiv genug waren. Die Expression von 49,5% der Gene (Fig. 13.1; n=115) zeigten ein ubiquitäres Expressionsmuster. Diese Gene könnten natürlich auch von *Foxa2* reguliert sein, jedoch hatten wir für diese Gene kein direktes Präselektionskriterium. Dagegen konnte in 12,9% der Fälle (Fig. 13.3; n=30) ein spezifisches Expressionsmuster in Embryonen detektiert werden, allerdings nicht in entodermalen Regionen oder im Primitivknoten von gastrulierenden Embryonen. Diese Gene könnten einer nicht-zell-autonomen Regulation durch *Foxa2* unterliegen, da in den *Foxa2* Mutanten, wie oben beschrieben, die Organisatorregionen fehlen. Die Genexpression von 6,9% der Gene (Fig. 13.4; n=16) fiel auf entodermale Regionen. Eine spezifische Expression in der Organisatorregion des Embryos im Stadium E7,5 wurde in 2,6% der Gene (Fig. 13.5; n=6) detektiert. Die hohe Anzahl an Genen, die spezifisch in entodermalen oder Organisatorregionen exprimiert sind, lässt darauf schließen, dass erstens spezifisch für solche Gene angereichert wurde und zweitens *Foxa2* ein molekulares Programm steuert, welches Entoderm und Organisatorregionen reguliert. In bisherigen Veröffentlichungen, in denen die zu analysierenden Gene allerdings willkürlich aus cDNA-Banken ausgewählt wurden, konnten prozentual weniger Gene identifiziert werden, die in spezifischen Regionen exprimiert sind. So analysierten z.B. auch Sousa-Nunes et al., 2003 das Expressionsmuster in gastrulierenden Mausembryonen im Stadium E7,5. In diesem Screen wurde das Expressionsmuster von 1851 Genen analysiert, davon waren 6 Gene (0,3%) im viszeralem Entoderm exprimiert, keines davon im definitiven Entoderm (0%) und nur 5 Gene (0,27%) im Primitivknoten.

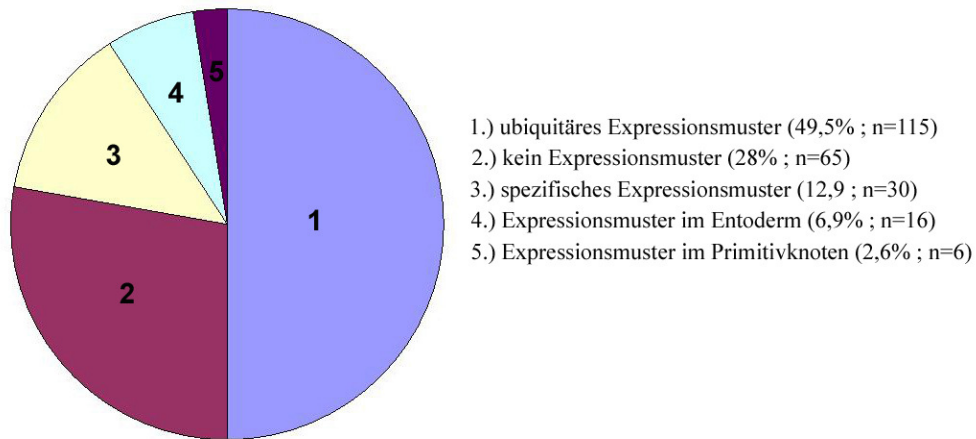


Fig. 13: Übersicht whole-mount *in situ* Hybridisierungsscreen

Verteilung der unterschiedlichen Expressionsmuster der potentiellen Zielgene von *Foxa2*

3.1.3 Gene mit spezifischem Expressionsmuster

Unter den 232 analysierten Genen mittels *in situ* Hybridisierung konnte in nahezu 13% der Gene ein spezifisches Expressionsmuster, dass nicht in entodermalen Regionen oder im Primitivknoten exprimiert war, detektiert werden. Aufgrund des spezifischen Expressionsmusters kann bei einigen Genen eine interessante Funktion vermutet werden. So konnte z.B. bei *Colec12* (*collectin sub-family member 12*, Fig. 14E) eine Expression in endothelialen Zellen in den Zwischenräumen der Somiten, im cerebralen Cortex und Hippocampus detektiert werden. *Colec12* ist ein phagozytischer Rezeptor mit derzeit unklarer Funktion. Auch bei *Pcdh19* (*Protocadherin 19*) (Fig. 14G, H) konnte eine spezifische Expression während der Entwicklung detektiert werden. So ist dieses X-chromosomale Gen im Stadium E7,75 im paraxialen Mesoderm (Fig. 14G) und später im Stadium E8,5 in der Schwanzknopse exprimiert (Fig. 14H) und in einem Gradienten in dem am meist posterior gelegenen Somiten. Da diese Region für das Wachstum der Somiten und die Segmentierung verantwortlich ist, ist es sicherlich von Interesse die Funktion dieses Gens weiter zu untersuchen. Auch das Expressionsmuster von *Thsd2* (*Thrombospondin2*) ist nennenswert. *Thsd2* (auch *R-Spondin-3 Vorläufer*; *Roofplate-specific spondin3*, *Cabriolet*) ist im Stadium E7,75 im paraxialen Mesoderm exprimiert. Später E8,5 kann eine starke Expression in der mesodermalen Schwanzdomäne detektiert werden. Zusätzlich ist *Thsd2* in der Grenze zwischen dem Mittelhirn und Hinterhirn im Stadium E9,5 exprimiert. Bis jetzt ist über die Funktion von *Thsd2* bekannt, dass dieses Gen ein Aktivator der β -Catenin-Signalkaskade ist,

welches zu einer TCF-abhängigen Genaktivierung führt. Um zu analysieren, ob *Thsd2* nun ein direktes oder indirektes Zielgen von *Foxa2* ist, sollten die Expressionsdomänen beider Gene miteinander verglichen werden und durch *Foxa2*^{-/-} Mutantenanalyse untersucht werden, ob *Thsd2* durch *Foxa2* reguliert wird. Ein weiteres Gen mit einem spezifischen Expressionsmuster ist *Agtrl1* (*Apelin receptor1*) (Fig. 14C, D). Auch *Agtrl1* ist in den endothelialen Zellen der Somitenzwischenräume exprimiert. Knock-out-Analysen in der Maus haben gezeigt, dass Mutationen in dem Gen zu einem kardiovaskulären Phänotyp führen. Ebenso konnte *Pcsk1* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*) (Fig. 14M, O) identifiziert werden, welches im Stadium E7,75 in der Mittellinie und später im Stadium E8,5 spezifisch in der Vorderhirnregion exprimiert ist. Knock-out-Analysen haben gezeigt, dass eine Mutation in diesem Gen zur frühen embryonalen Letalität führt. *Wdr9* (auch *Brwd1*, *bromodomain and WD repeat domain containing 1*) (Fig. 14N) weist eine starke Expression in der Mittellinie im Vorderhirn und im Hinterdarm auf. Über die Funktion von *Wdr9* sind bisher keine Details bekannt, aber es wird vermutet, dass dieses Gen als transkriptioneller Aktivator wirkt und in der Chromatinumgestaltung eine Rolle spielt. Bei dem bisher unbekanntem Rikenklon *261036h15rik* konnte im Stadium E7,5 eine Expression im Mesoderm und im Stadium E9,0 im dorsalen Neuralrohr und im Mittelhirn eine Expression im Stadium E9,0 detektiert werden (Fig. 14A, B). Über die Funktion dieses Rikenklons ist bisher nichts bekannt. Das Gen *Ripk3* ist nur im Stadium E7,5 im Mesoderm exprimiert (Fig. 14L). Es gehört zu der Superfamilie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Über die Funktion von *Ripk3* ist nur bekannt, dass es apoptotische Signale begünstigt. Dagegen konnte im Fall von *Anxa5* (*AnnexinA5*) gezeigt werden, dass homozygote Mäuse für dieses Gen keine phänotypische Besonderheiten aufweisen, da sie lebensfähig und fertil sind. *Anxa5* ist in der Schwanzknospe und in den intersomitischen Epithelzellen im Stadium E9,5 exprimiert. Ein weiteres spezifisches Expressionsmuster konnte in dem *Ghsr* Gen (*Growth hormone secretagogue receptor type 1*, EST-Klon *Mm118004*) detektiert werden (Fig. 14F). Im Stadium E8,25 konnte eine Expression in der Mittellinie detektiert werden. In früheren oder späteren Stadien ist dagegen kein *Ghsr* mehr exprimiert. *Ghsr* ist ein Rezeptor von *Ghrelin* und stimuliert die Sekretion von Wachstumshormonen.

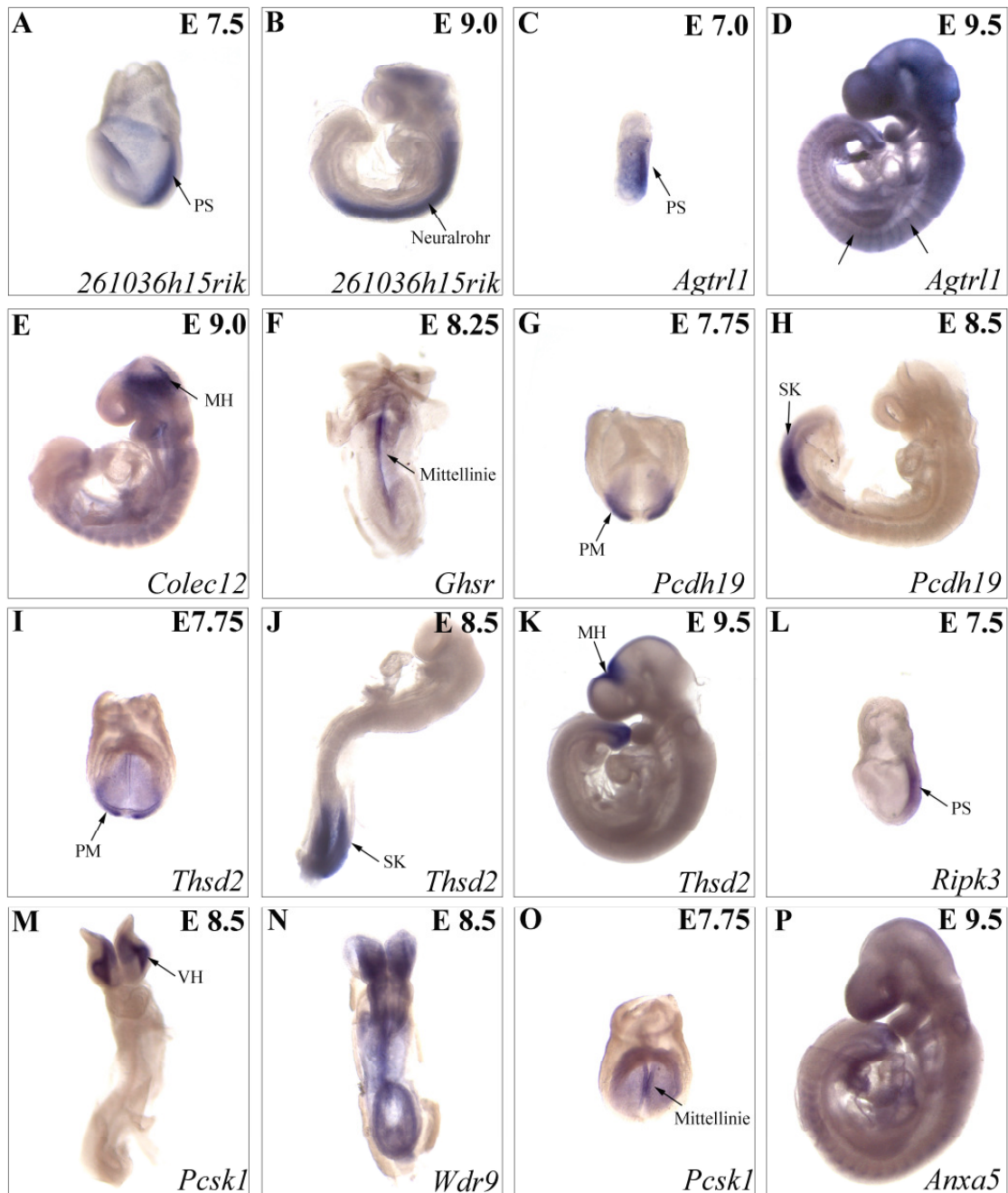


Fig. 14: Gene mit spezifischen Expressionsmuster

Expressionsdomänen der Gene, die ein spezifisches Expressionsmuster aufweisen, aber nicht in entodermalen Regionen oder Organisatorregionen exprimiert sind. A, C, L zeigen frühe und späte Gastrulationsembryonen zum Stadium E7,0–7,5 in lateraler Ansicht. Anterior ist links, distal ist unten. I, O anteriore Ansicht, G posteriore Ansicht von Embryonen im Stadium E7,75. F, M anteriore Ansicht, J laterale Ansicht, N posteriore Ansicht im Stadium E8,25–8,5. B, D, E, H, K, P laterale Ansicht von Embryonen im Stadium E8,5–9,5. PS=Primitivstreifen, MH=Mittelhirn, PM=paraxiales Mesoderm, SK=Schwanzknospe, VH=Vorderhirn

3.1.4 Gene mit entodermalen Expressionsmuster

Ein wichtiges Ziel unserer Analysen war es mit Hilfe des whole-mount *in situ* Hybridisierungsscreen neue entodermale Marker zu identifizieren, um durch die Analyse dieser Gene die Entwicklung von entodermalen Strukturen besser verstehen zu können. Unter den 232 analysierten Genen waren 6,9% der Gene in entodermalen Domänen exprimiert, wobei vier Gene ein sehr spezifisches entodermales Expressionsmuster aufwiesen. Zwei dieser Gene gehören zu der Familie der Claudine. Die Familie der Claudine ist essentiell für die Ausbildung von Tight-Junctions (Zellkontakte, durch welche Epithelzellen miteinander verbunden werden) und besteht aus 24 Mitgliedern. Claudine sind kleine Transmembranproteine, die in vielen Organismen vorkommen und hoch konserviert sind. Alle Claudine, bis auf Claudin12, besitzen eine hoch konservierte PDZ-Domäne am C-Terminus, die für die Lokalisation an die Tight-Junctions benötigt wird. Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, sind in der Regel Gerüstproteine, die für die Organisation von Proteinkomplexen an subzellulären Kompartimenten verantwortlich sind. Die PDZ-Domäne hat ihren Namen von den ersten drei Proteinen erhalten, die diese Proteindomäne besitzen: das synaptische Protein PSD95/SAP90 (PSD steht für *Post synaptic density*), das Septate junction-Protein Discs large, identifiziert aus der *Drosophila melanogaster*, und das tight junction-Protein Zonula occludentes-1. Ein spezifisches entodermales Expressionsmuster konnten nun bei *Claudin4* (*Cldn4*) und *Claudin6* (*Cldn6*) identifiziert werden (Fig. 15A-H). Sowohl *Cldn4* als auch *Cldn6* weisen eine starke extraembryonale Expression im Stadium E6,5-7,75 auf und eine schwache Expression in lateralen DE-Zellen und in der Einstülpung des Vorderdarms (Fig. 15A-B, E-F). Im Gegensatz zu *Cldn6* kann bei *Cldn4* erst eine Expression in entodermalen Zellen im Stadium E7,5 detektiert werden. Später kann eine Expression der Claudine nur in entodermalen Regionen detektiert werden, wie im Vorder-, Mittel- und Hinterdarm (Fig. 15C-D, G-H). Zusätzlich zu den beiden Claudinen wies auch *Cpm* (*Carboxypeptidase M precursor*) ein interessantes Expressionsmuster auf. Über die Funktion von *Cpm* ist bisher nur wenig bekannt. Dieses Gen hat eine proteolytische Funktion und soll eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Peptidhormonen und Wachstumshormonen an der Zelloberfläche spielen. *Cpm* ist im Stadium E6,5 und E7,5 in einzelnen anterioren DE-Zellen exprimiert (Fig. 15I- J), später E9,0 spezifisch im Vorder-, Mittel- und Hinterdarm (Fig. 15K) und schließlich E9,5 in der Leber und am posterioren Ende des Darms (Fig. 15L). Auch *Cpn1* (*Carboxypeptidase N1*) zeigt ein spezifisches Expressionsmuster im Entoderm. Auch über dieses Gen ist bisher nur wenig bekannt. So ist dieses Enzym für die Inaktivierung der Peptide, wie z.B. die Kinine und Anaphylatoxine wichtig und könnte z.B. eine

extrazelluläre proteolytische Funktion in der Umgestaltung der extrazellulären Matrix besitzen oder Signalmoleküle aktivieren oder inhibieren. Im Stadium E6,5 kann keine Expression von *Cpn1* detektiert werden (Fig. 15M). Dagegen im Stadium E7,75 beginnt die Expression von *Cpn1* im Primitivknoten und in einzelnen anterioren DE-Zellen (Fig. 15N). Später (E8,5) ist *Cpn1* stark im Hinterdarm und in der Mittellinie des Embryos exprimiert (Fig. 15O). Im Stadium E9,0 ist die Expression auf das Entoderm und das dorsale Neuralrohr beschränkt (Fig. 15P).

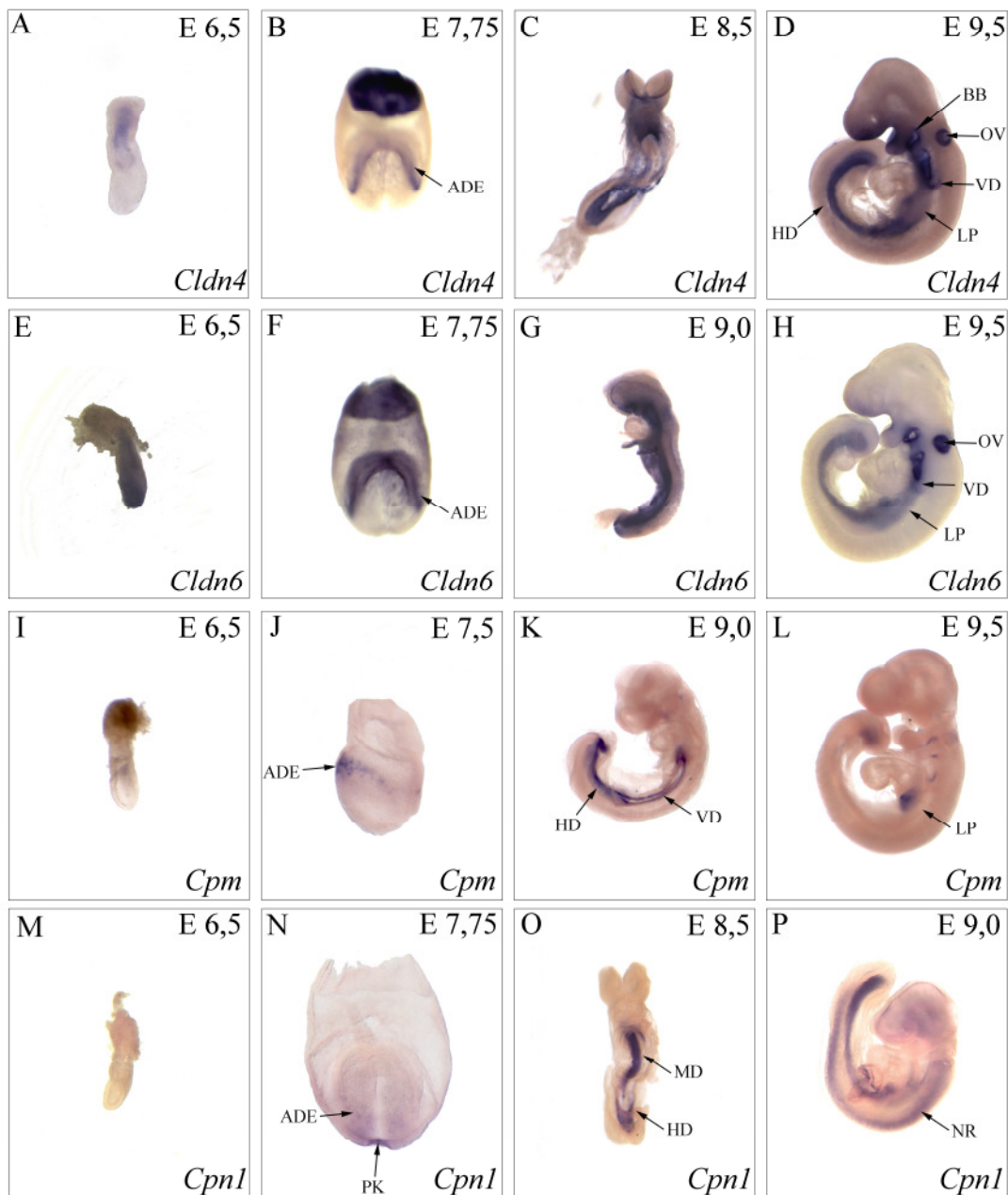


Fig. 15: Gene mit entodermalen Expressionsmuster

Expressionsdomänen von *Cldn4* (A-D), *Cldn6* (E-H), *Cpm* (I-L), *Cpn1* (M-P). Analyse der Expressionsmuster in Embryonen zwischen dem Stadium E6,5-9,5. A, E, I, M zeigen Embryonen zum Stadium E6,5 in lateraler Ansicht. Anterior ist links, distal ist unten. B, F, J, N zeigen Embryonen zum Stadium E7,5- 7,75. B, F, N, anteriore Ansicht, J laterale Ansicht. C, O ventrale Ansicht von Embryonen im Stadium E8,5-9,0. D, G, H, K, L, P zeigen Embryonen in lateraler Ansicht im Stadium E9,0-9,5. ADE= anteriores definitives Entoderm, BB=Bronchialbogen, OV=otisches Vesikel, VD=Vorderdarm, LP=Leberprimordium, HD=Hinterdarm, NR=Neuralrohr, MD=Mitteldarm, PK=Primitivknoten

3.1.5 Gene mit einer Expressionsdomäne im Primitivknoten

Bis jetzt konnten 49 Gene identifiziert werden, die im Stadium E7,5 in der Organisatorregion exprimiert sind (siehe www.informatics.jax.org/). In unserem Screen konnten wir 10 Gene hinzufügen, die in der Organisatorregion exprimiert sind (Tamplin et al., 2008). Dadurch konnten wir also die Anzahl der bekannten Marker, die im Primitivknoten exprimiert sind um nahezu 20% erweitern. Unter den Genen, die im Primitivknoten exprimiert sind, sind zwei völlig unbekannte Rikenklone, bei denen nur in den monoziliären Zellen des Primitivknotens eine Expression zu detektieren ist: *1700027A23rik* (*Pitchfork*) (Fig. 16I, J) und *1700009P17rik* (*Cep20*) (Fig. 16M-O). Da die monoziliären Zellen des Primitivknotens für die Links-Rechts-Achsendeterminierung des Embryos eine große Rolle spielen, ist das Expressionsmuster dieser Rikenklone besonders hinsichtlich einer hiermit vermuteten Funktion in der Musterbildung des Embryos interessant. Es wurden zwei affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen das C-terminale Ende von *Cep20* synthetisiert (Pineda, Berlin). In immunhistochemischen Färbungen konnte bisher gezeigt werden, dass *Cep20* am Zentrosom lokalisiert ist. Die Lokalisation am Zentrosom und die spezifische Expression in den monoziliären Zellen des Primitivknotens lassen eine Funktion von *Cep20* während der Ziliogenese vermuten. Dies wird zusätzlich durch Analysen von McClintock et al., 2008 bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass sowohl *Pitchfork* als auch *Cep20* in ziliären Gewebe hoch angereichert ist. Um zu analysieren, ob *Cep20* eine Funktion während der Ziliogenese hat, wurden Knock-out-Mäuse generiert (in Zusammenarbeit mit Dr. Ingo Burtscher und Wenke Barkey), um die Funktion dieses Rikenklones zu analysieren. In unserem Screen konnte auch ein weiterer Rikenklon identifiziert werden *111007C05rik*, der im Stadium E7,5 im Primitivknoten der Maus exprimiert ist (Fig. 16A) und im Stadium E9,0 im posterioren Neuralrohr und im Einflusstrakt des Herzens (Fig. 16B). Ein weiteres Gen ist *Mlf1* (*Myeloid leukemia factor 1*). Es wird vermutet, dass *Mlf1* ein Transkriptionsfaktor ist, der p53 aktiviert und den Zellzyklus arretiert (Yoneda-Kato et al., 2005). *Mlf1* ist im Primitivknoten im Stadium E7,5 exprimiert (Fig. 16C) und später im Stadium E10,5 in der

Aorta-Gonaden-Mesonephros(AGM)-Region (Fig. 16D). Ein weiteres Gen mit einer organisatorspezifischen Expression ist *Dncl2b* (Fig. 16H). Dieses Gen kann nur im Stadium E7,5 in der Primitivknotenregion detektiert werden. Da *Dncl2b* im Dyneinkomplex lokalisiert ist und nur in den monoziliären Zellen exprimiert ist, ist eine Funktion während der Ziliogenese wahrscheinlich. Ebenso ist *Cthrc1* in dieser Region im Stadium E8.5 exprimiert (Fig. 16E). Später kann eine Expression zusätzlich im Neuralrohr detektiert werden (Fig. 16F, G). *Cthrc1* ist ein sekretiertes Glykoprotein. Yamamoto et al. (2008) konnten zeigen, dass *Cthrc1* selektiv in der Aktivierung des planaren Zellpolaritäts(PCP)signalweges durch Wnt Proteine involviert ist. Obwohl *Cthrc1*^{-/-} Mäuse keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten aufweisen, zeigen Mäuse, die zusätzlich eine heterozygote Mutation eines weiteren PCP-Gens, *Vangl2*, tragen, phänotypische Defekte, die für Mutationen im PCP-Signalweg typisch sind, wie z.B. ein offenes Neuralrohr. *Nptx2* (*neuronal pentraxin 2*) ist ein weiteres Gen, welches wir im Screen identifizieren konnten. Im Stadium E7,75 ist *Nptx2* in der Mittellinie und in den Herzvorläuferzellen exprimiert (Fig. 16K). Einen Tag später E8,5 kann eine Expression nur im Ausflusstrakt des Herzens detektiert werden (Fig. 16L). Eine Analyse von Knock-out-Mäusen zeigte, dass *Nptx2* eine Funktion im Nervensystem und in der Augenentwicklung haben muss. In unserem Screen konnten alleine drei Gene identifiziert werden, die in der Organisatorregion exprimiert sind und wahrscheinlich eine Funktion während der Ziliogenese haben. Dies macht deutlich, wie eng die Organisatorregion und Zilien miteinander verknüpft sind und dass Studien am Primitivknoten eine gute Möglichkeit bieten, Fragestellungen zur Ziliogenese zu analysieren.

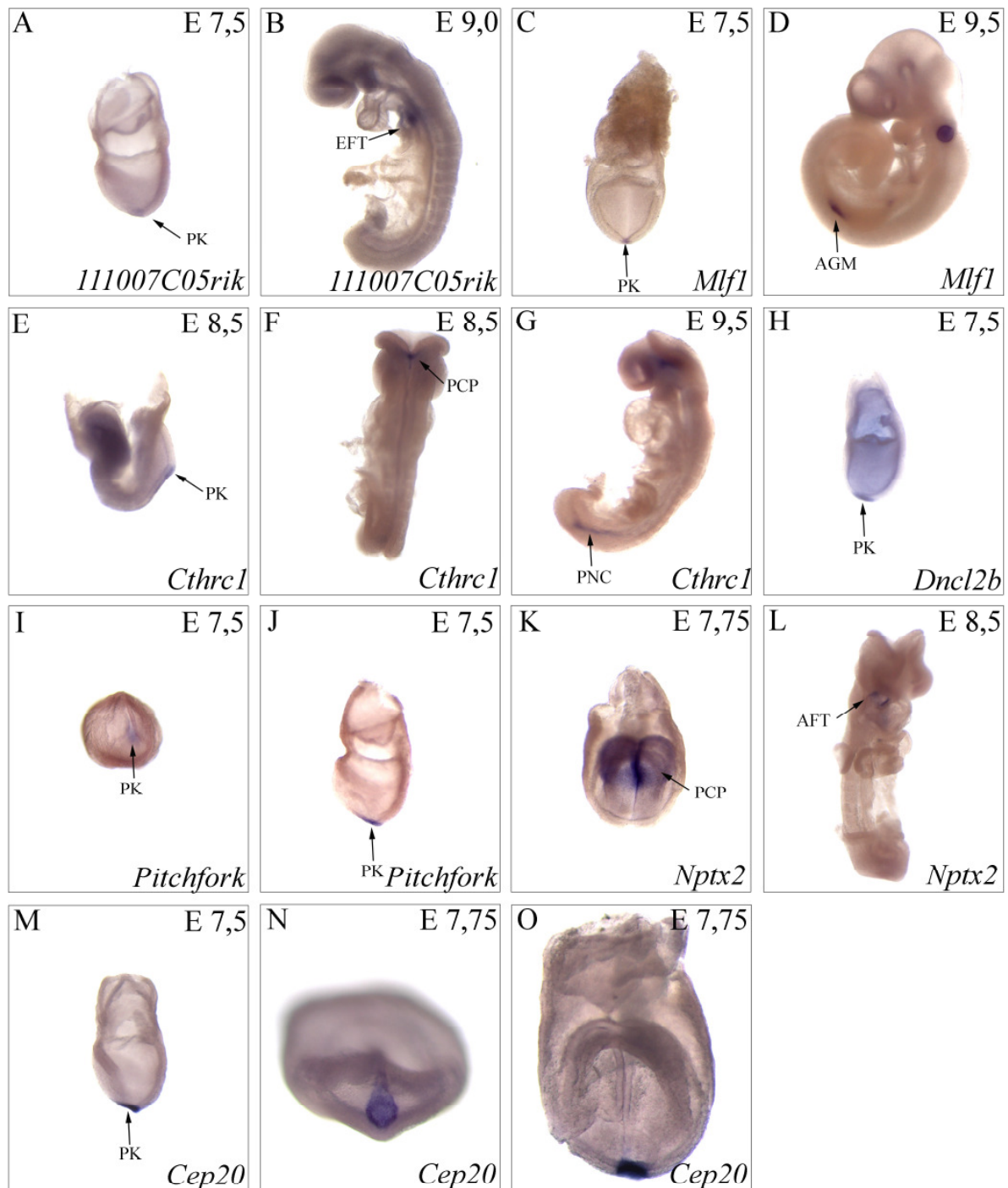


Fig. 16: Gene mit einer Expressionsdomäne im Primitivknoten

Bei *Dncl2b* (H), *Pitchfork* (I,J) und *Cep20* (M,N) kann nur im Primitivknoten im Stadium E7,5-7,75 eine Expression detektiert werden. Bei *111007C05rik* (A,B), *Mlf1* (C,D), *Cthrc1*(E-G) und *Nptx2* (K,L) ist auch zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung eine Expression vorhanden. PK=Primitivknoten, EFT=Einflusstrakt, AGM=Aorta-Gonaden-Mesonephros, PCP=Prächordalplatte, PNC=posteriore Notochord, AFT=Ausflusstrakt

3.1.6 Analyse neuer definitiver entodermaler Marker

Am Tag E6,5 umhüllt das viszerale Entoderm den Epiblasten und das extraembryonale Ektoderm (siehe Fig. 17A). Der Epiblast trägt zur Bildung des späteren Embryos bei, wohingegen der viszerale Dottersack zusammen mit dem Trophektoderm zur Bildung der fetalen Plazenta beiträgt. Am Tag E6,5 wird nun die Gastrulation eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt bildet sich der Primitivstreifen an der posterioren Seite des Embryos aus. Zellen durchwandern eine epheliale-mesenchymale Transition und wandern aus dem Epiblasten aus. Diese Zellen werden entweder zu definitivem Entoderm und verdrängen das darüberliegende viszerale Entoderm oder werden zu mesodermale Zellen, die nun eine Zellschicht zwischen dem Epiblasten und dem definitiven Entoderm bilden. Die Gastrulation schreitet bis zum Stadium E7,5 voran, und endet, wenn die Organisatorregion als Primitivknoten am distalen Ende des Embryos sichtbar wird. Nun ist dieser Prozeß abgeschlossen und der Embryo wird nicht mehr von viszeral entodermalen Zellen umgeben. Bis heute ist kein Gen bekannt, welches nur im definitiven Entoderm exprimiert ist. Das Interesse an solchen Markern ist allerdings für die Stammzellbiologie als diagnostischer Marker sehr groß. Um zu testen, ob die in unserem Screen identifizierten entodermalen Gene nur im definitiv entodermalen Gewebe exprimiert sind, da wir bei *Cldn4* und *Cpn1* nur im Stadium E7,5, allerdings nicht im Stadium E6,5 eine Expression in embryonalen Gewebe detektieren konnten, präparierten wir jeweils 100 *Wildtyp*-Embryonen im Stadium E6,5 und E7,5. Wir separierten den extraembryonalen Abschnitt von dem embryonalen Abschnitt, um davon ausgehen zu können, dass im embryonalen Teil im Stadium E6,5 viszerales Entoderm und im embryonalen Teil im Stadium E7,5 ein paar wenige viszeral entodermale Zellen aber vor allem definitives Entoderm vorhanden ist. Wir synthetisierten zunächst RNA aus den Gewebestücken und anschließend cDNA (Fig. 17A). Es wurden nun PCRs auf die unterschiedlichen cDNAs mit verschiedenen Primerpaaren, die an die *Cldn4*, *Cldn6*, *Cpm* und *Cpn1* cDNA binden, durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte ergab, dass *Cldn4* und *Cpn1* im embryonalen Gewebe im Stadium E6,5 nicht exprimiert sind, sondern erst im Stadium E7,5 (Fig 18). Dieses Ergebnis stimmt mit unseren Expressionsdaten überein, da wir erst im Stadium E7,5 bei beiden Markern eine embryonale Expression detektieren konnten. Da also im viszeralen Entoderm im Stadium E6,5 für *Cldn4* und *Cpn1* keine Expression detektiert werden konnte, aber im Stadium E7,5 beide Marker exprimiert sind, wird durch dieses Experiment deutlich, dass von den 13 Genen, die wir in dem Screen als entodermale Gene identifiziert haben, zwei davon ausschließlich in definitivem Entoderm exprimiert sind. Diese Gene können in der Zukunft als diagnostischer Marker in der Embryologie und Stammzellbiologie dienen.

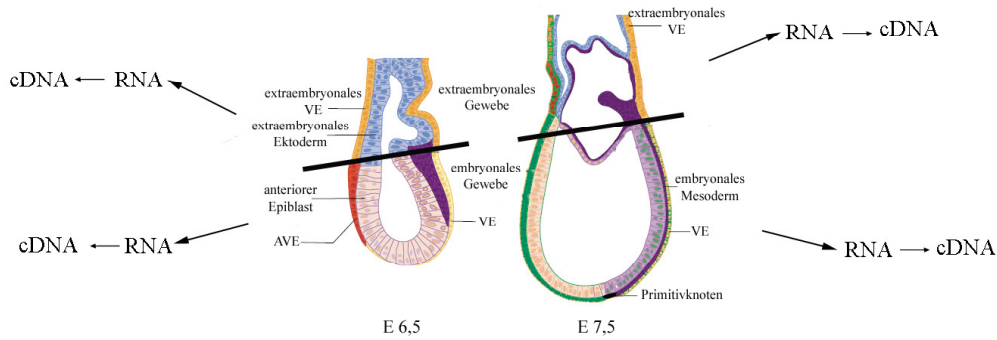


Fig. 17: Übersicht zum Versuchsaufbau um viszerale entodermale und definitiv entodermale Marker zu unterscheiden

Es wurden 100 *Wt* und *Foxa2*^{-/-} Embryonen im Stadium E6,5 und E7,5 präpariert. An den Embryonen wurde der extraembryonale vom embryonalen Abschnitt getrennt. Aus dem Gewebe wurde RNA gewonnen und anschließend cDNA synthetisiert

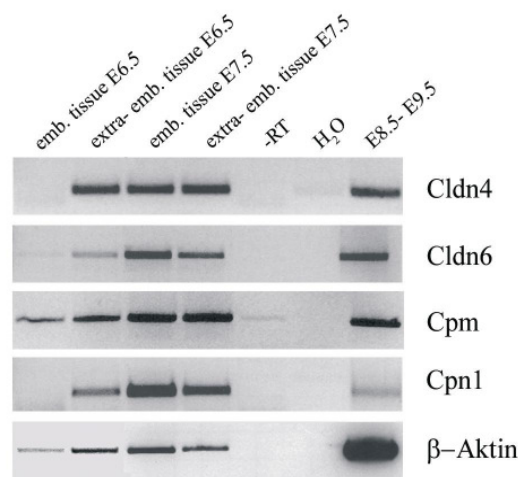


Fig. 18: Analyse vier entodermaler Marker mittels PCR

Es wurden PCRs auf vier verschiedenen cDNAs (embryonal und extraembryonal im Stadium E6,5, embryonal und extraembryonal im Stadium E7,5) mit fünf Primerkombinationen (*Cldn4*, *Cldn6*, *Cpm*, *Cpn1*, *β-Aktin*) durchgeführt. Die Analyse ergab, dass *Cldn6* und *Cpm* in allen Geweben im Stadium E6,5-E7,5 exprimiert sind. Dagegen sind *Cldn4* und *Cpn1* nicht im embryonalen Teil des Embryos im Stadium E6,5 exprimiert, sondern nur im extraembryonalen Teil des Embryos im Stadium E6,5 und im Stadium E7,5. Eine PCR auf *β-Aktin* wurde als Positivkontrolle durchgeführt.

3.2 Die molekulare und funktionelle Analyse von *Pitchfork*, einem neuen Organisationsorgan

3.2.1 Bioinformatische Analyse

Wir fokussierten uns auf einen bisher völlig unbekanntes Rikenklon 1700027A23rik aufgrund des spezifischen Expressionsmusters im Primitivknoten. Wir nannten dieses bisher funktionell nicht annotierte Gen *Pitchfork* (*Pifo*), welches spezifisch in den monoziliären „Pit“-Zellen im Primitivknoten exprimiert ist. Die „Pit“-Zellen spielen bei der Organisation des Embryos eine große Rolle. So besitzt jede Zelle in dieser Region ein motiles Zilium. Durch die Beweglichkeit der Zilien wird ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, der sogenannte „nodal-flow“. Dieser transportiert Morphogene des Nodal/TGF β -Signalweges auf die zukünftige linke Seite des Embryos, wodurch die Links-Rechts-Achse des Embryos determiniert wird. Durch die spezifische Expression von *Pifo* in diesen für die Entwicklung so wichtigen Zellen vermuteten wir auch eine wichtige Funktion von *Pifo* während der Entwicklung. Da nichts über dieses Gen bekannt war, analysierten wir zunächst *Pitchfork* bioinformatisch (in einer Kooperation mit Dr. Dietrich Trümbach, Abteilung für Entwicklungs-genetik). Mittels der Genomatrix-Software konnten zwei unabhängige Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden, aus denen zwei verschiedene RNA-Isoformen resultieren, die Proteine von 207 und 246 Aminosäuren kodieren (Fig. 19).

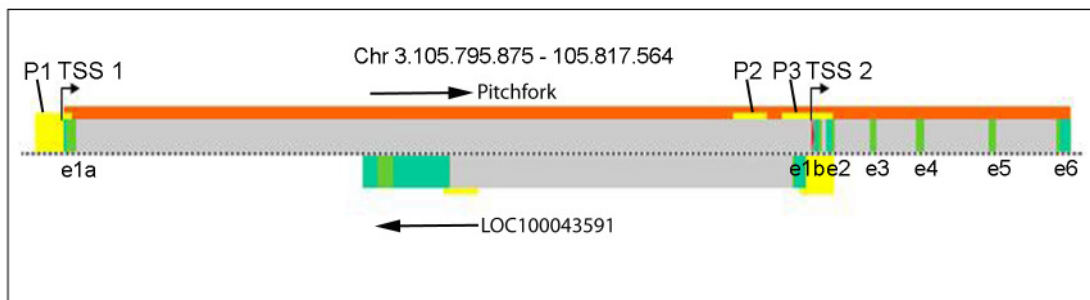


Fig. 19: Analyse von *Pitchfork* mittels Genomatrix Software

Mittels Genomatrix Software wurden drei unterschiedliche Promotoren ermittelt (P1-P3), aus denen zwei unterschiedliche mRNA-Transkripte von zwei unabhängigen Transkriptionsstartpunkten (TSS1 und TSS2) resultieren

Ein weiterer Grund, neben der spezifischen Expression, weshalb wir uns für die funktionelle Analyse dieses Rikenklones entschieden war, dass *Pitchfork* unter den Chordatiern sehr hoch

konserviert ist. Die chorda dorsalis ist das ursprüngliche innere Achsenskelett aller Chordatiere, auch Notochord genannt. Das Notochord ist eine transiente Struktur und wird später in der Entwicklung durch die Wirbelsäule ersetzt. Da nun Pifo unter den Chordatiere hoch konserviert ist und in keinem anderen Organismus vorkommt, lag die Vermutung nahe, dass Pifo bei der Bildung des Notochords eine Rolle spielen könnte. Dies wäre zudem konsistent mit der Identifizierung von Pifo als potentiell Zielgen von *Foxa2*. Die bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass die lange Proteinisoform eine N-terminale coiled-coil Domäne beinhaltet (Fig. 20; gestrichelte Linie). In beiden Protein-Isoformen ist eine DUF1309-Domäne zu finden (Domain of unknown function; Fig. 20; unterstrichene Sequenz).

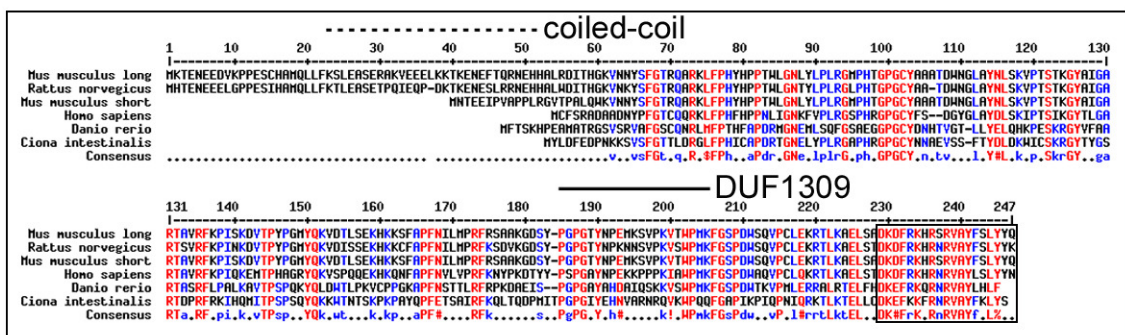


Fig. 20: Pifo ist unter den Chordatiere hoch konserviert

Der Vergleich der Aminosäuresequenz mehrerer Spezies ergab eine evolutionäre Konservierung Pitchforks in Chordaten und eine hohe Konservierung der C-terminalen Region. Die N-terminale coiled-coil-Domäne ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet, die DUF1309-Domäne durch die durchgezogene Linie. Die durch einen Kasten markierte Region stellt das Epitop für die Antikörper Produktion dar.

Diese Domäne ist hoch konserviert und kann unter anderem auch in drei Proteinen einer Genfamilie gefunden werden: *Odf3* (Outer dense fiber 3), *Odf3-like1*, und *ODF3-like2* (Fig. 21). Es konnte gezeigt werden, dass *Odf2* und *Odf3* in verschiedenen, aber sich überlappenden Regionen im Spermienschwanz exprimiert sind und deren Aufgabe es ist, dort axonemale Mikrotubuli zu stabilisieren (de Carvalho et al., 2002). *Odf2* hat aber zusätzlich noch eine weitere wichtige zellbiologische Funktion. Für die Basalkörperreifung in Zellen, die ein primäres Zilium bilden wollen, spielt *Odf2* eine große Rolle (Ishikawa et al., 2005).

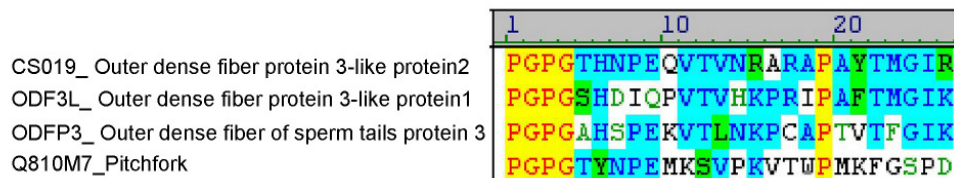


Fig. 21: Die DUF1309-Domäne von Pitchfork ist zu der Domäne der ODF-Familie hoch konserviert

Ein HMM-Vergleich der DUF1309-Domäne von Pitchfork mit Familienmitgliedern der ODF-Familie. Die Domäne endet mit der Aminosäure an Position 21. Fünf Aminosäuren wurden hinzugefügt, um den Vergleich zu vervollständigen.

3.2.2 Generierung zweier affinitätsaufgereinigter Antikörper gegen Pitchfork

Um endogenes Pitchfork *in vivo* und *in vitro* genauer analysieren zu können, wurden von der Firma Pineda (Berlin) zwei polyklonale Antikörper aus zwei Kaninchen gegen die konservierte Region am C-terminalen Ende synthetisiert (Fig. 20; eingerahmte Sequenz). Da das C-terminale Ende in den miteinander verglichenen Chordaten hoch konserviert war, entschieden wir uns für die Generierung der Antikörper gegen diese Region, um Antikörper zu erzeugen, die das humane und murine Pifo erkennen. Es wurde die Spezifität eines der beiden affinitätsaufgereinigten Antikörper (PifoI) im Westernblot getestet. Dazu wurde eine DNA-Sequenz amplifiziert und im Leserahmen vor die lange Pifo-Isoform kloniert, die für ein 5kDa große Affinitätskassette (TAP, tandem affinity purification) (Glöckner et al., 2007) kodiert. Dieses TAP-Pifo-Konstrukt wurde in HEK293T-Zellen überexprimiert, und 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Im Westernblot konnte eine spezifische Bande bei der erwartenden Größe (~33kDa) detektiert werden. Um nun die Spezifität des Antikörpers zu testen, wurde die Membran, auf die die Proteine transferiert worden waren, vor der Antikörperinkubation mit dem Peptid für 2h bei Raumtemperatur geblockt. Nach anschließender Antikörperinkubation konnte auf diesem Blot keine Bande mehr detektiert werden, da der Antikörper an das Peptid mit dem spezifischen Epitop gebunden hatte (Fig. 22A).

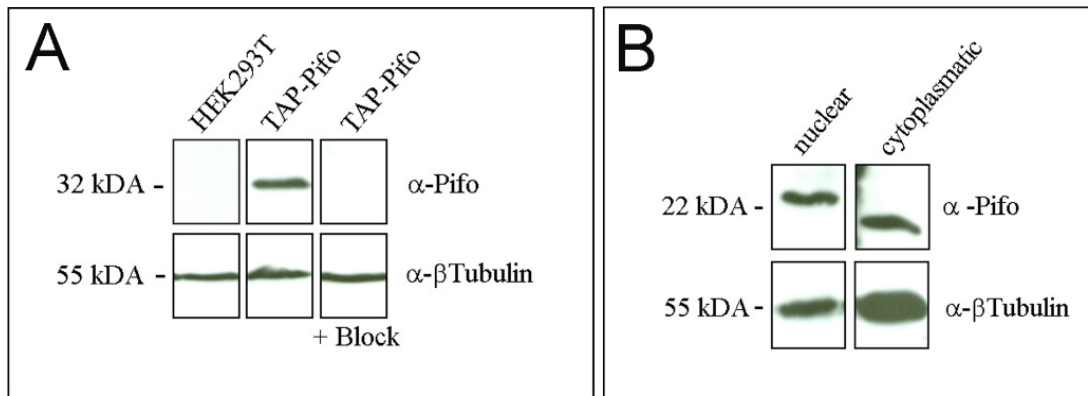


Fig. 22: Analyse des Pitchfork Proteins und der generierten Antikörper

Ein Lysat von HEK293T-Zellen, die zuvor mit TAP-tag-Pifo transfektiert worden waren, wurde mittels Western Blot analysiert. Der affinitätsaufgereinigte Pifo-Antikörper detektiert eine spezifische Bande bei ~33 kDa, die nicht mehr detektiert werden kann, nachdem die Membran zuvor mit dem Peptid, das das Epitop beinhaltet, geblockt wurde (A). Mittels einer nuklearen und zytoplasmatischen Fraktion eines Testis-Lysats können zwei unterschiedliche Pifo-Isoformen mit Hilfe einer Western Blot-Analyse detektiert werden (B).

3.2.3 Analyse der zwei unterschiedlichen Pitchfork Isoformen

Die bioinformatische Analyse von *Pifo* ergab, dass zwei Promotoren die Expression zweier mRNA-Isoformen regulieren. Die längere Isoform wird in ein Protein translatiert, das eine coiled-coil-Domäne besitzt, die besonders häufig in zentrosomalen Proteinen zu finden ist. Die kurze Isoform (Δ cc-Pifo) wird dagegen in ein Protein translatiert, dem diese Domäne fehlt. Ab dem zweiten Exon unterscheiden sich beide Transkripte allerdings nicht, daher besitzen auch beide Isoformen die DUF1309-Domäne.

Um zu analysieren, ob die zwei unterschiedlichen Pitchfork-Isoformen in unterschiedlichen Gewebe oder unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen, wurde adulter Testis lysiert und die zytoplasmatische und nukleare Fraktion getrennt. Im Western Blot konnten nun zwei unterschiedlich große Proteinbanden in den zwei Fraktionen detektiert werden (Fig. 22B). Die Größen der beiden Proteine entsprachen ungefähr der zu erwartenden Größen von 28,16 kDa und 23,43 kDa. In der nuklearen Fraktion wurde die lange Isoform, in der zytoplasmatischen Fraktion die kurze Isoform detektiert. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass die coiled-coil-Domäne für die Lokalisation im Nukleus verantwortlich ist und bestätigt die bioinformatische Analyse, dass zwei verschiedene Promotoren ein langes und ein kurzes *Pifo*-Transkript im adulten Testis transkribieren sowie zwei Proteinisoformen in unterschiedlichen Zellkompartimenten translatiert werden.

3.2.4 Die coiled-coil Domäne von Pitchfork ist für die Kernlokalisierung verantwortlich

Um zu analysieren, welche der Proteindomänen für die subzelluläre Lokalisation verantwortlich ist, klonierten wir ein GFP-Konstrukt N-terminal an die lange (siehe Fig.19; *mus musculus long*) und kurze Pifo-Isoform (siehe Fig. 20; *mus musculus short*). Beide Konstrukte wurden dann in HEK293T- und NIH3T3-Zellen transfektiert und nachfolgend die GFP-Pifo und GFP- Δ ccPifo-Lokalisation während des Zellzyklusses untersucht (Fig. 23 und Fig. 24), um zu erkennen, ob sich während des Zellzyklus die subzelluläre Lokalisation verändert. Beide Zelllinien zeigten ähnliche Resultate. Die Zellen wurden nach immunohistochemischen Färbungen analysiert. Dies ergab, dass GFP-Pifo in Interphasezellen im Nukleus lokalisiert ist (Fig. 23A-C). Sobald die Zelle in die Prophase geht und sich die Kernhülle auflöst, ist die lange Pifo-Isoform nicht länger ausschließlich nuklear sondern auch zytoplasmatisch lokalisiert. Zusätzlich kann auch eine Lokalisation am Zentrosom detektiert werden (Fig. 23A-C, G-J). Die Lokalisation von GFP-Pifo am Zentrosom kann zu einem späteren Zeitpunkt der Mitose nicht mehr detektiert werden (Fig. 23J-L). Zu diesem Zeitpunkt ist GFP-Pifo gleichmäßig im Zytoplasma lokalisiert.

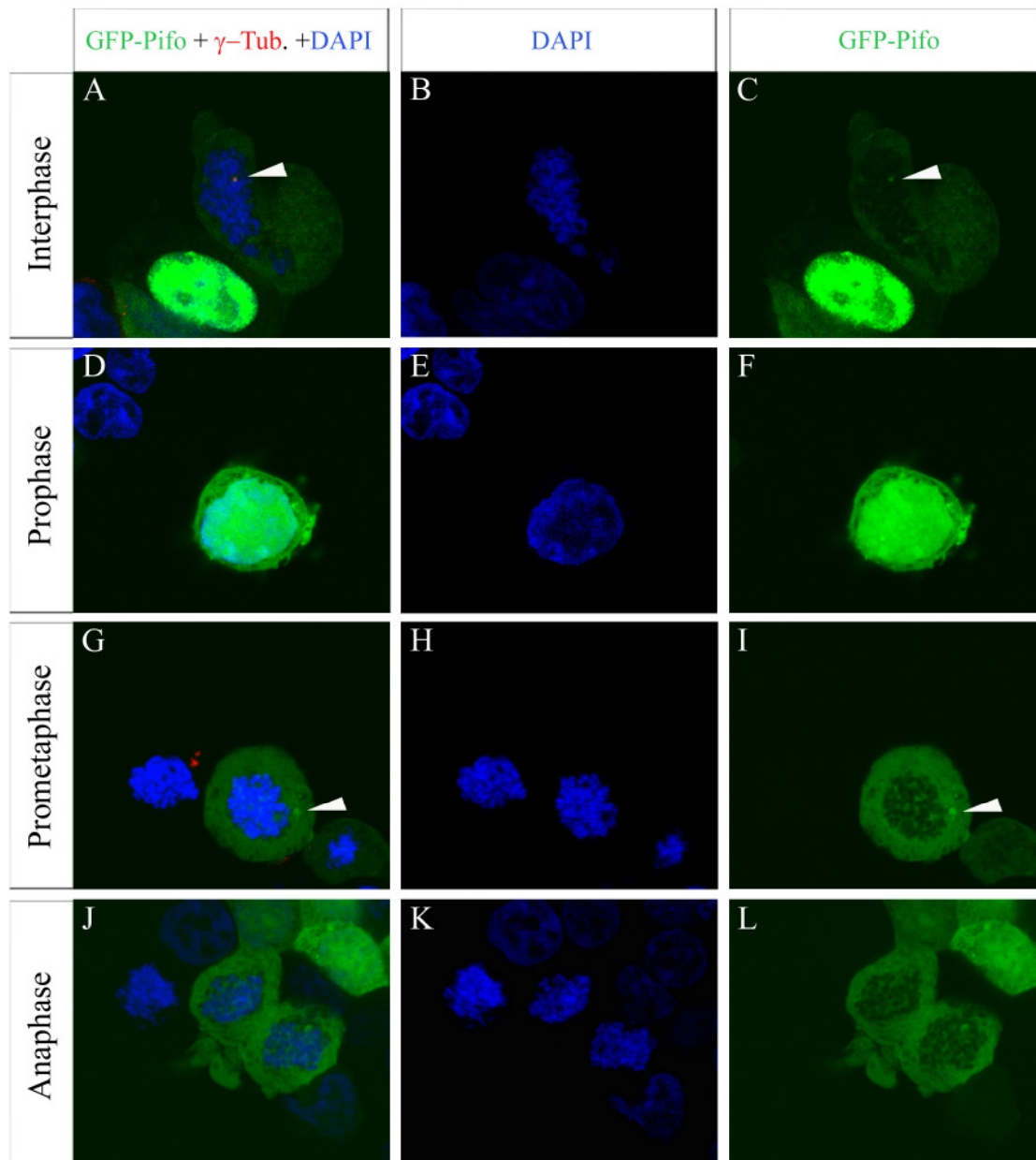


Fig. 23: Lokalisation von GFP-Pifo während des Zellzyklus

HEK293T-Zellen wurden mit GFP-Pifo transfektiert, immunohistochemisch mit γ -Tubulin angefärbt und die Lokalisation von GFP-Pifo während des Zellzyklus analysiert. Analyse der Lokalisation in Interphasezellen (A-C), Prophasezellen (D-F), Prometaphasezellen (G-I) und Anaphasezellen (J-L).

Im Gegensatz dazu ist das Konstrukt ohne die coiled-coil-Domäne (GFP- Δ ccPifo) bereits in Interphasezellen zytoplasmatisch lokalisiert (Fig. 24A). Auch hier ist jedoch die kurze Isoform nur in Zellen, die sich in der Prophase befinden am Zentrosom lokalisiert (Fig. 24A-B). Im weiteren Verlauf des Zellzyklus ist die Lokalisation von GFP-Pifo und GFP- Δ ccPifo

ähnlich (Fig. 24C). Diese Überexpressionsanalyse von der langen und kurzen Pifo-Isoform machen deutlich, dass die coiled-coil-Domäne von *Pitchfork* für die Kernlokalisation verantwortlich ist. Zusätzlich könnten diese Ergebnisse daraufhin deuten, dass die DUF-Domäne für die Assoziation mit den Zentrosomen entscheidend ist.

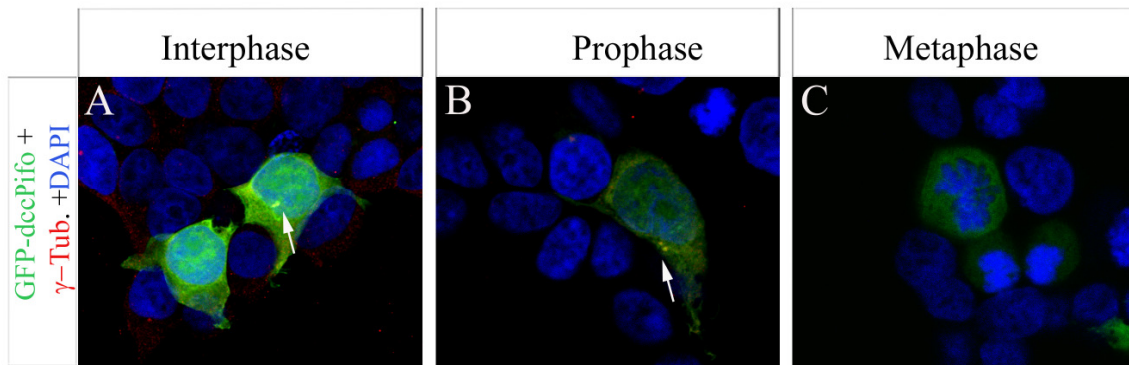


Fig. 24: Lokalisation von ΔccGFP-Pifo während des Zellzyklus

HEK293T-Zellen wurden mit ΔccGFP-Pifo transkektiert, immunohistochemisch mit γ -Tubulin angefärbt und die Lokalisation von GFP-Pifo während des Zellzyklus analysiert. Analyse der Lokalisation in Interphasezellen (A), Prophasezellen (B) und Metaphasezellen (C).

3.2.5 Pitchfork hat eine reprimierende Funktion im Nukleus

Da in der nuklearen Fraktion des Testis-Lysats die kurze Pifo-Isoform detektiert werden konnte (Siehe Fig. 22B), stellte sich nun die Frage, ob Pitchfork eine Funktion im Nukleus, z.B. als reprimierender oder aktivierender kotranskriptioneller Faktor hat. Da Pitchfork keine offensichtliche DNA-Bindungsdomäne hat, kann Pifo höchstens als Transkriptionsfaktor koregulieren. Diese Fragestellung wurde anhand eines Dual-Luciferase®-Reporter-Assays (Promega) analysiert. Bei dieser Methode kann die Genregulation, primär die transkriptionelle Kontrolle eines Gens bestimmt werden. Dazu wurde der pGL3-Enhancer (Promega) Vektor verwendet. Dieses Reporterkonstrukt beinhaltet fünf Kopien der Gal4-Bindestelle und eine SV40-Enhancer-Region, welche hinter einem Luciferase-Gen und einem poly(A)-Signal lokalisiert ist. Das zu analysierende Gen wird hinter einen starken CMV-Promotor und einer Gal4-Bindungsdomäne in einen Vektor kloniert und in die Zellen kotransfiziert. Nach der Bindung des zu analysierenden Gens mit seiner Gal4-Bindungsdomäne an das Reporterkonstrukt wird die Luciferase aktiviert.

Die Messung der Biolumineszenz wird quantifiziert und ist proportional zur transkriptionellen Aktivität des zu analysierenden Gens. Um nun zu analysieren, ob Pitchfork eine regulatorische Funktion im Nukleus hat, wurde Pifo hinter einen starken CMV-Promotor mit einer Gal4 Bindungsdomäne kloniert (pCMV-Gal4-Pifo) (Fig. 25C). Es wurden HEK293T-Zellen mit dem pGL3-Enhancer alleine transfektiert, um die Basalaktivität zu messen (Fig. 25A), der pGL3-Enhancer mit einem starken Repressor (pCMV-Gal4-BcoR) als Positivkontrolle kotransfektiert (Fig. 25B) und ebenso der pGL3-Enhancer mit dem pCMV-Gal4-Pifo Konstrukt in verschiedenen Konzentrationen cotransfektiert (Fig. 25C). Die Zellen wurden nach 30h lysiert und anschließend sofort am Luminometer analysiert.

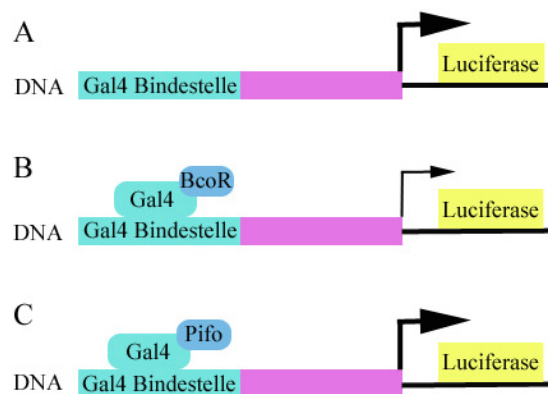


Fig. 25: Verwendete Konstrukte, um eine nukleäre Funktion von Pitchfork zu analysieren

Der pGL3-Enhancer wurde als Reporterkonstrukt verwendet, eine Transfektion in HEK293T-Zellen, spiegelt die Basalaktivität wieder (A). Als Positivkontrolle wurde zum Reporterkonstrukt ein starker Repressor kotransfektiert (B). Ebenso wurde zum Reporterkonstrukt CMV-Pifo-Gal4 kotransfektiert (C), um eine regulatorische Funktion zu analysieren. HEK293T-Zellen wurden mit Lipofectamin transfektiert, und 30h nach der Transfektion lysiert und am Luminometer ausgewertet.

Die gemessene Firefly-Luciferase-Aktivität wurde mit der Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert und ausgewertet (Fig. 26). Wie zu erwarten zeigte die Kotransfektion mit dem starken Repressor BcoR (Huynh et al., 2000) eine bis zu 10fach verminderte Aktivität des Luciferase-Enzyms. Eine Kotransfektion mit einem Kontrollplasmid zeigte, dass die Luciferase-Aktivität durch den Vektor nicht beeinträchtigt war. Eine Kotransfektion mit dem pCMV-Gal4-Pifo-Konstrukt in verschiedenen Konzentrationen wies nach, dass Pifo eine starke reprimierende Funktion hat. Die Renilla-Aktivität war dabei nicht beeinflusst, woraus geschlossen werden konnte, dass keine generellen Auswirkungen auf den Zellmetabolismus oder apoptotischen Effekte vorhanden war. Eine Kotransfektion der gleichen Konzentration an BcoR und Pifo zeigte, dass Pifo eine dreifach stärkere reprimierende Funktion hat als der

BcoR-Repressor. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pitchfork im Nukleus eine stark reprimierende Funktion hat. Um diese Funktion im Detail zu analysieren, werden jedoch weitere Analysen nötig sein, da keine DNA-Bindungsdomänen in der Pitchfork-Sequenz gefunden werden konnten. Auch durch die Tatsache, dass die kurze Isoform im Nukleus in der Western Blot-Analyse detektiert werden konnte, entstehen weitere Fragestellungen, z.B. inwieweit das Fehlen der coiled-coil-Domäne für diese reprimierende Funktion verantwortlich ist.

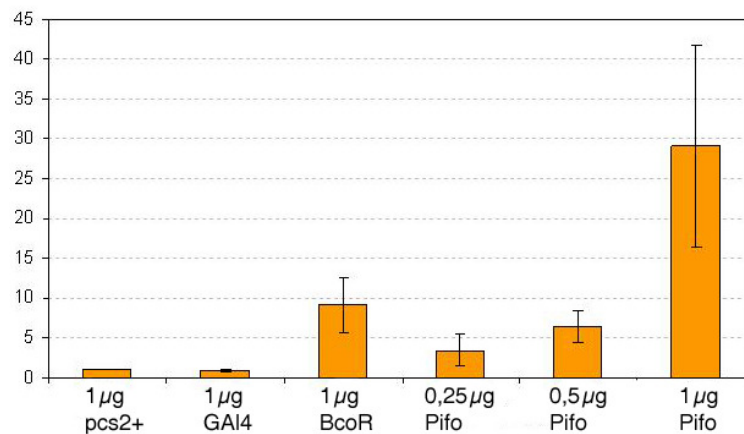


Fig. 26: Pitchfork hat im Nukleus eine reprimierende Funktion

Auswertung der Luciferase-Aktivität am Luminometer. kotransfektion eines Kontrollplasmids (pcs2+) zeigt keine veränderte Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Reporterkonstrukt (Gal4). Kotransfektion von 1µm BcoR zeigt eine bis zu 10fache reprimierende Aktivität der Luciferase-Aktivität. Kotransfektion verschiedener Konzentrationen an Pitchfork zeigt eine starke reprimierende Funktion (je nach Konzentration 5 bis 30fach). Es wurden drei unabhängige Experimente zusammengefasst. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2.6 Analyse der subzellulären Lokalisation von Pitchfork

Um die subzelluläre Lokalisation von Pitchfork in der Ultrastruktur zu analysieren, wurde auf gastrulierenden Embryonen E7,5 eine Immunfärbung mit goldgekoppelten Zweitantikörper durchgeführt. Die Region des Primitivknotens wurde anhand eines Transmissionselektronenmikroskops (EM10CR Zeiss) mithilfe von Ultradünnschnitten genauer analysiert (Fig. 27) (mit Hilfe von Frau Jennen, Abteilung für Zytometrie). Die ultrastrukturelle Analyse ergab, dass das Pifo-Protein im Nukleus, im Golgiapparat und in Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerkes lokalisiert ist (Fig. 27A). Zusätzlich konnte auch eine Lokalisation an der Plasmamembran, in der Nähe der ziliären Axoneme detektiert werden (Fig. 27B-C).

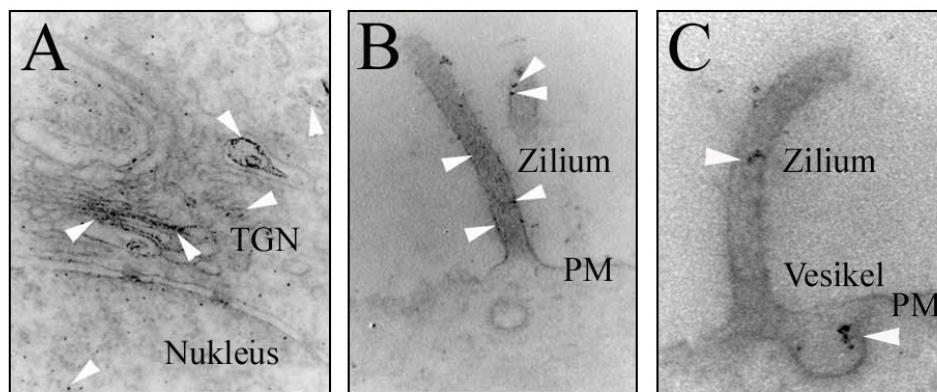


Fig. 27: Subzelluläre Lokalisation von Pitchfork

Die ultrastrukturelle Analyse ergab, dass Pitchfork im trans-golgi-Netzwerk und im Nukleus (A), entlang der Zilien (B) und in Vesikeln (C) exprimiert ist. TGN=Trans-golgi-Netzwerk, PM=Plasmamembran

Immunofärbungen mit fluoreszierenden Zweitantikörpern auf adulten Testis ergab zudem, dass Pifo entlang der stabilisierten Mikrotubuli von Spermienschwänzen in adulten Spermatozyten in Form von kleinen Partikeln lokalisiert ist (Fig. 28A, B). Fluoreszenzmarkierte Immunofärbungen von Pifo auf Mausembryonen E7,5 zeigten ebenso, dass in der Primitivknotenregion in den sogenannten „Pit“-Zellen Pifo ebenfalls in kleinen Partikeln an den stabilisierten Mikrotubuli und den primären Zilien lokalisiert ist (Fig. 28C, D). Da die Pifo-Lokalisation große Ähnlichkeiten mit der Lokalisation der intraflagellaren Proteinen und den damit assoziierten Mikrotubuli-Motorproteinen zeigt (Rosenbaum und Witman, 2002) und zudem in Studien von McClintock et al., 2008 gezeigt werden konnte, dass *Pifo*-mRNA in anderen ziliären Gewebe hoch exprimiert ist, deutet dies auf eine Funktion von *Pifo* während der Ziliogenese hin.

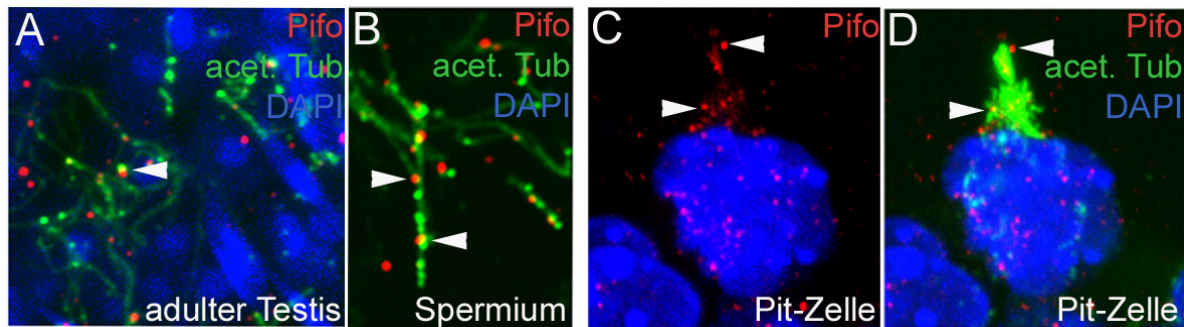


Fig. 28: Pitchfork akkumuliert in Vesikeln an stabilisierten Mikrotubuli

Koimmunohistochemische Färbungen von adultem Testis und den Zellen im Primitivknoten im Mausembryo E7,5 mittels konfokaler Mikroskopie (einzelne optische Schnitte, 63x Vergrößerung, 3x Zoom) ergab, dass Pifo in Vesikeln entlang der Spemischwänze (B) des adulten Maustestis (A) und entlang der stabilisierten Mikrotubuli der Zellen im Primitivknoten exprimiert ist (C, D). DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol, acet. Tub.=acetyliertes Tubulin,

3.2.7 Generierung des Pitchfork^{lacZ/+} Allels

Um die Funktion von Pitchfork *in vivo* im Detail analysieren zu können, wurde eine NLS-lacZ (nuclear localisation sequence β -Galaktosidase)-Kassette in das offene Leseraster des zweiten Exons kloniert, um den kodierenden Leserahmen vom zweiten bis zum sechsten Exon zu entfernen (Fig. 29). Dazu wurde ein Vektor (wie in Fig. 29 dargestellt und detailliert in Material und Methoden 5.2.1.5. beschrieben) kloniert. F1-ES-(embryonale Stammzellen)-Zellen (IDG3.2; Hitz et al., 2007) wurden mit dem AscI-linearisierten Vektor pL254 Pifo-NLS-lacZ-neo elektroporiert. Anschließend wurden die elektroporierten Klone mit Neomycin (300 μ g/ml G418) über 7 Tage hinweg selektioniert. Die Neomycin resistenten Klone wurden individuell expandiert. Um die homologe Rekombination an dem *Pifo*-Lokus zu überprüfen, wurden die ES-Klone per Southern Blot analysiert (Fig. 29B, C). Zunächst wurde die genomische DNA enzymatisch verdaut (für die 3'Probe mit BglII und für die interne lacZ-Probe mit NcoI) und die DNA auf eine Membran transferiert. Nun wurden die ES-Zellen mit einer 3'-Probe, die außerhalb der homologen Region bindet, und einer internen lacZ-Probe hybridisiert. Korrekte in den *Pifo*-Lokus rekombinierte Klone zeigen einen RFLP (restriction fragment length polymorphism) von 9,5kb, während das *Wildtyp*-Allel bei 10,5kb zu detektieren ist (Fig. 29B). Um zu zeigen, dass der Vektor nicht mehrfach in das Genom integriert hatte, wurde eine zusätzliche Southern Blot-Analyse mit der internen lacZ-Probe durchgeführt. In dieser Southern Blot-Analyse zeigten die positiven Klone nur in dem Falle einer einmaligen Rekombination in den *Pifo*-Lokus eine Bande der Größe 6,5 kb (Fig. 29C).

Es wurden drei homolog rekombinierte ES-Zellen identifiziert und diese in C57Bl/6 Blastocysten injiziert, um Chimären zu generieren.

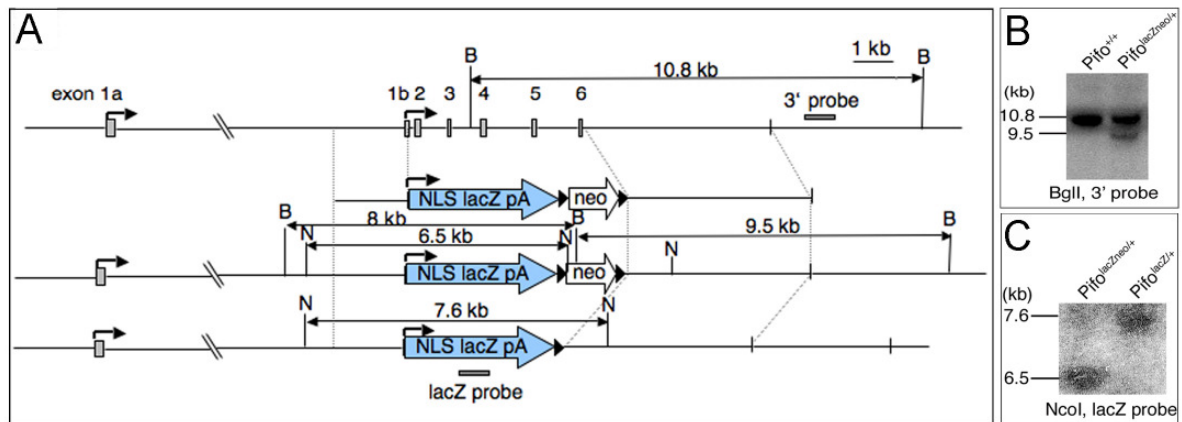


Fig. 29: Generierung des *Pitchfork*^{lacZ/+} Allels

Eine NLS-lacZ-Kassette wurde in das offene Leseraster des zweiten Exons kloniert, um den kodierenden Leserahmen vom zweiten bis zum sechsten Exon zu entfernen. ES-Zellklone wurden mit Hilfe einer externen 3'-Probe und einer internen lacZ-Probe verifiziert. Dazu wurde die DNA mit B (BglII) und N (NcoI) verdaut (A). Southern Blot-Analyse der ES-Zellen, die mit BglII verdaut und mit einer externen 3'-Probe hybridisiert worden waren, zeigen ein Wildtyp-Allel 10,5kb und ein rekombiniertes Pifo-Allel 9,5kb groß (B). ES-Zellen, die mit NcoI verdaut und mit einer internen Probe hybridisiert worden waren, zeigen ein rekombiniertes Allel bei 7,6 kb und ein deletiertes Neomycin-Allel bei 6,5kb (C).

3.2.8 Haploinsuffizienz von *Pitchfork* führt zur männlichen Infertilität

Mit Hilfe der Blastocysteninjektion wurden 13 Chimären aus drei verschiedenen ES-Zellen generiert. Aufgrund ihrer Fellfarbe lag die Vermutung nahe, dass die ES-Zellen nur zu einem geringen Prozentsatz zu den generierten Chimären beigetragen hatten. Mit der Verpaarung der Männchen mit C57Bl/6 Weibchen wurde deutlich, dass bis auf drei Männchen alle Chimären steril waren. Bei zwei von den nicht-sterilen Chimären führten nur Spermien mit dem Wildtyp-Allel zur Befruchtung. Ein Männchen dagegen trug zur Keimbahn bei, was sich in der braunen Fellfarbe der Neugeborenen zeigte, aber dieses Männchen vererbte nur das Wildtyp-Allel, nie das mutierte Allel (n=32). Um verstehen zu können, warum die *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimären niemals das mutierte Allel durch die Keimbahn vererben konnten, analysierten wir die Spermien einer Chimäre genauer. Zunächst detektierten wir endogenes Pifo in den Spermenschwänzen, um zu zeigen, ob *Pitchfork* dort überhaupt eine Funktion haben kann (Fig. 30A). Immunofärbungen mit acetylierten Tubulin und β -Galactosidase zeigten anschließend, dass die Spermien mit dem mutierten Allel einen schweren Defekt in

den Spermenschwänzen aufwiesen (Fig. 30B-E). So besaßen Spermien mit einer niedrigeren Expression an *Pitchfork* verkümmerte oder duplizierte Spermenschwänze, wohingegen *Wildtyp*-Spermien stets nur einen Spermenschwanz besaßen (Fig. 30A). Durch das Motilitätsproblem der Spermien liegt die Vermutung nahe, dass die Spermien mit dem mutierten Allel die Oocyte nicht erreichen können und somit das mutierte Allel nicht weitervererbt werden konnte. Derzeit analysieren wir diesen Phänotyp im Detail.

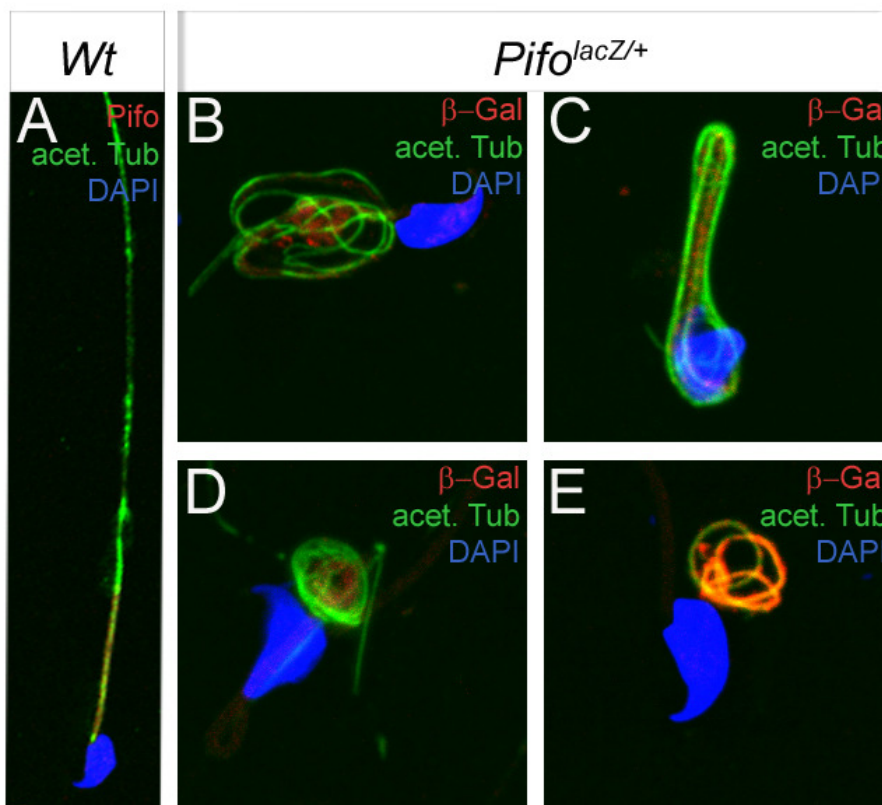


Fig. 30: Haploinsuffizienz von Pitchfork führt zur männlichen Infertilität

Koimmunohistochemische Färbungen an Spermien einer *Wt*-Maus (A) und einer *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimäre (B-E) ergaben, dass Spermien mit einem geringeren Pegel Defekte in den Spermenschwänzen aufweisen (B-E), wodurch die Motilität dieser Spermien beeinträchtigt ist. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (einzelne optische Schitte, 63x Vergrößerung). DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol, acet. Tub.=acetyliertes Tubulin, β -Gal= β -Galaktosidase

3.2.9 Analyse des Pitchfork- lacZ-Reporterallels

Um zu überprüfen, dass die *Pifo-lacZ*-Expression mit der endogenen Pifo-Protein-Lokalisation übereinstimmt, wurde die lacZ-Expression in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimären

analysiert. Zunächst wurde die lacZ-Expression im adulten Testis mit der Pifo-Protein Lokalisation in den Spermatogonien bestätigt (Fig. 31).

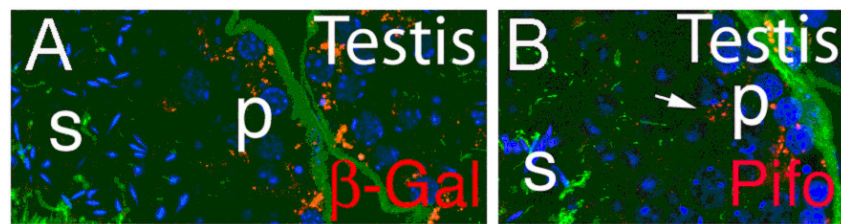


Fig. 31: Vergleich Pifo-lacZ-Expression mit der endogenen Pifo-Protein-Lokalisation im Testis

Vergleich einer β -Galactosidase-Färbung eines Testis einer *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimäre und immunhistochemische Färbungen von Pifo in einem *Wt*-Testis ergab, dass die *Pifo*-lacZ-Expression mit der endogenen Pifo-Protein-Lokalisation übereinstimmt. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (einzelne optische Schitte, 63x Vergrößerung, 3x Zoom). DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol, β -Gal= β -Galaktosidase, p=Vorläuferzellen, s=Spermien

Die Analyse eines sieben Tage alten Neugeborenen (P7) ergab eine hohe lacZ-Expression in der Niere, im Urogenitaltrakt, im Pankreas und in den Testes (Fig. 32H). Mittels tetraploider Aggregation wurden Embryonen generiert, die ausschließlich aus *Pitchfork*^{lacZ/+} ES-Zellen entstanden waren und analysierten die lacZ-Expression dieser. Am Tag E12,5 ist Pitchfork im Darm und Pankreas (Fig. 32B), in den Keimzellen (Fig. 32C), in der Wachstumszone der Lunge (Fig. 32D), in den Motoneuronen (Fig. 32E), in der Bodenplatte des Neuralrohrs und dem Notochord (Fig. 32F), in spezifischen Regionen des Gehirns, wie z.B. dem Hippocampus (Fig. 32G) und in der apikalen Ektodermalzone (AER) der vorderen Extremitäten in einem Gradienten und in der Wachstumszone exprimiert (siehe Fig. 33A). Die Analyse ergab, dass die β -Galactosidase-Aktivität des *Pitchfork*^{lacZ/+}-Reporterallels mit der endogenen Proteinlokalisierung von Pitchfork übereinstimmt. Diese Daten stimmen auch mit denen von McClintock et al., 2008 überein, in denen gezeigt wurde, dass Pitchfork mRNA in ziliären Geweben exprimiert ist, wie z.B. Lunge, Niere und Hoden. Zusätzlich ergab die Analyse der lacZ-Expression, dass Pitchfork nur in Geweben mit Organisatorfunktion und hoher *Shh*-Aktivität exprimiert ist, wie z.B. in der Bodenplatte des Neuralrohrs, in der AER-Region der Extremitäten und in den spezifischen Gehirnregionen, was daraufhin deutet, dass Pitchfork eine Funktion in der Musterbildung des frühen Embryos haben könnte und unter Umständen eine molekulare Funktion in der Shh-Signalweiterleitung besitzt.

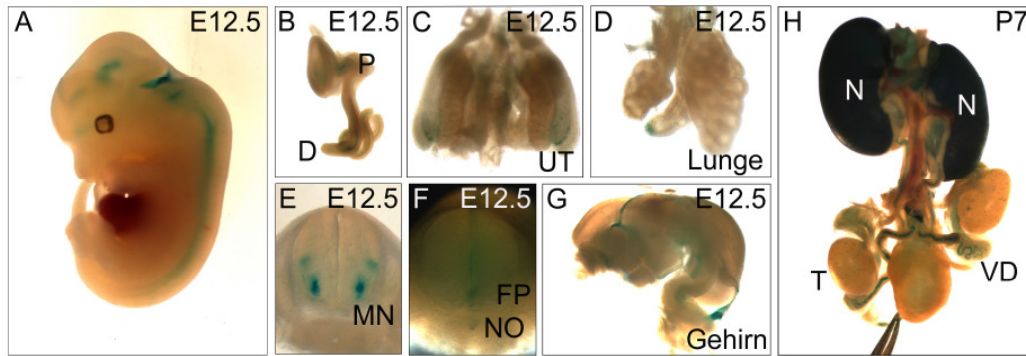


Fig. 32: Analyse des Pitchfork-lacZ-Reporterallels

Analyse der lacZ Expression in tetraploiden *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen im Stadium E12,5 (A-G) und einer P7 alten *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimäre. Eine lacZ-Expression kann im Pankreas (P), Darm (D) (B), im Urogenitaltrakt (UT) (C), in der Lunge (D), in den Motoneuronen (MN) (E), in der Bodenplatte (floorplate, FP) und dem Notochord (NO) und in spezifischen Gehirnregionen (G) detektiert werden. Später in der Entwicklung in der Niere (N), dem Testis (T) und dem Vas deferens (VD) (H).

3.2.10 *Pitchfork*^{lacZ/+} Embryonen entwickeln postaxiale Polydaktylie

Die Analyse des *Pitchfork*-lacZ-Reporterallels ergab eine spezifische Expression von Pitchfork in einem Gradienten in der apikalen Ektodermalzone (AER) und in der polarisierenden Region (ZPA, zone of polarising activity) der Vorderextremitäten im Stadium E10,5 (Fig. 33A). Ebenso konnten wir auch endogenes Pitchfork in dieser Region detektieren (Fig. 33B). Diese Regionen sind wichtige Organisationszentren für die Entwicklung der Extremitätenachsen. Die Organisation der Extremitäten ist ein komplexer Vorgang, die durch Wechselwirkung mehrerer Signale determiniert wird. So ist *Sonic Hedgehog* (*Shh*) ein wichtiges Signalmolekül, welches die Proliferation und die antero-posteriore Musterbildung der Extremitäten der Vertebraten kontrolliert. *Shh* ist in der polarisierenden Region exprimiert und hält diese aufrecht, indem es mit der apikalen Ektodermalzone (AER) durch gegenseitige Wechselwirkung interagiert. Wichtige Moleküle, die in der AER exprimiert sind, sind z.B. die FGFs (Fgf4, FGF9, FGF17). *Shh* ist aber nicht nur ein wichtiges Gen für die Musterbildung der Extremitäten, sondern auch für viele andere Musterbildungen im frühen Embryo. So ist *Shh* unter anderem für die Organisation des Neuralrohres, der Somiten und der Determinierung der Links-Rechts-Achse des Embryos verantwortlich. Da eine niedrigere Expression an *Shh* dramatische Auswirkungen auf den Embryo hat und die Tatsache, dass *Pitchfork* nur in Regionen mit hoher *Shh*-Aktivität exprimiert ist, wie z.B. in der Bodenplatte des Neuralrohres, im Hippocampus, im Primitivknoten, und in der Organisatorregion der

Extremitäten, war nun die Frage, ob *Pitchfork* im Sonic-Hedgehog-Signalweg agiert. Die Extremitäten eignen sich zur Analyse dieser Fragestellung besonders gut, da Defekte in dieser Region sich sofort in der Anzahl und Struktur der Finger zeigen (Gurreri et al., 2002). Da *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen, die mittels tetraploider Aggregation generiert wurden, am Tag E12,5 an einem spezifischen Herzdefekt sterben und zu diesem Zeitpunkt die Extremitäten dieser Embryonen noch nicht voll entwickelt sind, generierten wir mittels Morulaaggregation von *Pitchfork*^{lacZ/+}-ES-Zellen diploide Chimären. Diese sind je nach Chimärismus lebensfähig. Wir analysierten nun *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimären im Stadium E16,5 und konnten hier eine postaxiale Polydaktylie detektieren (Fig. 33C, D). In der Maus sind mehrere Genmutationen bekannt, die zu Polydaktylien führen (z.B. *HoxD13*). Allerdings konnte bis heute keine postaxiale Polydaktylie in der Maus beobachtet werden (Gurreri et al., 2002). Die Analyse der Extremitäten eignet sich zusätzlich besonders gut, da die Mutationen in der Maus meistens einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, wie in menschlichen Krankheiten. Im Menschen sind bisher zwei Krankheiten, die zu einer Polydaktylie führen, identifiziert worden: die postaxiale Polydaktylie TypA und das Pallister-Hall Syndrom. Beide Phänotypen werden durch Mutationen im *Gli3* Gen (*GLI-Krüppel family member GLI3*), dem Shh vermittelnden Transkriptionsfaktor, verursacht.

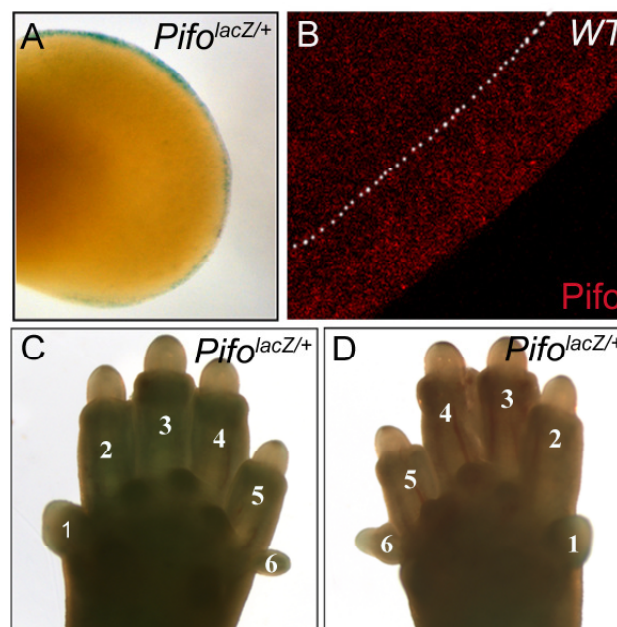


Fig. 33: *Pitchfork*^{lacZ/+} Embryonen entwickeln postaxiale Polydaktylie

Analyse des lacZ-Reproteralles in der Vorderextremität eines *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryos im Stadium E10,5 zeigt eine Expression in der AER in einem Gradienten (A). Im *Wt*-Embryo konnte in dieser Region endogenes *Pitchfork* detektiert werden (B). *Pitchfork*^{lacZ/+}-Chimären zeigen im Stadium E16,5 eine postaxiale Polydaktylie (C, D).

Um den postaxialen Phänotyp in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen molekular zu analysieren, untersuchten wir die Expression von *Fgf4* (fibroblast growth factor 4), *Ptch1* (patched homolog 1) und *Bmp2* (bone morphogenetic protein 2) in Vorderextremitäten E10,5 mittels *in situ* Hybridisierungen (Fig. 34). Die Analyse ergab, dass die *Fgf4*-Domäne im AER sowohl anterior als auch posterior bei den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen stark reduziert war (Fig. 34A, B). Auch die Expression von *Ptch1*, das direkte Zielgen von *Shh*, war in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen im AER reduziert (Fig. 34C, D). Dagegen war die Expression in der ZPA im Vergleich zu *Wildtyp*-Embryonen unverändert. Auch die Expression von *Bmp2* im AER war in den Mutanten im Vergleich zu den *Wildtyp*-Embryonen nicht kontinuierlich (Fig. 34E, F).

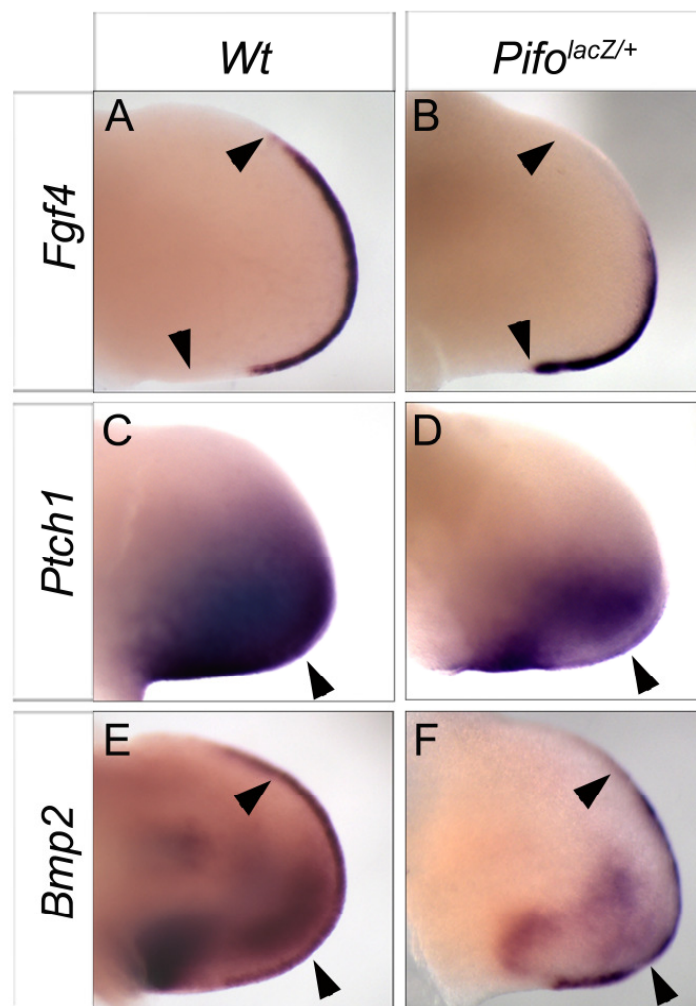


Fig. 34: Markeranalyse in *Pitchfork*^{lacZ/+}-Extremitäten

In situ Hybridisierungen in Vorderextremitäten von *Wt*-(A,C,E) und *Pitchfork*^{lacZ/+}-Extremitäten (B,D,F) im Stadium E10,5.

Dagegen blieb die Expression bei *Bmp4*, *Gli1* (einem weiteres Zielgen von *Shh*) und *HoxD13* unverändert (Fig. 35), was darauf hindeutet, dass Pitchfork keinen generellen Einfluß auf die Entwicklung der Vorderextremität nimmt, sondern in einem bestimmten Prozess wirken muss. *Fgf4* ist für das Auswachsen der Extremität in proximo-distaler Richtung verantwortlich. Ebenso ist *Fgf4* für die Aufrechterhaltung der *Shh*-Expression in der ZPA während der Extremitätenelongation verantwortlich. Die regulatorische Interaktion zwischen *FGF4* und *Shh* ist reziprok, da *Shh*, das in der ZPA produziert wird, *FGF4*-Expression in der Apikalleiste induziert und aufrecht erhält. Durch diese positive Rückkopplungs-Schleife zwischen *FGF4* und *Shh* wird die Musterbildung der Extremitäten gewährleistet. Diese Grenze zwischen AER und ZPA ist nun bei den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen verschoben, wodurch ein zusätzlicher Finger an der posterioren Seite entstehen kann. Pitchfork ist also im AER exprimiert und beeinflusst den *Shh*-Signalweg, welcher in der ZPA exprimiert ist, was durch die veränderte *Ptch1*-Expression in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen gezeigt werden konnte. Dies ist insofern von Bedeutung, da bisher nicht bekannt war, dass Signale aus der AER in der Lage sind, *Shh* in der benachbarten ZPA-Domäne zu regulieren.

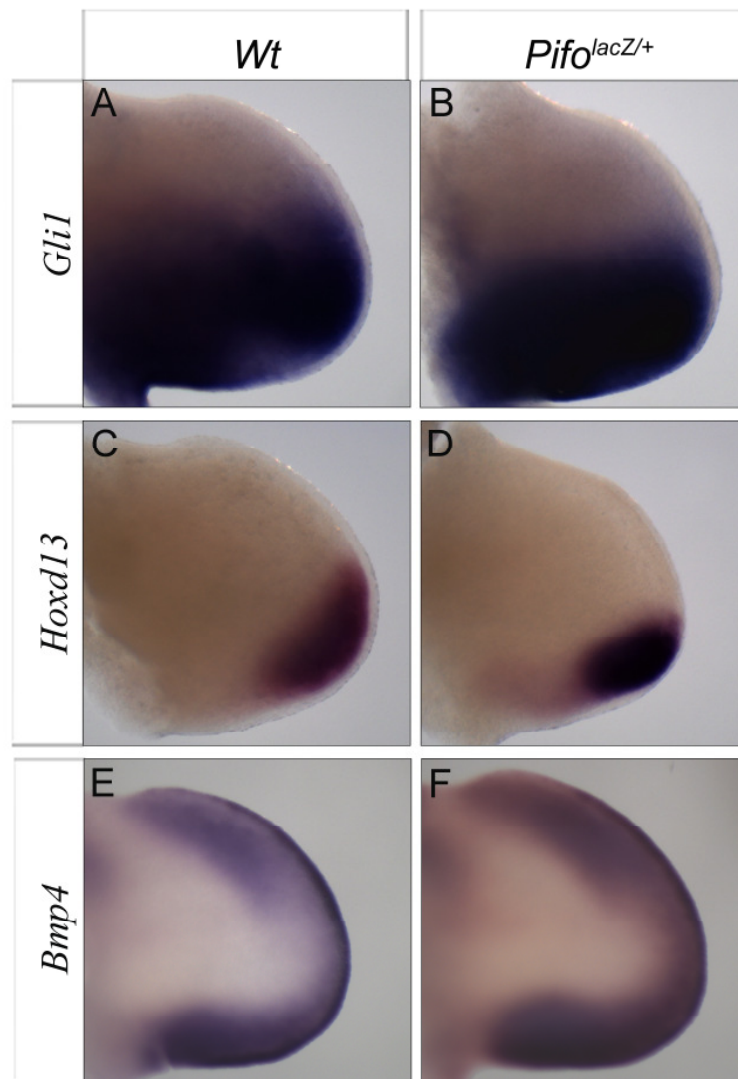


Fig. 35: Markeranalyse in *Pitchfork*^{lacZ/+} Extremitäten

In situ Hybridisierungen in Vorderextremitäten von Wt-(A,C,E) und *Pitchfork*^{lacZ/+}-Extremitäten (B,D,F) im Stadium E10,5.

3.2.11 *Pitchfork* reguliert während der Embryonalentwicklung die Links-Rechts-Asymmetrie im Herzen

Da durch Blastozysteninjektion der *Pitchfork*^{lacZ/+}-ES-Zellen nur niedrig prozentige Chimären generiert werden konnten und die Anzahl der Chimären pro Wurf sehr gering war, lag die Vermutung nahe, dass *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen auch einen embryonalen somatischen Phänotyp besaßen. Da durch den Spermienphänotyp es unmöglich war adulte *Pitchfork*^{lacZ/+}-Mäuse zu züchten, generierten wir mittels der Technik der tetraploiden Aggregation (Nagy et al., 1993) Embryonen, die heterozygot für *Pifo* waren. Eine Analyse der embryonalen

Entwicklung dieser Mäuse ergab, dass Embryonen, die aus *Pitchfork*^{lacZ/+}-ES-Zellen generiert worden waren, am Tag E12,5 an einem spezifisch angeborenen Herzfehlern (n=25) sterben, dem double outlet right ventricle (=DORV) Phänotyp (Fig. 36). Dieser Phänotyp entsteht während der Embryonalentwicklung, wenn die Links-Rechts-Achse des Embryos festgelegt wird, indem durch eine gestörte Drehung der Ausflussbahn des Herzens sowohl die Aorta als auch die Pulmonalarterie bei zusätzlichem Ventrikelseptumdefekt ausschließlich bzw. überwiegend der rechten Herzkammer entspringen. In früheren Maus-Studien konnte gezeigt werden, dass strukturelle Defekte in den Zilien des Primitivknotens der Maus zu Defekten in der Links-Rechts-Orientierung des Embryos führen können, sowie die Drehung des Herzens beeinflusst wird und konsekutiv die korrekte Ausbildung der Ausflussbahnen des Herzens gestört werden kann (Hamada et al., 2002, Wright et al., 2002). Durch den sog „nodal flow“ werden unilaterale Signalkaskaden des Nodal/TGFβ-Signalweges aktiviert. Dadurch werden Gene, die die Links-Rechts-Achsenbildung festlegen, induziert, wie z.B. *Nodal* (Gebbia et al., 1997; Lowe et al., 1998), aber auch *Nodal*-Inhibitoren, wie z.B. *Lefty1* und *Lefty2* (Hamada et al., 2002; Hirokawa et al., 2006) und der Homeoboxtranskriptionsfaktor *Pitx2* (Kitamura et al., 1999; Liu et al., 2001; Liu et al., 2002; Kioussi et al., 2002). *Pitx2* ^{-/-} Mutanten weisen einen ähnlichen Phänotyp wie *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen auf. Auch diese Mutation bewirkt einen spezifischen Herzdefekt, der Defekte in der atrio-ventrikulären Verbindung bewirkt und so in einem DORV-Phänotyp und ventrikulärer Hypoplasie resultiert (Fig. 36A-D). Im Gegensatz zu anderen Mutanten, ist bei den *Pitx2*^{-/-} Mutanten aber die rechtsseitige Drehung des Herzens korrekt (Harvey et al., 2002). Bei der morfo-histologischen Analyse der *Pitchfork*^{lacZ/+}-Mutanten zeigt sich nun, dass zwar alle Mutanten auch einen DORV-Phänotyp und eine rechtsventrikuläre Hypoplasie aufwiesen, die rechtsseitige Drehung des Herzens aber jedoch bei allen Embryonen korrekt verlaufen war (Fig. 36A-D), ähnlich dem *Pitx2*^{-/-} Phänotyp (Kitamura et al., 1999, Ai et al., 2006). Um die Ursache dieses Herzdefektes besser verstehen zu können, wurden *Pitchfork*^{lacZ/+}-Herzen von Embryonen im Stadium E10,5 anhand von Markern mithilfe von *in situ* Hybridisierungen analysiert, die in der Ausflusstraktentwicklung eine Rolle spielen. So ergab die Analyse anhand von *Pitx2c*, dass *Pitx2c* in diesen Mutanten zwar in der linken lateralen Wand des rechten Ventrikels normal exprimiert war, dagegen in der Region des linken Ausflusstraktes nur vermindert (Fig. 36E, F). Dieses Resultat bestätigt die phänotypische Ähnlichkeit zwischen den *Pitx2*^{-/-} Mutanten und den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen. Die Analyse von *Bmp2* in den *Pitchfork*-Mutanten ergab ein ähnliches Resultat, nämlich dass die Expression in der Region des linken Ausflusstraktes

von *Bmp2* reduziert war, die Expression in der linken lateralen Wand des rechten Ventrikels jedoch normal (Fig. 36G, H).

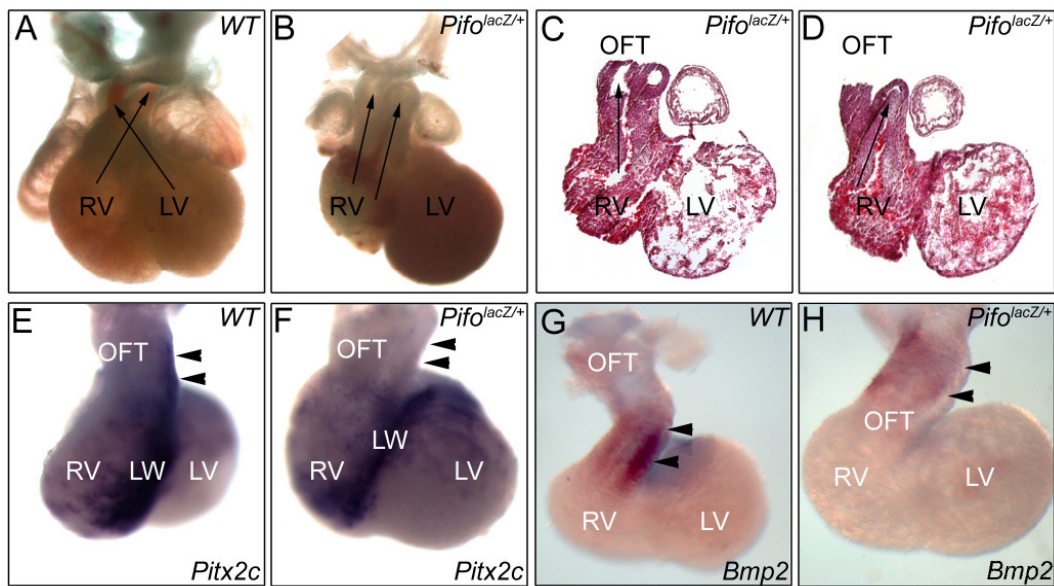


Fig. 36: Pitchfork reguliert während der Embryonalentwicklung die Links-Rechts-Asymmetrie im Herzen

Phänotypischer Vergleich von *Wt*-(A) und *Pitchfork^{lacZ/+}*-Herzen (B,C,D) im Stadium E10,5. *Pitchfork^{lacZ/+}*-Herzen weisen einen DORV-Phänotyp auf (B,C,D). *Pitx2c*-(E,F) und *Bmp2*-(G,H) Markeranalyse von *Wt*-und *Pitchfork^{lacZ/+}*-Herzen im Stadium E10,5.

Die Expression von *Bmp4* in den *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen war dagegen im Vergleich zu *Wildtyp*-Embryonen allerdings normal (Fig. 37).

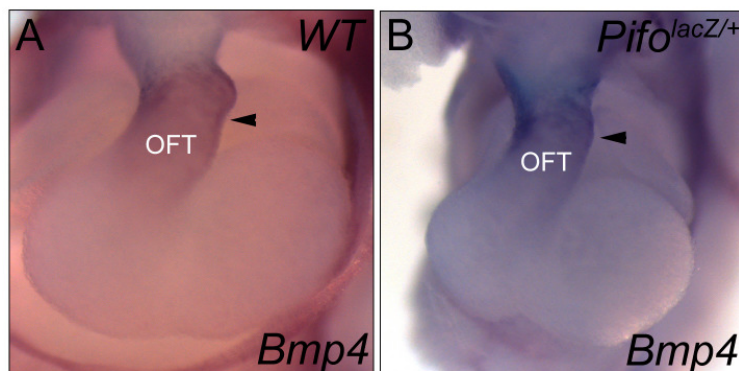


Fig. 37: Markeranalyse von *Bmp4* in *Pitchfork^{lacZ/+}*-Herzen

Analyse von *Bmp4* in *Wt*-(A) und *Pitchfork^{lacZ/+}*-Herzen (B) im Stadium E10,5 mittels *in situ* Hybridisierung. Die Expression ist im *Wt*-und in mutanten Herzen unverändert.

Da aber interessanterweise in den *Pifo*-Mutanten, genauso wie in den *Pitx2*^{-/-} Mutanten weder die Drehung des Herzens noch die Drehung des Embryos beeinträchtigt war, untersuchten wir, ob frühe Links-Rechts-Marker wie *Nodal* und *Lefty* in den Mutanten im Vergleich zu *Wt*-Embryonen unterschiedlich exprimiert waren. Die Expression im linken lateralen Plattenmesoderm in Embryonen im Stadium E7,75 bis E8,5 war im Vergleich zu *Wildtyp*-Embryonen jedoch unverändert (Fig. 38).

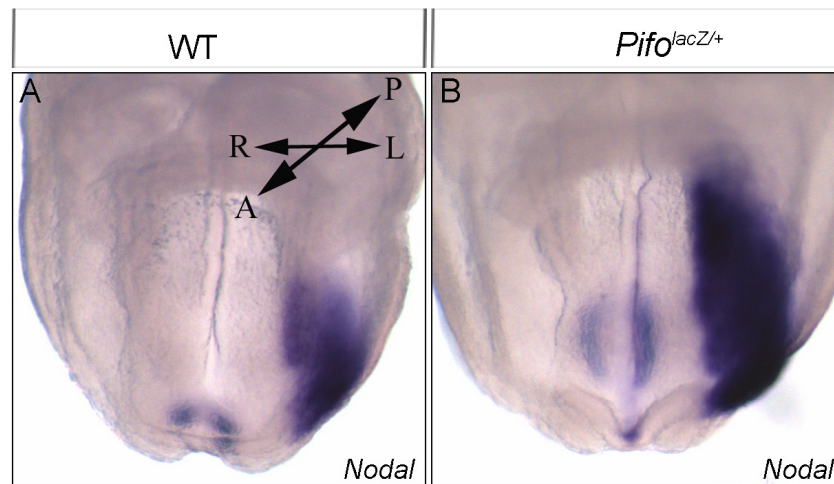


Fig. 38: Die Expression von *Nodal* ist in *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen unverändert

Analyse der *Nodal*-Expression in *Wt*-(A) und *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen (B) im Stadium E8,25 mittels *in situ* Hybridisierung. Die Embryonen wurden unterschiedlich lang gefärbt, die *Nodal*-Expression ist in der Mutante im Vergleich zum *Wt*-Embryo unverändert.

Diese Resultate zusammen mit der Tatsache, dass *Pitchfork* mRNA zu keinem früheren oder späteren Zeitpunkt als in E7,75 in den primären Zilien detektiert werden kann (Fig. 39) zeigen, dass *Pitchfork* zwar die Links-Rechts-Asymmetrie des Herzens reguliert, jedoch dieser Prozess unabhängig von den anderen Prozessen geschaltet sein muss, die die Links-Rechts-Drehung des Herzens und die Drehung des Embryos beeinflussen.



Fig. 39: Pitchfork mRNA Expression während der Entwicklung

Pitchfork mRNA ist in den primären Zilien im Primitivknoten der Maus im Stadium E7,75 exprimiert (B). Im Stadium E6,5 (A), E8,25 (C), E8,75 (D) und E10,0 (E) kann keine Pitchfork-Expression detektiert werden.

3.2.12 *Pitchfork* reguliert die Anzahl der primären Zilien und damit die Links-Rechts-Asymmetrie im Primitivknoten

Studien von Hamada et al., 2002 konnten zeigen, dass strukturelle Defekte in den Zilien des Primitivknotens zu Problemen bei der Links-Rechts-Achsenspezifizierung, der embryonalen Drehung und so zur vollwertigen Ausbildung beider Ausflusstrakte des Herzens führt.

Da *Pitchfork* spezifisch in den Zellen mit primären Zilien im Primitivknoten und nicht im Herzen exprimiert ist und Embryonen heterozygot für *Pitchfork* einen spezifischen DORV-Phänotyp im Herzen aufweisen, wurde eine detaillierte Analyse der primären Zilien im Primitivknoten der Maus durchgeführt. Dazu analysierten wir Embryonen im Stadium E7,75 am Rasterelektronenmikroskop (mit freundlicher Unterstützung von Helga Wehnes), um die morphologische Struktur der primären Zilien in der Organisatorregion mit größtmöglicher Vergrößerung untersuchen zu können (Fig. 40). *Wildtyp*-Embryonen (n=3) weisen pro Zelle nur ein Zilium im Primitivknoten auf (Zilien n=270; Fig. 40A). Dagegen zeigen sich in *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen (n=7) fast bei 50% aller Zellen Defekte in diesen spezialisierten Zilien (Zilien n=544; Fig. 40G). Wir kategorisierten die Ziliendefekte in 5 unterschiedliche Klassen: In duplizierte (Fig. 40B), gespaltene (Fig. 40C), teilweise gespaltene Zilien (Fig. 40D), in duplizierte und deformierte (Fig. 40E) und in gebogene Zilien (Fig. 40F). Da die linke Achse des Embryos durch die Aktivierung des Nodal/TGFβ-Signalweges auf der linken Seite des Embryos durch den „nodal flow“ aktiviert wird, lag die Vermutung nahe, dass durch die defekten Zilien diese Flussbewegung gestört ist.

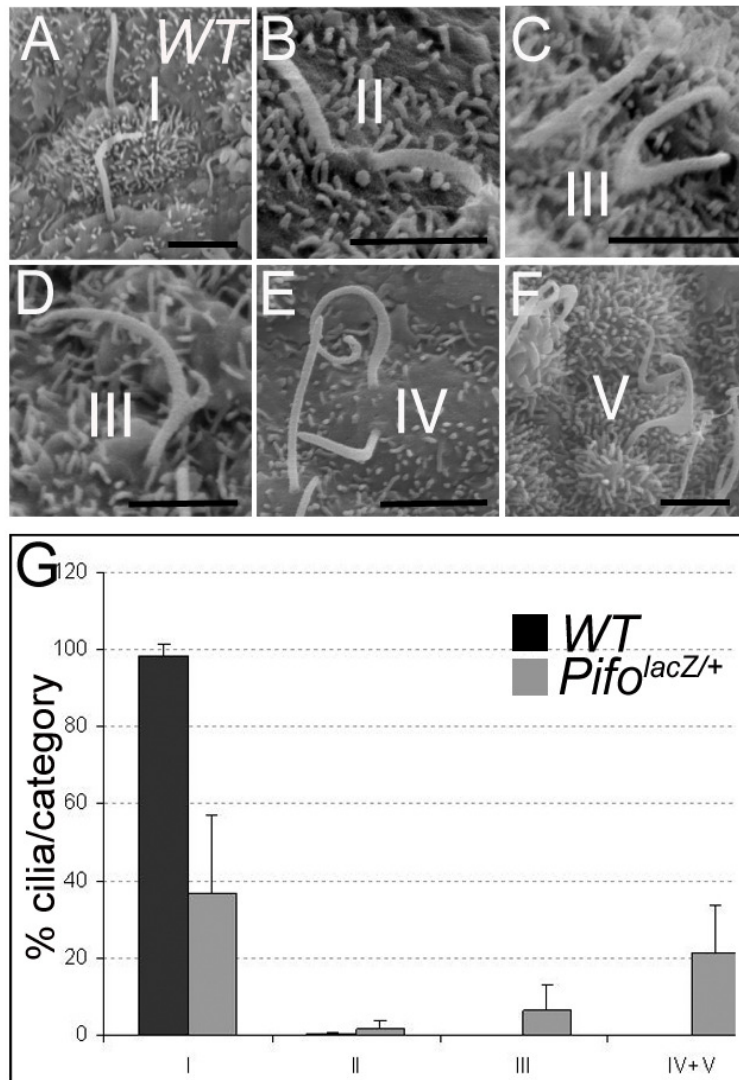


Fig. 40: Analyse der *Pitchfork^{lacZ/+}*-Zilien im Primitivknoten

Analyse der Ziliendefekte mittels Rasterlektronenmikroskopie an Primitivknoten der Maus im Stadium E7,5-7,75. *Wt*-Zellen sind monoziliär (A, Kategorie I). Dagegen weisen *Pitchfork^{lacZ/+}*-Zilien Defekte auf, wie z.B. eine Duplikation (B, II), gespaltene Zilien (C, III), teilweise gespaltene Zilien (D, III), duplizierte und deformierte Zilien (E, IV) und gebogene Zilien (F, V). Die Ergebnisse wurden quantifiziert und graphisch dargestellt (G). Insgesamt wurden drei *Wt*- (n=270, Anzahl der gezählten Zilien) und sieben *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen (n=544, Anzahl der gezählten Zilien) ausgezählt. Die Fehlerbalken zeigt die jeweilige Standardabweichung.

Um zu untersuchen, ob die Links-Rechts-Musterbildung im Primitivknoten *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen gestört ist, wurde das Expressionsmuster der frühesten linksrechts-determinierenden Gene, die in der linken und rechten Seite des Embryos unterscheiden, analysiert, den Nodal/TGF β -Antagonisten *Cerberus2* (*Cerr2*; Marques et al., 2004) und den Liganden *Nodal* (Lowe et al., 1996) (Fig. 41). Beide Gene zeigen eine bilaterale asymmetrische Expression in den sog. „Crown“-Zellen, die die monoziliären Zellen des

Primitivknotens in einer hufeisenähnlichen Form umschließen. Die *Wildtyp*-Embryonen zeigten das erwartete asymmetrische Expressionsmuster in diesen Zellen (Fig. 41A-C), wohingegen bei den *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen die Organisation der „Crown“-Zellen gestört und damit auch die hufeisenähnliche Form der Zellen nicht mehr vorhanden, sondern die linke und die rechte Seite dieser Zellen miteinander verbunden war (Fig. 41D-F). Auch die asymmetrische Expression der beiden Marker mit der stärkeren Expression von *Cerr2* auf der linken und *Nodal* auf der rechten Seite fehlte. Diese Resultate machen deutlich, dass die Links-Rechts-Defekte im Herzen bereits im Primitivknoten des Embryos ihren Ursprung haben müssen. Die Tatsache, dass zu keinem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung *Pitchfork*-mRNA exprimiert ist, vor allem nicht in Herzvorläuferzellen oder im Herzen selber, unterstützt diese Annahme.

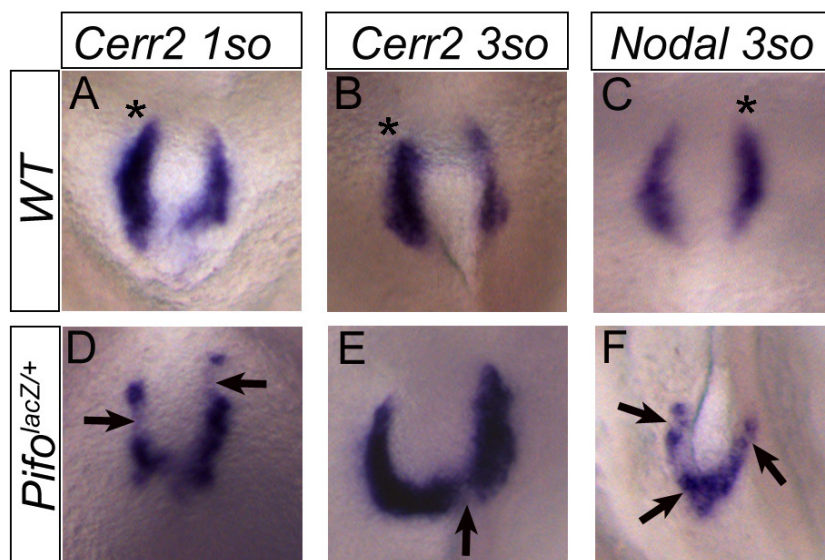


Fig. 41: Analyse der Links-Rechts-Musterbildung in *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen

Analyse früher Links-Rechts-Asymmetrie Marker mittels *in situ* Hybridisierung von *WT*-(A, C) und *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen (D-F) in der Maus im 1-3 Somiten Stadium. In *WT*-Embryonen zeigt die *Cerr2*- und *Nodal*-mRNA Expression ein hufeisenähnliches Expressionsmuster, mit einer stärkeren Expression auf einer Seite des Embryos (mit einem Stern gekennzeichnet) (A-C). Das Expressionsmuster beider Marker in den *Pitchfork^{lacZ/+}*-Embryonen ist unterbrochen und nicht mehr asymmetrisch verteilt (D-F). Die Bilder zeigen eine distale Ansicht auf den Primitivknoten der Maus, wobei anterior am oberen Ende des Bildes und die linke Seite des Embryos auf der rechten Bildhälfte zu sehen ist.

3.2.13 *Pitchfork* reguliert die Mikrotubuliarchitektur in den primären Zilien des Primitivknotens

Um den Mechanismus besser verstehen zu können, warum die Zilien in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Mutanten defekt oder dupliziert waren, wurde die Ultrastruktur dieser Zilien genauer analysiert. Dazu wurden die Zellen des Primitivknotens in Ultradünnschnitten mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops detailliert untersucht. Eine Besonderheit der primären Zilien im Primitivknoten der Maus ist ihre Mikrotubulstruktur, denn im Vergleich zu anderen primären Zilien, die eine „9+2“-Mikrotubuliduplett-Architektur in der Zilienperipherie aufweisen, besitzen diese eine „9+0“-Mikrotubuliduplett-Anordnung. Die Analyse von *Wildtyp*- und mutanten Embryonen im Stadium E7,75 am Transmissionselektronenmikroskop (mit Hilfe von Frau Jennen, Abteilung für Zytometrie) (Fig. 42) konnte in Querschnitten zeigen, dass *Wildtyp*-Zilien, wie oben beschrieben, aus „9+0“-Mikrotubulidupletten aufgebaut sind (Fig. 42C). Dabei sind die Mikrotubuli parallel entlang der longitudinalen Achse des ziliären Axonems nebeneinander angeordnet (Fig. 42A). Im Vergleich dazu sind bei den Zilien in den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen die Mikrotubuli nicht mehr entlang der Achse parallel angeordnet und die „9+0“-Struktur gestört (Fig. 42B, D-E). Eine Erklärung für die strukturellen Defekte der Zilien könnte sein, dass die Basalkörper nur fehlerhaft an die Plasmamembran verankert werden und somit die Funktion als MTOC („microtubuli organizing centre“) nicht mehr erfüllen können. Dies könnte in einer Desorganisation der axonemalen Mikrotubuli resultieren.

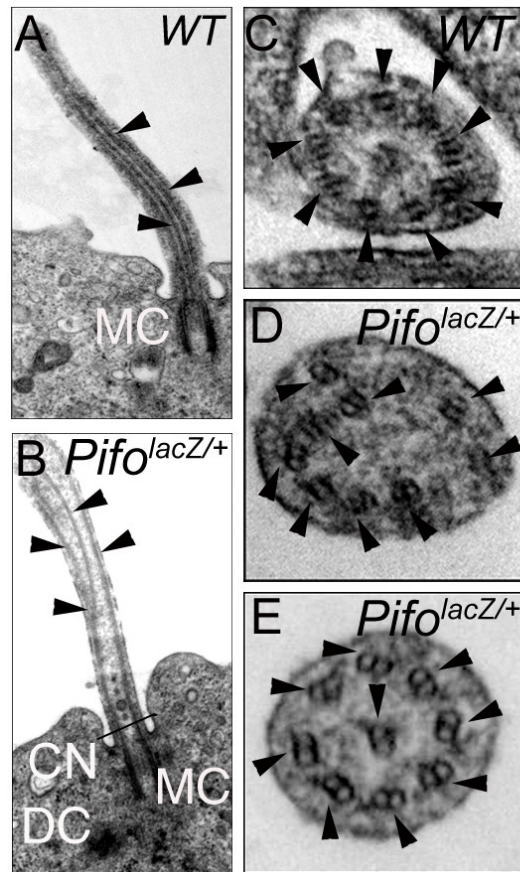


Fig. 42: Analyse der *Pitchfork*^{lacZ/+}-Zilien mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Analyse von *Wt*-(A,C) und *Pitchfork*^{lacZ/+} Zilien (B,D,E) in Zellen des Primitivknotens der Maus im Stadium E7,5-7,75. *Wt*-Zilien im Primitivknoten zeigen im Querschnitt eine „9+0“-Mikrotubulidublett-Anordnung (durch Pfeile gekennzeichnet) (C). In *Pitchfork*^{lacZ/+}-Zilien ist die Mikrotubuli-Architektur gestört (D,E), was auch in Schnitten entlang der longitudinalen Achse in *Wt*-Zilien (A) und *Pitchfork*^{lacZ/+}-Zilien sichtbar wird. MC=Muttercentriole, DC=Tochtercentriole, CN=ziliäre halskrausenähnliche Struktur

3.2.14 Überexpression von *Pitchfork* führt zu Apoptose, zerstört das Mikrotubuligerüst und führt zu mitotischen Defekten *in vitro*

In den Überexpressionsexperimenten war die hohe Rate an apoptotischen Zellen besonders auffällig. Eine genauere Analyse ergab, dass ein Viertel der GFP-Pifo und die Hälfte der GFP-AccPifo transfektierten Zellen apoptotisch waren (Fig. 43). Eine weitere Auffälligkeit war, dass die Anzahl der mitotischen Zellen in den überexprimierten Pifo-Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontroll-GFP-Konstrukt transfektiert worden waren, vermindert oder nicht vorhanden war (Fig. 43).

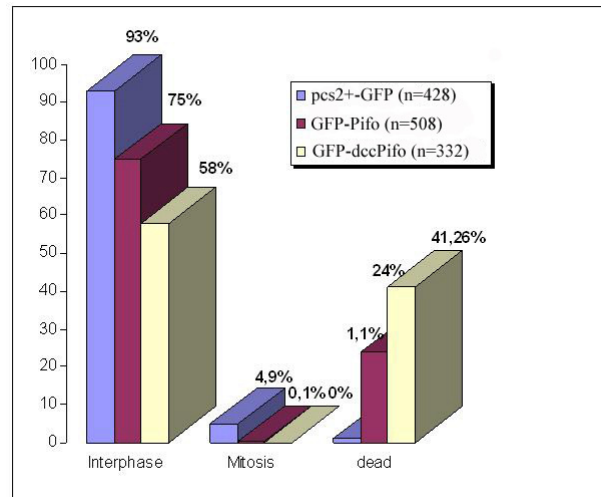


Fig. 43: Überexpression von Pitchfork führt zur Apoptose

Analyse von HEK293T-Zellen, die zuvor mit einem Kontrollplasmid (pcs2+-GFP), GFP-Pifo und GFP- Δ ccPifo transfektiert worden waren. 30h nach der Transfektion wurden die Zellen quantifiziert. Der blaue Balken zeigt die Verteilung der pcs2+-GFP transfektierten Zellen (n=428) in der Interphase, der Mitose und den apoptotischen Zellen. Der rote Balken repräsentiert die Verteilung der GFP-Pifo transfektierten Zellen (n=508) und der gelbe Balken die Verteilung der GFP- Δ ccPifo transfektierten Zellen (n=332).

Um nachzuvollziehen, weshalb eine Überexpression von Pitchfork zu Apoptose führt, wurden die GFP-Pifo transfektierten NIH3T3-Zellen mittels immunohistochemischen Färbungen von α -Tubulin genauer untersucht (Fig. 44). Dies ergab, dass in Zellen, die sich in der Interphase befinden, d.h. Pitchfork im Nukleus lokalisiert ist, dass Mikrotubuligerüst normal ist (Fig. 44A). Sobald aber die Zelle in die Mitose geht und Pitchfork am Zentrosom und im Zytoplasma lokalisiert ist, interagiert Pitchfork mit dem Mikrotubuligerüst und es kommt zu Defekten (Fig. 44B-D).

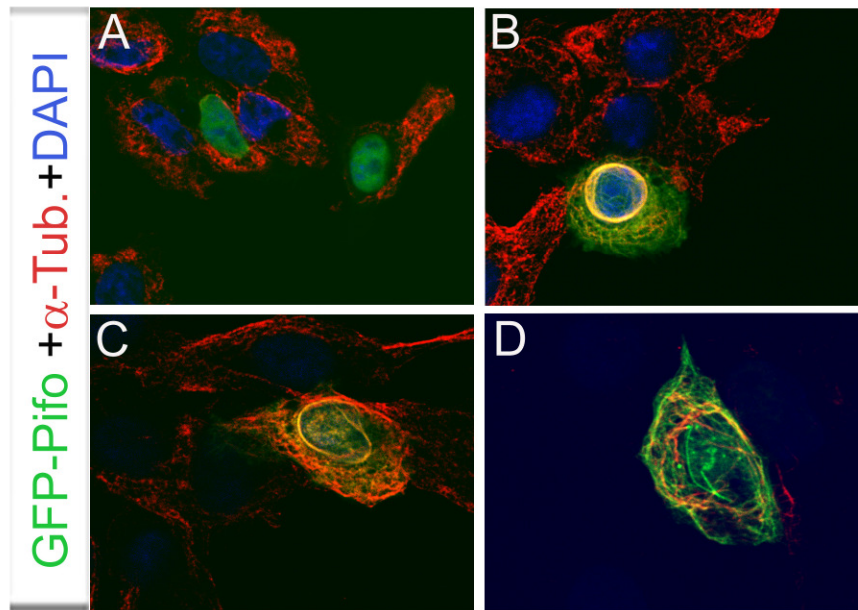


Fig. 44: Überexpression von Pitchfork zerstört das Mikrotubuligerüst *in vitro*

NIH3T3-Zellen wurden mit GFP-Pifo transfektiert und anschließend nach immunhistochemischen Färbungen mittels konfokaler Mikroskopie (einzelne, optische Schnitte, 63x Vergrößerung, 3x Zoom) analysiert. In Interphase-Zellen ist GFP-Pifo im Nukleus lokalisiert und das α -Tubulin Gerüst normal (A). GFP-Pifo ist während der Mitose im Zytoplasma lokalisiert (B-D), und es kommt zu Defekten im Mikrotubuligerüst. α -Tub.= α -Tubulin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol

Eine weitere Auffälligkeit war, dass in manchen Zellen multiple Zentrosomen detektiert werden konnten (Fig. 45A-L). Dies wurde in den immunhistochemischen Färbungen mit α -Tubulin deutlich. Von jedem Zentrosom gehen α -Tubulin-positive Mikrotubuli spindelförmig ab. In den GFP-Pifo transfektierten Zellen waren mehrere solche Mikrotubuli-Astern sichtbar (Fig. 45D, H, L). In einigen Zellen, die während der Zellteilung nicht apoptotisch waren, konnte zusätzlich beobachtet werden, dass Pitchfork nach der Telophase nicht gleichmäßig auf zwei Tochterzellen verteilt wurde, sondern nur in einer Zelle lokalisiert war (Fig. 45M-T). Anhand der Ergebnisse lässt sich auch die Tatsache erklären, warum so viele GFP-Pifo und GFP- Δ ccPifo transfektierte Zellen apoptotisch waren. Aufgrund des gestörten Mikrotubuligerüsts, der multiplen Zentrosomen und die asymmetrische Verteilung von Pitchfork nach der Mitose wird die Zellteilung beeinflusst, was zu einem vermehrten Zelltod führt.

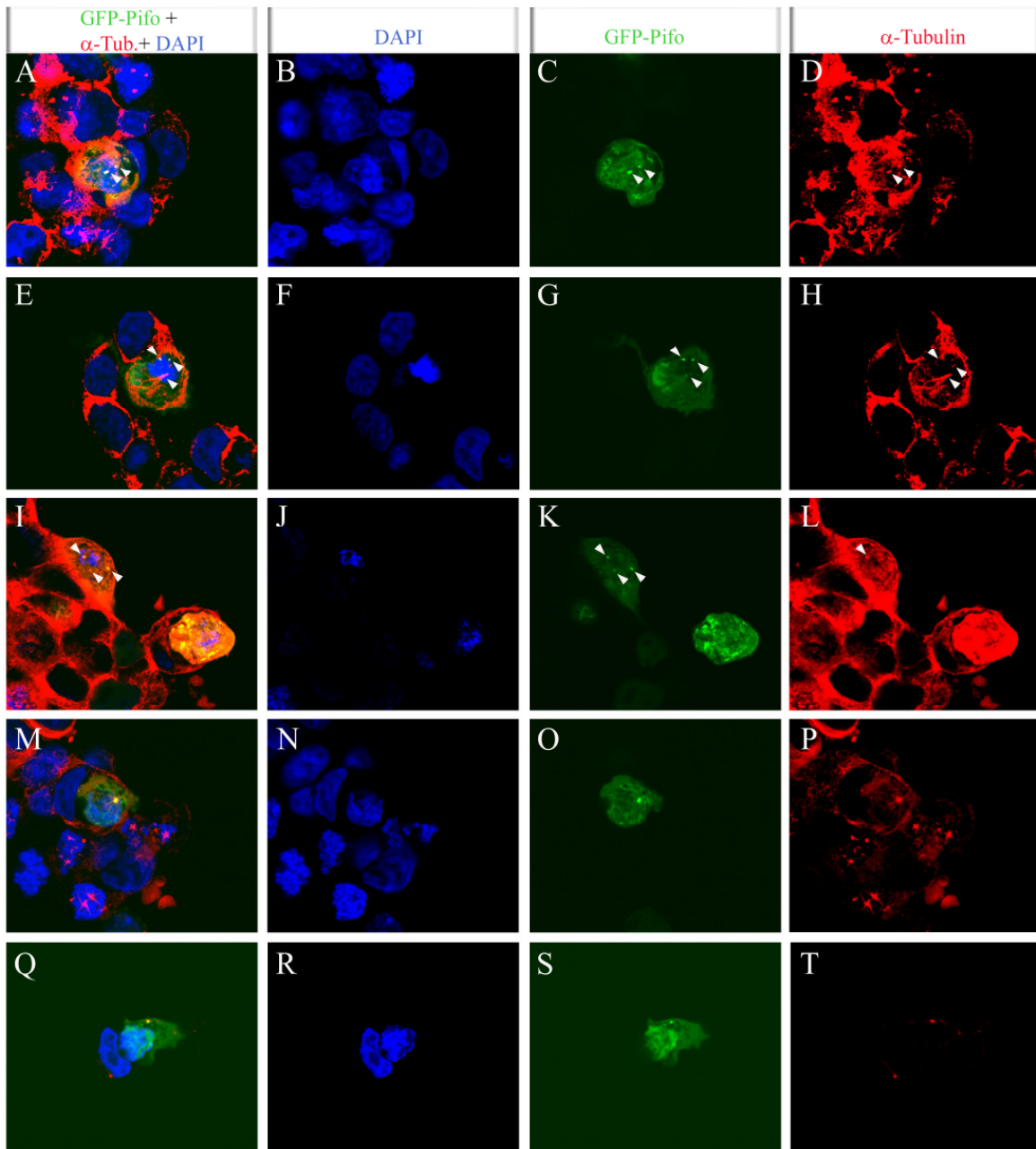


Fig. 45: Überexpression von Pitchfork führt zu multiplen Zentrosomen und wird asymmetrisch nach der Zellteilung verteilt

Analyse von GFP-Pifo transfektierten HEK293T-Zellen mittels immunhistochemischen Färbungen. In manchen Zellen konnten multiple Zentrosomen detektiert werden (A-L). In anderen Zellen wurde GFP-Pifo nach der Zellteilung nur auf eine Tochterzelle verteilt (M-T). Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, 3x Zoom). α -Tub.= α -Tubulin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol

3.2.15 Endogenes Pitchfork akkumuliert während der Ziliogenese

Um besser verstehen zu können, warum eine suboptimale Expression an *Pitchfork* ausreicht, um die Ziliogenese zu beeinflussen, wurde die endogene Expression von Pitchfork in der

embryonalen Lunge im Stadium E14,5 (Fig. 46) genauer analysiert. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Lunge aus zwei unterschiedlichen Zellpopulationen. Zum einen aus den mesenchymalen Zellen, die ein primäres Zilium besitzen, und aus den zu diesem Zeitpunkt nichtziliären epithelialen Zellen, die erst im Stadium E16,5 multiziliär werden (Toskala et al., 2005). Auf Kryoschnitten wurde nun mittels immunohistochemischen Färbungen endogenes Pitchfork und Zilien mittels acetylierten Tubulins angefärbt. Auffällig war, dass Pitchfork-Protein besonders stark in Zellen, die sich in der S-Phase befanden, akkumulierte (Fig. 46A). Stark war die Expression von Pitchfork außerdem in mitotischen Zellen, die im Verlauf der Mitose aber abnahm (Fig. 46B).

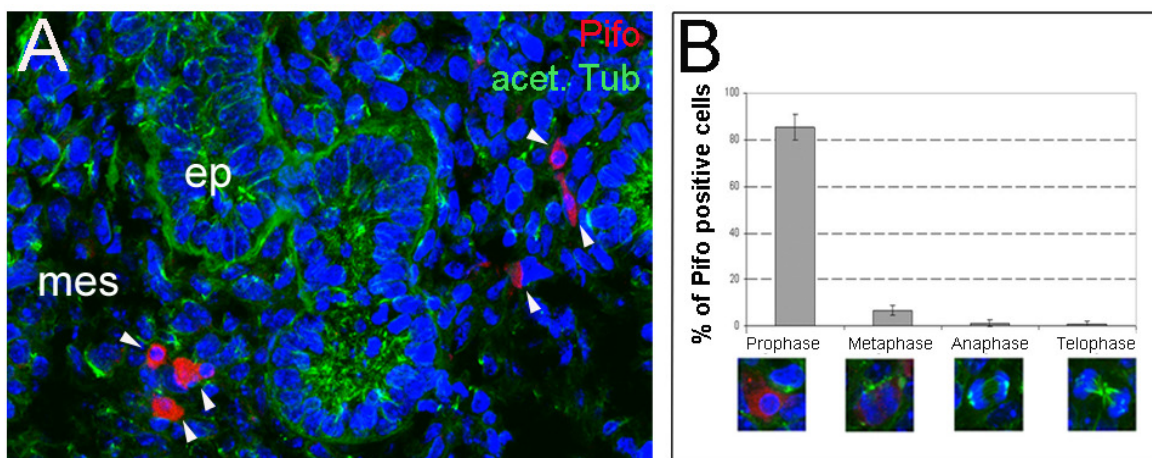


Fig. 46: Endogene Expression von Pitchfork in mitotischen Zellen des embryonalen Lungengewebes

Pifo kann im embryonalen Lungengewebe im Stadium E14,5 nur in mesenchymalen Zellen, dagegen nie in epithelialen Zellen detektiert werden (A). Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung), acet.Tub.=acetyliertes Tubulin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol. Pifo akkumuliert nur während der frühen Mitose in den primär ziliären mesenchymalen Zellen (B). Es wurden jeweils 100 Zellen in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und quantifiziert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Um zu unterscheiden, ob Pifo in proliferierenden Zellen oder in Zellen, die sich in der G0-Phase befinden und somit ein Zilium besitzen, akkumuliert, wurde die Pitchfork-Expression während der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklusses (Fig. 47) analysiert. Der Versuch, in verschiedenen etablierten Zelllinien (NIH3T3, HEK293T, RpE1) endogenes Pitchfork zu detektieren, mißlang, da die Expression von Pitchfork unter dem Detektionsminimum lag. Da ein Phänotyp in den Vorderextremitäten der *Pichfork^{lacZ/+}*-Embryonen detektiert werden konnte, war bekannt, dass Pitchfork dort auch einen hohen Expressionsspiegel haben muss. Aus diesem Grund wurden primäre Fibroblasten aus den Vorderextremitäten (primary

limbbud culture, PLC) von *Wildtyp*-Embryonen im Stadium E11,5 generiert, die unter dünn ausgesäten Bedingungen in der Lage sind sich mehrmals zu teilen, bevor sie seneszent werden. Primäre Fibroblasten, die unter dicht gesäten Bedingungen wachsen, also kontakthemmt sind und ohne fetales Kälberserum (FCS) kultiviert werden, verlassen den Zellzyklus und gehen in die G₀-Phase über, wo sie ein Zilium ausbilden können (Ocbina und Anderson 2008). Die Fibroblasten können allerdings auch wieder in die Mitose eintreten und das Zilium abbauen, sobald sie wieder unter mitogenen Bedingungen (mit 15% FCS) kultiviert werden (Tucker et al., 1979, Rieder et al., 1979, Pugacheva et al., 2007). Die generierten Fibroblasten wurden nun unter verschiedenen Bedingungen 24h lang kultiviert: Unter proliferierenden Bedingungen (dünn ausgesät und mit 15% Serum) und unter dicht ausgesäten FCS-armen Bedingungen. Einen Teil der PLC wurde nach Ablauf der 24h unter mitogenen Bedingungen (mit 15% FCS) wieder in den Zellzyklus entlassen und nach 4h, 8h und 15h (Fig. 47) fixiert. Immunohistochemische Färbungen ergaben, dass unter den proliferierenden Bedingungen kein Pitchfork (weder in der Interphase noch in der Mitose) detektiert werden konnte (Fig. 47I). In PLC, die unter FCS-armen Bedingungen den Zellzyklus verlassen und die Ziliogenese einleiten, konnte endogenes Pitchfork in Vesikeln im Zytoplasma, im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und im wachsendem Axonem detektiert werden (Fig. 47II, III). In Zellen, die ein ausgewachsenes Zilium besaßen und sich damit in der G₀-Phase befanden, konnte Pitchfork ebenfalls im TGN und am Basalkörper detektiert werden (Fig. 47IV, V). Die Expression in den Vesikeln nahm in diesen Zellen aber ab, so dass in manchen Zellen Pitchfork nur an der Tochterzentriole und am Basalkörper detektiert werden konnte. In Zellen mit primären Zilien, die unter mitogenen Bedingungen wieder in die Mitose eintreten konnten, und damit das Zilium wieder abbauten, konnte endogenes Pitchfork wieder in einer hohen Akkumulation in zytoplasmatischen Vesikeln detektiert werden (Fig. 47VI). Die Zellen traten nun wieder in den Zellzyklus ein. Zellen, die sich in der S-Phase befanden, sowie in den frühen mitotischen Phasen (Prophase und Metaphase), besaßen eine hohe Expression an Pitchfork, Zellen in späteren mitotischen Phasen (Anaphase und Telophase) hatten nur eine geringe Expression an Pitchfork (Fig. 47VII). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Pitchfork während der Ziliogenese eine Rolle spielt, und zwar spezifisch dann, wenn Fibroblasten beim Verlassen des Zellzyklusses Zilien ausbilden und beim Eintritt wieder abbauen. Dies sind die Zellzyklusphasen, bei denen Basalkörper zu Zentrosomen konvertieren und anschließend wieder umgekehrt.

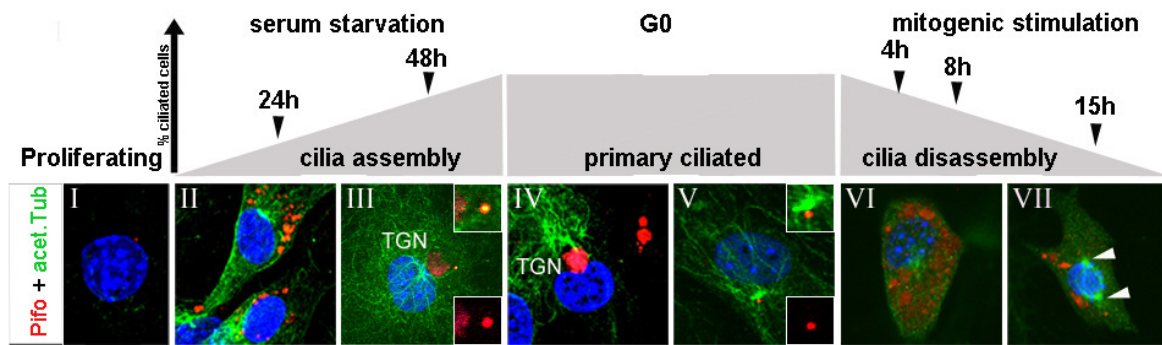


Fig. 47: Pitchfork Expression während der Ziliogenese

Analyse der Pifo-Expression während des Zellzyklus anhand von primären Fibroblasten der Vorderextremitäten (PLC). In proliferierenden Zellen kann Pifo kaum detektiert werden (I). PLC Zellen wurden für 24h und 48h unter serumarmen Bedingungen kultiviert, um Ziliogenese einleiten zu lassen. Während des Aufbaus des Ziliums akkumuliert Pifo in Vesikeln im Zytoplasma (II) und koloalisiert mit dem sich formenden Axonem des Basalkörpers (III). In primär ziliären Zellen ist Pifo entweder im TGN oder am Basalkörper lokalisiert (IV), jedoch nicht an der Mutterzentriole (V). Während der G0-Phase wird die Pifo-Expression schwächer. Nachdem die PLC durch Zugabe von Serum wieder in den Zellzyklus entlassen werden, akkumuliert Pifo erneut in Vesikeln im Zytoplasma und hat während der frühen mitotischen Phasen seinen Höhepunkt (VI), bevor die Expression wieder schwächer wird (VII). Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, 3x Zoom). acet.Tub.=acetyliertes Tubulin

3.2.16 Endogenes Pitchfork lokalisiert nur während der Zentrosomen zu Basalkörper-Konvertierung in der Ziliogenese

Durch die Verdopplung und Spaltung der Zilien im Primitivknoten des Mausembryos und die oben beschriebene Expression von Pitchfork während der Ziliogenese *in vitro*, lag die Vermutung nahe, dass Pitchfork während der Entwicklung des MTOC und der Verankerung des Basalkörpers im Primitivknoten eine Rolle spielt. Mittels immunohistochemischen Färbungen wurde untersucht, ob endogenes Pitchfork spezifisch an Zentrosomen oder Basalkörpern im Primitivknoten exprimiert ist. Der Primitivknoten der Maus eignet sich besonders als *in vivo* Model zur Analyse des Auf- und Abbaus der Zilien, da dieser aus unterschiedlichen Zelltypen besteht (Fig. 48A). Zum einen aus der ventral gelegenen epithelialen Zellschicht, die aus den monoziliären Zellen besteht und der dorsal gelegenen epithelialen Zellschicht, die aus den nicht ziliären Epiblastzellen besteht. Zellen dieser proliferierenden Zellschicht teilen sich Richtung der amniotischen Höhle (Fig. 48A, rosa Zelle). Die monoziliären Zellen des Primitivknotens, die sog. „Pit“-Zellen (Fig. 48A, rote Zelle) entstehen aus den dorsalen epithelialen Epiblastzellen. Diese „Pit“-Zellen verlassen die ventral gelegene epitheliale Zellschicht (Fig. 48A, grüne Zelle), gehen in die G0-Phase über und bilden ein Zilium. Zellen, die die Epiblastzellen verlassen, um ein Zilium auszubilden,

wandern zunächst in eine Zwischenschicht ein, die eine dritte Zellschicht bildet, die zwischen den dorsalen und ventralen Zellen des Primitivknotens liegt. Zellen in dieser Schicht ändern auch ihre apiko-basale Orientierung, um es Basalkörpern zu ermöglichen, an die Plasmamembran anzudocken und ein Zilium auszubilden. Monoziliäre Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, sind dennoch in der Lage wieder in den Zellzyklus einzutreten (Fig. 48A; gelbe Zelle). Dazu wird das Zilium wieder abgebaut und die Verankerung vom Basalkörper an der Zellmembran wird gelöst. Nun wird der Basalkörper wieder als mitotisches Zentrosom umfunktioniert und die Zentriole beginnt sich zu duplizieren. Es wurden nun immunohistochemischen Färbungen an gastrulierenden Embryonen E7,75 durchgeführt, um die Lokalisation von endogenen Pitchfork mit der Lokalisation des Zentriolenmarkers Cep135 (Kleylein-Sohn et al., 2007) und einem Marker für den Basalkörperfortsatz, Cep164 (Graser et al., 2007), zu vergleichen (Fig. 48B,C). Die Analyse ergab, dass Pitchfork sowohl mit Cep164 als auch mit Cep135 in den Zellen, die sich in der Zwischenschicht befinden, also Zellen, die gerade im Begriff sind ein Zilium zu bilden, kolokalisiert ist (Fig. 48B,C). Ebenso wurde eine Kolokalisation in Zellen gefunden, die wieder in den Zellzyklus eingetreten waren, das Zilium abgebaut hatten und sich in einer frühen mitotischen Phase befanden (Prophase oder Metaphase (Fig.34 B,C; sh. Vergrößerung)). Dagegen war nie eine Kolokalisation von Pitchfork mit dem Zentrosomen/Basalkörper-Markern in Zellen zu finden, die ein primäres Zilium ausgebildet hatten und sich in der G₀-Phase befanden. In hoch auflösenden Bildern (63x Objektive, 3fach Zoom) konnte die Kolokalisation von Pitchfork sowohl mit Cep135 als auch mit Cep164 in den Zwischenzellen des Primitivknotens bestätigt werden.

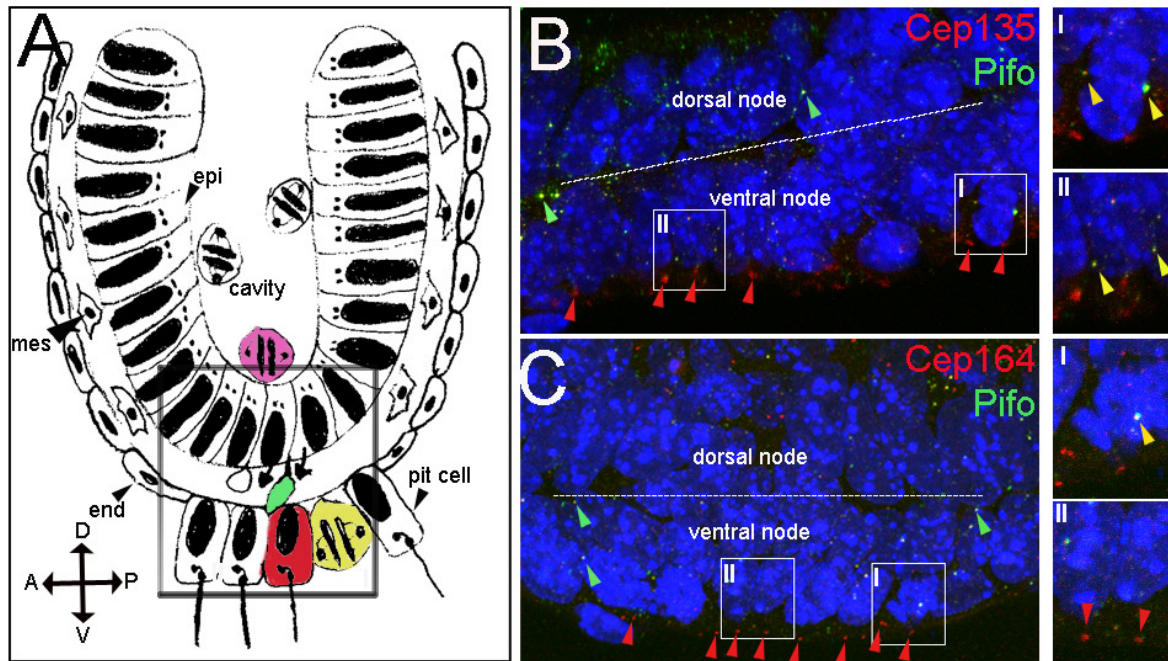


Fig. 48: Endogenes Pitchfork lokalisiert nur während der Konvertierung in der Ziliogenese an Zentrosomen und Basalkörpern

Modell eines Mausembryos im Gastrulationsstadium (A). Epiblastzellen teilen sich in Richtung amniotischer Höhle (violette Zelle). Zellen, die die epitheliale Epiblastenschicht verlassen (grüne Zelle), verlassen den Zellzyklus und treten in die G0-Phase ein (rote Zelle) und bilden ein Zilium aus. Zellen, die die G0-Phase wieder verlassen und mitotisch werden, teilen sich im epithelialen ventralen Primitivknoten (gelbe Zelle). Koimmunohistochemische Färbungen von Cep135 und Cep164 mit Pifo zeigen (B,C), dass Pifo mit dem zentriolaren Marker Cep135 in Zellen, die sich in der Zwischenschicht befinden und ein Zilium aufbauen wollen (grüne Pfeile) und mit Cep135 in mitotischen Zellen, die das Zilium wieder abbauen wollen (gelbe Pfeile) kolokalisiert ist (B,I,II). Dagegen kann in Zellen, die ein primäres Zilium besitzen keine Kolokalisation von Pifo mit dem Basalkörper detektiert werden (rote Pfeile). Das Resultat konnte mit Cep164 einem Marker für den Basalkörperfortsatz bestätigt werden (C,I,II). Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, B,C; 63x Vergrößerung, 3x Zoom, BI,II; CI,II).

Zusätzlich konnte in konfokalen Schnitten parallel zur apikalen Plasmamembran in Zellen in der Zwischenschicht gezeigt werden, dass endogenes Pitchfork ein, wie in Pedersen et al., 2008 beschriebenes, ziliäres halskettenähnliches Muster zeigt (Fig. 49). Ebenso zeigten immunohistochemische Färbungen mit E-Cadherin und acetyliertem Tubulin, dass Pitchfork an der apikalen Membran dieser Zellen lokalisiert ist, und dass dort diese beschriebene halskettenähnliche Expression auftritt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Pitchfork mit dem für den mikrotubuliabhängigen Transport wichtigen Protein Kif3a und dem Zentriolenmarker Cep135 kolokalisiert ist. Mit Hilfe dieses *in vivo* Modells für den Auf- und Abbau von Zilien kann nun vermutet werden, dass Pitchfork eine Rolle bei der Umwandlung von Zentrosomen zu Basalkörpern spielt, da Pitchfork spezifisch nur in diesen Schritten mit diesen Organellen kolokalisiert ist.

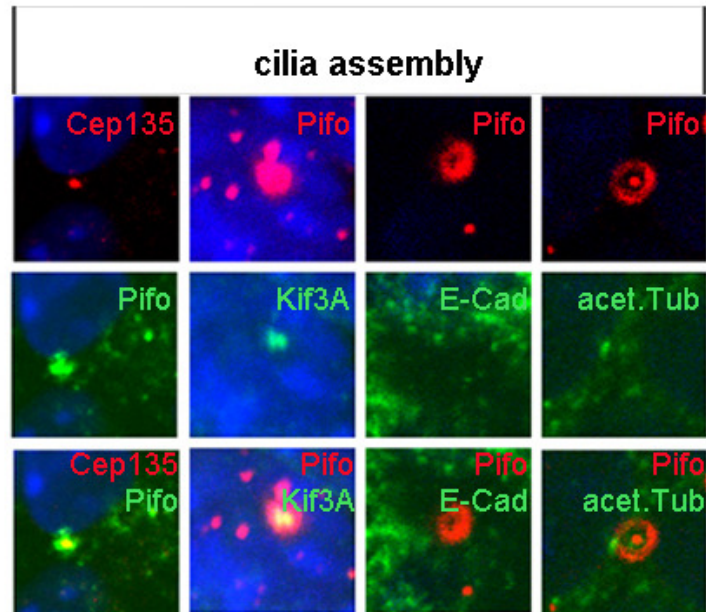


Fig. 49: Pitchfork erscheint an der apikalen Plasmamembran als halskrausenähnliche Struktur

Hochauflösende konfokale Bilder von koimmunhistochemischen Färbungen mit Pifo und dem zentriolären Protein Cep135, dem Motorprotein Kif3a, dem Adhäsionsprotein E-Cadherin und dem ziliären Protein acetyliertes Tubulin in zilienformenden Zellen in der Zwischenschicht des Primitivknotens. Pifo ist an der apikalen Plasmamembran an der Basis des primären Ziliums in einem halskettenähnlichen Muster exprimiert und mit Kif3a und Cep135 kolokalisiert. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, 3x Zoom). acet.Tub.=acetyliertes Tubulin, E-Cad=E-Cadherin

3.2.17 Pitchfork Vesikel transportieren *Shh*-Moleküle zur Plasmamembran

In Studien konnte gezeigt werden, dass in den monoziliären Zellen des Primitivknotens Vesikel mit wichtigen Signalmolekülen zur Membran transportiert werden (Tanaka et al., 2005). Diese Vesikel sind z.B. mit *Shh* beladen, docken an der Plasmamembran an und entladen dort ihren Inhalt. Entlang der Zilien wandert nun *Shh* und andere Morphogene, wie z.B. Nodal, in Richtung Zilienperipherie. Da die motilen Zilien sich in ständiger Bewegung im Uhrzeigersinn bewegen, werden die Signalmoleküle in eine Richtung geschleudert und mit dem sog „nodal-flow“ zu einer Seite des Embryos transportiert, wodurch die linke Achse des Embryos festgelegt wird. Da wir zeigen konnten, dass *Pitchfork* in den monoziliären Zellen des Primitivknotens exprimiert ist (siehe Fig. 28) und dort in Vesikeln akkumuliert, wurde der Inhalt dieser Vesikel genauer analysiert. Zunächst wurde die endogene Expression von den Proteinen, Smoothend (Smo), einem Rezeptor, und Gli3, einem Transkriptionsfaktor, die im *Shh*-Signalweg eine wichtige Rolle spielen, in den Zellen des Primitivknotens genauer

untersucht (Fig. 50A, B, D, E). Es ist bekannt, dass der Smo-Rezeptor auf dem Zilium lokalisiert ist und dass der Transkriptionsfaktor Gli das Zilium für die Prozessierung benötigt (Huangfu et al., 2005). Die endogene Expression von Smo und Gli3 ähnelt sehr stark der vesikulären Expression von Pifo in diesen Zellen (Fig. 50C, F). Auch bei diesen Proteinen kann eine vesikuläre Lokalisation intrazellulär aber auch entlang der stabilisierten Mikrotubuli detektiert werden. Immunohistochemische Färbungen von Shh in den Zellen des Primitivknotens zeigen ebenso eine vesikuläre Expression (Fig. 50G). Koimmunohistochemische Färbungen mit Shh und Pifo in dieser Region zeigen, dass in Zellen in der Zwischenschicht, die sich aktiv in der Ziliogenese befinden, Pitchfork in dem oben beschriebenen halskettenähnlichen Muster auftritt. In Pedersen et al., 2008 wurde dieses Muster als wachsendes Axonem, verbunden mit dem Basalkörper beschrieben. Diese Strukturen werden von Vesikeln umhüllt und werden Richtung Plasmamembran transportiert. An der Plasmamembran wird nun der Basalkörper mit der Zellmembran verankert, entlässt die mit Signalmolekülen gefüllten Vesikel und erscheint im TEM in einer apikalen Ansicht als halskettenähnliches Muster. Koimmunohistochemische Färbungen mit Shh und Pifo zeigen nun in zwei verschiedenen Schnittebenen von 1,5µm Abstand, dass die Pifo-positiven Vesikel, die in diesem halskettenähnlichen Muster erscheinen mit Shh gefüllt sind (Fig. 50G). Diese Resultate deuten daraufhin, dass Pitchfork für den Transport von Signalmolekülen an die Plasmamembran eine Rolle spielt, aber nur in denjenigen Zellen, die in die Ziliogenese gehen. Da Pitchfork nur in Regionen mit hoher Organisatoraktivität exprimiert ist und dort nur während der Ziliogenese akkumuliert, stellt sich nun die Frage, ob Pitchfork durch den Transport wichtiger Signalmoleküle als Schalterfunktion zwischen proliferierenden und differenzierenden Zellen die Musterbildung reguliert.

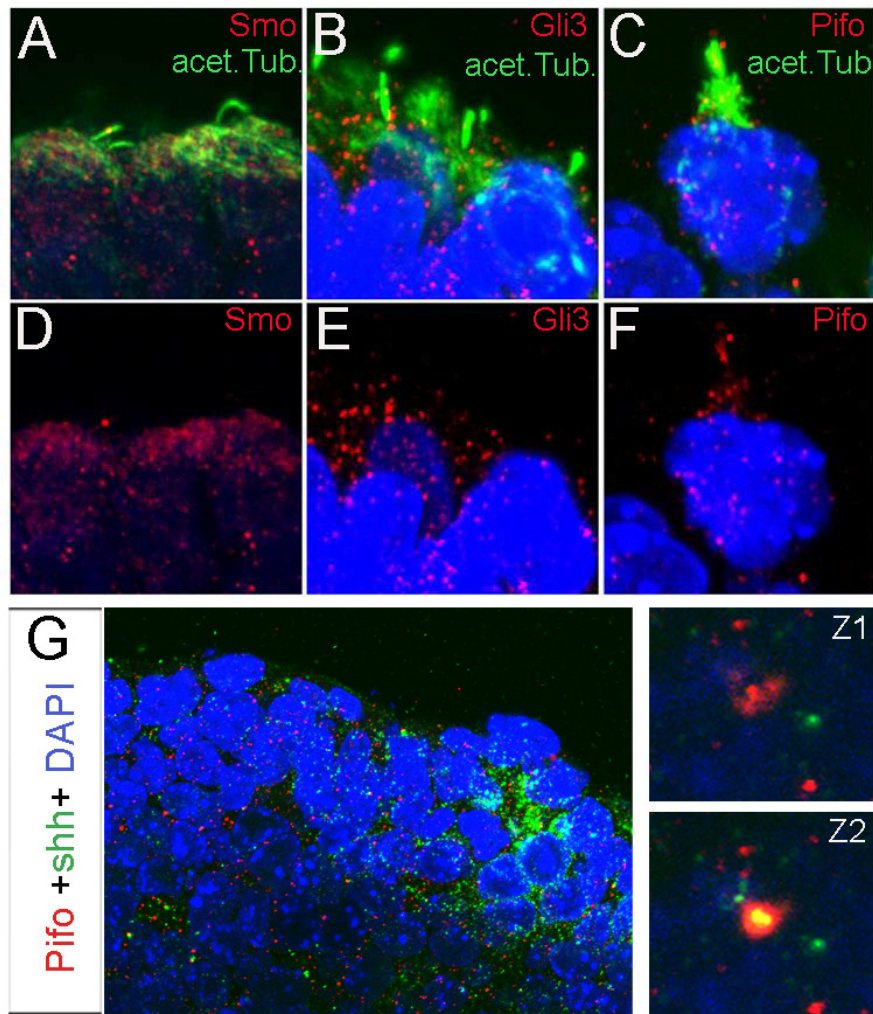


Fig. 50: Pitchfork akkumuliert in Vesikeln und transportiert Shh zur Plasmamembran

Analyse von koimmunhistochemische Färbungen von acetyliertem Tubulin mit Smo (A, D), Gli3 (B,E) und Pifo (C,F) in Zellen des Primitivknotens. Smo, Gli3 und Pifo zeigen eine ähnliche vesikuläre Expression in diesen Zellen (A-F). Koimmunhistochemische Färbungen von Pifo und Shh zeigen, dass Pifo und Shh in Zellen, die sich in der Zwischenschicht befinden, kolokalisiert ist. Hochauflösende konfokale Bilder, in einem Abstand von 1,5 μ m aufgenommen zeigen, dass die Pifo Vesikel, die als halskrausenähnliche Struktur erscheinen, mit dem Signalmolekül Shh beladen sind. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung G, 63x Vergrößerung, 3x Zoom A-F). acet. Tub.=acetyliertes Tubulin, Smo=Smoothend

3.2.18 Pitchfork ist in den mikrotubuli-abhängigen Transport zur Plasmamembran involviert

Das Andocken und die Verankerung der Zentrosomen an die Plasmamembran, sowie das Ablösen von dieser wird durch vesikulären und mikrotubuliabhängigen Transport von Proteinen gewährleistet (Park et al., 2008; Tsang et al., 2008). Da in immunohistochemischen Färbungen gezeigt werden konnte, dass Pitchfork während der Ziliogenese, wenn Zentrosomen zu Basalkörpern konvertieren, spezifisch mit diesen Organellen kolokalisiert ist,

lag die Vermutung nahe, dass Pitchfork mit Proteinen, die in dem Prozess des vesikulären und mikrotubuliabhängigen Transport eine Rolle spielen, ebenso interagiert. Um mögliche Bindungspartner von Pitchfork zu identifizieren, testeten wir eine mögliche Interaktion mehrerer zentrosomaler, mikrotubulärer und Motorproteinen mittels Affinitätsaufreinigungen von endogenem Pitchfork (Fig. 51). Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Tap-Pitchfork und Tap- Δ ccPitchfork (tandem affinity purification tagg, Glöckner et al., 2007) überexprimiert. Die überexprimierten Zellen wurden für 48h unter serumarmen Bedingungen kultiviert, um Ziliogenese zu induzieren, anschließend wurden die Zellen lysiert. Mittels einer Streptavidin-Aufreinigung wurde endogenes Pitchfork präzipitiert und anhand einer Western Blot Analyse mögliche Interaktionspartner detektiert. So konnte gezeigt werden, dass z.B. das zentriolare Protein Centrin, das mikrotubuläre Protein β -Tubulin, der perizentriolare Marker γ -Tubulin und das Motorprotein Kif3a physisch mit Pitchfork in der Zellkultur interagiert. Dagegen zeigen zusätzlich die Immunpräzipitationen, dass die Protein-Protein-Interaktion ohne die N-terminale coiled-coil-Domäne im Vergleich zu dem Konstrukt mit der langen Isoform sehr viel schwächer ist.

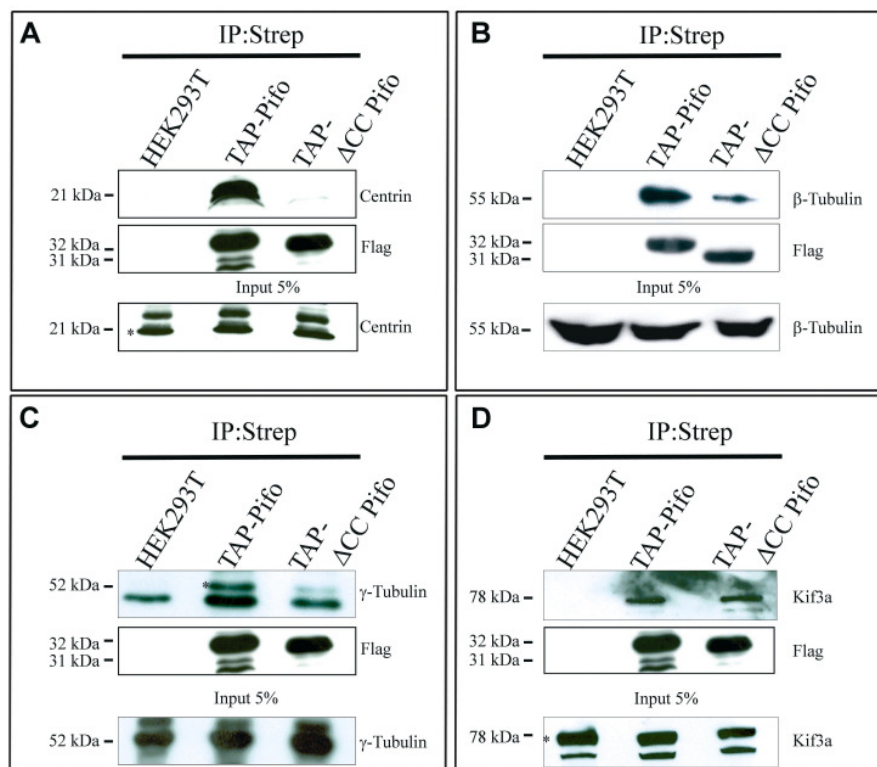


Fig. 51: Pitchfork interagiert mit Proteinen für den vesikulären und mikrotubuliabhängigen Transport

HEK293T-Zellen wurden mit der langen und kurzen Pifo-Isoform transfektiert, für 48h unter serumarmen Bedingungen kultiviert, und die primär ziliären Zellen anschließend lysiert und

mittels Streptavidin (Strep)-affinitäts-Perlen immunpräzipitiert. Endogenes Centrin (A), β -Tubulin (B), γ -Tubulin (C) und Kif3a (D) konnten extrahiert und anschließend mittels Western Blot-Analyse detektiert werden. Um zu kontrollieren, ob Pifo präzipitiert wurde, wurde eine Western Blot-Analyse mit Flag-Antikörpern durchgeführt. Als Lade- und Spezifitätskontrolle wurden 5% Einsatzmenge gewählt.

In koimmunhistochemischen Färbungen mit Kif3a und Pifo konnte eine Kolokalisation im Primitivknoten der Maus bestätigt werden (Fig. 52). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pitchfork mit zentrosomalen und mikrotubulären Proteinen, sowie mit Motorproteinen interagiert, die während des Auf- und Abbaus eines Ziliums eine wichtige Rolle spielen.

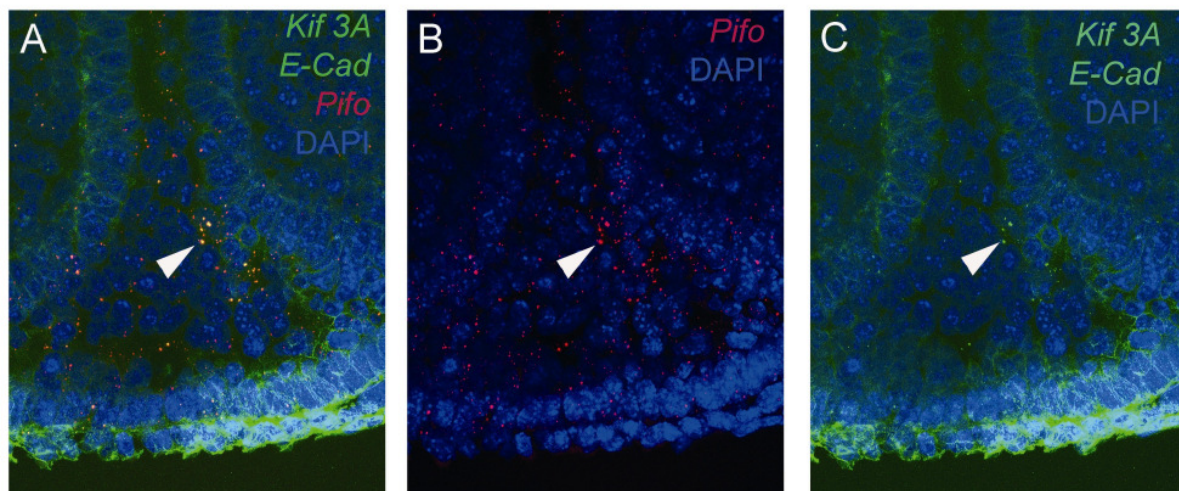


Fig. 52: Kolokalisation von Pitchfork und Kif3a im Primitivknoten der Maus

Analyse koimmunhistochemischen Färbungen von Pifo, E-Cadherin und Kif3a im Primitivknoten im Stadium E7,75 (A,B,C). Kolokalisation von Pifo und Kif3a im Primitivknoten (A; Pfeil). Der Embryo ist in distaler Ansicht abgebildet. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung), E-Cad.=E-Cadherin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol

3.2.19 Pitchfork reguliert den Abbau des primären Ziliums

Ultrastrukturelle Analysen von *Pichfork*^{lacZ/+}-Embryonen im Stadium E7,75 haben gezeigt, dass die Zilien im Primitivknoten dieser Embryonen entweder dupliziert sind oder Defekte in ihrer Struktur aufweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass endogenes Pitchfork während der Konvertierung der Zentrosomen zu Basalkörpern in der Ziliogenese spezifisch an diesen Organellen kolokalisiert ist. Dies ließ vermuten, dass Pifo während der Konvertierung der Zentrosomen zu Basalkörpern und umgekehrt eine Rolle spielt. Um den Auf- und Abbau der Zilien in Zellkultur genauer analysieren zu können, wurden primäre Fibroblasten aus *WT*- und *Pichfork*^{lacZ/+}-Vorderextremitäten (PLC) im Stadium E11,5

(Fig. 53) generiert. Die Fibroblasten wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. So wurden die PLC-Zellen unter nicht dichten Bedingungen und unter dichten Bedingungen ausgesät. Die dichten Zellen wurden nun für 24h unter serumarmen Bedingungen kultiviert. Ein Teil dieser Zellen wurde unter Zugabe von Serum (15% FCS) wieder für 4h, 8h und 15h in den Zellzyklus entlassen, um das Zilium wieder abbauen zu können und um den Basalkörper zum Zentrosom für die Zellteilung zu konvertieren. In immunohistochemischen Färbungen mit acetyliertem Tubulin konnte nun gezeigt werden, dass in 80% der Zellen, die für 24h unter serumarmen Bedingungen kultiviert wurden, sich die Zellen in der G0-Phase befanden, also ein Zilium besaßen (Fig. 53K). Nach Zugabe von Serum, konnten die Zellen mit primären Zilien wieder in die Mitose eintreten, was sich in dem reduzierten Prozentsatz der ziliären Zellen und dem Anstieg an mitotischen Zellen (Fig. 53L) zeigte. Koimmunohistochemische Färbungen mit dem perizentriolaren Marker γ -Tubulin und dem ziliären Marker acetyliertes Tubulin zeigten, dass sowohl in *WT*- als auch *Pitchfork*^{lacZ/+}-PLC-Zellen, nach 24h unter serumarmen Bedingungen, pro Zelle ein Zilium und zwei Zentrosomen vorhanden war (Fig. 53A, F). *Pitchfork*^{lacZ/+}-PLC-Zellen, die durch Serumzugabe wieder in den Zellzyklus eintreten konnten, zeigten einen hohen Prozentsatz an mitotischen Defekten (Fig. 53M). Auch in der Zytokinese zeigten *Pitchfork*^{lacZ/+}-PLC-Zellen multipolare Spindeln (Fig. 53I). Dies ist konsistent mit dem Phänotyp im Primitivknoten von *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen, die duplizierte oder gespaltene Zilien zeigten. Der Grund für die multipolaren Spindeln lässt sich durch eine unkontrollierte Überreplikation der Zentrosomen während der S-Phase erklären, da bereits in der Prophase der mutanten Fibroblasten eine viel zu große Anzahl an Zentrosomen detektiert werden konnte (Fig. 53H). Die übermäßige Replikation der Zentrosomen führte dann auch während der Meta- und Anaphase zu multipolaren Spindeln (Fig. 53I). Diese Resultate sind ein erster Hinweis darauf, dass Pifo nicht *per se* im Zellzyklus eine Rolle spielt, sondern primär nur in ziliären Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, wieder in den Zellzyklus eintreten und aktiv ihr Zilium abbauen.

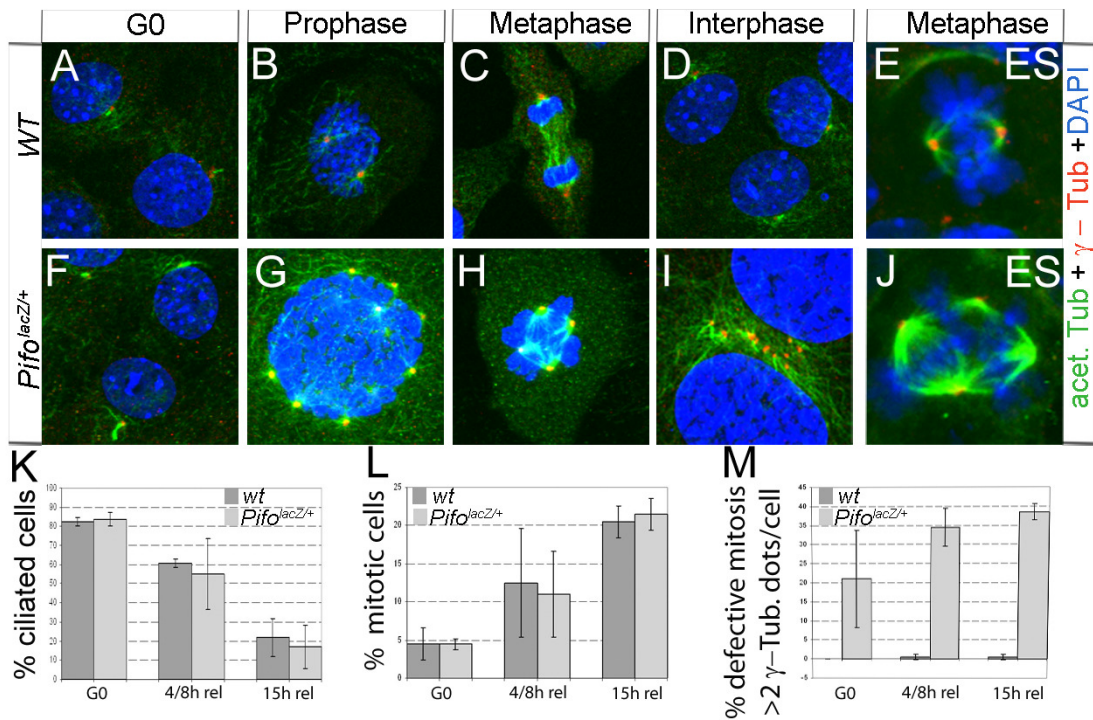


Fig. 53: Pitchfork reguliert den Abbau des primären Ziliums

Analyse der Pitchfork-Funktion während des Abbaus des Ziliums in *Wt*- (A-D) und *Pitchfork^{lacZ/+}*- (F-I) primären Fibroblasten (PLC). In *Wt*- (A) und *Pitchfork^{lacZ/+}*- (F) PLC, die für 48h unter serumarmen Bedingungen kultiviert wurden, besitzen 80% der Zellen ein Zilium (K) und 5% der Zellen sind mitotisch (L). Nach Zugabe von Serum bauen *Wt*- und *Pitchfork^{lacZ/+}*-PLC das Zilium wieder ab (K) und treten in die Mitose ein (L). Im Gegensatz zu *Wt*-Zellen (B-D), zeigen *Pitchfork^{lacZ/+}*-Zellen eine Überreplikation von Zentrosomen während der S- zur Prophase (G), multipolare Spindeln in der Metaphase (H) und multiziliäre Zellen nach der Zytokinese (I). Undifferenzierte, proliferierende ES-Zellen besitzen zu 10-15% ziliäre Zellen und haben in Kultur eine hohe Teilungsrate (E). In *Pitchfork^{lacZ/+}*-ES-Zellen besitzen 2,5% der sich teilenden Zellen multipolare Spindel (J). Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, 3x Zoom), γ -Tub.= γ -Tubulin, acet Tub.=acetyliertes Tubulin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol. In K, L, M wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst, in denen jeweils 100-200 Zellen ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.2.20 Pitchfork ist in ES-Zellen exprimiert und reguliert den Abbau des primären Ziliums

Um zu untersuchen, ob Pitchfork auch in ES-Zellen exprimiert ist und um zu zeigen, dass *Pifo* nicht *per se* im Zellzyklus eine Rolle spielt, wurden *WT*- und *Pitchfork^{lacZ/+}*-ES-Zellen mittels immunohistochemischen Färbungen von Zentrosomen und Zilien (Fig. 53E, J) analysiert. Eine Besonderheit von ES-Zellen ist, dass unter normalen Kulturbedingungen rund 10-15% der ES-Zellen ein Zilium besitzen. Ein weiteres Merkmal der ES-Zellen ist, dass sie sich sehr schnell teilen, da bei ihnen der Kontrollpunkt während der G1-Phase fehlt. Die immunohistochemischen Färbungen ergaben nun, dass in *Pitchfork^{lacZ/+}*-ES-Zellen nur 2,5%

der Mitosen einen Defekt zeigten. Zum einen konnte dadurch gezeigt werden, dass Pitchfork in embryonalen Stammzellen exprimiert ist. Zum anderen lässt sich durch die geringe Anzahl an defekten Mitosen und dem geringen Prozentsatz an ziliären ES-Zellen vermuten, dass Pifo tatsächlich nur in Zellen, die wieder in den Zellzyklus nach der G0-Phase treten, eine Funktion hat.

3.2.21 Pitchfork reguliert den Abbau des Basalkörpers vom Zilium

Bis heute ist nur sehr wenig über den Mechanismus bekannt, wie eine Zelle, die sich in der G0-Phase befindet in der Lage ist, das Zilium wieder abzubauen, um in den Zellzyklus einzutreten. Pugacheva et al., 2007 konnten zeigen, dass Interaktionen des Strukturproteins HEF1 und der Aurora A-Kinase dafür verantwortlich sind, dass die stabilisierten und acetylierten Mikrotubuli des ziliären Axonems deacetyliert und destabilisiert werden, um den Abbau des Ziliums initiieren zu können. Der Mechanismus, wie der Basalkörper vom ziliären Axonem während der Zentriolenduplikation gelöst wird, ist allerdings bis heute nicht bekannt. Um den molekularen Mechanismus verstehen zu können, wie die übermäßige Replikation der Zentrosomen in den synchronisierten, mitotischen Zellen nach Abbau des Ziliums der *Pitchfork*^{lacZ/+}-PLC-Kulturen zustande kommt, wurden diese Zellen *in vitro* und *in vivo* genauer analysiert. Dazu wurden immunohistochemische Färbungen an *WT*-, und *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen E7,5 und PLC-Kulturen durchgeführt, um die perizentriolare Matrix und das Zilium anzufärben und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie auszuwerten (Fig. 54). In *WT*-Zellen des Primitivknotens und in Fibroblasten, die sich in der G0-Phase befinden wird das Zilium resorbiert, bevor die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten. Dies konnte bereits in anderen Zelltypen gezeigt werden (Tucker et al., 1979, Rieder et al., 1979, Pugacheva et al., 2007). In der Analyse von Zellen des Primitivknotens wie auch in primären Fibroblasten, die eine geringere Expression an Pitchfork haben, konnten nun allerdings auch Zellen gefunden werden, die ein Zilium besitzen und sich in der Mitose befinden. Eine genauere Analyse ergab, dass Basalkörper in diesen Zellen nicht vom Zilium gelöst werden können, dadurch das Zilium nicht abgebaut werden kann und so auch Zellen, die sich in der Mitose befinden weiterhin ein Zilium besitzen. In Zellen, die mit Hydroxyurea behandelt wurden, konnte ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden. Diese Zellen sind in der S-Phase arretiert, was zu einer übermäßigen Replikation von Zentrosomen führt (Balczon et al., 1995). Zusammen mit den Beobachtungen, dass Pifo wichtig für den Abbau des Ziliums und für das Loslösen des Basalkörpers vom ziliären Axonem ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine fehlerhafte Umwandlung des Basalkörpers zum Zentrosom zu einer Arretierung in

der S-Phase führt und dies zu einer übermäßigen Verdopplung der Zentrosomen und Basalkörper.

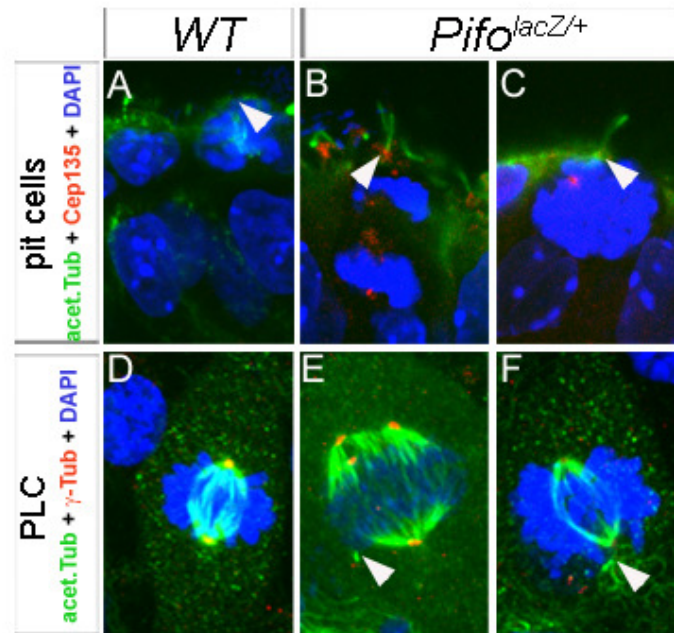


Fig. 54: Pitchfork reguliert den Abbau des Basalkörpers vom Zilium

Analyse von Zellen im Primitivknoten (A-C) der Maus und von PLC-Zellen (D-E) nach immunhistochemischen Färbungen von acetyliertem Tubulin und CEP135 (A-C) und γ -Tubulin (D-F). *Wt*-Zellen im Primitivknoten (A) und *Wt*-PLC-Zellen (D) bauen das Zilium ab und besitzen zwei Spindelpole (A,D), wohingegen *Pitchfork*^{lacZ/+}-Zellen im Primitivknoten (B,C) und PLC-Zellen (E-F) multiple Spindelpole besitzen und das Zilium nicht resorbieren können. Analyse mittels konfokaler Mikroskopie (63x Vergrößerung, 3x Zoom). γ -Tub.= γ -Tubulin, acet Tub.=acetyliertes Tubulin, DAPI=4',6-Diamidino-2-phenylindol.

3.2.22 Identifizierung von neuen Pitchfork Protein-Protein Interaktionspartnern

In den letzten 10 Jahren wurde als Ursache für viele menschliche Krankheiten defekte Zilien und Basalkörper verantwortlich gemacht. Mittlerweile sind mehrere Dutzend sogenannter Ciliopathien bekannt. Solche Ciliopathien sind z.B. primäre ziliäre Dyskinesien, das Karthagener-Syndrom, Situs inversus, Hydrocephalien, polyzystische Leber- und Nieren-Erkrankungen, Unfruchtbarkeit und verschiedene Formen von retinaler Degeneration. Aber auch Mutationen in ziliären Proteinen können sich in menschliche Krankheiten auswirken, wie z.B. das Bardet-Biedl-Syndrom, das Alstrom-Syndrom und das Meckel-Gruber-Syndrom. Da in *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen und PLC-Kulturen die Struktur und Anzahl der Zilien defekt ist und gezeigt werden konnte, dass Pifo mit zentrosomalen Proteinen und Motorproteinen physisch interagiert, ergab sich die Fragestellung, ob Pitchfork auch mit Proteinen, die in

Ciliopathien eine Rolle spielen, interagiert. Dazu wurde die lange Isoform von TAP-Pifo in HEK293T-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden für 48h unter serumarmen Bedingungen kultiviert und anschließend lysiert. Pifo wurde nun mittels Affinitätsaufreinigung präzipitiert und in der Massenspektrometrie (LC-MS/MS; Glöckner et al., 2007) analysiert (mit Unterstützung von Karsten Boldt, Abteilung für Humangenetik, AG Dr. Ueffing). Wir identifizierten in dieser Analyse 172 mögliche Interaktionspartner von Pitchfork (siehe Anhang 6.3.2). Zehn dieser Interaktionspartner sind in der Zytoskelett- oder Mikrotubulstruktur involviert und fünf Proteine sind wichtig für die Basalkörperfunktion, was auf eine hohe Spezifität dieser Analyse schließen lässt.

Wichtig zu erwähnen ist, dass der Versuch mit einer kleinen Modifikation wiederholt wurde: Dazu wurden nach der Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem TAP-Pifo-Konstrukt die Zellen direkt, ohne sie vorher für 48h ohne Serum zu kultivieren, lysiert. Dadurch konnten die Zellen nicht in die Ziliogenese gehen, und die Expression von Pitchfork war daher gering. Nach der Aufreinigung konnten in der Analyse in der Massenspektrometrie keine spezifischen Interaktionspartner von Pitchfork identifiziert werden. Dieses Ergebnis ist als interne Kontrolle wichtig, um zu zeigen, dass die identifizierten Proteine tatsächliche physiologische Interaktionspartner von Pitchfork sind. Zusätzlich zu den Mikrotubuli-, Zytoskelett- und Basalkörper-Proteinen, die als Interaktionspartner von Pitchfork identifiziert werden konnten, analysierten wir 4 Proteine, die am Zentrosom und am Basalkörper lokalisiert und in menschliche ziliäre Krankheiten involviert sind. Unter anderem war es das RPGRIP-Protein, welches ein Nephrocystin4-Interaktor ist und zu dem Joubert-Syndrom führt. Diese Krankheit äußert sich in Mikrozephalie, Tumoren der Zunge, Holoprosencephalie, Polydaktylie und zu Nephrozystie. Ein weiteres Gen ist das Oral-facial-digital syndrome 1 Protein. Phänotypische Analysen in der Maus konnten zeigen (Ferrante et al., 2006), dass dieses Protein für die Links-Rechts-Achsendeterminierung verantwortlich ist. Knock-out-Mäuse weisen zudem eine Polydaktylie auf. Die Ähnlichkeit der Phänotypen beider Krankheitsgene mit den *Pitchfork*^{lacZ/+}-Embryonen lassen darauf hindeuten, dass Pitchfork genau wie die beschriebenen zentrosomalen Proteine und Basalkörper, in der Ziliogenese eine Rolle spielen muss und identifiziert Pitchfork als potentiell Krankheitsgen.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung neuer Spemann/Mangold-Organisatorgene

Um regulatorische Netzwerke, durch die die Entwicklung des Embryos koordiniert werden, besser verstehen zu können, wurde in den letzten Jahren das Genexpressionsprofil von *Wildtyp*- und mutanten Embryonen miteinander verglichen. Dies eignet sich besonders gut um Zielgene von Transkriptionsfaktoren in verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen zu identifizieren und um sekundäre Effekte wie den Verlust von Zelltypen, Geweben oder nichtzellautonomen Effekten besser zu verstehen. Wir haben nun das Genexpressionsprofil von *Wildtyp*- und Null-Mutanten, in denen der Forkheadbox-Transkriptionsfaktor *Foxa2* deletiert wurde, in Embryonen im Gastrulationsstadium E7,5 miteinander verglichen. *Foxa2*^{-/-} Mutanten können bestimmte Organisatorregionen nicht auszubilden, wie z.B. den Primitivknoten, das anteriore Mesendoderm (AME) und das definitive Entoderm (DE). Wir konnten nun bekannte direkte Zielgene von *Foxa2* in unserem Datensatz identifizieren, die signifikant im Vergleich zum *Wildtyp*-Datensatz herunterreguliert waren. In dem Datensatz waren aber auch hunderte von unbekanntem herunterregulierten Genen, wodurch sich nun die Frage stellte, welche von diesen Genen wichtig für den Organisator sind. Aus diesem Grund fokussierten wir uns auf die $\geq 1,5$ fach signifikant herunterregulierten Gene und führten einen whole-mount *in situ* Hybridisierungsscreen durch, um Gene mit einem Expressionsmuster in Geweben mit Organisatorfunktion zu identifizieren, wie z.B. im Primitivknoten oder in entodermalem Gewebe. Dieser Versuch wurde als Kollaboration in unserem Labor, aber auch in der Arbeitsgruppe von Prof. Janet Rossant durchgeführt. Zusammen analysierten wir das Expressionsmuster von 314 unbekanntem Genen. Davon waren 10 (3,1%) neue Marker spezifisch im Primitivknoten exprimiert und 5 (1,5%) im definitiven Entoderm (Tamplin et al., 2008). Wie spezifisch unsere Analyse war, zeigt sich im Vergleich zu bisherigen Veröffentlichungen, in denen die analysierten Gene allerdings zufällig aus cDNA-Banken ausgewählt wurden. So haben auch Sousa-Nunes et al., 2003 das Expressionsmuster in gastrulierenden Mausembryonen im Stadium E7,5 analysiert. In diesem Screen wurde das Expressionsmuster von 1851 Genen analysiert, davon allerdings nur 0,3% der Gene (n=6) im viszeralem Entoderm exprimiert waren, keines davon im definitiven Entoderm und nur 0,27% der Gene (n=5) im Primitivknoten. Bisher waren nur 49 Gene bekannt, die im Primitivknoten der Maus exprimiert sind (siehe www.informatics.jax.org). In unserem Screen konnten wir nun die Liste der Gene, die in dieser spezifischen Region exprimiert sind um fast 20%

erweitern, weshalb dieser Screen zu einer der effektivsten Analysen gehört, in der neue Organismorgene identifiziert wurden.

4.2 Das Expressionsmuster innerhalb des sich entwickelnden Darms wird regional dynamisch reguliert

Das Ziel dieses Screens war es Organismorgene, wie auch entodermale Gene zu identifizieren. Bisher waren keine Marker bekannt, die spezifisch im definitiven Entoderm exprimiert sind. In unserem Screen dagegen konnten wir zwei Gene identifizieren, die ausschließlich im definitiven Entoderm exprimiert sind, nämlich *Cldn4* und *Cpn1*. Das Interesse an definitiv entodermalen Genen ist sehr groß, um die Musterbildung des sich entwickelnden Darms während der embryonalen Entwicklung besser verstehen zu können. Besonders die *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen in definitiv entodermale Zellen und später in eine bestimmte entodermale Richtung, wie z.B. Leber, Lunge und Pankreas, ist für therapeutische Zwecke essentiell. Aus diesem Grund ist es nötig die Entwicklung des Entoderms und der daraus entstehenden Organe zu verstehen, um die mechanistischen Prinzipien von der Embryogenese auf die Zellkultur übertragen zu können. Die ersten Analysen dazu wurden bereits durchgeführt (Franklin et al., 2008, Tam et al., 2004, Tam et al., 2007, Tremblay et al., 2005), indem anatomische Kartierungen des definitiven Entoderms von der Gastrulation bis hin zu den sich daraus entwickelnden Organen angefertigt wurden. Fest steht aber, dass das Expressionsmuster des primitiven Darms regional dynamisch reguliert wird. Wie die unzähligen entodermalen Gene zeitlich und räumlich miteinander interagieren und so entodermale Strukturen ausbilden ist dagegen momentan noch unklar. So gibt es Gene, die nur in frühen Stadien der entodermalen Entwicklung exprimiert sind, wie z.B. das für die Musterbildung des Embryos wichtige Gen *Cer1* (Biben et al., 1998). Andere Gene dagegen sind von Beginn an in entodermalen Zellen exprimiert und nur später spezifisch in einer bestimmten entodermalen Region, wie z.B. *Trh* (McKnight et al., 2007). So ist es auch bekannt, dass Gene wie z.B. *Sox17* (Kanai-Azuma et al., 2002) und *Tmprss2* (Moore-Scott et al., 2007) nur im Mitteldarm und Hinterdarm exprimiert sind. Wir konnten diese Liste durch die Identifizierung von *Ppp1r14a* erweitern, da dieser Marker ab dem Stadium E8,5 ebenfalls nur in diesen Regionen exprimiert ist. Dadurch lässt sich vermuten, dass es Unterschiede in der anterioren und der posterioren Region des sich entwickelnden Darmes geben muss. Die Identifizierung eines weiteren Gens *Cldn4* war insbesondere von Bedeutung, da dieser Marker während der definitiv entodermalen Entwicklung beinahe

durchgängig exprimiert ist. Die Familie der Claudine ist sehr groß und besteht aus 24 Familienmitgliedern. *Cldn4* zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie *Cldn6*, aber über die Funktion von *Cldn4* ist bisher nichts bekannt. Zur Zeit werden in unserem Labor eine *Cldn4*-iCre Mauslinie und ein Knock-out Konstrukt generiert, um eine mögliche Funktion während der Embryonalentwicklung zu identifizieren und um die Fragestellung zu analysieren, inwiefern dieses regionale Expressionsmuster während der entodermalen Entwicklung für die spätere Musterbildung des Entoderms und der daraus gebildeten Organe notwendig ist.

4.3 Reguliert *Foxa2* ein Netzwerk durch die Aktivierung von Genen in der Organisatorregion und den daraus entstehenden Derivaten?

Foxa2 ist von Beginn an im Primitivknoten exprimiert besteht dort auch so lange, bis diese Regionen sich zu den Derivaten entwickelt haben, dem axialen Mesoderm (Notochord), dem definitiven Entoderm (Darm) und dem ventralen Neuroektoderm (Bodenplatte). Dadurch stellt sich die Frage, wie nun *Foxa2* die Regulation in den verschiedenen aber räumlich eng miteinander assoziierten Zelltypen während der Gastrulation koordinieren kann. Studien im Seeigel (Oliveri et al., 2008) haben gezeigt, dass durch vernetzte Genregulation die Abstammung verschiedener Zellen spezifiziert werden, z.B. durch gegenseitige Wechselwirkung zweier Gene, die sich dadurch gegenseitig stabilisieren oder durch Aktivierung von Genen, die sich selber und damit auch benachbarte Zellen durch ihre Expression stabilisieren. So lässt sich vermuten, dass auch im Mausembryo ein solches Netzwerk der Genregulation existiert. Bei Tamplin et al., 2008 konnten wir die ersten Hinweise auf ein solches Netzwerk finden. So ergab eine Analyse möglicher Bindungsstellen vom mesodermalen Transkriptionsfaktor *Brachyury/T* und dem mesentodermalen Transkriptionsfaktor *Foxa2*, dass sich beide Gene durch eine Rückkopplungsschleife gegenseitig regulieren. Diese These wird durch die Daten von Burtscher und Lickert, 2009 unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass *Foxa2* schon in den AME-Vorläuferzellen im Epiblasten exprimiert ist, welche das *Brachyury/T*-Protein nach dem Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Zellen aktivieren. Während der Entwicklung des axialen Mesoderms und Populationen des anterioren Entoderms bleibt diese AME-Zellpopulation sowohl für *Foxa2* als auch für *Brachyury/T* positiv. Es wäre aber auch möglich, dass *Foxa2* und *Brachyury/T* weitere Gene für ihre gegenseitige Wechselwirkungen benötigen, z.B. ein in dieser Zellpopulation ebenfalls exprimierter axialer mesentodermaler Transkriptionsfaktor, *Foxa1*. Eventuell müssen alle drei Gene gleichzeitig in einer Zelle exprimiert sein und

interagieren, um dieser Zelle eine Orientierung geben zu können. Aber *Foxa2* interagiert genetisch auch mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *Noto* (Yamanaka et al., 2007), *Lhx1* (Perea-Gomez et al., 1999), *Otx2* (Jin et al., 2001) oder *Gsc* (Filosa et al., 1997). Es werden also noch weitere Analysen notwendig sein, um zu untersuchen, ob durch gegenseitige Wechselwirkungen verschiedener Gene eine Zelle in eine bestimmte Differenzierungsrichtung gezwungen wird und somit ihre Abstammung nachverfolgt werden kann.

4.4 Die Funktion von Pitchfork während der Ziliogenese

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Zilien eine weit wichtigere Funktion haben, als bisher angenommen. So beeinflussen Zilien die Zellbewegung, den Transport von Flüssigkeiten und entwicklungsrelevanten Signalen (Rosenbaum und Witman, 2002, Eggenschwiler und Anderson, 2007, Bettencourt-Dias und Glover, 2007). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass primäre Zilien eine wichtige sensorische Funktion für Signalmoleküle haben, wie z.B. Shh, Wnt, PDGFa (Huangfu et al., 2003, Eggenschwiler und Anderson, 2007) und dadurch die Musterbildung des Embryos steuern. Weshalb Zilien in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen haben liegt vor allem auch daran, dass gezeigt werden konnte, dass defekte Zilien zu einem breiten Spektrum an menschlichen Krankheiten führen, wie z.B. Defekte in der Links-Rechts-Asymmetrie, männliche Infertilität, Zysten in Pankreas, Leber und Niere, ebenso wie Atemwegserkrankungen, aber auch zu Krankheiten, die nicht direkt in Zusammenhang mit Zilien gebracht werden, wie z.B. Fettleibigkeit, Diabetes oder Krebs (Michaud und Yoder, 2006; Badano et al., 2006).

Der intraflagellare Transport ist für den Aufbau eines Ziliums wichtig (Rosenbaum und Witman, 2002; Pazour und Witman, 2003). Der Mechanismus und die Moleküle, die für den Abbau des Ziliums verantwortlich sind, sind bisher nur rudimentär verstanden. Sorokin hat bereits 1962 anhand von elektronenmikroskopischen Analysen die frühen Schritte des Zilienaufbaus detailliert beschrieben (Sorokin, 1962 und 1968; Review von Pedersen et al., 2008). Er unterteilt den Aufbau des Ziliums in vier Schritte, aber bisher sind nur wenige Moleküle bekannt, die diesen Aufbau organisieren, wie z.B. Cep97, Cep110 und Cep270 (Spektor et al., 2007; Bettencourt-Dias und Carvalho-Santos, 2008; Tsang et al., 2008). Zellen können aber nicht nur in die G0-Phase gehen und ein Zilium aufbauen, sondern sie sind auch in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten und das Zilium abzubauen (Rieder et al.,

1979; Tucker et al., 1979; Quarmby und Parker, 2005; Pan und Snell, 2007). Der Mechanismus, wie Zilien wieder abgebaut werden ist bisher nicht bekannt.

Ziliogenese ist aber auch an den Zellzyklus gekoppelt. So können primäre Zilien ausgebildet werden, wenn eine proliferierende Zelle aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase eintritt. Dabei werden Zentrosomen, die während des Zellzyklusses als MTOC fungieren, zu Basalkörpern umgewandelt. Sie werden an die Plasmamembran transportiert, verankern sich dort und das Axonem kann sich zu einem funktionsfähigen Zilium ausbilden (Sorokin, 1962, Sorokin, 1968). Beim Abbau des Ziliums löst sich nun der Basalkörper von der Plasmamembran und konvertiert wieder zum Zentrosom. Eine fehlerhafte Konvertierung des Zentrosoms zum Basalkörper und umgekehrt könnte zu Defekten in der Mitose führen, die Aneuploidie verursachen und zur Entstehung von Tumoren führen könnte.

Ein im Primitivknoten spezifisch exprimiertes Gene ist *1700027A23rik*, welches wir molekular und funktionell analysierten. Wir nannten dieses Gen *Pitchfork*, aufgrund seines heterozygoten Phänotyps im Primitivknoten der Maus, der zu duplizierten oder gespaltenen Zilien führt. Haploinsuffizienz von *Pitchfork* führt zusätzlich zu männlicher Infertilität, zu Defekten in der Links-Rechts-Asymmetrie, zu spezifischen Herzdefekten und zu postaxialer Polydaktylie. Endogenes *Pitchfork* akkumuliert in Vesikeln während des Auf- und Abbaus eines Ziliums, also wenn Basalkörper zu Zentrosomen umgewandelt werden und umgekehrt. Zusätzlich konnten wir eine Kolo-kalisation und physikalische Interaktion von *Pitchfork* mit Mikrotubuli, mikrotubuliabhängigen Transportproteinen, zentrosomalen und Basalkörper-Proteinen nachweisen, was eine Funktion in diesen Prozessen impliziert. Eine detaillierte funktionelle Analyse ergab, dass eine geringere Expression an *Pitchfork* dazu führt, dass der Basalkörper sich nicht mehr vom Zilium lösen kann, wenn eine Zelle wieder in den Zellzyklus eintritt. Dies führt dann zu einer unkontrollierten Zentriolenduplikation, was dann in duplizierten Zilien resultiert. Ein hypothetisches Modell zur molekularen Funktion von *Pitchfork* während der Ziliogenese ist in Fig. 55 graphisch dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Daten darauf hindeuten, dass der mikrotubuliassoziierte vesikuläre Transport für die Konvertierung der Basalkörper zu Zentrosomen und umgekehrt in primär ziliären Zellen wichtig ist und *Pitchfork* in diesem Prozeß eine Rolle spielt.

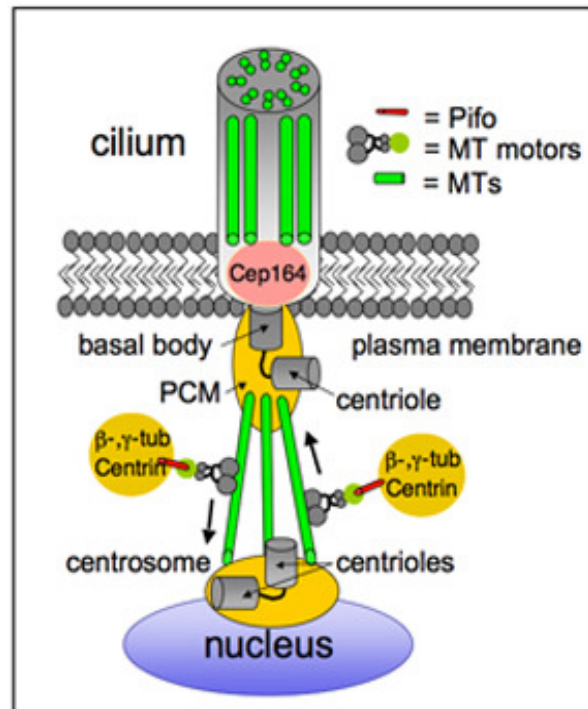


Fig. 55: Funktion von Pitchfork während der Ziliogenese

Modell, welches die Funktion von Pitchfork in den primär ziliären Zellen des Primitivknotens zusammenfasst. MT= Mikrotubuli; MT Motors = mikrotubuläre Motorproteine.

4.5 Die Funktion von Pitchfork beim Aufbau und Abbau des Ziliums

Sorokin hat bereits 1962 die ersten Schritte des Zilienaufbaus beschrieben. Anhand von EM-Analysen konnte er zeigen, dass im ersten Schritt der Ziliogenese die Mutterzentriole am distalen Ende mit Vesikeln aus dem Golgi-Apparat assoziiert ist. In unserer Analyse der subzellulären Lokalisation von Pifo konnten wir zeigen, dass Pifo in Vesikeln aus dem TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) in Zellen des Primitivknotens akkumuliert. Zusätzlich konnten wir in Zellkultur zeigen, dass endogenes Pifo in Vesikeln während des Auf- und Abbaus von Zilien akkumuliert und dass diese mit Pifo gefüllten Vesikel entlang der stabilisierten Mikrotubuli in Zellen des Primitivknotens und entlang von Spermenschwänzen transportiert werden. Diese Lokalisation ähnelt stark der von intraflagellaren Proteinen. Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass Pifo mit dem Prozeß des mikrotubuliabhängigen vesikulären Transports assoziiert ist. Diese Vermutung wird durch unsere Proteininteraktomanalyse unterstützt. Dort konnten wir eine Pifointeraktion mit Arf3 und Arf4 identifizieren. Diese Proteine sind kleine GTPasen, die den gerichteten vesikulären Transport während der Ziliogenese regulieren.

Im zweiten Schritt des ziliären Aufbaus, wird der Basalkörper mit dem wachsenden Axonem in Richtung Plasmamembran transportiert. Dort verankert sich der Basalkörper mit seinem distalen und subdistalen Anhängen und initiiert das Wachstum des Ziliums. Diese Anhänge sind wichtig für die Verankerung des Ziliums an die Plasmamembran. Ein wichtiges Protein, welches auf diesen Anhängen lokalisiert ist, ist Odf2. In *Odf2*^{-/-} Mausmutanten konnte gezeigt werden, dass der Basalkörper sich nicht mehr richtig an der Plasmamembran verankern kann und demzufolge in diesen Mäusen keine Zilien mehr ausgebildet werden können (Ishikawa et al., 2005). In unseren Analysen konnten wir zeigen, dass Pifo im Primitivknoten der Maus mit den wachsenden Zentriolen und mit dem Protein Cep164, welches die Anhänge des Basalkörpers markiert, während des Auf- und Abbaus der Zilien kolokalisiert ist. Also genau zu dem Zeitpunkt, in dem der Basalkörper an die Membran verankert wird und auch zu dem Zeitpunkt, wenn dieser wieder von der Membran losgelöst wird.

Im dritten Schritt wird der Basalkörper an die Plasmamembran verankert. Die zentriolaren Vesikel verschmelzen nun mit den Lipiden der Plasmamembran, weshalb in der Ultrastruktur dieser Komplex als tassenförmige Struktur erscheint, und auch als halskettenähnliches Muster beschrieben wird (ciliary neckles; Übersichtsartikel von Pedersen et al., 2008). In hoch auflösenden konfokalen Bildern nach immunhistochemischen Färbungen von Zellen des Primitivknotens konnten wir zeigen, dass Pifo mit dem Motorprotein Kif3a und dem zentriolaren Marker Cep135 an der Basis des Ziliums kolokalisiert ist und in der oben beschriebenen halskettenähnlichen Struktur erscheint. Diese Struktur konnte bisher noch nie in immunhistochemischen Färbungen beschrieben werden.

Wir konnten zwar zeigen, dass Haploinsuffizienz von Pitchfork nicht *per se* das Andocken des Basalkörpers an die Plasmamembran beeinflusst, wir konnten aber Defekte in den Zilien des Primitivknotens detektieren, wie z.B. gespaltene oder deformierte Zilien, was daraufhin deuten könnte, dass die Verankerung des Basalkörpers nicht korrekt ist, so dass dies zu den defekten Zilien führt. Die Daten zusammenfassend lässt sich vermuten, dass Pifo eine Funktion während der ersten drei Schritte der Ziliogenese hat, die von Sorokin beschrieben worden sind.

Der Prozeß des Aufbaus des Ziliums ist sehr gut verstanden. Wie aber das Zilium wieder abgebaut wird, ist bisher nur wenig untersucht worden. Klar ist aber, dass die Verankerung des Basalkörpers von der Plasmamembran wieder losgelöst wird, der Basalkörper zum Zentrosom umfunktioniert wird und wieder als MTOC im Zellzyklus fungiert. Die ersten funktionellen Daten zum Abbau des Ziliums konnten in Zellkulturexperimenten gezeigt

werden (Pugacheva et al., 2007). In diesen wurde gezeigt, dass der HEF1-AuroraA-HDAC6-Komplex für die Destabilisierung der Mikrotubuli verantwortlich ist, um den Abbau des Ziliums zu initiieren. Interessanterweise führt die Inhibition von AuroraA zu einem ähnlichen zellulären Phänotyp wie in Zellen mit einer niedrigeren Expression an Pitchfork. Auch hier besitzen mitotische Zellen immer noch ein Zilium, die während der Mitose arretieren (Pugacheva et al., 2007). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Abbau des Ziliums durch die Destabilisierung der Mikrotubuli und das Loslösen des Basalkörpers von der Plasmamembran miteinander verknüpft sind.

Unsere Daten zeigen, dass ein niedriger Level an Pitchfork zwar ausreicht ein Zilium aufzubauen, aber beim Abbau des Ziliums Defekte entstehen. Anhand dieser Resultate ist es möglich, dass Pifo während des Zilienabbaus für das Loslösen des Basalkörpers von der Plasmamembran verantwortlich ist, indem der mikrotubuliabhängige Transport ebenso involviert sein muss. Dies stimmt auch mit den bereits veröffentlichten Daten überein, dass der intraflagellare Transport eine Funktion beim Abbau des Ziliums hat (Pan und Snell, 2005; Pugacheva et al., 2007). In unserem Datensatz konnten wir zeigen, dass Zellen mit einem geringeren Pegel an Pifo den Basalkörper nicht mehr von der Plasmamembran lösen können, weshalb die Zellen während der S-Phase arretieren, wodurch die Zentriolen überreplizieren und multiziliäre Zellen entstehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieser Datensatz die These unterstützt, dass der Abbau des Ziliums und das Loslösen des Basalkörpers von der Plasmamembran essentiell für die darauffolgende Zellteilung ist (Pan und Snell, 2007). Defekte in diesem Mechanismus führen zu multipolaren Spindeln und Aneuploidie, was letztendlich zum Wachstum von Tumoren führen kann.

4.6 Regulieren Pitchfork und Odf2 durch wechselseitige Interaktion die Umwandlung des Zentrosoms zum Basalkörper?

In unseren Analysen konnten wir zeigen, dass Pitchfork während des Aufbaus des Ziliums für kurze Zeit mit Cep164, dem Marker für die Anhängen des Basalkörpers, und Cep135, dem zentriolären Protein kolokalisiert ist. Wir stellten uns nun die Frage, wie Pitchfork in der Lage ist, den Auf- und Abbau des Ziliums zu kontrollieren. Ein weiteres wichtiges Protein, welches für die Basalkörperreifung und den Aufbau des Ziliums essentiell ist, ist *Odf2* (*Outer dense fiber 2*) (Ishikawa et al., 2005), da *Odf2*^{-/-} Mäuse keine Zilien ausbilden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Odf2* Gstrap-Mäuse während der Periimplantationsphase sterben, was daraufhin deutet, dass dieses Gen während der Organogenese und der

Homöostase eine Funktion haben muss (Salmon et al., 2006). In der bioinformatischen Analyse von Pitchfork fiel uns eine hoch konservierte Domäne auf. Die Funktion dieser DUF1309-Domäne ist bisher nicht bekannt, interessanterweise aber ist diese Domäne nur in der *Odf*-Genfamilie zu finden, die aus *Odf1*, *Odf2* und *Odf3* besteht. *Odf2* ist genauso wie Pitchfork auch am Spermienschwanz exprimiert und hat dort die Aufgabe die Mikrotubuli zu stabilisieren (de Carvalho et al., 2002). Pitchfork scheint aber in der direkt angrenzenden *Odf2*-Domäne im Spermienschwanz exprimiert zu sein (dies zeigen erste Beobachtungen). Aber auch während der Ziliogenese scheinen Pitchfork und *Odf2* zu verschiedenen Zeitpunkten des Zilienaufbaus am Basalkörper lokalisiert zu sein, da *Odf2* am wachsenden Basalkörper an den Anhängen lokalisiert ist, um die Verankerung an die Plasmamembran zu gewährleisten. Es stellt sich nun die Frage, ob sich Pitchfork und *Odf2* gegenseitig regulieren, um die Umwandlung des Zentrosoms zum Basalkörper zu initiieren. Die funktionelle Analyse beider Gene während der Ziliogenese zu vertiefen ist sicherlich sinnvoll, um ein besseres Verständnis vom Auf- und Abbau des Ziliums zu bekommen. Den ersten Hinweis darauf würden koimmunohistochemische Färbungen ergeben, die *Odf2*, Pifo und acetyliertes Tubulin oder γ -Tubulin im Primitivknoten der Maus anfärben. Es wäre nun zu erwarten, dass *Odf2* und Pifo während des Auf- und Abbaus des Ziliums nicht zur gleichen Zeit an der Mutter- oder Tochterzentriole exprimiert sind. Interessant wird es auch sein, Zellen, in denen Pitchfork nicht exprimiert ist, jedoch *Odf2* vorhanden ist, hinsichtlich der Reaktion auf Signalmoleküle und dem Einfluß auf ziliäre Krankheiten zu analysieren. Um diese Fragestellungen zu beantworten sind in bereits bestehenden konditionellen Knock-out-Konstrukten die Voraussetzungen geschaffen, diese Gene während der Organogenese und Homöostase detailliert zu analysieren.

4.7 Wie beeinflusst Pitchfork den intraflagellaren Transport?

Aufgrund unserer Daten vermuten wir, dass der mikrotubuliassoziierte vesikuläre Transport für die Konvertierung der Basalkörper zu Zentrosomen und umgekehrt in primär ziliären Zellen wichtig ist und dass Pitchfork in diesem Prozeß eine Rolle spielt. Allerdings können wir aufgrund unseres bisherigen Datensatzes nicht sagen, wie Pitchfork in der Lage ist, das Andocken und Ablösen des Basalkörpers an die Plasmamembran mit dem mikrotubuliabhängigen vesikulären Transport zu vernetzen. Eine Möglichkeit die molekulare Funktion von Pitchfork in diesem Prozeß genauer zu analysieren, wäre es, mit Hilfe des von uns etablierten Zellkultursystem, die Ziliogenese auf subzellulärer Ebene zu verfolgen und

anhand von kurzen Filmsequenzen auszuwerten. Dazu könnte man zunächst primäre *Wildtyp*-Fibroblasten (PLC) generieren und Pitchfork an eine Fluoreszenz fusionieren und mit andersfarbigen Fusionskonstrukten, die für die Ziliogenese essentiell sind, kotransfektieren: So könnten mögliche Konstrukte z.B. für den anterograden intraflagellaren Transport (Kif3a), für den retrograden Transport (Dynein), für den mikrotubulären Transport (β -Tubulin), für die perizentriolare Matrix (γ -Tubulin) und das Zentrosom (Centrin) generiert werden. Durch Konstrukte, die mehrere Marker durch eine 2A-Sequenz und einen zusätzlichen nuklearen Marker (z.B. H2B) miteinander verknüpfen, könnte die Ziliogenese *in vivo* auf subzellulärer Ebene verfolgt werden. So könnte man anschließend primäre Fibroblasten generieren, die eine geringere Expression an Pitchfork haben. Durch die Möglichkeit bei diesen Zellen die Ziliogenese, durch serumarmer Bedingungen zu induzieren und durch anschließende Serumzugabe die Zellen synchron wieder in den Zellzyklus zu entlassen, wäre es möglich parallel die beiden PLC-Kulturen zu analysieren und in kurzen Filmsequenzen zu demonstrieren, ab wann und wie der intraflagellare Transport gestört ist, und wie das Andocken und das Ablösen des Basalkörpers dadurch beeinflusst wird.

4.8 Reguliert Pitchfork durch den Auf- und Abbau des Ziliums entwicklungsbiologische Prozesse?

Pitchfork kann aus zwei Gründen keinen generellen Einfluß auf den Auf- und Abbau des Ziliums haben. Zum einen sind ziliäre Proteine während der Evolution hoch konserviert und nicht wie Pitchfork nur unter den Chordaten. Und zum zweiten, wenn Pifo generell wichtig für die Ziliogenese wäre, wäre dieses Protein in allen ziliären Zellen des Organismus exprimiert. Pifo ist aber spezifisch nur in embryonalen Regionen mit Organisatorfunktion exprimiert, wie z.B. in dem Primitivknoten der Maus, der Bodenplatte des Neuralrohrs und in der apikalen Ektodermalzone der embryonalen Extremität. Diese Regionen sind für die embryonale Musterbildung wichtig und sind eine Quelle für viele Differenzierungs- und Proliferationssignale. Es konnte gezeigt werden, dass Zilien als wichtige Sensoren für Signalmoleküle dienen (Eggenchwiler und Anderson, 2007). Zusammen mit der Tatsache, dass ziliäre Zellen das Zilium abbauen müssen, wenn sie wieder in den Zellzyklus eintreten, ist es möglich, dass der Auf- und Abbau der Zilien zwischen Proliferation und Differenzierung von primären Zellen unterscheidet. Dies könnte bewirken, dass eine Zelle damit spezifisch reguliert wird und damit auf umgebene Signale reagieren kann. Es ist

möglich, dass Pitchfork als solcher Schalter agiert, um entweder die Zelle in den Status der Differenzierung oder die der Proliferation zu schicken.

Da Pifo nur in Regionen hoher Shh-Aktivität exprimiert ist und mit Proteinen im mikrotubuliabhängigen vesikulären Transport interagiert, wäre es eine Möglichkeit, dass Pifo in diesen Geweben als Adaptormolekül wichtige Signalmoleküle zur Plasmamembran transportiert. Dort könnte dann eine Signalkaskade angeschaltet werden, die Zielgene von Shh aktiviert oder reprimiert und somit entwicklungsbiologische Prozesse gesteuert werden können.

4.9 Ist Pitchfork ein direktes Zielgen von Sonic Hedgehog?

Pitchfork akkumuliert in Vesikeln während des Auf- und Abbaus von primären Zilien. In unseren Daten konnten wir zeigen, dass Pitchfork zu diesem Zeitpunkt auch eine Funktion hat. Schon eine Reduktion an Pitchfork reicht aus, dass Zellen, die wieder in den Zellzyklus eintreten, ihr Zilium nicht mehr abbauen können, was zu einer übermäßigen Replikation von Zentrosomen führt und schließlich zu multiziliären Zellen. Ebenso konnten wir zeigen, dass Pitchfork nur in Regionen hoher *Shh*-Aktivität exprimiert ist, wie z.B. dem Neuralrohr oder der Bodenplatte. Nun stellt sich die Frage, ob Pitchfork ein direktes Zielgen von *Shh* ist. In unseren bioinformatischen Analysen konnten wir sechs hoch konservierte Gli-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im ersten Intron finden. Der Transkriptionsfaktor Gli vermittelt *Shh*-Signale. Eine Möglichkeit um nun zu testen, dass Pitchfork ein direktes Zielgen von *Shh* ist, wäre es anhand von Deletionen und Punktmutationen im ersten Intron β -Galaktosidase-Reporterkonstrukte zu generieren, um den Einfluß dieser regulatorischen Elemente auf die Pitchfork-Expression zu analysieren. Mit dieser Methode könnte man die Expression des *Wildtyp*-Reporterkonstrukts mit den mutierten Reporterkonstrukten *in vivo* miteinander vergleichen. Am Tag E12,5 würden die Embryonen analysiert werden, da zu diesem Zeitpunkt Pitchfork eine einfach zu analysierende Expression in Regionen hoher *Shh*-Aktivität zeigt, wie z.B. in der Bodenplatte des Neuralrohrs, in der apikalen Ektodermalzone der Extremitäten oder auch im Pankreas. Diese *in vivo* Reporteranalysen sollten klar zeigen, ob Pitchfork ein Zielgen von *Shh* ist.

4.10 Wie beeinflusst Pitchfork den Shh-Signalweg?

In den letzten Jahren wurde deutlich, wie eng Zilien und der Shh-Signalweg miteinander verknüpft sind. In einem Übersichtsartikel haben Huangfu und Anderson 2005 die Rolle des Ziliums im Shh-Signalweg in Vertebraten genauer analysiert. So blockt der Rezeptor Patched (Ptch1), wenn kein Shh daran bindet, den Transport von Smoothend (Smo) an die Basis des Ziliums. Dadurch fungiert der Transkriptionsfaktor Gli, der sowohl in einer aktivierenden Form agieren (GliAkt) kann oder zu einer reprimierenden Form prozessiert werden kann, als Repressor (Gli3R). Wenn nun allerdings Shh an den Rezeptor Ptch1 bindet, kann dieser nicht mehr verhindern, dass Smo in Vesikeln an die Membran transportiert wird. Nun wird eine Prozessierung von Gli3 verhindert, was dazu führt, dass Smo die aktive Form von Gli aktiviert.

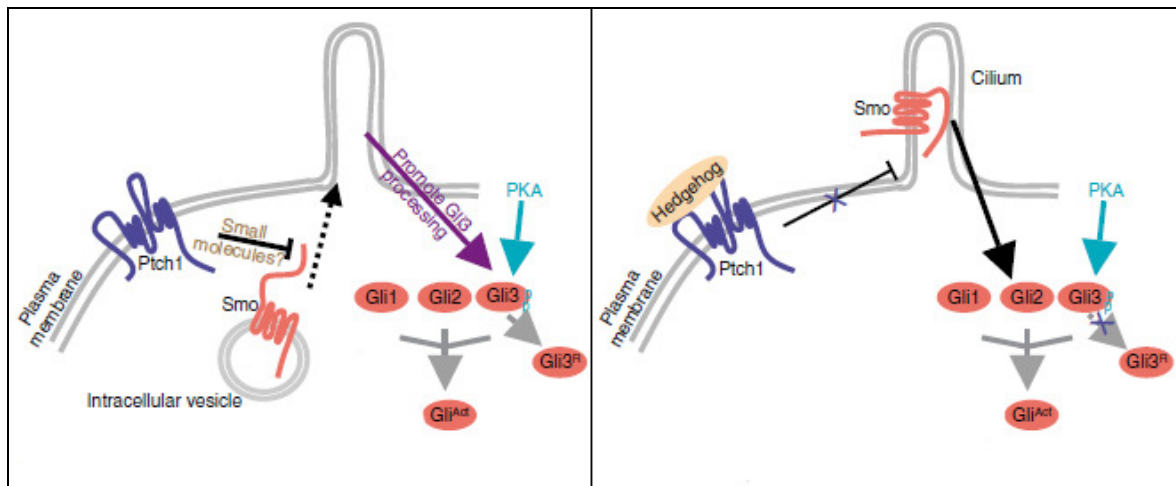


Fig. 56: Ein funktionelles Zilium ist für den Shh-Signalweg essentiell

Wenn kein Shh an den Rezeptor Ptch1 bindet, blockt Ptch den Transport von Smo an die Basis des Ziliums. Dadurch wird Gli prozessiert und agiert nun als Repressor. Wenn Shh allerdings an Ptch1 bindet, kann der Rezeptor den Transport von Smo an die Membran nicht verhindern. Am Zilium angekommen aktiviert Smo den Transkriptionsfaktor Gli, der in seiner aktiven Form agiert. Smo=Smoothend, GliAkt=Gli-Aktivator, Gli3R=Gli3-Repressor

Es konnte nun gezeigt werden, dass durch Defekte im Shh-Signalweg eine Reihe von menschlichen Krankheiten entstehen, wie z.B. Holoprosencephalie, Defekte in der Schädelstruktur oder in der Skelettbildung, Situs inversus oder Polydaktylien (McMahon et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Shh-Signalweg die Struktur der Zilien beeinflusst, wodurch viele Ciliopathien entstehen, wie z.B.: das Bardet-Biedl-Syndrom, das Kartagener-Syndrom, Nierenerkrankungen oder retinale Degeneration (Pan et al., 2005). Wir

konnten nun zeigen, dass Embryonen, die eine geringere Expression an Pitchfork haben, eine postaxiale Polydaktylie aufweisen. Eine molekulare Analyse hat ergeben, dass in den Pitchfork^{lacZ/+}-Embryonen die *Ptch1*-Expression, welches ein Shh-Zielgen ist, im Vergleich zu den *Wildtyp*-Embryonen schwächer und lückenhaft ist. Pitchfork hat also wahrscheinlich auf Zielgene von Shh eine aktivierende Funktion. Die Frage stellt sich nun, wie Pitchfork dazu in der Lage ist. Eine Möglichkeit ist sicherlich, dass Pitchfork Komponenten des Shh-Signalweges von und zum Zilium transportiert, da wir ja auch zeigen konnten, dass Pitchfork-positive Vesikel mit Shh gefüllt sind. Ein weitere interessante Tatsache ist, dass ein geringerer Pegel an Pitchfork postaxiale Polydaktylie in der Maus verursacht. Im Menschen sind postaxiale Polydaktylien beschrieben und werden durch Mutationen im Transkriptionsfaktor Gli3 verursacht und führen zu dem Pallister-Hall-Syndrom (PHS) (Kang et al., 1997) und dem Creig-Cephalopolysyndactylie-Syndrom (GCPS) (Vortkamp et al., 1991). Beide Krankheiten werden autosomal dominant vererbt. Trotzdem gibt es in den Erkrankungen phänotypische Unterschiede. So haben Patienten mit einem PHS-Syndrom nur eine einfache postaxiale Polydaktylie, wohingegen bei dem GCPS die Patienten zusätzlich auch Syndaktylien aufweisen und so durchaus auch an einer Extremität bis zu acht Finger besitzen können. Zwar werden beide Krankheiten durch Mutationen im *Gli3*-Gen verursacht, jedoch konnte interessanterweise in Studien von Johnston et al., 2005 gezeigt werden, dass die Position der Mutation die zwei unterschiedlichen Krankheitsbilder verursacht. Wie oben beschrieben, kann Gli3 als Aktivator oder aber wenn Gli3 prozessiert wird, als Repressor fungieren. So wiesen 89 Patienten mit dem GCPS eine Mutation im ersten Drittel des Gens auf, wohingegen 56 Patienten mit Mutationen im zweiten Drittel des Gens PHS aufwiesen. Das bedeutet, dass Haploinsuffizienz von Gli3 zu dem GCPS-Phänotyp führt, wohingegen Gli3, wenn es nach der DNA-Bindungsdomäne gespalten wird als Repressor fungiert und zu dem PHS führt. Das PHS ähnelt nun sehr stark dem Extremitätenphänotyp, den wir in den Pitchfork^{lacZ/+}-Embryonen detektieren konnten. Diese Ergebnisse, zusammen mit der Tatsache, dass die Expression von Zielgenen, wie z.B. *Ptch1* in Pitchfork^{lacZ/+}-Extremitäten schwächer ist, könnte daraufhin deuten, dass Pitchfork als ein Zielgen von *Shh* die Prozessierung des *Gli3*-Gens beeinflusst, und dieser Transkriptionsfaktor dadurch als Repressor oder Aktivator agieren kann.

4.11 Die Rolle von Pitchfork in Ciliopathien

Ciliopathien sind pleiotropische Krankheiten mit einem großen Spektrum an menschlichen Krankheitsbildern. Diese können sich in Zysten in der Leber und im Pankreas äußern, oder in Atemwegserkrankungen und können Diabetes oder Krebs auslösen. In den letzten Jahren konnten einige Gene für diese Krankheitsbilder verantwortlich gemacht werden. Diese Gene spielen in der Ziliogenese eine wichtige Rolle oder sind für die Struktur oder Organisation von Organellen, die für die Ziliogenese wichtig sind, verantwortlich, wie z.B. Zentrosomen, Basalkörper, die perizentrioläre Matrix oder distale bzw. subdistale Anhänge der Basalkörper. In der Analyse von Pitchfork konnte nun gezeigt werden, dass dieses bisher unbekanntes Gen eine Funktion während der Ziliogenese hat und auch in Ciliopathien eine Rolle spielen könnte. In unseren Analysen haben wir HEK293T-Zellen, mit einem TAP-Pifo (tandem affinity purification tagg) Konstrukt transfektiert und anschließend für 30h ohne Serum kultiviert, um Ziliogenese zu induzieren. Die Zellen wurden lysiert und anschließend Pifo-Proteininteraktionen analysiert, indem die Zellen mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung behandelt und anschließend mit Hilfe eines Massenspektrometers analysiert worden waren. In der Tat konnten wir native Proteinkomplexe identifizieren, die Ciliopathien verursachen und die mit Pitchfork während der Ziliogenese assoziiert sind. So haben wir in unserem Datensatz z.B. die ziliären Proteine und Basalkörperproteine OFD1, Nephrocystin4, RPGRIP1L und Usherin identifizieren können. Alle diese Proteine sind nicht nur im Mausmodell für die Organisation der Zilien bekannt, sondern auch im Menschen als Gene für Ciliopathien verantwortlich (Ferrante et al., 2006, Arts et al., 2007; Delous et al., 2007; Reiners et al., 2006). Da Pitchfork auch im Menschen vorhanden ist und mit diesen Proteinen interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass Pitchfork ein neuer Kandidat dafür ist, auch in menschliche Krankheiten involviert zu sein. Zusätzlich zu den Proteinen, die zu Ciliopathien führen, konnte unsere Vermutung, dass Pitchfork im vesikulären mikrotubuliabhängigen Transport eine Rolle spielt, auch durch andere Interaktionspartner bestätigt werden. So konnten wir eine mögliche Proteininteraktion mit mikrotubulären Proteinen (α -Tubulin und β -Tubulin), sowie Proteininteraktionen mit Proteinen, die mit vesikulären mikrotubuliabhängigen Transport (Kif3a und Sortilin) und mit Proteinen, die in der Modifikation der Posttranslation von Mikrotubuli und MTOCs verantwortlich sind (Proteinphosphatase1 (PP1), Histon Deacetylase1 (HDAC1), Tubulin Tyrosin Ligase1 (TTL)). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die Analyse von Pitchfork nun die Möglichkeit ergibt, den Zusammenhang zwischen menschlichen Ciliopathien und den molekularen Ursachen besser verstehen zu können.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Ausstattung

Zentrifugen	5417 C (Eppendorf AG, Hamburg) 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg) Heraeus Rotanta 460 R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) Hettlich Universal 30F (Andreas Hettlich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) 1-14 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) Galaxy Mini (VWR International GmbH, Darmstadt)
Inkubatoren	37°C Bakterien Schüttler (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Cornelius) TH-30 und SM-30, 32°C Bakterienschüttler (Edmund Bühler GmbH, Hechingen) 65°C Ofen Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg) Shake `n/ Stack (ThermoHybaid), Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham)
Elektroporationssysteme	BioRad Gene Pulser Xcell (BioRad Laboratories, München)
Stromversorgung	Power Pack Basic (BioRad Laboratories, München) Agarose Gel Kammern Midi 450 (Hamischmacher, Kassel)
Geldokumentationssystem	UV- Transilluminator (Biorad, München) Gene Flash (Syngene Bio Imaging, Synoptics Ltd, Cambridge)
Pipetten	1000µl/200µl/20µl/10µl Eppendorf Research (Eppendorf AG, Hamburg)

	Pipetboy accu-jet and accu-jet R Pro (Brand GmbH & Co, KG, Wertheim)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf) ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham)
Polyacrylamid-Gelkammer	Mini Trans-Blot R Cell (BioRad GmbH, Heidelberg)
PCR Maschinen	Px2 Thermo Hybaid (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) PXE0.2 Thermo Cyclers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham)
Vortexer	Vortexer (VWR international GmbH, Darmstadt)
Taumlern	VSR 23 (Grant BOEKEL, VWR international GmbH, Darmstadt) Roller Mixer SRT1 (Bibby Scientific (Stuart), Staffordshire, GB)
Wasserbad	VWR
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH-Meter (HANNA instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein)
Pumpen	LABOPORT R (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)
HybridisierungsgefäÙe	Hybridizer HB 100 (ThermoHybaid, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham)
Filmkassetten	Hypercassette (Amersham, GE Healthcare GmbH, München)
Entwicklermaschine	AGFA Curix 60 developing machine (AGFA Health Care GmbH, Bonn)
Radiation Monitor	Berthold LB 122 radiation monitor (BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Wildbach)
Mikroskope	Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Göttingen) Lumar.V12 (Carl Zeiss AG, Göttingen) MS5 (Leica microsystems GmbH, Wetzlar) TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
Kameras	AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG, Göttingen) AxioCam HRm (Carl Zeiss AG, Göttingen)

Mikrowelle	700W (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern)
Rührer	STIR (VWR international GmbH, Darmstadt)
Mikrotom	Microm HM 355S rotation microtome (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham)
Glaswaren	Schott-Duran (Schott Mainz)
Plastikwaren	(VITLAB GmbH, Großostheim)
Zählkammer für Zellen	Neubauer (LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf)
Gefrierschrank	-20°C (Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen)
Kühlschrank	4°C (Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen)

5.1.2 Verbrauchsmaterial

50ml/15ml Gefäße	(Becton and Dickinson and Company, Franklin Lakes; Sarstedt, Nürnbrecht)
14 ml Gefäße	BD Labware (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
2ml/1,5ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf AG, Hamburg)
0,2ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf AG, Hamburg)
15cm/10cm/6cm Zellkulturschalen	nunc (ThermoScientific Fisher, Wiesbaden)
6-/12-/24-/48-/96-Loch-Platten	nunc (Thermo scientific Fisher, Wiesbaden)
10cm Bakterienplatten	BD Falcon™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
Einbettkassetten 50/25/10/5/2ml	(Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe)
1ml Plastikpipetten	(Greiner bio-one, Frickenhausen)
Plastik Pasteurpipetten	Transferpipetten (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Parafilm	Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha)
PVDF-Membrane	(BIORAD Laboratories, Hercules)
Nitrocellulose Membrane	(GE Healthcare Buchler GmbH & Co, München)
Blot Papier Whatman paper	(GE Healthcare Buchler GmbH & Co, München)
Filme Kodak BioMax MS	(Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg)
Amersham Hyperfil ECL	(GE Healthcare Buchler GmbH & Co., KG München)

5.1.3 Reaktionssysteme (Kits)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Holding, Hilden)

QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen Holding, Hilden)

QIAgen Maxi Kit (Qiagen Holding, Hilden)

QIAgen Mini Kit (Qiagen Holding, Hilden)

Labelling Kit (Roche Holding GmbH, Applied Science, Mannheim)

ECL Detection Kit (Millipore Cooperation, Billerica, MA)

Luciferase-Reporter-Assay (Promega, Mannheim)

5.1.4 Chemikalien

(Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg; Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH &CO. KG, Karlsruhe)

A Acrylamid/Bisacrylamid

Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)

Ampicillin

APS

B BCA

BSA

Bradford Reagenz

BM Purple AP Substrat

C Calciumchlorid

Chloroform, 99%

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

D Diethylpyrocarbonat (DEPC), ca. 97%

Dimethylsulfoxid (DMSO), >99,9%

Dithioereitol (DTT)

dNTPs (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

E EDTA

Ethanol, 96%

Ethidiumbromid

F Formaldehyd

Formamid

- G** Gelatine
Glutamin
Glutaraldehyd
Glycerol
G418 (Geneticin, 50mg/ml, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
- H** HEPES (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
HCl
- I** Isopropanol
- K** Kanamycin
- L** L-Glutamin (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
- M** Magnesiumchlorid
Methanol, 100%
MEMs non essential amino acids (100x, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
Milchpulver (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
Mitomycin C
B-Mercaptoethanol (50mM)
- O** Oligo-dT-Primer (Promega GmbH, Mannheim)
- P** Paraformaldehyd
PBS (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol: 25:24:1; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (Gibco, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
Polyacrylamid
Puromycin
- S** Stickstoff (Linde AG, München)
- T** TEMED
Tween20
Tris
Triton X-100
Trizol (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Karlsruhe)
- X** Xylen

5.1.5 Puffer und Lösungen

Isolierung genomischer DNA

Proteinase-K-Lysis-Puffer:	100mM Tris, pH8,0-8,5
	5mM EDTA, pH8,0
	2% SDS
	200mM Natriumchlorid

Plasmid-Präparation

P1-Puffer:	50mM Tris HCL, pH8,0
	10mM EDTA
	100µg/ml RNAase A
P2 Puffer:	200mM Natriumhydroxid
	1% SDS
P3 Puffer:	3M Kalziumacetat, pH5,5
QBT-Puffer:	750mM Natriumchlorid
	50mM MOPS, pH7,0
	15% Isopropanol
	0,15% Triton X-100
QC Puffer:	1M Natriumchlorid
	50mM MOPS, pH7,0
	15% Isopropanol
GF Puffer:	1,25M Natriumchlorid
	50mM Tris HCl, pH8,5
	15% Isopropanol
TE Puffer:	10mM TrisHCl, pH8,0
	0,1mM EDTA
EB Puffer:	10mM Tris HCL, pH8,0

DNA/RNA-Agarosegele	TAE-Puffer (50x stock): 2M Tris 50mM Essigsäure 50mM EDTA
Ladepuffer DNA	100mM EDTA 2% SDS 60% Glycerol 0,2% Bromphenolblau
Ladepuffer RNA (2x)	95% Formamid 0,025% SDS 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylencyanol FF 0,025% Xylencyanol FF 0,025% Ethidiumbromid 0,5mM EDTA

Southern Blot

Depurinierung (Fragmente $\geq 10\text{kb}$) 1,1% HCl in H_2O

Denaturierung 87,66g Natriumchlorid
20,00g Natriumhydroxid
mit H_2O auf 1000ml auffüllen

Neutralisierung 87,66g Natriumchlorid
60,50g Tris
mit H_2O auf 1000ml auffüllen

Transferpuffer, 20xSSC 88,23g Tri-Natriumcitrat
175,32g Natriumchlorid
auf 1000ml H_2O

Hybridisierungspuffer 1M Natriumchlorid
50mM Tris, pH7,5 (37°C)

	10% Dextransulfat
	1% SDS
	250µg/ml Salmon Sperm DNA sonificated
	bei -20°C aufbewahren
Waschpuffer	1.) 2x SSC/0,5% SDS
	2.) 1x SSC/0,5% SDS
	3.) 0,1% SSC/0,5% SDS
Stock Lösungen	1.) 20x SSC 175,3g Natriumchlorid
	88,2g Natriumcitrat
	pH7,0
	2.) 20% SDS 200g SDS
	auf 1000ml H ₂ O
Western Blot	
Lysispuffer	50mM Tris/HCl, pH7,4
	150mM Natriumchlorid
	2mM EDTA, pH8,0
	1% Nonidet P-40
APS	10% APS (in Aqua dest.)
4x Tris/SDS pH8,8	1,5M Tris (→ pH8,8)
	0,4% SDS
4x Tris/SDS pH6,8	0,5M Tris (→ pH6,8)
	0,4% SDS
10x Tris-Glycin (Laufpuffer)	1,0% SDS
	0,25M Tris
	1,92M Glycin
4x SDS-Ladepuffer	(2M DTT und frisch zugeben: 40µl auf 160 µl
	Puffer)

	200mM Tris/HCl, pH6,8 8% SDS 40% Glycerol 0,4% Bromphenolblau
Kathodenpuffer	25mM Tris/HCl, pH9,4 40mM Glycin 10% Methanol
Anodenpuffer I	300mM Tris/HCl, pH10,4 10% Methanol
Anodenpuffer II	25mM Tris/HCl, pH10,4 10% Methanol Ponceau-Lösung: 0,2 % PonceauS 3% TCA
10x TBST	(zu Waschpuffer Tween20 frisch hinzugeben) 100mM Tris-HCl, pH7,4 1,5M Natriumchlorid 1,0% Tween20
Blockinglösung	1:10 Milchpulver 1g BSA in 1x TBST
ECL-Lösung	Lösung A Lösung B (direkt vor Gebrauch gemischt)
LacZ-Färbelösung	
Fixierungslösung	0,02% NP-40 5mM EGTA, pH8,0 2mM MgCl ₂ x6 H ₂ O 1% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd in PBS
Waschpuffer	0,02% NP-40 in PBS

Färbelösung	0,02% NP-40 2mM MgCl ₂ · 6H ₂ O 5mM K ₃ [Fe(CN) ₆] · 6H ₂ O 0,01% Natriumdesoxycholat 1mg/ml X-Gal in PBS
-------------	---

5.1.6 Immunhistochemische Färbung

Permeabilisierungslösung	0,1% Triton X-100, 100mM Glycin in PBS
Blockierungslösung	10% Kälberserum (FCS), 0,1% BSA, 3% Schafserum in TBST
TBST	20mM Tris-HCl, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,05% Tween20

5.1.7 Enzyme und Reaktionssysteme

Proteinase-Inhibitoren	(Sigma-Aldrich GmbH, Seelze)
Superscript II	(Fermentas GmbH, St-Leon-Rot)
RNase-Inhibitoren	(Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)
Restriktionsenzyme	(NEB GmbH, Frankfurt a.M.; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
DNA-Polymerasen	(DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment, NEB GmbH, Frankfurt a.M.; <i>Taq</i> DNA-Polymerase recombinant, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Pfu DNA-Polymerase, Stratagene , La Jolla)
RNase	(Promega GmbH, Mannheim)
RNase-freie Dnase I	(Promega GmbH, Mannheim)
Ligase	(T4 DNA Ligase; NEB GmbH, Frankfurt a.M.; M0202)
Phosphatase	(T4 Polynucleotide Kinase, NEB GmbH, Frankfurt a.M.; Antarctic phosphatase, NEB GmbH, Frankfurt a.M.)

5.1.8 Antikörper und Seren

primäre Antikörper

anti-acetylatet Tubulin (mouse) (Sigma) 1:250
anti-Flag (mouse)(Sigma) 1:10000
anti-Kif3a (mouse) (BD) 1:250
anti-SMOH (rabbit) (BIOZOL)
anti-Gli3 (N-19) (goat) 1:500
anti-Centrin (rabbit) (Abcam) 1:2000
anti- γ -Tubulin (rabbit) (Sigma) 1:250
anti- α -Tubulin (mouse) (Sigma) 1:250
anti- β -Tubulin (mouse) (Sigma) 1:250
anti-E-Cadherin (mouse) (BD)
anti-Cep164 (rabbit, Cy3-gekoppelt) (Labor Erich Nigg)
anti-Cep135 (rabbit, Cy3-gekoppelt) (Labor Erich Nigg)
anti-Pifo I (rabbit) (Pineda, Berlin) (für Western Blot Analyse) 1:250
anti-Pifo II (rabbit) (Pineda, Berlin) (für immunhistochemische Analyse) 1:50
anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche)

sekundäre Antikörper

anti-rabbit IgG (HRP-gekoppelt) (Millipore) 1:1000
anti-mouse (HRP gekoppelt) (Millipore)1:1000
anti-mouse 488 (Invitrogen) 1:800
anti-rabbit 594 (Invitrogen) 1:800
anti-goat 555 (Invitrogen) 1:800

Serum

Schafserum (Sigma)

5.1.9 Vektoren und BACs

Vektoren	pBluescript
	pL451-loxP (Lee et al., 2001; Liu et al., 2003; modifiziert)
	pcs2+ (Invitrogen)
	pEGFP-C1 (Invitrogen)

pEYFP-N1 (Invitrogen)

pGL3-Enhancer (Promega)

BAC

(RP23-306O20, RZPD, Pitchfork-BAC)

5.1.10 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
NLS-lacZ-fwd-XhoI	5'-NNNCTCGAGGCCACCATGAACCTTGAAGCTCGAAAAACAAAG
NLS-lacZ-rev-XhoI	5'-NNNCTCGAGCATATGTTATTATTATTTTGGACACCAGACCAACTGG
5'-HR-fwd-AscI	5'-NNNGGCGCGCCGGGGAATGCCAGGGCCAGGAAGC
5'-HR-rev-SpeI	5'-NNNACTAGTCATATGGACCAAAGGCCTCTCCTCTATTGATGGCC
3'-HR-fwd-SpeI	5'-NNNACTAGTTTCTATGGACTCACCATAGTGGGT
3'-HR-rev-XbaI	5'-NNNTCTAGATGTTACGTTAGACTTTAGGGGC
PCR1-rev-XhoI	5'-NNNCTCGAGCACCTTCCCTAAAGATCAAGAGAAGAAAC
PCR1-fwd-NotI	5'-NNNGCGGCCGC CCCGGAGTCCAGACCTAGGGTGATCTGAG
PCR2-fwd-XhoI	5'-NNNCTCGAGAATGTAGGCACTGTCTTCACGTGCTGTCCT
PCR2-rev-KpnI	5'-NNNGGTACCCAATGCTTGTTCAGTTGCCTGGCATT
3'-probe-fwd	5'-TCCACAGGAGAAATGATTGTCTGCATAC
3'-probe-rev	5'-CAGTATTTAATATGGCCCTCCTCAGTC
LacZ-probe-fwd	5'-GCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
LacZ-probe-rev	5'-TCACTATAGGGCGAATTGGGTACACT
EP11	5'-NNNACTAGTAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTATAG
EP12	5'-NNNGGATCCACGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGAC
EP108	5'-GGCCGTTTAAACTTAATTAAGCTTGGCGCGCCATGCATTTAAAT
EP109	5'-GGCCATTTAAATGCATGGCGCGCCAAGCTTAATTAAGTTTAAAC

5.1.11 Southern-Proben

Pifo: 3`-Southern-Probe, 740 bp

5`-TCCACAGGAGAAATGATTGTCTGCATACACATAAAGAAATTTTTAACTTAAAT
AAAGCCATCGTTGAGCCAGGTTTCTGATGTCACTATTATTTTAGTGGAGATTCCCA
TGCAGTAGTCCCACATAAGTATATATGGAATAAGAATAAAAGTTTTACTTATGCT
TCTACCTTCTCCACTTAATAACTTTTTAGTCAATGGTCTAGAAAGTTACAGTACCA
ACCATCTCAAAGTAGGAGAAGGCAGTAGAACTCTGAAGTGTCTTATAAAATAC
ACATATTTTGGACCAGCCAGATAGTTAAAATAAGGAGCCTAACTTAGCCTCCTGC
TATATATGCAATATTAACCAAGAGTGTTACATACAACTGGAATCTTTGTAA
TCACTTTTCTGACATGCTTAAATCCTTCTATTATGTCTAGATCTTGGCCCAGGTCCT
GACTGCAACCAATGTCCCCAGAACTCTATACTAAGCTGTAGAAACAAGTAGTGTT
TTCATCTCAGCAGCAAGATTATTGGGAATATTTAAGTGGTAGAAAGAATGTGAAA
CCCTATACAAAAGAACCTACACCTCCCAGCAAACATTTTTACTAAAGAAGAAACC
CACAGGCTTCCAGAAACACTCTGCAAAGTCAACATTCTAGTCTGGAGCAGTGGCA
GAGCCTGCTTGGGAAATTCTCAGGCATCTTACTGGATAAATTGGCTGATGTGTGA
CTGAGGAGGGCCATATTAATACTG-3`

Pifo: interne lacZ -Southern Probe, 495 bp

5`-TACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAAT
TGAATTATGGCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTA
CAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGA
AGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCC
TGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACC
AGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACATATGCTCCTAGTAGGTAAGTGTAC
CCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC
CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACA
GTT-3`

5.1.12 Molekulargewicht-Marker

DNA-Leiter

100bp Leiter; 1kb Leiter (NEB GmbH, Frankfurt
a.M.)

Protein-Leiter	SeeBlueR Plus2 Pre-Stained standard (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
RNA-Leiter	RNA Ladder high range (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)

5.1.13 Bakterien und Kulturmedien

Bakterien

<i>E.coli</i> K12 EL250	(Lee et al., 2001)
<i>E.coli</i> K12	XL-1 Blue endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F ⁺ :: Tn10 proAB + lacIq Δ(lacZ)M15]hsdR17(rK-mK+) (Stratagene, La Jolla)
<i>E.coli</i> K12 DH5α	F-.lacI-recA1, endA1, D(lacZY A-argF), U169, F80dlacZDM15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 (Hanahan et al., 1985)

Kulturmedien

LB Medium	(Lysogeny broth; Bertani, 1951)
LB Agar	(Lysogeny broth; Bertani 1951)
je nach Bedarf versehen mit 100µg/ml Ampicillin	
25 µg/ml Kanamycin	
12,5 µg/ml Chloramphenicol	

5.1.14 Zelllinien, Kulturmedien und Zellkulturlösungen

Zelllinien

HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, gewonnen aus HEK293 Zellen, die stabil das T-large Antigen des SV40 (Simian Virus 40) exprimieren (Graham et al., 1977)
NIH3T3	Murine embryonale Fibroblasten Zelllinie (Todaro and Green, 1963)
IDG3.2	Murine ES Zelllinie (F1); genetischer Hintergrund: 129SV/C57Bl/6

MEF Primäre murine embryonale Fibroblasten, isoliert am Tag E13,0

Primäre Extremitätenkultur (PLC) Primäre murine embryonale Fibroblastenkultur, gewonnen aus Vorderextremitäten muriner Embryonen, isoliert am Tag E11,5-E13,0

Kulturmedien

HEK293T/NIH3T3/PLC DMEM(Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), versehen mit 2mM L-Glutamin (200mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), 10%FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

MEF DMEM (Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), versehen mit 2mM L-Glutamin (200mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), 15% FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 0.1mM β -mercaptoethanol (50mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA); 1xMEM (non-essentiell amino acids, 100x; Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA)

IDG3.2 DMEM (Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), versehen mit 2mM L-Glutamin (200mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), 15% FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 0.1mM β -mercaptoethanol (50mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA); 1xMEM (non-essentiell amino acids, 100x; Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA), ESGRO R (LIF) (10^7 U/ml, Chemicon, Millipore, Schwalbach), 2mM HEPES (200mM, Gibco, InvitrogenTM Cooperation, Carlsbad, CA)

Zellkulturlösungen

1x PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}	(Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)
1x Trypsin-EDTA	(0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA 4NA, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

5.1.15 Mauslinien

C57Bl/6N	inbred strain (Inzuchtstamm)
CD1	outbred strain (Stamm mit gemischtem genetischen Hintergrund)
YVP	(Hadjantonakis et al., 2002)
dsRed	(Vintersten et al., 2004)

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 ES-Zellkultur

Damit murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) in Kultur nicht differenzieren, benötigen sie embryonale Fibroblasten, gewonnen aus Embryonen E13,0, sog. murine embryonale Feeder-Zellen (MEF). Außerdem muss dem ES-Medium LIF zugegeben werden, damit sie im undifferenzierten Stadium passagiert werden können.

5.2.1.1.1 Behandlung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) mit MitomycinC (MMC)

MMC ist ein Mitoseinhibitor, der verhindert, dass Feeder-Zellen das Wachstum der ES-Zellen beeinflussen. Um die MEFs mit MMC behandeln zu können, müssen diese auf 15cm-Platten ausgesät und bis zu einer konfluenten Dichte wachsen gelassen werden. Wenn dies erreicht ist, werden diese abtrypsinisiert, abzentrifugiert und wieder in 20ml MEF-Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen mit 200µl MMC (1mg/ml) für 45min bei 37°C inkubiert. Alle 15min wird das Eppendorfgefäß invertiert, um ein Anheften der Zellen an der Kunststoffwand des Probengefäßes zu verhindern. Im Anschluß daran werden die

Fibroblasten bei 250g für 5min abzentrifugiert. Im Folgenden kann nun entschieden werden, ob die Zellen sofort auf Zellkulturplatten ausplattiert, oder für eine spätere Benutzung tiefgefroren werden sollen.

5.2.1.1.2 Auftauen von ES-Zellen

Um ES-Zellen auftauen zu können, muss im Vorfeld ein 10ml-Eppendorfgefäß mit vorgewärmten ES-Medium vorbereitet werden. Ein Kryoröhrchen mit tiefgefrorenen ES-Zellen wird nun möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in das vorbereitete Röhrchen transferiert. Die Zellen werden bei 250g für 4min abzentrifugiert und in einem geeigneten Volumen ES-Medium wieder aufgenommen, um die ES-Zellen z.B.auf 6cm-Schalen, die zuvor mit einem dichten Feederrasen versehen wurde, auszuplattieren. ES-Zellen werden bei 37°C und 5-7%igem CO₂ in einem feuchten Inkubator kultiviert.

5.2.1.1.3 Passagieren von ES-Zellen

Nach ungefähr 48h müssen ES-Zellen gesplittet werden, um eine Differenzierung der Zellen zu vermeiden, und um die Zellpopulation zu expandieren. ES-Zellen können im Verhältnis 1:2 bis 1:30 je nach ihrer Teilungsrage gesplittet werden. Das Medium wird dazu abgesaugt und die Zellen mit PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen. Auch das PBS wird abgesaugt und die Zellen werden mit 0,05% Trypsin-EDTA (z.B. 1ml pro 6cm-Platte) für 5min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst haben und ggf. die Reaktion mit dem dreifachen Volumen an ES-Medium abgestoppt. Um eine Einzelzellsuspension zu bekommen, wird die Zelllösung mehrere Male mit der Pipette resuspendiert und in ein Falcongefäß transferiert. Die Zellen werden für 4min bei 250g abzentrifugiert und in einem geeigneten Volumen an ES-Medium aufgenommen, um sie anschließend auf neue Feeder-Platten splitten zu können. Die ES-Zellen werden wie oben beschrieben kultiviert (siehe 5.2.1.1.2.).

5.2.1.1.4 Einfrieren von ES-Zellen

Um ES-Zellen im flüssigen Stickstoff einfrieren zu können, müssen zunächst die Zellen von der Platte abtrypsinisiert und abzentrifugiert werden (siehe 5.2.1.1.3.). Danach werden die ES-Zellen in Kryoröhrchen mit Einfriermedium transferiert. Diese werden möglichst schnell

in Einfrierboxen gestellt und bei -80°C gelagert. Nach 1-2 Tagen können dann die tiefgefrorenen ES-Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert werden.

5.2.1.1.5 Homologe Rekombination von ES-Zellen

Um transgene oder knock-in-Mäuse generieren zu können, ist die Methode der homologen Rekombination von ES-Zellen elementar.

Dafür werden ES-Zellen mit dem linearisierten Zielvektor durch Elektroporation transformiert, anschließend für die Insertion selektioniert und die für die Insertion positiven Kolonien gepickt und expandiert.

5.2.1.1.6 Transformation von ES-Zellen durch Elektroporation

Für eine Elektroporation wird eine halbe 10cm-Schale mit zu 80% konfluentem Wachstum verwendet. Die Zellen werden zunächst wie oben beschrieben trypsinisiert (siehe 5.2.1.1.3.) und die Einzelzellsuspension abzentrifugiert. Im Anschluß daran werden die Zellen mit 10ml PBS ($-\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wird nun in 1,5ml eiskaltem PBS ($-\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) resuspendiert. 0,7ml dieser Zellsuspension werden in eine vorgekühlte Küvette transferiert und mit 0,1ml Vektor (25 μg) gemischt. Die Elektroporation wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Programm: 220V
500 μF
Widerstand: ∞

Nach der Elektroporation wird die Küvette sofort für 5min auf Eis gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen auf zwei 10cm-Schalen mit einer dichten Feederschicht transferiert. Am nächsten Tag wird das ES-Medium gewechselt und am darauffolgendem Tag beginnt die Selektion. Dazu wird täglich das ES-Medium gewechselt, dem zusätzlich Neomycin (G418) in einer Endkonzentration von 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben wird. Nach 6-8 Tagen Selektion können Einzelklone gepickt werden.

5.2.1.1.7 Picken von ES-Zellklonen

Bevor ES-Zellklone gepickt werden können, muss im Vorfeld eine konische 96-Lochplatte mit je 60µl PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) und zwei normale 96-Lochplatten vorbereitet werden, wovon die eine mit 0,1% Gelatine und 100µl ES-Medium, und die andere mit einer dichten Feederschicht und 100µl ES-Medium vorbehandelt werden muss. Auf der Platte mit den ES-Zellklonen wird das Medium abgesaugt und 10ml PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) hinzugegeben. Unter einem Stereomikroskop werden optimale ES-Zellklone mit kompaktem und runden Aussehen zusammen mit max. 20µl ihres Mediums gepickt. Dazu wird mit der Pipettenspitze der Klon von der Platte gekratzt, mit der Pipette aufgesaugt und in die konische 96-Lochplatte transferiert. Um Mischklone zu verhindern muss darauf geachtet werden, dass nur einzelne Klone gepickt werden. Nach einer gepickten Platte wird mit einer Mehrkanalpipette zu jedem Klon 30µl 0,05% Trypsin-EDTA zugegeben und die Platte bei 37°C für 15min inkubiert. Anschließend werden mit der Mehrkanalpipette die Zellen mehrmals aufgesogen und wieder entlassen, um eine Einzellsuspension zu generieren. Je 50µl dieser Zellsuspension werden nun auf eine neue 96-Lochplatte transferiert. Zellen auf der Gelatine-Platte sind für die DNA-Gewinnung vorgesehen, Zellen auf der Feeder-Platte hingegen zum Einfrieren als Masterplatte.

5.2.1.1.8 Einfrieren von ES-Zellklonen auf 96-Lochplatte

Um ES-Zellklone auf einer 96-Lochplatte einfrieren zu können, muss zunächst ein zweifaches ES-Einfriermedium vorbereitet und vorgekühlt werden:

4ml ES Medium
4ml FCS
2ml DMSO
Σ 10ml

Das vorhandene Medium auf der Platte mit den gepickten Klonen wird entfernt und die Zellen mit 200µl PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen. Anschließend wird je 40µl 0,05% Trypsin-EDTA hinzupipettiert. Die ES-Zellen werden im Anschluß daran bei 37°C für 5min inkubiert. Mit 60µl kaltem ES-Medium wird die Reaktion abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nun werden jeweils 100µl zweifaches Einfriermedium

hinzugegeben, die Platten rasch mit Parafilm umschlossen, in Windeln eingehüllt und in Pappboxen verstaut und bis zum Auftauen bei -80°C Kälte gelagert.

5.2.1.1.9 Generieren von Pitchfork+/- Zellen

Der Vektor pL254-Pifo-NLS-lacZneo wurde mit AscI in einer Endkonzentration von $25\mu\text{g}$ linearisiert und in IDG3.2 ES-Zellen elektroporiert. Die homologe Rekombination wurde anhand einer Southern-Blot-Analyse verifiziert.

5.2.1.2 Herstellen von primären Fibroblasten aus Vorderextremitäten (PLC)

Embryonen werden im Stadium E11,5 in PBS präpariert. Die Vorderextremitäten werden mit einer Pinzette abgetrennt und in je $40\mu\text{l}$ DMEM in eine 48-Lochplatte überführt. Anschließend werden $80\mu\text{l}$ 0,05% Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Präparate mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze zerkleinert. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C wird das Gewebe anschließend erneut mit einer Pipettenspitze durch Auf- und Abpipettieren zerkleinert. Nach weiteren 5min bei 37°C werden $150\mu\text{l}$ 15% FCS-DMEM (Pen/Strep) hinzupipettiert und die Zellsuspension auf eine 96-Lochplatte überführt. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und je nach Zelldichte gesplittet. Es ist dabei darauf zu achten, dass primäre Fibroblasten aus Vorderextremitäten erst dann gesplittet werden, wenn die Zellen konfluent gewachsen sind.

5.2.1.3 Ausbilden von Zilien in Fibroblasten und mitotische Synchronisation der Zellen

Zunächst werden die Fibroblasten unter normalen Bedingungen passagiert (15% FCS, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep in DMEM). Um Fibroblasten nun in der G0-Phase zu synchronisieren wird diesen Zellen für 24h das fetale Kälberserum entzogen (2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep in DMEM). Hierdurch bilden 99% der Zellen Zilien aus. Nun wird wieder ursprüngliches Kulturmedium zugefügt (15% FCS, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep in DMEM), so dass die Zellen ihr Zilium wieder resorbieren, die G0-Phase verlassen und wieder in den Zellzyklus eintreten. Dadurch ist ein Großteil der Zellen mitotisch synchronisiert.

5.2.1.4 Transfektion von HEK293T und NIH3T3 Zellen

Um Expressionsplasmide in HEK293T und NIH3T3 zu transformieren, wurden die Zellen mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) transfektiert. Dazu werden die Zellen einen Tag zuvor so gesplittet, dass sie am darauffolgendem Tag zu 80-90% konfluent sind. Für eine 6-Lochplatte werden dazu 3×10^6 Zellen ausgesät. 2µg DNA bzw. 4µl Lipofectamin werden in 500µl Optimem verdünnt. Nach 5min Inkubation bei RT werden beide Suspensionen fusioniert und gemischt. Nun folgt ein weiterer 20minütiger Inkubationsschritt, bevor die Suspension tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert wird. Am nächsten Tag wird das Medium der Zellen gewechselt und die Transfektion mit Hilfe einer Transfektionskontrolle pcs2+-GFP unter UV-Licht kontrolliert.

5.2.1.5 Klonierung des Pitchfork-knock-in-Konstruktes

Das knock-in-Konstrukt wurde wie folgt beschrieben kloniert.

Zunächst wurden die 5` und 3` homologen Regionen des Pitchfork-Gens mittels PCR aus dem BAC (RP23-306O20) amplifiziert (5`-HR-fwd-AscI, 5`-HR-rev-SpeI, 3`-HR-fwd-SpeI, und 3`-HR-rev-XbaI.) und die Produkte in den pL253-Vektor subkloniert (AscI und XbaI). Dieser pL253-Vektor (Copeland et al., 2001; Liu et al., 2003) wurde modifiziert, so dass in die NotI-Schnittstelle ein aneinandergelagertes Oligonukleotid (EP108 und EP109) kloniert wurde. Der modifizierte Vektor wurde nun pL254 genannt. Mittels homologer Rekombination wurde ein 6,5kb großes Fragment aus dem BAC in EL250 Bakterien rekombiniert (siehe Protokolle nach Lee et al., 2001; Liu et al., 2003). Das Produkt daraus wurde als pL254-Pifo bezeichnet. Um die knock-in-Kassette in den offenen Leserahmen in das zweite Exon zu klonieren, wurde eine NLS-lacZ Kassette folgendermaßen kloniert. Ein artifizielles Intron-PolyA wurde mit Hilfe einer PCR (EP11, EP12) amplifiziert und in den pBKS-Vektor kloniert (SpeI, BamHI). Eine NLS-lacZ-Sequenz wurde mit NLS-lacZ-fwd-XhoI, NLS-lacZ-rev-XhoI mittels PCR amplifiziert und in den pBKS-Vektor, der bereits das Intron-PolyA beinhaltete, in die Restriktionsschnittstellen XhoI, SalI kloniert. Anschließend wurde eine Neo-Kassette (pL-452; HindIII, XhoI; Liu et al., 2003) an das 3`-Ende der PolyA-Sequenz kloniert. Nun wurden 5`- und 3`-homologe Arme, die an die NLS-lacZ-Kassette angrenzen, amplifiziert: PCR1-fwd-NotI; PCR1-rev-XhoI; PCR2-fwd-XhoI; PCR2-rev-KpnI. Die PCR-Produkte wurden mit NotI, XhoI (PCR1) und mit XhoI, KpnI (PCR2) geschnitten und in den pBKS-Vektor, der zuvor mit NotI, KpnI verdaut war, subkloniert. Die nun entstandene Kassette NLS-lacZ-Intron-polyA-neo wurde nun mit XhoI aus dem Vektor herausgeschnitten und zwischen die 5`-

und 3'-homologen Arme im pBKS-Vektor, der zuvor ebenfalls mit XhoI linearisiert wurde, subkloniert. Die richtige Orientierung der knock-in-Kassette wurde mittels Sequenzierung kontrolliert. Anschließend wurde das nun entstandene Plasmid pBKS-5'HR-NLS-lacZ-3'HR mit NotI und KpnI geschnitten, um die homologen Regionen mit der knock-in-Kassette mittels homologer Rekombination in den EL250 Bakterien in den pL254-Pifo-Vektor zu rekombinieren. Der Zielvektor pL254-Pifo-NLS-lacZneo wurde durch Sequenzierung verifiziert.

5.2.2 Molekularbiologie

5.2.2.1 Plasmid- und BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Präparation

5.2.2.1.1 Plasmidpräparationen mit Hilfe der QIAGEN Plasmid Kits

Plasmidpräparationen in kleinen Mengen wurden mit Hilfe von Mini-Kits von QIAGEN amplifiziert. Das DNA-Pellet wurde in 50µl TE-Puffer resuspendiert. Für größere Mengen an DNA wurde das QIAGEN Maxi-Kit verwendet und die DNA in 300µl TE-Puffer eluiert.

5.2.2.1.2 BAC-Minipräparation nach Copeland

Die Präparation von BAC-DNA folgt ähnlich der der Plasmid-DNA. Dazu wurde das Protokoll nach Warming et al., 2005 leicht modifiziert.

5ml Bakterien-Übernachtskultur werden für 5000rpm für 5min (5804R Zentrifuge; Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 250µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 250µl P2-Puffer zugegeben und das Eppendorfgefäß vorsichtig invertiert. Nach 5min Inkubation bei RT werden 250µl P3-Puffer zugefügt und das Gefäß für 5min auf Eis inkubiert. Das Protein wird durch Zentrifugieren bei 13,500rpm für 5min präzipitiert. Die DNA wird durch Fällern mit 750µl Isopropanol präzipitiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der BAC-DNA wird diese in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Um ein Brechen der BAC DNA zu verhindern, wird die DNA bei 4°C gelagert und nicht bei -20°C weggefroren.

5.2.2.2 Genomische DNA-Isolierung im 96-Lochplatten-Format

Nach dem Separieren der ES-Zellen lässt man diese in einer 96-Lochplatte bis zur DNA-Isolierung für 2-3 Tage wachsen, bis die Farbe des Mediums innerhalb eines Tages nach Gelb umschlägt. Dem Lysispuffer wird im Vorfeld Proteinase K in einer Konzentration von 100µg/ml zugegeben. Die Zellen werden zunächst zweimal mit PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen, bevor mit einer Mehrkanalpipette je 50µl Lysispuffer hinzupipettiert werden. Die Platte wird mit Parafilm umschlossen und bei 55°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden 150µl 5M Natriumchlorid mit 10ml eiskaltem 100%igem Ethanol gemischt und davon je 100µl dazugegeben, um die DNA zu präzipitieren. Nach einer halben Stunde wird die Flüssigkeit aus der Platte vorsichtig dekantiert und mit eiskaltem 70%igem Ethanol dreimal für je 30min gewaschen. Nach den Waschsritten wird die DNA getrocknet und anschließend in je 25µl TE-Puffer pro Einheit resuspendiert.

5.2.2.3 RNA-Präparation

RNA aus embryonalem oder adultem Gewebe wird mittels Trizol extrahiert. Dazu wird 1ml Trizol auf 50-100mg Gewebe pipettiert (z.B. 800µl). Das Gewebe wird z.B. mittels einer Spritze homogenisiert und für 5min bei RT inkubiert. Nun wird dem Gemisch Chloroform (z.B. 160µl) hinzugegeben und kräftig gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000rpm für 10min bei 4°C wird die obere Phase, die die RNA enthält, vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert. Zum Fällern der RNA wird nun 400µl Isopropanol hinzupipettiert und erneut bei 12000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird nur kurz getrocknet und in 10-50µl DEPC H₂O aufgenommen.

5.2.2.4 Auftrennung von DNA/RNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA- oder RNA- Fragmente wandern innerhalb eines Agarosegels in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Auftrennung von verschiedenen DNA/RNA-Fragmenten zu Nutze. Ein 1%iges Agarose/TAE-Gemisch wird zunächst aufgekocht und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,005% hinzugegeben. Im kochenden Zustand wird nun ein Gel mit Taschen gegossen und nach Erkalten mit einer Gelkammer in eine TAE-Pufferlösung gelegt. Der optimale Auftrennungsbereich 1%iger Gele liegt bei 500bp und 7kb. Um größere Fragmente

aufzutrennen, muss ein niedrigprozentiges Gel gegossen werden, um kleinere Fragmente aufzutrennen, höherprozentige Gele. Das Gel wird nun beladen und ein elektrisches Feld angelegt, wobei sich am oberen Ende die Kathode und am unteren Ende die Anode befindet. Die DNA/RNA wandert innerhalb des Gels Richtung der positiv geladenen Anode. Kleinere Fragmente mit geringerem Molekulargewicht wandern innerhalb des Gels schneller als große Fragmente. Als Marker werden 10µl eines 1kb-Größenstandards (80,1µg/µl) verwendet.

5.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA kann an einem Photometer (Nanodrop) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt werden. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft darüber, welche Reinheit die Probe besitzt. Werte zwischen 1,8 und 2,0 bedeuten eine hohe Reinheit der gelösten RNA oder DNA.

5.2.2.6 Herstellen von cDNA mittels reverser Transkription

Die Methode der reversen Transkriptions(RT)-PCR wird angewendet, um kurze Regionen von cDNA mit genspezifischen Primern zu amplifizieren. Dazu wird aus Embryonen oder Geweben Gesamt-RNA hergestellt, cDNA synthetisiert und anschließend der gewünschte cDNA Bereich mittels PCR amplifiziert. Bei der Synthese der Primer ist darauf zu achten, dass diese so gewählt werden, dass sie nicht die Intron-Exon Grenze überlagern.

Es wird folgender Ansatz für die RT-PCR gewählt:

2,0 µl RNA
1,0 µl Oligo-dT-Primer (500ng/µl)
mit DEPC H₂O auf 11,0µl Endvolumen aufgefüllt

Die Lösung wird für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, wo folgende Komponenten hinzugefügt wird:

4,0µl fünffach Transkriptasepuffer
2,0µl DTT (0,1M > 10mM)
1,0µl dNTPs (je 10mM > 0,8mM)
1,0µl RNA Inhibitor (40U/µl > 40U)

Das Gemisch wird nun für 2min bei 42°C inkubiert und anschließend 1µl SuperScript (200U/µl) dazupipettiert. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 42°C für 50min, bevor die Reaktion durch Denaturierung des Enzymes bei 70°C über 15min abgestoppt wird. Die cDNA kann nun bei -20°C gelagert werden.

5.2.2.7 Ligation

Ziel der Ligation ist es, ein verdautes DNA-Fragment in einen mit denselben Restriktionsenzymen aufgeschnittenen Vektor zu bringen. Dazu kann das Fragment und der Vektor mit komplementären überstehenden oder glatten Enden geschnitten worden sein. Für die Ligation wird das Enzym T4-Ligase (Roche, Mannheim) verwendet. Die Ligasereaktion erfolgt in 10µl Ligationsansatz, versehen mit zehnfachem Ligasepuffer, wobei die zu klonierenden Fragmente in 2-3fach molarem Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt werden. Für die Ligation wird der Reaktionsansatz bei 16°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag direkt für die Transformation eingesetzt.

5.2.2.8 Transformation von Bakterien

Um ein DNA-Fragment z.B. in einem Plasmid oder in einem BAC in Bakterien zu transformieren gibt es zwei Möglichkeiten: die chemische Transformation oder die Elektroporation.

Bei der chemischen Transformation wird durch Ca^{2+} Ionen und Hitze die Bakterienmembran porös, so dass DNA durch Anheften an die Membran aufgenommen werden kann. Bei der Elektroporation werden die Membranen der Zellen in einer salzfreien Lösung durch kurze elektrische Stöße permeabilisiert.

5.2.2.8.1 Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompenter Bakterien wird auf Eis aufgetaut. 1-2µl DNA für die Transformation werden zu den Bakterien auf Eis pipettiert. Die Mischung wird in eine vorgekühlte Küvette (0,1cm) blasenfrei transferiert. Die Elektroporation wird bei einer Spannung von $U=2,5\text{kV}$ durchgeführt. Nach dem elektrischen Puls werden die Bakterien in ein Eppendorfgefäß transferiert und mit 1ml LB-Medium verdünnt. Um die transformierten Bakterien zu amplifizieren, wird das Gefäß bei 850rpm im Eppendorf Schüttler bei 37°C für

60min behandelt. Anschließend werden die Bakterien auf LB-Platten, die mit einem Selektionsantibiotikum versehen sind, ausplattiert und über Nacht auf 37°C gestellt.

5.2.2.8.2 Chemische Transformation

Dh5 α -Bakterien werden auf Eis aufgetaut. 4 μ l des zu transformierenden Vektors werden anschließend zu den Bakterien pipettiert und das Gemisch für 30min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock werden die Bakterien für 90sec bei 42°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis abgekühlt. Auch hier werden die Bakterien nach der Transformation mit LB-Medium verdünnt, bei 850rpm für 60min geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

5.2.2.9 Homologe Rekombination in Bakterien

Von einem Glycerolstock wird eine Bakterienkultur EL-250 über Nacht bei 32°C angeimpft. Die Übernachtskultur wird am nächsten Tag 1:50-1:100 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀=0.6 in 50ml LB-Medium wachsen gelassen. Dann wird die Kultur gesplittet: 25ml werden als Rekombinationskontrolle bei RT inkubiert, die anderen 25ml werden bei 42°C im Wasserbad unter permanentem Schütteln inkubiert. Beide Kulturen werden im Anschluß daran auf Eis abgekühlt und dort gehalten. Die Bakterien werden bei 4°C für 5-15min bei 5000rpm abzentrifugiert (Eppendorf 5804 R) und das Bakterienpellet in 1,8ml eiskaltem 10%igem Glycerol resuspendiert. Die Suspension wird nun bei voller Geschwindigkeit (14000, Eppendorf 5417 R) bei 4°C für 20sec erneut zentrifugiert und wieder in 1,8ml 10%igem eiskaltem Glycerol resuspendiert. Dieser Waschschrift wird noch drei Mal wiederholt, ehe das Pellet in einem Endvolumen von 100 μ l 10%igem Glycerol aufgenommen wird. 15ng des linearisierten PL-254-5`HR;3`HR-Vektors werden mit 50 μ l kompetenten Zellen fusioniert, 5min auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert.

5.2.2.10 Sequenzierung

Bei einer Sequenzierreaktion werden Didesoxy-Nukleotide verwendet, die mit 4 verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen für jede Base vorhanden sind. Für eine Sequenzierung wird eine PCR mit einem Primer durchgeführt, die abbricht, sobald ein Didesoxy-Nukleotid mit spezifischer Fluoreszenzmarkierung eingebaut wird. Dadurch

entstehen statistisch verteilte Fragmente jeder Länge, wobei sich am Ende jedes Fragments ein Didesoxy-Nukleotid mit der jeweiligen spezifischen Fluoreszenzmarkierung befindet.

Es wird ein Mastermix für jede Sequenzierreaktion vorbereitet:

0,5µl BigDye
2,0µl BigDye-Puffer
10pM Primer (sense/antisense)
(n) bp/100 = x ng
Σ 5,0µl

Folgendes PCR-Programm wird für die Sequenzierreaktion verwendet:

96°C 1min
96°C 10sec }
50°C 5sec } 35x
60°C 4min
4°C ∞

Um die DNA zu präzipitieren werden der PCR-Reaktion 0,5µl 125mM EDTA, 2,0µl 3M Natriumacetat und 50µl 100%iges Ethanol zugegeben, gemischt und bei RT für 15min inkubiert. Die DNA wird durch Zentrifugation (4°C;11000rpm) für 30min pelletiert, anschließend mit 70%igem Ethanol durch erneute Zentrifugation gewaschen, das Pellet getrocknet und in 25µl HPLC-H₂O aufgenommen.

Die Proben am Sequenzierer im 96-Lochformat aufgetragen. Bei der Sequenzierung werden die Fragmente in einer Gelsäule der Größe nach aufgetrennt und die am Ende befindliche Fluoreszenz detektiert. Die Fluoreszenzabfolge entspricht der Sequenz der zu analysierenden DNA.

5.2.2.11 Restriktionsverdau genomischer DNA für die Analyse mittels Southern-Blot

Um im 96-Lochplatten-Format mittels Restriktionsenzymen genomische DNA zu verdauen, wird folgender Ansatz in jede Einheit pipettiert:

25µl DNA (gelöstes Volumen der DNA)
0,40µl 100x BSA
0,40µl 100mM Spermidin
0,25µl RNase A 1mg/ml
4,00µl 10x Enzypuffer
2,50µl Enzym (10U/µl)
7,45µl H₂O
Σ40.00µl

Die 96-Lochplatte wird mit Parafilm umhüllt und, um eine Kondensation zu verhindern, in eine feuchte Kammer gestellt. Der Restriktionsverdau erfolgt über Nacht schüttelnd bei 37°C.

5.2.2.12 Southern Blot

Im Jahre 1975 wurde von Edwin Southern die Methode des Southern Blots entwickelt, um eine bestimmte genomische DNA-Sequenz zu detektieren. Dazu wird die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen in kleine Stücke geschnitten und durch Gelelektrophorese separiert. Diese DNA-Stücke werden nun auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten gegensträngigen DNA-Probe hybridisiert. Das nun radioaktiv markierte DNA Stück kann durch Exponierung auf einen Film sichtbar gemacht werden. Nach homologer Rekombination von ES-Zellen wird die Methode des Southern-Blots häufig benutzt, um die korrekte Integration des Zielvektors in das Genom zu überprüfen.

5.2.2.12.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Zunächst wird die genomische DNA über Nacht mit einem Restriktionsenzym verdaut. Dieser Verdau wird am nächsten Abend auf ein 0,8%iges Gel geladen und bei schwacher Voltzahl (30V) über Nacht aufgetrennt. Am nächsten Morgen wird mittels UV-Licht-Fotographie einerseits anhand eines fluoreszierenden Lineals die Lauflänge des Gels festgehalten,

andererseits die Vollständigkeit des genomische Verdaus durch den Nachweis repetitiver Banden überprüft.

5.2.2.12.2 Blotten

Zunächst wird das Gel in einer Depurinisierungslösung für 20min durch leichtes Schwenken inkubiert. Anschließend wird jeweils eine halbe Stunde lang das Gel in einer Denaturierungs- und Neutralisierungslösung inkubiert.

Der Blotaufbau wird wie unten beschrieben in 20igfacher SSC-Lösung aufgebaut; der Transfer findet über Nacht statt. Am nächsten Tag wird der Blot wieder abgebaut, die Membran getrocknet und bei 80°C für eine halbe Stunde gebacken.

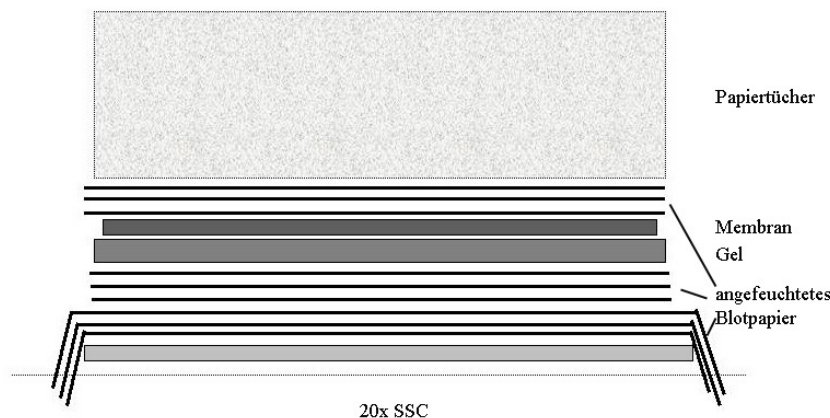


Fig. 57: Versuchsaufbau des Southern-Blots

Beim Southern-Blot wird angefeuchtetes Blotpapier auf eine Glasscheibe gelegt, die Seitenränder des Blotpapiers ragen in eine Wanne, die mit 20x SSC befüllt ist. Das Gel wird mit den Taschen nach unten auf das Blotpapier und die Nitocellulosemembran blasenfrei darüber gelegt. Die Membran wird mit Blotpapier und mehrlagig Papiertüchern bedeckt.

5.2.2.12.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgt in drei Schritten.

Prähybridisierung

30ml vorgewärmte Hybridisierungslösung werden zu einer Hybridisierungsröhre, in die zuvor die Membran mit der DNA Seite nach innen eingerollt wurde, hinzugegeben. Die Röhre wird in einen Hybridisierungsofen bei 65°C für mindestens 2h vorhybridisiert.

Radioaktive Markierung der Probe

100ng der linearisierten Probe werden auf ein Volumen von 24µl mit dest H₂O verdünnt, 10µl Random-Oligonukleotide werden ebenfalls zugegeben und das Ganze für 5min im Wasserbad aufgeköcht. Nach Ablauf der Zeit wird die Probe sofort auf Eis gestellt und abgekühlt. 10µl fünffacher Puffer (d*CTP-Puffer für 32P gelabeltes CTP) wird nun der Lösung zugegeben. Im Radioaktivlabor folgt dann noch radioaktiv gelabeltes CTP (50Cu) und 5U Klenow-Enzym (Exo(-) Klenow, 1µl, 5U/µl). Die Lösung wird durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 37°C für 20min inkubiert. Danach werden 2µl STOPmix hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden.

Um die markierte Probe von Proteinen und nicht eingebauten Nukleotiden zu reinigen, wird diese auf eine vorbereitete Säule gegeben und für 2min bei 400g abzentrifugiert.

Mit 1µl der nun markierten Probe wird die Aktivität der Reaktivität gemessen. Um die Probe zu denaturieren, werden 500µl Lachsspermien-DNA (10mg/ml) bei 100°C im Wasserbad denaturiert und in einem 50ml Falcongefäß auf Eis gestellt. Die heiße Probe wird in einer Endkonzentration von 1×10^6 Zählungen pro 1ml Hybridisierungslösung hinzugegeben. Die Lösung wird durch Zugabe von 50µl 10N Natriumhydroxid denaturiert. Anschließend wird durch leichtes Schwenken des 50ml-Röhrchens noch 300µl 2M Tris, pH 8,0 und 475µl 1M HCl tropfenweise hinzupipettiert.

Hybridisierung

Die Prähybridisierungslösung wird nach Ablauf der 2h Prähybridisierung durch die frisch radioaktiv-markierte DNA-Probe ersetzt. Es folgt nun eine 24stündige Inkubation bei 65°C im rotierenden Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wird die heiße Probe vorsichtig aus dem Hybridisierungsröhrchen dekantiert. Die Membranen werden in einer auf 65°C vorgewärmten zweifachen SSC/0,5%-SDS-Lösung in einer Plastikwanne gewaschen. Alle 5min wird die Radioaktivität auf der Membran mit einem Geigerzähler kontrolliert. Wenn das Signal höher als $100-200 \times 10^2$ Zähler ist, wird der Waschschrift wiederholt oder die Stringenz der Waschlösung erhöht (wahlweise einfache SSC/0,5%-SDS- oder zehntel SSC/0,5%-SDS-Lösung). Bei gewünschter Radioaktivität wird die Membran in Saranfolie eingewickelt und in einer Filmkassette fixiert. Ein Film (Kodak, BioMax) wird aufgelegt, die Kassette bei -80°C gelagert und der Film nach ungefähr 48h entwickelt (AGFA Curix 60).

5.2.2.13 *In vitro*-Transkription von markierten RNA-Proben

Für whole-mount *in situ* Hybridisierungen werden komplementäre RNA-Proben hergestellt. Dazu werden cDNA-Fragmente verwendet, die zuvor in Vektoren kloniert wurden, die die Sp6-, T3- oder T7-Bakteriophagen-Promotoren besitzen. Einige Plasmide wurden vom RZPD-Resourcenzentrum in Berlin (nun: imagenes) als EST-Klone bestellt oder freundlicherweise unserem Labor zur Verfügung gestellt.

5.2.2.13.1 Linearisierung der Plasmide

Zum einen wurden die Plasmide, die das cDNA-Fragment enthalten linearisiert. Dazu wird das linearisierte Plasmid gefällt und anschließend RNA-Sonden des nicht kodierenden Strangs („anti-sense“) *in vitro* hergestellt.

Anschließend wird folgender Reaktionsansatz pipettiert:

- 6µl DEPC-H₂O
- 1µl Transkriptionspuffer (Roche)
- 1µl linearisierte Plasmid-DNA
- 1µl 10xDIG RNA-Reaktionsmix (Roche)
- 0,5µl RNase-Inhibitor (Roche)
- 0,5µl RNA-Polymerase (Roche)

Dieser Ansatz wird für 2h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran werden 1µl DNase (10U/µl, Roche) zugegeben und für weitere 15min bei 37°C inkubiert. Um die RNA zu fällen wird nun das Volumen mit DEPC-H₂O auf 100µl aufgefüllt, 10µl 4M LiCl und 300µl 100%iges Ethanol zugegeben und für mindestens 20min bei -20°C inkubiert. Im Anschluß daran wird die RNA bei 14000rpm für 30min bei 4°C gefällt, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Schließlich wird die RNA in 55µl DEPC-H₂O aufgenommen, die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese kontrolliert und die Menge an RNA mittels Nanodrop ermittelt.

5.2.2.13.2 Amplifikation mittels PCR

Antisense RNA-Sonden von RZPD-Klonen wurden mit Hilfe von PCR-Produkten hergestellt. Dazu wurden Minipräparationen der cDNA-Klonen hergestellt und 1 µl als Template zu unterschiedlichen PCR-Reaktionsansätzen hinzupipettiert.

Vektor (antisense Polymerase)	Primer Name	Primer Sequenz	PCR Programm
pBluescript-Lion (Sp6)	Lion-5/ Lion-3-Sp6	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT/ ATTTAGGTGAACACTATAGAATCGAAGC GGCCGC CCGGGCAGGT	94°C 3' 15'' 95°C 45'' 56°C 45'' 72°C 1' 30 Zyklen 72°C 4'
pSort1 (SP6) pCMV-Sport6 (T7) pCMV-Sport2 (T7) pT7T3D-Pac1 (T3)	TM-M13 FWD/ TM-M13 REV	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGG CAGGAAACAGCTATGAC	96°C 2' 96°C 10'' 52°C 5'' 72°C 4' 30 Zyklen 72°C 4'
pBluescript- modified (T3)	RZPD-M13 FWD/ RZPD-M13REV	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA TG TG/ CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC TCG	94°C 3' 15'' 95°C 45'' 68°C 45'' 72°C 4' 30 Zyklen 72°C 4'
pME18s-F13 (T7)	SuganoF1-Sp6/ SuganoR1-T7	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA TG TG/ CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC TCG	94°C 2' 94°C 30'' 65°C 30'' 72°C 2' 30 Zyklen 72°C 5'
pBSII-SK (T7)	pBSII SK-FWD/ pBSII SK-REV	GTTTTCCAGTCACGACGTT/ TGTGGAATTGTGAGCGGATA	94°C 2' 94°C 30'' 60°C 30'' 72°C 3' 30 Zyklen 72°C 5'

Die PCR wurde auf einem Agarosegel kontrolliert und anschließend 5 µl des PCR-Produkts zum *in vitro* Transkriptionsreaktionsansatz (siehe oben) hinzupipettiert. Die *antisense*-RNA-Sonden wurden, wie oben beschrieben, hergestellt.

5.2.3 Biochemische Methoden

5.2.3.1 Extraktion von Proteinen

Um Proteine aus Geweben oder Zellen zu extrahieren ist ein schnelles Arbeiten bei niedrigen Temperaturen erforderlich, um Denaturierungen zu vermeiden. Bei der Proteingewinnung können entweder Proteine des gesamten Zelllysats oder Zellkompartimente (zytoplasmatische oder nukleäre Fraktionen) extrahiert werden. Durch Zugabe von Proteaseinhibitoren sowie Arbeiten bei 4°C bleiben die Proteine jedoch intakt.

5.2.3.1.1 Proteinextraktion aus Zellysat

Zellen werden mit eiskaltem PBS gewaschen und das PBS anschließend restlos abgesaugt. 50-100µl Lysispuffer, dem ein Proteaseinhibitor-Cocktail zugesetzt wird, werden auf eine 6-Lochplatte gegeben. Mit einem Zellkratzer werden die Zellen von der Platte gelöst und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß transferiert. Um die Zellen komplett zu lysieren, werden diese anschließend für 10min auf einen Schüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 4°C kräftig geschüttelt. Um die nichtlöslichen Zellbestandteile wie Zellkern und Membranen von dem restlichen Lysat zu trennen, werden die lysierten Zellen bei 14,000rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine beinhaltet, wird in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß transferiert und bei -80°C gelagert.

5.2.3.1.2 Zellkompartiment-Proteinextraktion mittels CelLytic™NuClear™ Extraction-Kit (Sigma, NXTRACT)

Einer 0,1M DTT- und einfachen hypotonische Lysispuffer-Lösung wird im Vorfeld der Proteaseinhibitor-Cocktail (PI) hinzugegeben (1000µl Lysispuffer, 1,5µl 0,1M DTT und 10µl PI).

Das Gewebe wird zunächst zweimal mit PBS gewaschen, das PBS sorgfältig abgesaugt und das Material im Anschluß daran mit 1ml einfachem Lysispuffer mittels einer dicken Nadel homogenisiert. Die Zellsuspension wird bei 10,000xg für 20min zentrifugiert. Der Überstand mit der zytoplasmatischen Fraktion wird sorgfältig abgenommen und separat bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wird in 140µl Extraktionspuffer homogenisiert und für 30min bei 4°C auf einen Schüttler inkubiert. Dann wird die Lösung bei 20,000xg für 5min bei 4°C

abzentrifugiert und der Überstand, der die nukleäre Fraktion beinhaltet, abgenommen und bei -80°C gelagert.

5.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonic acid (BCA)-Test

Abhängig von ihrer Konzentration können Proteine alkalisches Cu(II) zu Cu(I) reduzieren. BCA ist ein chromogenes Reagenz für Cu(I) , da es mit Cu(I) einen violetten Komplex ausbilden kann, der bei 562nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Die Absorption dieses Komplexes ist direkt proportional zu der Proteinkonzentration, so dass durch eine quantitative photometrische Messung der Proteinlösung, die mit einer konzentrationsbekanntem Standardreihe verglichen wird, die Proteinkonzentration berechnet werden kann.

Als Standardreihe werden folgende BSA Verdünnungen in Lysispuffer verwendet: 25, 125, 250 und 500 $\mu\text{g/ml}$. Die Proteinproben werden mit Lysispuffer 1:50 verdünnt. Eine Nullkontrolle (Lysispuffer pur), die Standardreihe und die Proteinproben werden mit der BCA Lösung 1:20 verdünnt. Die Mischungen werden anschließend für 30min bei 50°C inkubiert, wobei ein violetter Farbumschlag zu beobachten ist. Die Proben werden zunächst abgekühlt, bevor die Absorption am Eppendorf Photometer gemessen wird. Nachdem der Verdünnungsfaktor noch addiert wird, kann die Proteinkonzentration der Proben im Vergleich zu der Standardreihe berechnet werden.

5.2.3.3 StrepII-tag-Affinitätsaufreinigung

Um Protein-Interaktionen von Pitchfork nachweisen zu können, wurde N-terminal an die cDNA von Pitchfork eine StrepII-tag-Sequenz (Streptavidin) kloniert (SF-TAP-Pitchfork). Eine StrepII-tag-Aufreinigung wurde nach dem Protokoll von Gloeckner et al, 2007 durchgeführt. Dazu werden HEK293T Zellen mit dem SF-TAP-Pitchfork überexprimiert. Um eine hohe Expression von Pitchfork in diesen Zellen zu gewährleisten, werden die Zellen 10h nach der Transfektion für 30h ohne FCS kultiviert (10%DMEM, 2mM L-Glutamin, 1% Pen/Strep in DMEM). Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen mit Lysispuffer für 20min bei 4°C lysiert (50mM Tris-HCl, pH7,4, 150mM NaCl, 0,5% Nonidet-P40, Protease-Inhibitoren (Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (Sigma-Aldrich)). Anschließend wird das Lysat für 10min bei 14,000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und auf eine Strep-Tactin-Superflow-Säule (IBA) überführt. Nachdem das Lysat durch die Säule getropft ist, wird die Säule mit einem Waschpuffer dreimal gewaschen (50mM Tris-HCl-

Puffer (pH7,4), 150mM NaCl, 0,1% Nonidet-P40 und Phosphataseinhibitoren). Anschließend werden die Proteine im Strep-Tactin-Elutionspuffer (IBA) eluiert.

5.2.3.4 Western-Blot

Beim Western-Blot werden Proteine aufgrund ihrer Größe mittels Elektrophorese auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel separiert. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) umhüllt die Proteine und gibt ihnen je nach ihrer Größe eine unterschiedliche negative Ladung. Die Proteine werden anschließend mit Hilfe einer elektrischen Spannung mit einem "semi-dry"-Blotsystem auf eine Membran transferiert. Auf diese Membran können Antikörper spezifisch an die Proteine binden. Die Bindung der Antikörper kann mit Hilfe von an Meerrettich-Peroxidase-(horseradish peroxidase (HRP))-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert werden, welche durch eine enzymatische Katalysation sichtbar gemacht werden können. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wird die Membran vor der Antikörperinkubation mit Milchpulver und BSA geblockt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um 4 10%ige Trenngele zu gießen, wird folgender Ansatz vorbereitet:

10ml Acrylamid/Bisacrylamid- Mischung
7,5ml vierfach Tris/SDS Puffer, pH8,8
12,5ml H₂O
40,0µl TEMED
300 µl APS

Die Mischung wird zwischen zwei in einer Gelkammer fixierten Glasplatten gegossen und mit Wasser bedeckt, um einen luftgeschlossenen Raum und eine ebene Fläche zu generieren. Nach der Polymerisation des Gels wird das Wasser vorsichtig dekantiert.

Nun wird die Mischung für 4 Sammelgele zusammenpipettiert:

1,3ml Acrylamid/Bisacrylamid- Mischung
2,5ml vierfach Tris/SDS Puffer, pH6,8
6,2ml H₂O
20,0 µl TEMED
100 µl APS

Diese Mischung wird sofort mit einer Pipette langsam auf das Trenngel bis zur oberen Kante der beiden Glasplatten pipettiert und mit einem Gelkamm versehen.

Vierfach SDS-Ladepuffer wird frisch mit Dithiothreitol (DTT) versehen und 1:3 mit den Proben gemischt. Anschließend werden die verdünnten Proben bei 95°C für 4min gekocht und dann sofort auf Eis gestellt. Dem mittlerweile erhärteten Gel wird der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Taschen mit fließendem Wasser ausgespült. Die Gele werden in einer Gelkammer fixiert und mit frischem einfachem Tris-Glycin-Laufpuffer gefüllt. Die Geltaschen werden erneut mit einer Spritze gespült und anschließend mit den Proben beladen. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei 80-120V für ca. 1-2h.

Je nach Größe der zu auftrennenden Proteine werden verschiedene Acrylamid-Konzentrationen verwendet.

%	kDa
16.0	12-43
10.0	16-68
7.0	36-94
5.0	57-212

Blotten

Nach der Gelelektrophorese werden die Glasplatten vorsichtig vom Gel entfernt und für 10min im Kathodenpuffer äquilibriert. Die PVDF Membran wird für 15sec in Methanol aktiviert, für 2min in H₂O und anschließend noch einmal für 5min im Anodenpuffer II inkubiert. Die Nitrocellulosemembran dagegen wird nur kurz mit Anodenpuffer II befeuchtet. Der „semi-dry“-Blot wurde nach folgender Anleitung aufgebaut:

Anode

1x dickes Blotpapier, kurz mit API befeuchtet

1x dünnes Blotpapier, kurz mit APII befeuchtet

PVDF/Nitrocellulose-Membran

Gel

3x dickes Blotpapier, kurz mit Kathodenpuffer befeuchtet

Kathode

Blott bei 220mA für 20min

Immunofärbung

Nach dem Blotten wird die Membran in Blockinglösung für 2h inkubiert (einfacher TBST-Puffer + 5%iges Milchpulver + 1g BSA (50ml)). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockinglösung findet über Nacht bei 4°C statt. Im Anschluß daran wird die Membran dreimal mit TBST für je 15min gewaschen, bevor die Membran mit dem zweiten Antikörper für 2h bei RT inkubiert wird. Nach anschließenden Waschschritten mit einfachem TBST wird die Membran mit ECL-Lösung für 1min benetzt, die Membran anschließend in Saran-Folie gewickelt und mit einem Film in einer Kassette fixiert. Je nach Stärke des Signals werden die Filme nach 1sec-10min Exposition entwickelt.

5.2.3.5 Luciferase-Reporter-Assay

Mit Hilfe des Luciferase®-Reporter-Assays (Promega) kann analysiert werden, ob ein Transkriptionsfaktor eine reprimierende oder aktivierende Funktion hat. Bei dieser Methode kann die Genregulation, primär die transkriptionelle Kontrolle eines Gens bestimmt werden. Dazu wird der pGL3-Enhancer-Vektor (Promega) verwendet. Dieses Reporterkonstrukt beinhaltet fünf Kopien der Gal4-Bindestelle und eine SV40-Enhancer-Region, welche hinter einem Luciferase-Gen und einem poly(A)-Signal lokalisiert ist. Luciferasen sind strukturell unterschiedliche Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen reagieren. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Der pGL3-Enhancer-Vektor wird in Zellen transfektiert, und das Luciferase-Gen kann in fast allen Säugetierzellen stark exprimiert werden. Die Menge des Luciferase-Enzyms wird mittels Lichtemission an einem Luminometer gemessen und spiegelt die Basalaktivität wider. Das zu analysierende Gen wird hinter einen starken CMV-Promotor und einer Gal4-Bindungsdomäne in einen Vektor kloniert und in die Zellen kotransfektiert. Nach der Bindung des zu analysierenden Gens mit seiner Gal4-Bindungsdomäne an das Reporterkonstrukt wird die Luciferase aktiviert.

Die Messung der Biolumineszenz wird quantifiziert und ist proportional zur transkriptionellen Aktivität des zu analysierenden Gens. Bei dem Dual-Luciferase®-Reporter-Assay werden zwei unterschiedliche Luciferasen verwendet. Zum einen die Firefly-Luciferase (aus dem Leuchtkäfer), bei der Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagiert. Und zum anderen die Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*), die nur Luciferol und Sauerstoff in Abwesenheit von ATP zur Reaktion benötigt. Die Renilla-Luciferase wird in diesem System als Transfektionskontrolle benötigt und ist permanent aktiv. Die Aktivitäten der beiden Luciferasen werden hintereinander bestimmt. Der Luciferase-Reporter wird nach

Zugabe des Luciferase-Assay-Reagenz II (LARII) gemessen. Nachdem mit einem Luminometer die Biolumineszenz ermittelt wurde, wird die Reaktion gestoppt und simultan die Renilla-Luciferase-Reaktion durch ein Stop&Glo®-Reagenz aktiviert. Durch dieses Reagenz wird das Signal von der Renilla-Luciferase nacheinander stabilisiert, gemessen und gegen das Luciferase-Signal normalisiert. Dadurch kann z.B. eine Variabilität in der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden.

5.2.4 Embryologie

5.2.4.1 Herstellung tetraploider Embryonen

Die Herstellung tetraploider Embryonen wurde nach Protokollen von Nagy et al., 1993 (Manipulating the Mouse Embryo, Book Reference) durchgeführt. Bei dieser Methode werden sechs Wochen alte CD1-Weibchen superovuliert, indem ihnen zunächst 100µl PMSG und 46h später 100 µl humanes Choriongonadotropin (hCG) intraperitoneal injiziert werden. Die superovulierten Weibchen werden mit dsRed-Männchen (Vintersten et al., 2004) verpaart. Weitere 48h später werden den superovulierten Weibchen die Eileiter entnommen und gespült, um Embryonen im Zweizellstadium zu gewinnen. Diese Embryonen werden in Mannitol überführt und zwischen zwei Platinelektroden platziert. Die Grenzachse der Blastomere wird senkrecht zur Elektrode durch Anlegen einer Spannung von 0,5-1V orientiert und mit Hilfe eines elektrischen Impulses (35V für 35µsec) fusioniert. Im Anschluß daran werden die Embryonen in M2-Medium gewaschen und in KSOM (Millipore) transferiert.

5.2.4.2 Herstellung von ES-Zell-generierten-Embryonen mittels tetraploider

Aggregation

Fusionierte tetraploide Embryonen werden über Nacht in einem Tropfen KSOM unter Mineralöl bei 37°C in 5%igem CO₂ kultiviert. Embryonen, die sich nach der Fusion bis zum Vierzellstadium weiterentwickelt haben werden mit Tyrode`s-Lösung behandelt, um die *Zona pellucida* zu entfernen. Die Pitchfork+/- ES-Zellen werden kurz abtrypsinisiert und ES-Zellklumpen von 8-15 Zellen in eine Vertiefung der Aggregationsplatten zwischen je zwei tetraploiden Embryonen platziert, wo diese über Nacht mit den Embryonen aggregieren. Diese Aggregate werden über Nacht in KSOM gelagert und am nächsten Tag in die Uteri von E2,5 pseudoschwangeren CD1-Weibchen transferiert.

5.2.4.3 Isolierung von Embryonen und Organen

Die Isolierung von Embryonen und Organen wurde nach Protokollen von Nagy und Behringer („Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual“) durchgeführt. Die Embryonen wurden anhand von Downs und Davies (1993) ihrem Alter zugeordnet.

5.2.4.4 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)-Färbung

Die seziierten Embryonen oder Organe werden zweimal in PBS+Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen. Anschließend werden sie je nach ihrem Entwicklungsstadium für 15-60min in einer Fixierungslösung fixiert:

E12,5 oder jünger bei RT 15-40min

E13,0 oder älter bei RT 30-60min

Dann folgen drei weitere Waschschrte in PBS+ 0,02% NP40. Die Embryonen bzw. Organe werden nun in die X-gal-Färbelösung überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die gefärbten Embryonen wieder in PBS+ 0,02%NP40 gewaschen und im Folgenden in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C fixiert und für die Dokumentation aufbewahrt.

5.2.4.5 Whole-mount *in situ* Hybridisierung

Bei der whole-mount *in situ* Hybridisierung kann das Expressionsmuster einzelner Gene durch Bindung gegensträngiger RNA-Sonden in bestimmten Geweben eines frühen Mausembryos (E4,5-13,0) sichtbar gemacht werden. Dazu werden RNA-Sonden mit Digoxigenin markiert, die von einem Antikörper erkannt werden können, der durch eine enzymatische Reaktion mit einer BM-Purple-Lösung sichtbar gemacht werden kann. Für die whole-mount *in situ* Hybridisierung müssen Embryonen möglichst steril und zügig seziiert werden, für 1h bei 4°C fixiert und in einer aufsteigenden Methanolreihe in PBST dehydriert werden. Die Embryonen werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tag 1

Zunächst werden die Embryonen in einem Methanol/PBST-Gradienten in 5minütigen Inkubationsschritten rehydriert und zweimal für je 10min in PBST gewaschen. Um die Embryonen transparent zu machen folgt eine 20minütige Inkubation in 3% H₂O₂ in PBST bei

RT. Im Anschluß daran werden die Embryonen dreimal für je 5min in PBST gewaschen. In 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd werden die Embryonen ein weiteres Mal 20min lang fixiert. Danach werden die Embryonen für je 5min dreimal hintereinander gewaschen, bevor sie in die Prähybridisierungslösung überführt werden und für mindestens 2h bei 70°C inkubiert werden. Über Nacht folgt nun eine Hybridisierung mit den RNA-Sonden, ebenfalls bei 70°C.

PBST: 1x PBS, 0.1% Tween-20
Prehyb-Lösung: 50% Formamid, 5xSSC pH4.5, 1% SDS, 50µg/ml yeast tRNA, 50µg/ml Heparin
Hyb-Lösung: Prähyb-Lösung, 1µg/ml Sonde

Tag 2

Die Embryonen werden initial in der vorgewärmten Lösung I für jeweils mindestens 30min bei 70°C gewaschen. Anschließend werden sie in eine TNT-Lösung überführt und dreimal für 5min bei RT gewaschen. Die restlichen RNAs werden durch einen 0,1mg/ml RNase/TNT-Verdau bei 37°C zerstört. Um die Stringenz zu erhöhen folgen drei weitere 30minütige Waschschrte, dieses Mal mit der Lösung II. Dann erfolgt bei RT erneute dreimalige Inkubation über je 5min in MAB, bevor sie für 2h in die Blockinglösung transferiert werden. Über Nacht folgt dann die Antikörperinkubation bei 4°C.

Lösung I: 50% Formamid, fünffach SSC pH4,5, 1% SDS
Lösung II: 50% Formamid, fünffach SSC pH4,5, 0,2% SDS
TNT: 10mM Tris HCl pH7,5, 0.5M NaCl, 0,1% Tween-20
MAB: 100mM Maleic Acid, 150mM NaCl, 2mM Levamisole, 0,1% Tween20, pH7,5 mit NaOH
Blocking Lösung: MAB, 2% BM Blocking Reagenz
Antikörper Lösung: Eine kleine Spatelspitze Embryonenpuder wird für 30min bei 70°C in 5ml Blockinglösung inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. 50µl Schafserum und 4 µl Anti-Dig-Alkaline-Phosphatase-Antikörper (1:5000) werden nun zu der Blockinglösung hinzugegeben. Nun folgt eine 1stündige Inkubation auf Eis und anschließend eine Zentrifugation bei 5000rpm bei 4°C. Der Überstand wird in ein neues Falconröhrchen überführt und die Lösung mit Blockinglösung/1% Schafserum auf 20ml herunterverdünnt.

Tag 3

Über den nächsten Tag verteilt werden die Embryonen stündlich bei RT auf einem Schüttler liegend mit MAB gewaschen. Über Nacht wird der MAB Waschschrte bei 4°C fortgesetzt.

Tag 4

Jetzt werden die Embryonen zweimal für 10min zum Umpuffern bei RT in NTMT gewaschen und anschließend in BM-Purple transferiert. Die Färbung erfolgt im Dunkeln, je nach Stärke der RNA-Sonde, zwischen 1h und 4 Tagen. Nach Erreichen der gewünschten Färbung des Embryos werden diese in PBST gewaschen und in 4%PFA fixiert. Zum Fotografieren werden die Embryonen in PBST überführt.

NTMT: 100mM Tris HCl pH9,5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl,
 0,1% Tween20

5.2.4.6 Immunofärbungen

5.2.4.6.1 Whole-mount-Immunofärbungen

Um die endogene Expression von Proteinen im Embryo zu detektieren, wurden whole-mount-Immunofärbungen am Embryo nach dem Protokoll von Nakaya et al., 2005 durchgeführt. Hierbei werden Embryonen im Gastrulationsstadium isoliert und für 20min in 2%igem PFA in PBS bei RT fixiert. Um die Embryonen zu permeabilisieren, folgt eine Inkubation mit 0,1% Triton-X-100 in 0,1M Glycin, pH8,0. Die Embryonen werden in 10% FCS, 3% Schafserum, 0,1% BSA, 0,1% Tween20 in TBST für eine halbe Stunde geblockt, bevor sie mit dem ersten Antikörper in der Blockinglösung über Nacht inkubiert werden. Am nächsten Tag folgen drei 10minütige Waschschrte in TBST, bevor sie 1h bei RT mit dem zweiten Antikörpern inkubieren. Nach anschließenden Waschschrten mit TBST werden die Embryonen zwischen zwei Objektgläsern, die durch einen 120µm Secure-Seal™-Abstandshalter (Invitrogen) voneinander getrennt sind, orientiert und in ProLong® Gold Antifade mit DAPI eingebettet.

5.2.4.6.2 Zellkultur-Immunofärbungen

Zellen werden auf Deckgläschen ausgesät und wachsen bis zur gewünschten Dichte. Um die endogene Expression von Proteinen genauer analysieren zu können werden die Zellen zunächst mit 4%igem PFA für 5min bei RT fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellen folgt eine 5minütige Inkubation mit eiskaltem Methanol. Die Zellen werden anschließend dreimalig für 5min mit PBS gewaschen und in 10% Schafserum, 1% BSA und 0,1% Tween20 in PBS blockiert. Über Nacht werden die Zellen auf einem

Taumler mit dem ersten Antikörper, der in der Blockinglösung verdünnt vorliegt, inkubiert. Am darauf folgendem Tag werden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und für 1h mit dem zweiten Antikörper bei RT inkubiert. Es folgen weitere Waschschritte mit PBS, bevor die Zellen auf einem Objektträger in ProLong® Gold Antifade mit DAPI eingebettet werden.

5.2.4.6.3 Immunofärbungen auf Kryoschnitten

Zunächst werden die Kryoschnitte bei RT aufgetaut und getrocknet. Im Anschluß daran werden die Schnitte kurz in 0,1% Triton-X100 in PBS gewaschen, um das OCT zu entfernen. In einer feuchten Kammer werden die Schnitte bei RT für 1-2h in Blockinglösung geblockt (10% Schafserum, 1% BSA in 0,1% Triton-X100 in PBS). Über Nacht folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Blockinglösung, bei 4°C in der feuchten Kammer. Am nächsten Tag werden die Schnitte 0,1% Triton-X100 in PBS dreimalig für 5min gewaschen, bevor sie für 1h mit dem Zweitantikörper inkubiert werden. Auch dieser Antikörper wird durch mehrmaliges Waschen mit 0,1% Triton-X100 in PBS entfernt und die Schnitte anschließend in ProLong® Gold Antifade mit DAPI eingebettet.

5.2.5 Histologie

5.2.5.1 Paraffinschnitte

Die nach einer *in situ* Hybridisierung gefärbten Embryonen werden zunächst mit einer Methanolreihe in einem 10minütigen Abstand dehydriert (25, 50, 75, und 2x100%). Es folgt eine zweifache Inkubation in 100%igem Xylen für jeweils 30min. Über Nacht werden die Embryonen in Paraffin bei 63°C gelagert, ehe am nächsten Morgen das Paraffin erneuert und eine weitere Inkubation über Nacht bei 63°C bis zum nächsten Tag folgt. Dann werden die Embryonen in Einbettblöckchen überführt, orientiert und mit flüssigem Paraffin überdeckt. Nach Erkalten des Paraffins werden die Paraffinblöcke mit Hilfe eines Gitters am Mikrotom befestigt. Schnitte von 8µm Dicke angefertigt. Diese werden auf einen Objektträger positioniert, getrocknet und durch 2 15minütige Xylenschritte entwacht und mit Eindeckmedium auf den Objektträgern fixiert.

5.2.5.2 Kryoschnitte

Frisch präparierte Embryonen bzw. adulte Organe werden für 30-60min in 4% PFA bei RT fixiert. Im Anschluß daran werden die Embryonen kurz in PBS gewaschen und in 30%iger Saccharose in PBS in ein Glasröhrchen transferiert. Nach vollständiger Penetration sinken die Embryonen auf den Grund des Röhrchens und werden daraufhin in 50% OCT/15% Saccharose in PBS überführt. Ein Absinken der Embryonen nach circa 2h zeigt eine Penetration der Embryonen, wonach diese daraufhin kurz in 100%igem OCT gewaschen und anschließend in Blöcke mit OCT überführt werden, die dann auf Trockeneis erhärten. Die Blöcke werden bei -20°C gelagert und mittels eines Kryostaten 8-25 µm dicke Schnitte generiert.

5.2.6 Mikroskopie

5.2.6.1 Bildanalyse am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop

Für Rasterelektronenmikroskopie wurden Embryonen im Stadium E7,5-E7,75 präpariert und in 1%igem Glutaraldehyd in PBS über Nacht fixiert. Die Embryonen wurden nach standardisiertem Protokoll für die Analyse vorbereitet und an einem Jeol (JSM-6300F) Mikroskop analysiert.

Für das Transmissionmikroskop wurden Embryonen im Stadium E7,5 - E7,75 präpariert und in 2,5%igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit einer Ethanolreihe dehydriert und in Epon eingebettet und bei 60°C für 24h polymerisiert. Am Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte von 5nm Dicke angefertigt, diese Schnitte auf Cu-Grids aufgezogen und mit 0,5%igem wässrigen Uranylacetat und 3%igem wässrigen Bleicitrat kontrastiert. Die Schnitte wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop (EM10CR, Zeiss) analysiert.

5.2.6.2 Bildanalyse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Olympus FV1000

Immungefärbte Zellen, Kryoschnitte und Embryonen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop FV1000 bei 405, 488 und 543nm Wellenlänge analysiert. Für eine zweidimensionale Bildanalyse wurden optische Schnitte im Abstand von 0,49µm gescannt und die gewünschte Anzahl an Schnitten fusioniert.

5.2.6.3 Bildanalyse am Zeiss Lumar V12 Stereomikroskop

Die LacZ- und nach *in situ* Hybridisierung gefärbten Embryonen oder Gewebe wurden am Zeiss Lumar V12 Stereomikroskop analysiert und mit Hilfe einer AxioCam MRc5 Kamera fotografiert.

6 Literaturverzeichnis

- Ai, D., Liu, W., Ma, L., Dong, F., Lu, M.F., Wang, D., Verzi, M.P., Cai, C., Gage, P.J., Evans, S., *et al.* (2006). Pitx2 regulates cardiac left-right asymmetry by patterning second cardiac lineage-derived myocardium. *Dev Biol* 296, 437-449.
- Ang, S.L., Conlon, R.A., Jin, O., and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse Otx2 in ectoderm explants. *Development* 120, 2979-2989.
- Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Cascio, S., Rossant, J., and Zaret, K.S. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315.
- Arts, H.H., Doherty, D., van Beersum, S.E., Parisi, M.A., Letteboer, S.J., Gorden, N.T., Peters, T.A., Marker, T., Voeselek, K., Kartono, A., *et al.* (2007). Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat Genet* 39, 882-888.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., and Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 125-148.
- Balczon, R., Bao, L., Zimmer, W.E., Brown, K., Zinkowski, R.P., and Brinkley, B.R. (1995). Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 130, 105-115.
- Beddington, R.S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-620.
- Beddington, R.S., and Robertson, E.J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209.
- Belo, J.A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., and De Robertis, E.M. (1997). Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech Dev* 68, 45-57.
- Bertani, G. (1951). A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia Coli*. *Genetics* 36, 598-611.
- Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 451-463.
- Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C.C., Nash, A., Hilton, D., *et al.* (1998). Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev Biol* 194, 135-151.
- Capdevila, J., Vogan, K.J., Tabin, C.J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* 101, 9-21.
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Court, D.L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2, 769-779.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., *et al.* (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet* 39, 875-881.
- Downs, K.M., and Davies, T. (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118, 1255-1266.
- Dufort, D., Schwartz, L., Harpal, K., and Rossant, J. (1998). The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development* 125, 3015-3025.

- Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J., and Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281, 692-695.
- Eggenschwiler, J.T., and Anderson, K.V. (2007). Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 345-373.
- Egydio de Carvalho, C., Tanaka, H., Iguchi, N., Ventela, S., Nojima, H., and Nishimune, Y. (2002). Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein SHIPPO 1. *Biol Reprod* 66, 785-795.
- Epstein, D.J., McMahon, A.P., and Joyner, A.L. (1999). Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* 126, 281-292.
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247-1260.
- Essner, J.J., Vogan, K.J., Wagner, M.K., Tabin, C.J., Yost, H.J., and Brueckner, M. (2002). Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418, 37-38.
- Ferrante, M.I., Zullo, A., Barra, A., Bimonte, S., Messaddeq, N., Studer, M., Dolle, P., and 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.
- Filosa, S., Rivera-Perez, J.A., Gomez, A.P., Gansmuller, A., Sasaki, H., Behringer, R.R., and Ang, S.L. (1997). Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis. *Development* 124, 2843-2854.
- Fliegeauf, M., Benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 880-893.
- Gebbia, M., Ferrero, G.B., Pilia, G., Bassi, M.T., Aylsworth, A., Penman-Splitt, M., Bird, L.M., Bamforth, J.S., Burn, J., Schlessinger, D., *et al.* (1997). X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet* 17, 305-308.
- Gloeckner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., and Ueffing, M. (2007). A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics* 7, 4228-4234.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graser, S., Stierhof, Y.D., Lavoie, S.B., Gassner, O.S., Lamla, S., Le Clech, M., and Nigg, E.A. (2007). Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J Cell Biol* 179, 321-330.
- Hadjantonakis, A.K., Macmaster, S., and Nagy, A. (2002). Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. *BMC Biotechnol* 2, 11.
- Hallonet, M., Kaestner, K.H., Martin-Parras, L., Sasaki, H., Betz, U.A., and Ang, S.L. (2002). Maintenance of the specification of the anterior definitive endoderm and forebrain depends on the axial mesendoderm: a study using HNF3beta/Foxa2 conditional mutants. *Dev Biol* 243, 20-33.
- Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 3, 103-113.
- Harvey, R.P., Lai, D., Elliott, D., Biben, C., Solloway, M., Prall, O., Stennard, F., Schindeler, A., Groves, N., Lavulo, L., *et al.* (2002). Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 107-114.
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., and Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125, 33-45.

- Hou, J., Charters, A.M., Lee, S.C., Zhao, Y., Wu, M.K., Jones, S.J., Marra, M.A., and Hoodless, P.A. (2007). A systematic screen for genes expressed in definitive endoderm by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *BMC Dev Biol* 7, 92.
- Huangfu, D., and 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., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87.
- Huynh, K.D., Fischle, W., Verdin, E., and Bardwell, V.J. (2000). BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* 14, 1810-1823.
- Icardo, J.M., and Sanchez de Vega, M.J. (1991). Spectrum of heart malformations in mice with situs solitus, situs inversus, and associated visceral heterotaxy. *Circulation* 84, 2547-2558.
- Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nat Cell Biol* 7, 517-524.
- Jeong, Y., and Epstein, D.J. (2003). Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development* 130, 3891-3902.
- Jin, O., Harpal, K., Ang, S.L., and Rossant, J. (2001). Otx2 and HNF3beta genetically interact in anterior patterning. *Int J Dev Biol* 45, 357-365.
- Kaestner, K.H., Monaghan, A.P., Kern, H., Ang, S.L., Weitz, S., Lichter, P., and Schutz, G. (1995). The mouse fkh-2 gene. Implications for notochord, foregut, and midbrain regionalization. *J Biol Chem* 270, 30029-30035.
- Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J.M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P.P., *et al.* (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129, 2367-2379.
- Kang, S., Graham, J.M., Jr., Olney, A.H., and Biesecker, L.G. (1997). GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15, 266-268.
- Kaufman, M.H., and Webb, S. (1990). Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 110, 1121-1132.
- Kawakami, Y. (2005). [Mechanisms for establishment of vertebrate left-right asymmetry]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 50, 1609-1619.
- Kimura-Yoshida, C., Tian, E., Nakano, H., Amazaki, S., Shimokawa, K., Rossant, J., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2007). Crucial roles of Foxa2 in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5919-5924.
- Kinder, S.J., Tsang, T.E., Ang, S.L., Behringer, R.R., and Tam, P.P. (2001). Defects of the body plan of mutant embryos lacking Lim1, Otx2 or Hnf3beta activity. *Int J Dev Biol* 45, 347-355.
- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Wynshaw-Boris, A., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2002). Pitx genes during cardiovascular development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 81-87.
- Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y., *et al.* (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* 126, 5749-5758.
- Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D., and Nigg, E.A. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* 13, 190-202.

- Kramer-Zucker, A.G., Olale, F., Haycraft, C.J., Yoder, B.K., Schier, A.F., and Drummond, I.A. (2005). Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* 132, 1907-1921.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73, 56-65.
- Liu, C., Liu, W., Lu, M.F., Brown, N.A., and Martin, J.F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of *Pitx2c* activity. *Development* 128, 2039-2048.
- Liu, C., Liu, W., Palie, J., Lu, M.F., Brown, N.A., and Martin, J.F. (2002). *Pitx2c* patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. *Development* 129, 5081-5091.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P., and Kuehn, M.R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* 381, 158-161.
- Lu, C.C., Brennan, J., and Robertson, E.J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.
- Marques, S., Borges, A.C., Silva, A.C., Freitas, S., Cordenonsi, M., and Belo, J.A. (2004). The activity of the Nodal antagonist *Cerl-2* in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes Dev* 18, 2342-2347.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5043-5048.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- McKnight, K.D., Hou, J., and Hoodless, P.A. (2007). Dynamic expression of thyrotropin-releasing hormone in the mouse definitive endoderm. *Dev Dyn* 236, 2909-2917.
- Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2006). The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res* 66, 6463-6467.
- Mo, R., Freer, A.M., Zinyk, D.L., Crackower, M.A., Michaud, J., Heng, H.H., Chik, K.W., Shi, X.M., Tsui, L.C., Cheng, S.H., *et al.* (1997). Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124, 113-123.
- Monaghan, A.P., Kaestner, K.H., Grau, E., and Schutz, G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* 119, 567-578.
- Moore-Scott, B.A., Opoka, R., Lin, S.C., Kordich, J.J., and Wells, J.M. (2007). Identification of molecular markers that are expressed in discrete anterior-posterior domains of the endoderm from the gastrula stage to mid-gestation. *Dev Dyn* 236, 1997-2003.
- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110, 815-821.

- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96-99.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and 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.
- Norton, W.H., Mangoli, M., Lele, Z., Pogoda, H.M., Diamond, B., Mercurio, S., Russell, C., Teraoka, H., Stickney, H.L., Rauch, G.J., *et al.* (2005). Monorail/Foxa2 regulates floorplate differentiation and specification of oligodendrocytes, serotonergic raphe neurones and cranial motoneurons. *Development* 132, 645-658.
- Okada, Y., Nonaka, S., Tanaka, Y., Saijoh, Y., Hamada, H., and Hirokawa, N. (1999). Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol Cell* 4, 459-468.
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Belmonte, J.C., and Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633-644.
- Pan, J., and Snell, W.J. (2005). *Chlamydomonas* shortens its flagella by activating axonemal disassembly, stimulating IFT particle trafficking, and blocking anterograde cargo loading. *Dev Cell* 9, 431-438.
- Park, H.J., Seo, H.J., Kim, H.W., Kim, J.S., Hwang, S.Y., and Seong, Y.S. (2007). The centrosomal localization of KM-HN-1 (MGC33607) depends on the leucine zipper motif and the C-terminal coiled-coil domain. *Exp Mol Med* 39, 828-838.
- Pazour, G.J., and Witman, G.B. (2003). The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol* 15, 105-110.
- Pedersen, L.B., Veland, I.R., Schroder, J.M., and Christensen, S.T. (2008). Assembly of primary cilia. *Dev Dyn* 237, 1993-2006.
- Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Sasaki, H., Behringer, R.R., and Ang, S. (1999). HNF3beta and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo. *Development* 126, 4499-4511.
- Perea-Gomez, A., Vella, F.D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., *et al.* (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* 3, 745-756.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351-1363.
- Quarmby, L.M., and Parker, J.D. (2005). Cilia and the cell cycle? *J Cell Biol* 169, 707-710.
- Reiners, J., Nagel-Wolfrum, K., Jurgens, K., Marker, T., and Wolfrum, U. (2006). Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res* 83, 97-119.
- Rieder, C.L., Jensen, C.G., and Jensen, L.C. (1979). The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J Ultrastruct Res* 68, 173-185.
- Rompolas, P., Pedersen, L.B., Patel-King, R.S., and King, S.M. (2007). *Chlamydomonas* FAP133 is a dynein intermediate chain associated with the retrograde intraflagellar transport motor. *J Cell Sci* 120, 3653-3665.
- Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 813-825.

- Salmon, N.A., Reijo Pera, R.A., and Xu, E.Y. (2006). A gene trap knockout of the abundant sperm tail protein, outer dense fiber 2, results in preimplantation lethality. *Genesis* 44, 515-522.
- Sasaki, H., and Hogan, B.L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118, 47-59.
- Scholey, J.M. (2003). Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 423-443.
- Shih, J., and Fraser, S.E. (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* 122, 1313-1322.
- Shiratori, H., Sakuma, R., Watanabe, M., Hashiguchi, H., Mochida, K., Sakai, Y., Nishino, J., Saijoh, Y., Whitman, M., and Hamada, H. (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell* 7, 137-149.
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 15, 363-377.
- Sorokin, S.P. (1968). Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conf* 11, 213-216.
- Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., and Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* 130, 678-690.
- Spemann, H., and Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch mikr Anat und Entw mech* 100, 599-638
- Srinivas, S., Rodriguez, T., Clements, M., Smith, J.C., and Beddington, R.S. (2004). Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm. *Development* 131, 1157-1164.
- Strahle, U., Blader, P., Henrique, D., and Ingham, P.W. (1993). Axial, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos. *Genes Dev* 7, 1436-1446.
- Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S., and 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.
- Tamplin, O.J., Kinzel, D., Cox, B.J., Bell, C.E., Rossant, J., and Lickert, H. (2008). Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives. *BMC Genomics* 9, 511.
- Tanaka, Y., Okada, Y., and 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, 172-177.
- Todaro, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Toskala, E., Smiley-Jewell, S.M., Wong, V.J., King, D., and Plopper, C.G. (2005). Temporal and spatial distribution of ciliogenesis in the tracheobronchial airways of mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L454-459.
- Tsang, W.Y., Bossard, C., Khanna, H., Peranen, J., Swaroop, A., Malhotra, V., and Dynlacht, B.D. (2008). CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell* 15, 187-197.
- Tucker, R.W., Pardee, A.B., and Fujiwara, K. (1979). Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17, 527-535.
- Uetzmann, L., Burtscher, I., and Lickert, H. (2008). A mouse line expressing Foxa2-driven Cre recombinase in node, notochord, floorplate, and endoderm. *Genesis* 46, 515-522.

- Vieira, A.R., Avila, J.R., Daack-Hirsch, S., Dragan, E., Felix, T.M., Rahimov, F., Harrington, J., Schultz, R.R., Watanabe, Y., Johnson, M., *et al.* (2005). Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet* 1, e64.
- Vintersten, K., Monetti, C., Gertsenstein, M., Zhang, P., Laszlo, L., Biechele, S., and Nagy, A. (2004). Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* 40, 241-246.
- Vortkamp, A., Gessler, M., and Grzeschik, K.H. (1991). GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352, 539-540.
- Waddington, C.H., and Waterman, A.J. (1933). The Development in vitro of Young Rabbit Embryos. *J Anat* 67, 355-370.
- Weinstein, D.C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W.S., Hoodless, P., Prezioso, V.R., Jessell, T.M., and Darnell, J.E., Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-659.
- Wright, C.V., and Halpern, M.E. (2002). Specification of left-right asymmetry. *Results Probl Cell Differ* 40, 96-116.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H. (2008). Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* 15, 23-36.
- Yamanaka, Y., Tamplin, O.J., Beckers, A., Gossler, A., and Rossant, J. (2007). Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms. *Dev Cell* 13, 884-896.
- Yoder, B.K., Tousson, A., Millican, L., Wu, J.H., Bugg, C.E., Jr., Schafer, J.A., and Balkovetz, D.F. (2002). Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F541-552.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADE	anteriores definitives Entoderm
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	anterio-posterior
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AVE	anterior viszerales Entoderm
BAC	bacterial artificial chromosome
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	bone morphogenic protein
β-gal	β-Galaktosidase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DANN
CRE	causes recombination (verursacht Rekombination)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithioltheitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Zellen embryonale Stammzellen
EST	expressed sequence tag
FCS	fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
fwd	forward
g	Erdbeschleunigungskonstante
ggf	gegebenfalls
G418	Geneticin
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HEK293T	human embryonic kidney cell line
HPLC	high pressure liquid chromatography
HR	homologe Region
HRP	horse raddish peroxidase
ICM	Inner cell mass
IB	Immunblot
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
Lefty	left right determination factor
LIF	Leukemia inhibitory factor
loxP	locus of X over Pi
M	Molar
MEF	murine embryonic feeder
min	Minuten
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	Molekulargewicht
Neo	Neomycin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PS	Primitivstreifen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Puro	Puromycin Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Rev	reverse
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
Sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VE	viscerales Entoderm
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Galactosidase
z.B.	zum Beispiel

7.2 Tabellen

7.2.1 Übersicht über die analysierten Gene mittels whole-mount *in situ* Hybridisierung

Nr.	Genname	Titel	Expression E7,5	Expression E8,5
1	---	14, 17 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3222402J19 product:unclassifiable, full insert sequence	pa	pa
2	---	Transcribed locus		nt
3	0610006I08Rik	RIKEN cDNA 0610006I08 gene	wn	wn
4	1700009P17Rik	RIKEN cDNA 1700009P17 gene	nd	
5	1700027A23Rik	RIKEN cDNA 1700027A23 gene	nd	
6	1810007P19Rik	RIKEN cDNA 1810007P19 gene // similar to organic solute carrier protein 1	wn	wn
7	1810037I17Rik	RIKEN cDNA 1810037I17 gene	wn	wn
8	2310016C16Rik	RIKEN cDNA 2310016C16 gene	wn	wn
9	2700038N03Rik	RIKEN cDNA 2700038N03 gene	wn	rs

10	2810001A02Rik	RIKEN cDNA 2810001A02 gene	wn	wn
11	2810408M09Rik	RIKEN cDNA 2810408M09 gene	su	su
12	2810408M09Rik /// Ttp53rk	transformation related protein 53 regulating kinase /// RIKEN cDNA 2810408M09 gene	su	su
13	2810410L24Rik	RIKEN cDNA 2810410L24 gene	wn	en
14	2900097C17Rik	RIKEN cDNA 2900097C17 gene		rs
15	2900097C17Rik	RIKEN cDNA 2900097C17 gene		
16	3110001A13Rik	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	wn	wn
17	4632427E13Rik	RIKEN cDNA 4632427E13 gene	wn	wn
18	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene	wn	nt
19	4921506J03Rik	RIKEN cDNA 4921506J03 gene		en rs
20	4930432O21Rik	RIKEN cDNA 4930432O21 gene	wn	wn
21	6230416J20Rik	RIKEN cDNA 6230416J20 gene	wn	wn
22	6230416J20Rik	RIKEN cDNA 6230416J20 gene	wn	wn
23	6330407G11Rik	RIKEN cDNA 6330407G11 gene	su	su
24	7120426M23Rik	RIKEN cDNA 7120426M23 gene	en	ane en
25	A930016P21Rik	RIKEN cDNA A930016P21 gene	wn	wn
26	Acvr2b	activin receptor IIB	su	su
27	Agl	amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	wn	wn
28	Agpat1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)		wd
29	Agpat1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)		
30	Agtrap	angiotensin II, type I receptor-associated protein	wn	wn
31	Agtrl1	angiotensin receptor-like 1	rs	ve
32	Alkbh6	alkB, alkylation repair homolog 6 (E. coli)	na	na
33	Amph	amphiphysin	wn	tb st ot bal
34	Anxa5	annexin A5		rs
35	Apl3	adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3	su	su
36	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1	wn	wn
37	Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2	wn	wn
38	Baiap211	BAI1-associated protein 2-like 1	wn	wn
39	BC003993	cDNA sequence BC003993	wn	wn
40	BC003993	cDNA sequence BC003993		
41	BC003993	cDNA sequence BC003993	wn	wn
42	BC003993	cDNA sequence BC003993		
43	BC003993	cDNA sequence BC003993		
44	BC003993	cDNA sequence BC003993		
45	BC038156	cDNA sequence BC038156	wn	wn
46	BC057627	cDNA sequence BC057627	su	su
47	BC067047	cDNA sequence BC067047	wn	wn/9.5 nt
48	Bcl2l12	BCL2-like 12 (proline rich)	wn	wn
49	Bptf	bromodomain PHD finger transcription factor	su	su
50	Brwd1	bromodomain and WD repeat domain containing 1	wn	rs
51	Brwd2	bromodomain and WD repeat domain containing 2	wn	wn
52	C330050A14Rik	RIKEN cDNA C330050A14 gene	wn	wn
53	Calcoc1	calcium binding and coiled coil domain 1	su	su
54	Cald1	caldesmon 1	wn	wn
55	Cald1	caldesmon 1		
56	Cald1	caldesmon 1		
57	Ccdc28a	coiled-coil domain containing 28A	wn	wn
58	Cd300lf	CD300 antigen like family member F	wn	wn
59	Cd99l2	Cd99 antigen-like 2	su	su
60	Cdc14b	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)	ps	wn
61	Cep164	centrosomal protein 164	wn	wn
62	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	rs	nt
63	Cnn2	calponin 2	bal	lpm cm ane
64	Colec12	collectin sub-family member 12	wn	mb
65	Coq4	coenzyme Q4 homolog (yeast)	su	su
66	Cpn	carboxypeptidase M	en	en
67	Cpn1	carboxypeptidase N, polypeptide 1	en	en nt
68	Crnk1	Crn, crooked neck-like 1 (Drosophila)	wn	wn
69	Cthrc1	collagen triple helix repeat containing 1	nd	nc
70	D1Ert471e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 471, expressed	su	su
71	Dact1	dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)		en pa tb rh
72	Dbt	dihydroipoamide branched chain transacylase E2	su	su
73	Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	na	na
74	Dll3	delta-like 3 (Drosophila)	na	na
75	Dynlrb2	dynein light chain roadblock-type 2	nd	wn
76	Ece1	endothelin converting enzyme 1	su	su
77	Efemp2	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	wd	wd
78	Efh2	EF hand domain containing 2	ch	ift oft
79	Hmg1l1	high mobility group box 1	su	su
80	Eid1	EP300 interacting inhibitor of differentiation 1	su	su
81	Elk3	ELK3, member of ETS oncogene family	wn	wn
82	Epm2aip1	EPM2A (laforin) interacting protein 1	wn	wd
83	Epm2aip1	EPM2A (laforin) interacting protein 1		
84	Exosc9	exosome component 9	wn	wn
85	Fblim1	filamin binding LIM protein 1	wn	wn
86	Fgfbp3	fibroblast growth factor binding protein 3	pe	nt fb
87	Fjx1	four jointed box 1 (Drosophila)	wn	nt
88	Flrt2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	ade	pa
89	Foxc1	forkhead box C1	wn	wn

90	Foxc1	forkhead box C1		
91	Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2		nt
92	Gas5	growth arrest specific 5		rs
93	Gas5	growth arrest specific 5		
94	Ghitm	growth hormone inducible transmembrane protein		nt
95	Gltp	glycolipid transfer protein	wn	wn
96	Gng10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	wn	wn
97	Gpr180	G protein-coupled receptor 180	wn	wn
98	Gprc5c	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	rs	rs
99	Gpsm1	G-protein signalling modulator 1 (AGS3-like, C. elegans)	su	su
100	H13	histocompatibility 13	wn	wn
101	Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	wn	wn
102	Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1		
103	Hdgf	Hepatoma-derived growth factor	su	su
104	Heatr1	HEAT repeat containing 1	wd	wd
105	Heatr5a	HEAT repeat containing 5A	wn	wn
106	Hmgn3	high mobility group nucleosomal binding domain 3	en	su
107	Hmgn3	high mobility group nucleosomal binding domain 3		
108	Hnrpab	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	su	su
109	Hpn	hepsin	wn	wn
110	Hsd17b11	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11	na	na
111	Htra1	HtrA serine peptidase 1	wn	wn
112	Htra1	HtrA serine peptidase 1		
113	Hyou1	hypoxia up-regulated 1		9.5 tb
114	Itch	itchy, E3 ubiquitin protein ligase	wn	wn
115	Jarid1d	jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like)	wn	wn
116	Jmjd2a	jumonji domain containing 2A		ba
117	Josd2	Josephin domain containing 2	nd	ift
118	Kbtbd8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	wn	wn
119	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	wn	wn
120	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein		
121	Klk8	kallikrein related-peptidase 8	wn	wn
122	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	wn	tb
123	Sema3e	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E /// hypothetical protein LOC100044162	na	na
124	Nptx2	neuronal pentraxin 2 /// hypothetical protein LOC100044234	pp	ift nt
125	Otub1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	wn	wn
126	Tmsb4x	thymosin, beta 4, X chromosome 4	ps	ve fb mb nt
127	Sorl1	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing	wn	wn
128	Rfxdc2	regulatory factor X domain containing 2 homolog (human)	wn	wn
129	Rbm24	similar to RNA binding motif protein 24	su	su
130	Rbm24	similar to RNA binding motif protein 24		
131	Mvk	mevalonate kinase	wn	wn
132	Lrch1	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1	wn	wn
133	Lrfd4	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4	su	su
134	Lrig1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	wn	wn
135	Lrig3	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	en	pa so
136	Lrig3	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3		
137	Map3k12	mitogen activated protein kinase kinase kinase 12	wn	rs
138	Mapre1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	su	su
139	Mfap2	microfibrillar-associated protein 2	wn	st
140	Mfap2	microfibrillar-associated protein 2		
141	Mkks	McKusick-Kaufman syndrome protein		rs
142	Mlf1	myeloid leukemia factor 1	nd	
143	Mrp15	Mitochondrial ribosomal protein L15	wn	wn
144	Mrp15	mitochondrial ribosomal protein L15		
145	Mtfr1	mitochondrial fission regulator 1	rs	su
146	Mxd3	Max dimerization protein 3	wn	wn
147	Myef2	myelin basic protein expression factor 2, repressor	wn	wn
148	Napg	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein gamma	wn	wn
149	Ndel1	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)	wn	st
150	Pabpc1	poly A binding protein, cytoplasmic 1	su	su
151	Pabpc1	poly A binding protein, cytoplasmic 1	su	su
152	Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	ep	wn
153	Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1		
154	Pcdh19	protocadherin 19	wn	wn
155	Pcnp	PEST proteolytic signal containing nuclear protein		rs
156	Pcolce	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	wn	wn/ 9.5 en ba
157	Pcsk1n	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	ane	tb
158	Pdlim2	PDZ and LIM domain 2	wn	wn
159	Pdlim4	PDZ and LIM domain 4	wn	wn
160	Peli2	pellino 2	wn	wn
161	Phip	pleckstrin homology domain interacting protein	wn	wn
162	Pi4k2b	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	wn	wn
163	Pi4k2b	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta		
164	Pign	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class N	wn	wn
165	Pkig	protein kinase inhibitor, gamma	wn	wn
166	Pkig	protein kinase inhibitor, gamma		
167	Plagl2	Pleiomorphic adenoma gene-like 2	wn	ba
168	Plagl2	pleiomorphic adenoma gene-like 2		
169	Plagl2	pleiomorphic adenoma gene-like 2		
170	Pnkp	polynucleotide kinase 3'-phosphatase	wn	wn
171	Pnrc2	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	wn	wn

172	Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A		en ba
173	Ppp1r1a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	su	su
174	Prom1	prominin 1		nt
175	Prrx2	paired related homeobox 2	su	su
176	Prtg	protogenin homolog (Gallus gallus)	na	na
177	Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	wn	wn
178	Pygl	liver glycogen phosphorylase	wn	wn
179	Rabl2a	RAB, member of RAS oncogene family-like 2A	wn	wn
180	Rbm3	RNA binding motif protein 3	su	su
181	Rbms3	RNA binding motif, single stranded interacting protein	su	su
182	Rbmx	RNA binding motif protein, X chromosome	wd	wd
183	RbmX	RNA binding motif protein, X chromosome		
184	Reep3	receptor accessory protein 3	wn	wn
185	Riok3	RIO kinase 3 (yeast)	rs	rs
186	Riok3	RIO kinase 3 (yeast)		
187	Ripk3	receptor-interacting serine-threonine kinase 3	ps	ne
188	Rnf41	ring finger protein 41	wn	wn
189	Rpap1	RNA polymerase II associated protein 1	wn	wd
190	Rpl31	ribosomal protein L31	su	su
191	Rspo3	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)	PS	tb
192	Rsrc2	arginine/serine-rich coiled-coil 2	su	su
193	Sbsn	suprabasin	su	su
194	Scara3	scavenger receptor class A, member 3	wn	wn
195	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	ep	nt ift
196	Scn2b	sodium channel, voltage-gated, type II, beta	su	su
197	Sdc2	syndecan 2	wn	wn
198	Senp6	SUMO/sentrin specific peptidase 6	su	su
199	Sesn3	sestrin 3	wn	wn
200	Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	wn	wn
201	Slc10a3	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 3	wn	wn
202	Slc1a5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	su	su
203	Smad2	MAD homolog 2 (Drosophila)	en	ane en
204	Snupn	snurportin 1	su	su
205	---	sperm autoantigenic protein 17	wn	wn
206	Spint2	serine protease inhibitor, Kunitz type 2	wn	wn
207	Spint2	serine protease inhibitor, Kunitz type 2		
208	Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog	wn	wn
209	Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog	wn	wn
210	Sub1	SUB1 homolog (S. cerevisiae)	su	su
211	Tardbp	TAR DNA binding protein	wn	wn
212	Tex9	testis expressed gene 9	wn	wn
213	Tgds	TDP-glucose 4,6-dehydratase		9,5 tb
214	Thap4	THAP domain containing 4	wd	wd
215	Tmem50b	transmembrane protein 50B	su	wn
216	Tmem68	transmembrane protein 68	wn	pne tb
217	Tpbp	trophoblast glycoprotein	wn	en nt fb
218	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	wn	wn
219	Trrap	transformation/transcription domain-associated protein	wn	wn
220	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1	wn	wn
221	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1		
222	Tspan33	tetraspanin 33	wn	wn
223	Ttf1	transcription termination factor 1	wn	wn
224	Vamp3	vesicle-associated membrane protein 3	su	su
225	Wdfy1	WD repeat and FYVE domain containing 1	wn	wn
226	Wtap	Wilms' tumour 1-associating protein	wn	wn
227	Yaf2	YY1 associated factor 2	wn	wn
228	Yaf2	YY1 associated factor 2		
229	Zdhhc6	zinc finger, DHHC domain containing 6	su	su
230	Zdhhc6	zinc finger, DHHC domain containing 6		
231	Zdhhc6	zinc finger, DHHC domain containing 6		
232	Zfp207	zinc finger protein 207	wn	wn
233	Zfp386	zinc finger protein 386 (Kruppel-like)	wn	wn
234	Zfp451	zinc finger protein 451	wn	wn

wn=weak or no expression; su=strong ubiquitous; en= endoderm; nt=neural tube; fb=forebrain; tb=tail bud; pne=posterior neuroectoderm; ane=anterior neuroectoderm; wd=widespread; ep=epiblast; ift=inflow tract; oft=outflow tract; ps=primitive streak; ve=visceral endoderm; fb=forebrain; mb=midbrain; nd=node; na=not annotated; nc=notochord; lpm=lateral plate mesoderm; ba=branchial arches; so=somites, rs=restricted expression

7.2.2 Proteininteraktom von Pitchfork

Nr.	Identifizierte Proteininteraktion	Molekulargewicht	Wahrscheinlichkeit/ Anzahl der Peptide
1	14-3-3 protein epsilon; n=8; Amniota	29 kDa	99% (2)
2	Proteasome activator complex subunit 3; n=7; Eutheria	30 kDa	100% (7)
3	14-3-3 protein beta/alpha; n=4; Catarrhini	28 kDa	90% (1)
4	STIP1 homology and U box-containing protein 1; n=2; Homo sapiens	35 kDa	100% (10)
5	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2; n=1; Homo sapiens	56 kDa	100% (4)
6	14-3-3 protein zeta/delta; n=8; Theria	28 kDa	90% (1)
7	Proteasome subunit alpha type-5; n=6; Eutheria	26 kDa	100% (4)
8	14-3-3 protein gamma; n=7; Eutheria	28 kDa	90% (1)
9	Proteasome subunit alpha type-7; n=2; Homo sapiens	28 kDa	100% (2)
10	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit; n=1; Homo sapiens	111 kDa	93% (1)
11	WD repeat-containing protein 68; n=4; Amniota	39 kDa	100% (5)
12	14-3-3 protein/cytosolic phospholipase A2 protein; n=3; Eutheria	8 kDa	90% (1)
13	Splicing factor, proline- and glutamine-rich; n=3; Homo sapiens	76 kDa	99% (2)
14	Isoform Long of P25786 ; n=1; Homo sapiens	30 kDa	100% (4)
15	cDNA FLJ78433, highly similar to Homo sapiens chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon) (CCT5), mRNA; n=1; Homo sapiens	60 kDa	90% (1)
16	SAPS domain family member 3; n=1; Homo sapiens	98 kDa	90% (1)
17	Fructose-bisphosphate aldolase A; n=3; Homo sapiens	39 kDa	90% (1)
18	cDNA FLJ76863, highly similar to Homo sapiens stress-induced- phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) (STIP1), mRNA; n=1; Homo sapiens	63 kDa	99% (2)
19	T-complex protein 1 subunit gamma; n=2; Homo sapiens	61 kDa	90% (1)
20	55 kDa erythrocyte membrane protein; n=2; Homo sapiens	52 kDa	90% (1)
21	Protein phosphatase 1B; n=3; Homo sapiens	53 kDa	
22	HCLS1-associated protein X-1; n=2; Homo sapiens	32 kDa	
23	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (EC 3.6.3.8) (Calcium pump 1) (SERCA1) (SR Ca(2+)-ATPase 1) (Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic reticulum type, fast twitch skeletal muscle isoform) (Endoplasmic reticulum class 1/2 Ca(2+) ATPase); n=1; Homo sapiens	110 kDa	99% (1)
24	Protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLAD1; n=1; Homo sapiens	43 kDa	99% (1)
25	T-complex protein 1 subunit beta; n=4; Catarrhini	57 kDa	90% (1)
26	Proteasome subunit alpha type-4; n=6; Eutheria	29 kDa	
27	NEFA-interacting nuclear protein NIP30; n=1; Homo sapiens	29 kDa	99% (2)
28	CDNA FLJ27355 fis, clone TST05837; n=1; Homo sapiens	22 kDa	90% (1)
29	Sortilin precursor; n=2; Homo/Pan/Gorilla group	92 kDa	99% (2)
30	Usherin precursor; n=1; Homo sapiens	576 kDa	94% (1)
31	ATPase family AAA domain-containing protein 3A; n=2; Homo sapiens	71 kDa	100% (3)
32	FYN-binding protein; n=1; Homo sapiens	85 kDa	90% (1)
33	Putative uncharacterized protein DKFZp686P03159; n=1; Homo sapiens	40 kDa	
34	Calmodulin-like protein 5; n=1; Homo sapiens	16 kDa	
35	mRNA turnover protein 4 homolog; n=2; Homo/Pan/Gorilla group	28 kDa	90% (1)
36	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2-like 1; n=1; Homo sapiens	56 kDa	90% (1)
37	ATP-dependent DNA helicase Q5; n=1; Homo sapiens	109 kDa	90% (1)
38	Calcium-transporting ATPase type 2C member 2; n=1; Homo sapiens	105 kDa	90% (1)
39	WD repeat-containing protein 6; n=5; Homo sapiens	122 kDa	90% (1)
40	Arfaptin-1; n=1; Homo sapiens	42 kDa	90% (1)
41	Major histocompatibility complex class I-related protein MR1; n=1; Homo sapiens	39 kDa	90% (1)
42	Testis cDNA, clone: QtsA-18194, similar to human prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) (PTGER4); n=1; Macaca fascicularis	54 kDa	90% (1)
43	PRKR-interacting protein 1; n=1; Homo sapiens	22 kDa	90% (1)
44	Histidine ammonia-lyase; n=1; Homo sapiens	73 kDa	
45	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16; n=1; Homo sapiens	94 kDa	90% (1)
46	Ferritin light chain; n=1; Homo sapiens	20 kDa	90% (1)
47	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40; n=2; Homo sapiens	16 kDa	90% (1)
48	Ephrin-B2 precursor; n=2; Homo sapiens	37 kDa	90% (1)
49	Pentatricopeptide repeat-containing protein 1; n=2; Homo sapiens	79 kDa	90% (1)
50	Transcription elongation factor B polypeptide 1; n=8; Tetrapoda	12 kDa	90% (1)
51	Girdin; n=1; Homo sapiens	216 kDa	90% (1)
52	Protocadherin beta 15 precursor; n=1; Homo sapiens	86 kDa	90% (1)
53	Conserved oligomeric Golgi complex component 5; n=1; Homo sapiens	93 kDa	90% (1)
54	Probable UPF0334 kinase-like protein C1orf57; n=2; Homo sapiens	21 kDa	90% (1)
55	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog C; n=1; Homo sapiens	87 kDa	90% (1)
56	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial precursor; n=2; Homo sapiens	73 kDa	90% (1)
57	Dedicator of cytokinesis protein 7; n=1; Homo sapiens	243 kDa	90% (1)
58	RUN and FYVE domain-containing protein 2; n=1; Homo sapiens	75 kDa	90% (1)
59	Putative uncharacterized protein LQFBS-1; n=1; Homo sapiens	28 kDa	90% (1)
60	cDNA FLJ31117 fis, clone IMR322000609; n=1; Homo sapiens	16 kDa	90% (1)
61	Elongation factor 1-beta; n=3; Homo/Pan/Gorilla group	25 kDa	90% (1)
62	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3; n=1; Homo sapiens	57 kDa	90% (1)
63	Teneurin-4; n=2; Homo sapiens	308 kDa	90% (1)
64	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn; n=1; Homo sapiens	61 kDa	90% (1)
65	Isoform 3 of Q5TCS8 ; n=1; Homo sapiens	117 kDa	90% (1)
66	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial precursor; n=1; Homo sapiens	71 kDa	90% (1)
67	Uncharacterized protein ENSP0000383793; n=1; Homo sapiens	50 kDa	90% (1)
68	Uncharacterized protein MBTPS1; n=1; Homo sapiens	82 kDa	90% (1)
69	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 24; n=2; Homo sapiens	110 kDa	90% (1)
70	Putative adenosylhomocysteinase 3; n=1; Homo sapiens	67 kDa	90% (1)
71	PCLO_HUMAN Isoform 3 of Q9Y6V0 - Homo sapiens (Human); n=1; Bos taurus	565 kDa	90% (1)

72	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta precursor (EC 2.7.8.17) (GlcNAc-1-phosphotransferase subunits alpha/beta) (UDP- N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta) (Stealth protein GNPTAB); n=2; Homo sapiens	144 kDa	90% (1)
73	Tenascin-X precursor; n=1; Homo sapiens	464 kDa	98% (1)
74	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A; n=1; Homo sapiens	109 kDa	
75	Autophagy-related protein 2 homolog B; n=1; Homo sapiens	101 kDa	
76	mRNA export factor; n=3; Hominidae	41 kDa	90% (1)
77	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2 precursor (GABA(A) receptor subunit gamma-2); n=2; Hominidae	54 kDa	90% (1)
78	C-terminal-binding protein 1; n=2; Homo sapiens	48 kDa	90% (1)
79	Growth factor receptor-bound protein 10; n=2; Homo sapiens	67 kDa	90% (1)
80	RNA polymerase II subunit 5-mediating protein; n=1; Homo sapiens	57 kDa	90% (1)
81	Selenoprotein T precursor; n=1; Homo sapiens	22 kDa	90% (1)
82	Chromosome 6 open reading frame 86; n=1; Homo sapiens	10 kDa	90% (1)
83	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1; n=1; Homo sapiens	254 kDa	90% (1)
84	Putative uncharacterized protein DKFZp434M1616; n=2; Homo sapiens	136 kDa	90% (1)
85	Telomeric repeat-binding factor 1; n=1; Homo sapiens	50 kDa	90% (1)
86	Chromatin assembly factor 1 subunit A; n=1; Homo sapiens	105 kDa	90% (1)
87	Protocadherin alpha 4 precursor; n=1; Homo sapiens	102 kDa	90% (1)
88	ATP-binding cassette sub-family A member 12; n=1; Homo sapiens	293 kDa	90% (1)
89	Testis cDNA clone: QtsA-16447, similar to human chromosome 20 open reading frame 114 (C20orf114); n=1; Macaca fascicularis	21 kDa	90% (1)
90	Olfactory receptor 51A7; n=2; Homo sapiens	35 kDa	90% (1)
91	Isoform 2 of P22061 ; n=2; Homo/Pan/Gorilla group	25 kDa	90% (1)
92	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 7; n=1; Homo sapiens	10 kDa	90% (1)
93	Methionyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor; n=1; Homo sapiens	67 kDa	90% (1)
94	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase-like; n=1; Homo sapiens	97 kDa	90% (1)
95	Cyclin-D binding Myb-like protein variant; n=1; Homo sapiens	41 kDa	90% (1)
96	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-11 (Voltage-gated calcium channel subunit alpha Cav3.3) (Ca(v)3.3); n=1; Homo sapiens	245 kDa	90% (1)
97	FLJ00240 protein; n=1; Homo sapiens	42 kDa	90% (1)
98	cDNA FLJ46582 fis, clone THYMU3043327; n=1; Homo sapiens	23 kDa	90% (1)
99	Poly(A)-specific ribonuclease PARN-like domain-containing protein 1 precursor; n=1; Homo sapiens	60 kDa	90% (1)
100	Putative uncharacterized protein DKFZp564P1772; n=1; Homo sapiens	104 kDa	90% (1)
101	Serine/threonine-protein phosphatase 6; n=3; Eutheria	35 kDa	90% (1)
102	Putative uncharacterized protein DKFZp779L1068; n=1; Homo sapiens	10 kDa	90% (1)
103	Myotubularin-related protein 5; n=3; Homo sapiens	208 kDa	90% (1)
104	Pregnancy-specific glycoprotein; n=2; Homo sapiens	9 kDa	90% (1)
105	Calcium-dependent secretion activator 2; n=2; Homo sapiens	148 kDa	90% (1)
106	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase; n=2; Homo sapiens	136 kDa	90% (1)
107	Casein kinase 2, beta polypeptide; n=1; Homo sapiens	27 kDa	90% (1)
108	Tubulin-tyrosine ligase-like protein 2; n=1; Homo sapiens	67 kDa	90% (1)
109	LRRRC7 protein; n=1; Homo sapiens	92 kDa	90% (1)
110	Synaptonemal complex protein 2; n=3; Homo sapiens	176 kDa	90% (1)
111	Solute carrier family 26, member 9; n=1; Homo sapiens	87 kDa	90% (1)
112	Sulfate transporter; n=2; Homo sapiens	82 kDa	90% (1)
113	TBC1 domain family member 8; n=1; Homo sapiens	103 kDa	90% (1)
114	Uncharacterized protein ENSP00000344348; n=1; Homo sapiens	42 kDa	90% (1)
115	Homo sapiens (clone E05) gene from CpG-enriched DNA, partial cds; n=1; Homo sapiens	8 kDa	90% (1)
116	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A; n=3; Homo sapiens	262 kDa	90% (1)
117	Melanoma-associated antigen B4; n=1; Homo sapiens	39 kDa	90% (1)
118	WDR45L protein; n=1; Homo sapiens	17 kDa	90% (1)
119	Tubulin beta-3 chain; n=5; Eutheria	50 kDa	90% (1)
120	CDNA FLJ20242 fis, clone COLF6369; n=1; Homo sapiens	18 kDa	90% (1)
121	LOC401396; n=1; Homo sapiens	25 kDa	90% (1)
122	Ubiquitin specific peptidase 11; n=3; Hominidae	16 kDa	90% (1)
123	Neutral amino acid transporter A; n=1; Homo sapiens	56 kDa	90% (1)
124	Mutant NADH-cytochrome b5 reductase; n=1; Homo sapiens	6 kDa	90% (1)
125	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1 precursor; n=3; Homo sapiens	24 kDa	90% (1)
126	Uncharacterized protein C1orf96; n=2; Homo sapiens	30 kDa	90% (1)
127	Protein Jade-2; n=1; Homo sapiens	87 kDa	90% (1)
128	Zinc finger protein 566; n=3; Homo sapiens	49 kDa	90% (1)
129	Uncharacterized protein KIAA1600; n=1; Homo sapiens	87 kDa	90% (1)
130	Isoform CAE3 of P48751 ; n=1; Homo sapiens	104 kDa	90% (1)
131	Isoform 3 of Q4ZJ14 ; n=2; Homo sapiens	52 kDa	90% (1)
132	cDNA FLJ75174, highly similar to Homo sapiens calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta), mRNA; n=1; Homo sapiens	17 kDa	90% (1)
133	Novel protein similar to SNAPC2 (Small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2, 45kDa (Human)); n=1; Xenopus tropicalis	45 kDa	90% (1)
134	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase (EC 1.3.1.3) (Delta(4)-3- ketosteroid 5-beta-reductase); n=2; Homo sapiens	37 kDa	90% (1)
135	Cleavage stimulation factor 50 kDa subunit; n=3; Catarrhini	48 kDa	90% (1)
136	Dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit; n=2; Homo sapiens	33 kDa	90% (1)
137	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2; n=3; Catarrhini	31 kDa	90% (1)
138	Uncharacterized protein MAN1B1; n=1; Homo sapiens	98 kDa	90% (1)
139	Isoform 4 of Q8TAV0 ; n=1; Homo sapiens	35 kDa	90% (1)
140	Kazrin; n=2; Homo sapiens	86 kDa	90% (1)
141	Nuclear factor interleukin-3-regulated protein; n=1; Homo sapiens	51 kDa	90% (1)
142	Structural maintenance of chromosomes protein 3; n=4; Eutheria	142 kDa	90% (1)
143	P37 AUF1; n=1; Homo sapiens	31 kDa	90% (1)
144	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 6; n=2; Homo sapiens	35 kDa	90% (1)
145	PRO2259; n=1; Homo sapiens	7 kDa	90% (1)
146	Isoform 2 of Q9NYV4 ; n=1; Homo sapiens	163 kDa	90% (1)

147	Homeodomain-interacting protein kinase 4; n=1; Homo sapiens	69 kDa	90% (1)
148	Uncharacterized protein C12orf65; n=1; Homo sapiens	19 kDa	90% (1)
149	Fanconi anemia group B protein; n=1; Homo sapiens	98 kDa	90% (1)
150	CGMP-stimulated phosphodiesterase 2; n=1; Homo sapiens	6 kDa	90% (1)
151	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3; n=1; Homo sapiens	104 kDa	90% (1)
152	Prostaglandin E synthase 3; n=6; Eutheria	19 kDa	90% (1)
153	GDAP2 protein; n=2; Catarrhini	56 kDa	90% (1)
154	Signal transducer and activator of transcription 3; n=1; Homo sapiens	88 kDa	90% (1)
155	Similarity to human secreted protein sequence SEQ ID NO:154 patent WO200004140-A1; n=1; <i>Aspergillus niger</i>	50 kDa	90% (1)
156	Nephrocystin-4; n=1; Homo sapiens	158 kDa	90% (1)
157	Uncharacterized protein ENSP00000381653; n=1; Homo sapiens	10 kDa	90% (1)
158	Neurotensin receptor type 1; n=1; Homo sapiens	46 kDa	90% (1)
159	LanC-like protein 2; n=1; Homo sapiens	51 kDa	90% (1)
160	Fatty acyl-CoA reductase 1; n=1; Homo sapiens	59 kDa	90% (1)
161	Protein fantom; n=1; Homo sapiens	151 kDa	90% (1)
162	Chromosome 10 open reading frame 39; n=4; Homo sapiens	99 kDa	90% (1)
163	Calreticulin precursor; n=2; Homo sapiens	48 kDa	90% (1)
164	Homeobox protein HMX2; n=1; Homo sapiens	30 kDa	90% (1)
165	Ras-related protein Rab-34; n=1; Homo sapiens	29 kDa	90% (1)
166	Isoform 3 of Q15070 ; n=1; Homo sapiens	29 kDa	90% (1)
167	Novel protein similar to human MCF.2 cell line derived transforming sequence; n=1; <i>Danio rerio</i>	69 kDa	90% (1)
168	Leucine-rich repeat-containing protein 50; n=1; Homo sapiens	80 kDa	90% (1)
169	Hyaluronan-binding protein 2 precursor (EC 3.4.21.-) (Plasma hyaluronan-binding protein) (Hepatocyte growth factor activator-like protein) (Factor VII-activating protease) (Factor seven-activating protease) (FSAP); n=2; Homo sapiens	63 kDa	90% (1)
170	Ankyrin repeat and SOCS box protein 13; n=2; Homo sapiens	30 kDa	90% (1)
171	Zinc finger protein 64 homolog; n=1; Homo sapiens	25 kDa	90% (1)
172	Uncharacterized protein OR2W5; n=1; Homo sapiens	36 kDa	90% (1)

7.3 Abbildungsverzeichnis

Fig. 1:	Frühe Embryonalentwicklung der Maus.....	3
Fig. 2:	Gastrulation in der Maus.....	5
Fig. 3:	Transplantationsexperimente von Hans Spemann/Hilde Mangold	6
Fig. 4:	Primäre Zilien im Primitivknoten legen Links-Rechts-Achse des Embryos fest ..	9
Fig. 5:	Herzentwicklung in der Maus	11
Fig. 6:	Musterbildung der Extremitäten in der Maus	13
Fig. 7:	Aufbau des Ziliums.....	15
Fig. 8:	Aufbau eines Zentrosoms	16
Fig. 9:	Der Zentrosomenzyklus	17
Fig. 10:	Konvertierung eines Zentrosoms zum Basalkörper	19
Fig. 11:	Schematisches Modell der vier Schritte für den Aufbau eines Ziliums.....	20
Fig. 12:	Der intraflagellare Transport.....	22
Fig. 13:	Übersicht whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierungsscreen.....	30
Fig. 14:	Gene mit spezifischen Expressionsmuster.....	32
Fig. 15:	Gene mit entodermalen Expressionsmuster.....	35
Fig. 16:	Gene mit einer Expressionsdomäne im Primitivknoten.....	37
Fig. 17:	Übersicht zum Versuchsaufbau um viszeral entodermale und definitiv entodermale Marker zu unterscheiden	39
Fig. 18:	Analyse vier entodermaler Marker mittels PCR.....	39

Fig. 19:	Analyse von Pitchfork mittels Genomatix Software	40
Fig. 20:	Pifo ist unter den Chordatieren hoch konserviert	41
Fig. 21:	Die DUF1309-Domäne von Pitchfork ist zu der Domäne der ODF-Familie hoch konserviert	42
Fig. 22:	Analyse des Pitchfork Proteins und der generierten Antikörper	43
Fig. 23:	Lokalisation von GFP-Pifo während des Zellzyklus	45
Fig. 24:	Lokalisation von ΔccGFP-Pifo während des Zellzyklus	46
Fig. 25:	Verwendete Konstrukte, um eine nukleäre Funktion von Pitchfork zu analysieren	47
Fig. 26:	Pitchfork hat im Nukleus eine reprimierende Funktion.....	48
Fig. 27:	Subzelluläre Lokalisation von Pitchfork.....	49
Fig. 28:	Pitchfork akkumuliert in Vesikeln an stabilisierten Mikrotubuli	50
Fig. 29:	Generierung des Pitchfork ^{lacZ/+} Allels.....	51
Fig. 30:	Haploinsuffizienz von Pitchfork führt zur männlichen Infertilität	52
Fig. 31:	Vergleich Pifo-lacZ-Expression mit der endogenen Pifo-Protein-Lokalisation im Testis	53
Fig. 32:	Analyse des Pitchfork-lacZ-Reporterallels	54
Fig. 33:	<i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} Embryonen entwickeln postaxiale Polydaktylie	55
Fig. 34:	Markeranalyse in <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Extremitäten.....	56
Fig. 35:	Markeranalyse in <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} Extremitäten	58
Fig. 36:	Pitchfork reguliert während der Embryonalentwicklung die Links-Rechts-Asymmetrie im Herzen	60
Fig. 37:	Markeranalyse von <i>Bmp4</i> in <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Herzen	60
Fig. 38:	Die Expression von <i>Nodal</i> ist in <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Embryonen unverändert.....	61
Fig. 39:	Pitchfork mRNA Expression während der Entwicklung.....	62
Fig. 40:	Analyse der <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Zilien im Primitivknoten	63
Fig. 41:	Analyse der Links-Rechts-Musterbildung in <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Embryonen.....	64
Fig. 42:	Analyse der <i>Pitchfork</i> ^{lacZ/+} -Zilien mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	66
Fig. 43:	Überexpression von Pitchfork führt zur Apoptose	67
Fig. 44:	Überexpression von Pitchfork zerstört das Mikrotubuligerüst <i>in vitro</i>	68
Fig. 45:	Überexpression von Pitchfork führt zu multiplen Zentrosomen und wird asymmetrisch nach der Zellteilung verteilt	69

Fig. 46:	Endogene Expression von Pitchfork in mitotischen Zellen des embryonalen Lungengewebes	70
Fig. 47:	Pitchfork Expression während der Ziliogenese	72
Fig. 48:	Endogenes Pitchfork lokalisiert nur während der Konvertierung in der Ziliogenese an Zentrosomen und Basalkörpern	74
Fig. 49:	Pitchfork erscheint an der apikalen Plasmamembran als halskrausenähnliche Struktur.....	75
Fig. 50:	Pitchfork akkumuliert in Vesikeln und transportiert Shh zur Plasmamembran ..	77
Fig. 51:	Pitchfork interagiert mit Proteinen für den vesikulären und mikrotubuliabhängigen Transport.....	78
Fig. 52:	Colokalisation von Pitchfork und Kif3a im Primitivknoten der Maus	79
Fig. 53:	Pitchfork reguliert den Abbau des primären Ziliums	81
Fig. 54:	Pitchfork reguliert den Abbau des Basalkörpers vom Zilium	83
Fig. 55:	Funktion von Pitchfork während der Ziliogenese.....	90
Fig. 56:	Ein funktionelles Zilium ist für den Shh-Signalweg essentiell.....	96
Fig. 57:	Versuchsaufbau des Southern-Blots	127

8 Publikationen

Schäfer M, Kinzel D, Neuner C, Scharl M, Volf JN, Winkler C. (2005) Hedgehog and retinoid signalling confines nkx2.2b expression to the lateral floor plate of the zebrafish trunk, *Mech Dev.*;122(1):43-56.

Schäfer M, Kinzel D, Winkler C. (2007). Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish, *Dev Biol.*;301(1):117-29. Epub 2006 Sep 16.

Tamplin OJ, Kinzel D, Cox BJ, Bell CE, Rossant J, Lickert H. (2008). Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives, *BMC Genomics*. 2008 Oct 30;9:511.

Kinzel D, Burtscher I, Boldt K, Trümbach D, Wurst W, Ueffing M, Lickert H. Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry in the mouse embryo, *submitted*

9 Curriculum vitae

Name: **Doris Bengel**
Titel: Diplom-Biologin
Geburtstag: 09.01.1979
Geburtsort: Jülich
Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

1985-1998 Grundschule, integrierte Gesamtschule und Gymnasium
1998 Abitur am Armin-Knab Gymnasium Kitzingen

Hochschulbildung

1998-2000 Grundstudium Diplombiologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2000-2004 Hauptstudium Diplombiologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Hauptfach: Biochemie
Nebenfächer: Humangenetik, Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie
01/2004-12/2004 Diplomarbeit (JMU Würzburg, AG Dr. Christoph Winkler): Funktion des *nkx2.2b* Homeoboxgens für die Zelldifferenzierung im ventralen Neuralrohr im Zebrafisch
05/2005-02/2009 Doktorarbeit (Helmholtz Zentrum München, AG Dr. Heiko Lickert): Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Spemann/Mangold-Organisatorgene

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Dr. Heiko Lickert, der es mir ermöglichte in seinem Labor dieses interessante Projekt zu bearbeiten. Ganz besonders habe ich seine immense Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit geschätzt, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht entstanden wäre.
- Herrn Prof. Wolfgang Wurst, der als mein Doktorvater die Betreuung dieser Doktorarbeit übernommen und stets Interesse an meinem Projekt gezeigt hat.
- Frau Prof. Magdalena Götz, die mich während meiner Doktorarbeit immer unterstützt und ein offenes Ohr für mich hatte, besonders für ihr großes Interesse an meinem Projekt
- Herrn Prof. A. Gierl und Herrn Prof. K. H. Schneitz, dass sie sich spontan als Prüfer und Vorsitzender meiner Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben
- Karsten Boldt und Dr. Marius Ueffing für die Unterstützung bei den biochemischen Analysen und ihr Interesse an meinem Themengebiet
- Herrn Dr. Dietrich Truembach für die bioinformatische Analyse von Pitchfork
- Helga Wehnes und Luise Jennen für ihre Unterstützung am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop
- Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lickert für die gute Arbeitsatmosphäre, insbesondere Wenke Barkey für ihre Unterstützung in der Biochemie und Patrizia Giallonardo für unzählige Aggregationen
- Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht und mich jederzeit größtmöglichst unterstützt und motiviert haben. Ganz besonders herzlich danke ich meinem Mann Dominik für seine liebevolle Unterstützung, seine aufbauenden Worte und seine permanente Hilfe, die besonders wertvoll in den „schweren Zeiten“ dieser Arbeit war.