

Regulation des Transkriptionsfaktors Tcf-4 in der Gehirnentwicklung von *Xenopus laevis*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Sabrina König

aus Karlsruhe

Dekan:
Referentin:
Co-Referent:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Stefan Bräse
Prof. Dr. Doris Wedlich
Privatdozent Dr. Harald König
09.-13. Februar 2009

II

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie (Zoologie II) der Universität Karlsruhe in der Zeit von November 2005 bis November 2008 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Sabrina König, 07. Januar 2009

Abkürzungen

| | |
|----------|---|
| ANR | Anterior Neural Ridge, anteriore Neuralrippe |
| BCNE | Blastula Chordin und Noggin exprimierendes Zentrum |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| bp / kb | Basenpaar / Kilobase |
| cDNA | complementary DNA |
| ChIP | Chromatin Immunpräzipitation |
| CtBP | C-terminales Bindeprotein |
| Dsh | Dishevelled |
| En | Engrailed |
| Fgf | Fibroblast growth factor |
| Grg/TLE | Groucho related genes/Transducin Like Enhancer of split |
| HMG | High Mobility Group |
| kDa | kilo Dalton |
| Lef | Lymphoid enhancer factor |
| MO | Morpholino antisense Oligonukleotid |
| NLS | Nuclear Localization Signal |
| ORF | Open Reading Frame |
| Pax | Paired domain homeobox |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RLM-RACE | RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA ends |
| rpm | revolutions per minute |
| St. | Stadium |
| Tcf | T-cell factor |
| TSS | Transcription Start Site |
| UTR | Untranslated Region |
| Wnt | Wingless/Int-related |
| WRE | Wnt Responsive Element |
| ZLI | Zonula Limitans Intrathalamica |

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren | 1 |
| 1.2 Expression und Funktion von Tcf-4 | 5 |
| 1.2.1 Expression von Tcf-4 | 5 |
| 1.2.2 Funktion von Tcf-4 | 7 |
| 1.3 Neuralinduktion und Musterung des ZNS | 9 |
| 1.3.1 Neuralinduktion in <i>Xenopus laevis</i> | 9 |
| 1.3.2 Dorso-ventrale Musterung | 11 |
| 1.3.3 Anterio-posteriore Musterung des ZNS | 12 |
| 2. Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 3. Materialien | 19 |
| 4. Methoden | 31 |
| 4.1 Molekularbiologische Methoden | 31 |
| 4.1.1 Fällern von DNA/RNA | 31 |
| 4.1.2 Aufreinigung von DNA/RNA mit Phenol/Chloroform | 31 |
| 4.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA | 32 |
| 4.1.4 DNA-Restriktionsanalyse | 32 |
| 4.1.5 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese | 33 |
| 4.1.6 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese | 34 |
| 4.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende | 34 |
| 4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten | 35 |
| 4.1.9 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien | 35 |
| 4.1.10 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien | 36 |
| 4.1.11 Blau-Weiß-Selektion | 36 |
| 4.1.12 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab | 37 |
| 4.1.13 <i>In vitro</i> -Transkription von sense und antisense RNA | 38 |
| 4.1.14 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente | 39 |
| 4.1.14.1 Ortsspezifische Mutagenese | 40 |
| 4.1.15 Amplifikation teilweise unbekannter DNA Sequenzen | 41 |
| 4.1.16 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes | 45 |

| | |
|---|----|
| 4.1.17 DNA-Sequenzanalyse | 47 |
| 4.2 Zellbiologische und biochemische Methoden | 48 |
| 4.2.1 Kultivierung und Passagieren von humanen HEK 293-Zellen | 48 |
| 4.2.2 Transiente Transfektion von humanen Kulturzellen..... | 48 |
| 4.2.3 Transiente Transfektion von <i>Xenopus</i> tissue culture (XTC) Zellen..... | 49 |
| 4.2.4 Ernten von Gewebekultur-Zellen | 49 |
| 4.2.5 Reportergen-Analyse in Zellkultur | 50 |
| 4.2.5.1 Messung der Luziferase-Aktivität..... | 50 |
| 4.2.5.2 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität | 51 |
| 4.2.6 Reportergen-Analyse im Embryo..... | 51 |
| 4.2.7 Statistische Auswertung der Reportergen-Analyse | 52 |
| 4.2.8 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von XTC Zellen..... | 52 |
| 4.2.9 Chromatin Immunpräzipitation..... | 53 |
| 4.2.10 TNT [®] <i>in vitro</i> -Translation | 55 |
| 4.2.11 Proteinextraktion aus Embryonen..... | 56 |
| 4.2.12 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE | 56 |
| 4.3 Entwicklungsbiologische Methoden | 59 |
| 4.3.1 Haltung von <i>Xenopus laevis</i> | 59 |
| 4.3.2 Eiablage | 60 |
| 4.3.3 Testisextraktion | 60 |
| 4.3.4 <i>In-vitro</i> Fertilisation | 61 |
| 4.3.5 Entfernen der Gallerthülle..... | 61 |
| 4.3.6 Anfärben von unpigmentierten Eiern | 61 |
| 4.3.7 Mikroinjektion | 61 |
| 4.3.7.1 Mikroinjektion von EGFP-Reportergenkonstrukten..... | 63 |
| 4.3.8 Gen-Suppression durch antisense Morpholino Oligonukleotide | 63 |
| 4.3.9. Generierung transgener <i>Xenopoden</i> | 65 |
| 4.3.9.1 Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI)..... | 65 |
| 4.3.9.2 <i>I-SceI</i> Meganuklease vermittelte Integration | 68 |
| 4.3.10 Embryonenpflege und Fixierung..... | 69 |
| 4.3.11 Ganzkeimfärbung oder <i>in-situ</i> Hybridisierung..... | 70 |

| | |
|--|------------|
| 5. Ergebnisse | 72 |
| 5.1 Klonierung und Charakteristik der XTcf-4 Promotor- und Enhancer-Elemente | 72 |
| 5.1.1 Bestimmung des <i>XTcf-4</i> Transkriptionsstartpunktes | 72 |
| 5.1.2 Analyse eines <i>XTcf-4</i> -2720/+501 EGFP Reportergenkonstrukts..... | 74 |
| 5.1.3 Analyse der ersten beiden Introns des <i>XTcf-4</i> Gens | 75 |
| 5.1.4 Analyse eines <i>XTcf-4</i> -3855/+501 EGFP Reportergenkonstrukts..... | 78 |
| 5.2 Generierung transgener Xenopoden | 81 |
| 5.2.1 Integration über die Meganuklease <i>I-SceI</i> | 81 |
| 5.2.2 Generierung transgener <i>Xenopoden</i> über REMI | 84 |
| 5.3 Analyse der <i>XTcf-4</i> Enhancer Elemente zwischen -3855 und -2720 | 89 |
| 5.3.1 Regulation eines -3773/+501 Reportergens über Wnt, Shh und Fgf-8..... | 89 |
| 5.3.2 β -Catenin bindet an die Lef/Tcf Bindestelle auf dem <i>XTcf-4</i> Promotor | 90 |
| 5.3.3 Putative Bindemotive potentieller <i>XTcf-4</i> Regulatoren zwischen -3855 und -2720 | 92 |
| 5.3.4 Funktionalitätstest der putativen XPax-5 und XEn-2 Bindestellen | 94 |
| 5.3.5 Die <i>XEn-2</i> Promotoraktivität ist abhängig von <i>XTcf-4</i> | 98 |
| 5.3.6 Regulatorische Elemente des <i>XTcf-4</i> Promotors..... | 99 |
| 5.4 Gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren <i>XTcf-4</i>, <i>XEn-2</i>, <i>XPax-2</i> und <i>XPax-5</i> im Gehirn von <i>Xenopus laevis</i> | 100 |
| 5.4.1 Regulation der <i>XTcf-4</i> Expression durch <i>XEn-2</i> , <i>XPax-2</i> und <i>XPax-5</i> | 100 |
| 5.4.2 Charakterisierung der antisense Morpholino Oligonukleotide zum spezifischen knockdown von <i>XEn-2</i> , <i>XPax-2</i> und <i>XPax-5</i> | 101 |
| 5.4.3 Die <i>XTcf-4</i> Expression im Mittelhirn ist abhängig von <i>XEn-2</i> und <i>XPax-2/5</i> | 103 |
| 5.4.4 <i>XEn-2</i> und <i>XPax-2/5</i> regulieren sich gegenseitig am Isthmus | 105 |
| 5.4.5 Hierarchische Regulation der <i>XTcf-4</i> , <i>XEn-2</i> und <i>XPax-2/5</i> Transkriptionsfaktoren in der Gehirnmusterung | 106 |

| | |
|--|------------|
| 6. Diskussion | 110 |
| 6.1 XTcf-4 ist ein direktes Zielgen der Wnt/β-Catenin Signalkaskade | 110 |
| 6.2 Die Restriktion der XTcf-4 Expression im Mittelhirn wird durch regulatorische Elemente 5' von -2720 vermittelt | 113 |
| 6.3 Hierarchische Regulation der Transkriptionsfaktoren XTcf-4, XEn-2 und XPax-2/5 im sich entwickelnden Mittelhirn | 116 |
| 6.3.1 XEn-2 und XPax-2/5 regulieren sich gegenseitig am Isthmus | 116 |
| 6.3.2 XEn-2 und XTcf-4 regulieren sich gegenseitig | 118 |
| 6.3.3 Regulation der XTcf-4 Expression durch XPax-2/5 | 120 |
| 7. Zusammenfassung | 123 |
| 8. Literaturverzeichnis | 124 |
| 9. Anhang | 133 |
| Danksagung | 133 |
| Publikationen | 134 |
| Lebenslauf | 135 |

1. Einleitung

1.1 Die Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren der Lymphoid enhancer factor/T-cell factor (Lef/Tcf) Familie stellen die wesentlichen Kernmediatoren des aktiven Wnt/ β -Catenin Signalwegs. Dieser kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg ist aufgrund seiner herausragenden Bedeutung während der embryonalen Musterung und in der Krebsentstehung besonders intensiv untersucht worden [zusammengefasst in Logan und Nusse, 2004]. Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt über die Bindung von sezernierten Wnt Glykoproteinen an die extrazelluläre cysteinreiche Domäne eines Frizzled-Rezeptors, der sieben Transmembrandomänen und einen intrazellulären C-Terminus aufweist und mit dem Co-Rezeptor LRP (Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein) einen Komplex bildet. Durch die Ligandenbindung aktiviert der Rezeptor das cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dsh), welches wiederum die Glykogen Synthase Kinase 3β (GSK 3β) inhibiert. Die GSK 3β bildet mit dem Tumorsuppressor-Protein Adenomatous Polyposis Coli (APC), dem Gerüstprotein Axin und weiteren Komponenten den „Destruktionskomplex“, der in Abwesenheit von Wnt-Signalen β -Catenin für die Degradation im Proteasom markiert. In Anwesenheit von Wnts kann die durch Dsh inhibierte Serin/Threonin-Kinase GSK 3β ihr Substrat, das Onkoprotein β -Catenin nicht mehr an charakteristischen Serinresten im N-terminalen Bereich phosphorylieren, wodurch es im Cytoplasma akkumuliert und in den Zellkern transloziert. Dort interagiert es mit den High Mobility Group (HMG)-Box Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie. Dieser heterodimere Komplex aus β -Catenin und den Lef/Tcfs bindet über die HMG-Box sequenzspezifisch an die DNA und aktiviert über die Transaktivierungsdomäne im β -Catenin die Expression der Wnt-Zielgene [Brannon et al., 1997].

Dies ist eine sehr vereinfachte Darstellung einer überaus komplexen und eingehend erforschten Signalkaskade, zu der sich ausführliche Informationen auf der Wnt-Homepage (www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html) finden. Im Folgenden wird ein besonderes Augenmerk auf die Kernmediatoren der Lef/Tcf Familie gelegt.

Die Familie der Lef/Tcfs ist evolutionär hoch konserviert und besteht aus wenigen Mitgliedern. So konnte in *Drosophila*, *C. elegans* und *Hydra* lediglich ein Tcf-Ortholog

identifiziert werden. In *Drosophila* ist es das dTcf oder pangolin [Brunner et al., 1997], in *C. elegans* POP-1 [Lin et al., 1995] und in *Hydra* hyTcf [Hobmayer et al., 2000]. Vertebraten besitzen hingegen mit Lef-1 [Travis et al., 1991], Tcf-1 [van de Wetering et al., 1991], Tcf-3 und Tcf-4 [Korinek et al., 1998a] vier Familienmitglieder (Abb. 1.1). Die HUGO (Human Genome Organisation) Bezeichnung lautet in der gleichen Reihenfolge LEF1, TCF7, TCF7L1 und TCF7L2. Der Zebrafisch *Danio rerio* ist momentan der einzige bekannte Modellorganismus, der fünf Lef/Tcfs (zLef-1, zTcf-1, zTcf-3, zTcf-3b und zTcf-4) exprimiert [Veien et al., 2005].

Lef/Tcfs binden über ihre N-terminale β -Catenin-Bindestelle, welche die ersten 50 Aminosäuren umfasst, an die Armadillo-Motive 3-10 von β -Catenin. Zwischen den Orthologen weist diese Domäne eine Homologie in der Aminosäuresequenz von ca. 60 % auf. Durch die Transkription von alternativen Promotoren entstehen dominant-negative Isoformen des humanen Tcf-1 und Lef-1, denen die β -Catenin Binde-domäne fehlt [van de Wetering et al., 1996, Hovanes et al., 2001].

Die geringsten Homologien bestehen im Bereich zwischen der β -Catenin-Bindestelle und der DNA-bindenden HMG-Box, der so genannten kontextabhängigen regulatorischen Domäne (Context-dependent Regulatory Domain, CRD), an die Repressoren aus der Familie der Groucho-Proteine binden können. Die Bindung von *Drosophila* Groucho, den Mensch-Homologen TLE 1-4 (Transducin Like Enhancer of split) und den Maus-Homologen Grg (Groucho related genes) an die Lef/Tcfs lösen eine repressive Chromatin-Kondensation aus [Chen et al., 1999; Levanon et al., 1998]. Bei der Wnt-vermittelten Transkriptionsaktivierung verdrängt β -Catenin die an Lef-1 gebundenen Groucho/TLE Repressoren durch die Bindung an eine zweite C-terminale Bindestelle in Lef-1, welche mit der Groucho/TLE-Bindestelle überlappt [Daniels und Weis, 2005]. Die Vertebraten Lef/Tcfs besitzen innerhalb der CRD ein außer in Tcf-3 alternativ gespleißtes Exon, welches vermutlich zu den Tcf subtyp-spezifischen Eigenschaften beiträgt. Interessanterweise wird dieses Exon in Tcf-3 und der Tcf-4A Isoform von zwei kurzen Aminosäure-Motiven (LVPQ und SxxSS) flankiert, welche diesen Isoformen einen transkriptionell repressiven Charakter verleihen [Gradl et al., 2002, Liu et al., 2005].

Mit Ausnahme von Lef-1 mit einer kontext-abhängigen Aktivierungsdomäne (Context-dependent trans-Activation Domain, CAD) besitzen die Lef/Tcfs keine intrinsische Transaktivierungsdomäne. Diese CAD ermöglicht Lef-1 eine von β -Catenin unabhängige Transkriptionsaktivierung mit dem ubiquitär exprimierten Kernprotein ALY

(Ally of AML-1 and Lef-1) als Co-Aktivator [Bruhn et al., 1997; van de Wetering et al., 1996].

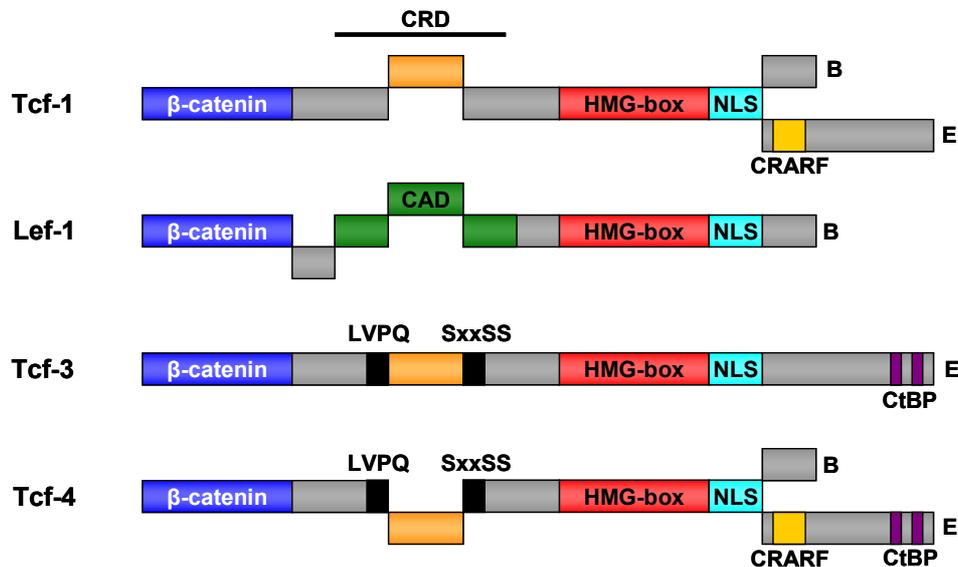


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der Vertebraten Lef/Tcf Proteine. Gezeigt sind ihre Binde-domänen und Isoformen. Die zu ca. 60 % konservierte N-terminale β -Catenin Bindedomäne (blau) und die zu annähernd 100 % konservierte DNA bindende HMG-Box (rot) werden durch einen Bereich geringerer Homologie, der so genannten kontextabhängigen regulatorischen Domäne (CRD, Context-dependent Regulatory Domain), voneinander getrennt. An diese Region können Co-Repressoren aus der groucho Familie binden. Des Weiteren befindet sich hier ein außer in Tcf-3 alternativ gespleißtes Exon (orange), welches in Tcf-3 und Tcf-4 von kurzen Aminosäure Motiven (LVPQ und SxxSS) flankiert wird. Lef-1 besitzt als einziger Vertreter eine kontext-abhängige Transaktivierungsdomäne (CAD, Context-dependent trans-Activation Domain, grün). Durch alternatives Spleißen entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher C-Termini. In der E-Isoform von Tcf-1 und Tcf-4 befindet sich eine konservierte CRARF Domäne (gelb), die in allen orthologen Lef/Tcfs mit Ausnahme der Vertebraten Lef-1 und Tcf-3 vorhanden ist. Des Weiteren befinden sich im C-Terminus von Tcf-3 und in der E-Isoform von Tcf-4 zwei CtBP Bindemotive (magenta). NLS = Nuclear Localization Signal (türkis), Kernlokalisierungssignal. [Verändert nach Arce et al., 2006].

Durch alternatives Spleißen entsteht aus allen Vertebraten Lef/Tcfs außer Tcf-3 eine große Anzahl C-terminaler Isoformen. Tcf-3 und die E-Variante des Tcf-4 besitzen in ihrem C-Terminus eine Bindestelle für den Co-Repressor CtBP (C-terminal Binding Protein). Nach Bindung des CtBP fungiert z.B. XTcf-3 als starker Repressor seiner Zielgene [Brannon et al., 1999]. Die CRARF Domäne (benannt nach ihren ersten fünf konservierten Aminosäuren) ist ein Motiv aus 30 Aminosäuren in der alternativ gespleißten E-Isoform des C-Terminus, das in Tcf-1 und Tcf-4 hoch konserviert ist. Diese aufgrund ihrer fünf hochkonservierten Cysteine auch als Cystein-Klammer bezeichnete Domäne vermittelt selbst eine schwache, für ein GC-Motiv sequenz-spezifische DNA Bindung und stabilisiert darüber hinaus die DNA Bindung der HMG-Box [Atcha et al., 2007].

Die Lef/Tcfs binden über die hochkonservierte (95-98 % Sequenzhomologie) 88 Aminosäuren umfassende HMG-Box sequenzspezifisch an 8-12 Basenpaare in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix [Hurlstone und Clevers, 2002]. Diese Konsensus-Sequenz ist hoch konserviert und beinhaltet die Basenabfolge CTTTGW (W=A/T) [van de Wetering und Clevers, 1992]. Durch ihre Bindung induzieren die architektonischen Lef/Tcfs erhebliche Krümmungen der DNA-Doppelhelix um 90-130°, wodurch die Bildung großer Nukleoprotein-Komplexe erleichtert und die Transkription unabhängig von β -Catenin (Abb. 1.2 A) unterstützt wird [Giese et al., 1995].

In fast allen untersuchten Zielgen-Promotoren wirken Lef/Tcfs in Abwesenheit von β -Catenin unter Mithilfe verschiedener Co-Faktoren, wie beispielsweise Groucho als Repressoren (Abb. 1.2 B) und werden erst durch die Bildung eines Heterodimers mit β -Catenin zu starken Transkriptionsaktivatoren (Abb. 1.2 C). Interessanterweise wurden im Gegensatz dazu mit den *Drosophila* Genen *stripe* [Piepenburg et al., 2000] und *Decapentaplegic (Dpp)* [Theisen et al., 2007], sowie dem murinen *CDH1* (E-cadherin) [Jamora et al., 2003] und *osteocalcin* [Kahler et al., 2003] einige wenige Zielgene identifiziert, die in Abhängigkeit von dTcf/Tcf und Armadillo/ β -Catenin direkt reprimiert werden (Abb. 1.2 D).

In einer neueren Studie wurde in *Drosophila* durch einen DNA Microarray Wingless-Zielgene (Wg = *Drosophila* Wnt) identifiziert, die durch Wg Signale stark reprimiert werden [Blauwkamp et al., 2008]. Es wurde gezeigt, dass dTcf/pangolin im Komplex mit Co-Aktivatoren das Zielgen *Ugt36Bc* unabhängig von Wg Signalen aktiviert. Eine Stimulation durch Wg führte in diesem Fall zur Arm (Armadillo = *Drosophila* β -Catenin) vermittelten transkriptionellen Repression. Überraschenderweise war in diesem Fall das dTcf nicht an die klassische Konsensus Sequenz gebunden, sondern an eine alternative Tcf Bindestelle, die das Motiv AGAWAW (W=A/T) umfasst (Abb. 1.2 E). Durch eine Mutation dieses alternativen Motivs konnte die Repression vollständig aufgehoben werden. Darüber hinaus führte die Umwandlung in die klassische WRE Sequenz CTTTGWWS (W=A/T, S=C/G) dazu, dass das zuvor repressiv wirkende DNA Motiv nun aktivierende Enhancer Eigenschaften aufwies. Somit scheint die Entscheidung darüber, ob der dTcf/Arm Komplex als Aktivator oder Repressor des *Ugt36BC* Zielgens fungiert, vom DNA Kontext abzuhängen.

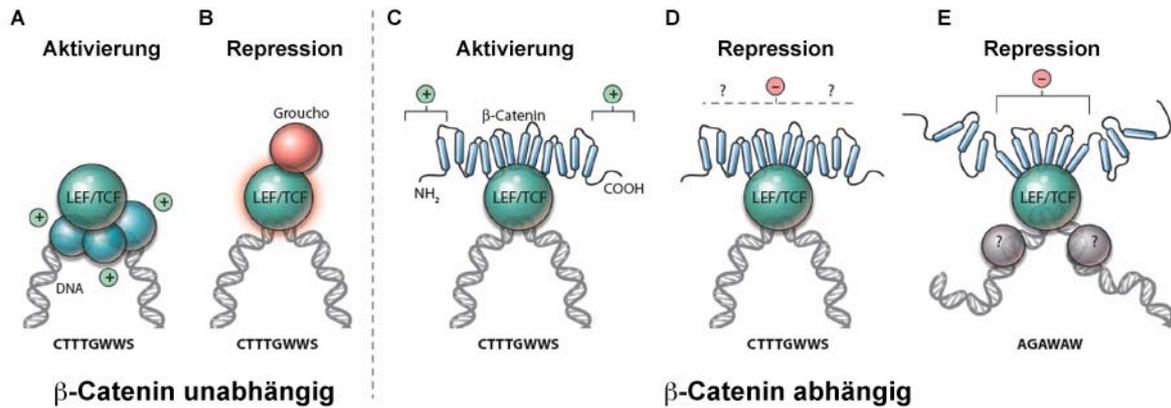


Abb. 1.2 Unterschiedliche Mechanismen der Lef/Tcf regulierten Transkription. Das Binden der Lef/Tcfs an ihre Konsensus Sequenz resultiert in einer starken Krümmung der DNA Helix, wodurch die Bildung von großen Nukleoprotein-Komplexen erleichtert wird. Diese führen unabhängig von β-Catenin zu einer transkriptionellen Aktivierung (A). In Abwesenheit von Wnt-Signalen rekrutieren die Lef/Tcfs Co-Repressoren (z.B. Groucho), um somit die Zielgene stillzulegen (B). Nach Wnt Stimulation aktiviert der Tcf/β-Catenin Komplex die Transkription, wobei zwei Aktivierungsdomänen („+“) innerhalb des N- und C-Terminus von β-Catenin eine tragende Rolle spielen (C). Es gibt einige wenige Beispiele der direkten transkriptionellen Repression durch Tcf/β-Catenin Komplexe, für die aber keine reprimierenden Domänen („-“) innerhalb des β-Catenin identifiziert werden konnten (D). Bindet Tcf an die weniger spezifische AGAWAW (W = A/T) Sequenz, so erfolgt nach Wnt Stimulation eine β-Catenin abhängige Repression, welche nicht durch den N- und C-Terminus des β-Catenin vermittelt wird (E). [Verändert nach Hoverter und Waterman, 2008].

1.2 Expression und Funktion von Tcf-4

1.2.1 Expression von Tcf-4

Xenopus, Zebrafisch und Maus weisen ähnliche Tcf-4 Expressionsmuster auf. Gemeinsam ist den Spezies die Expression im dorsalen Thalamus, wobei sich nur in *Xenopus* Tcf-4 Transkripte an der *Zona limitans intrathalamica* detektieren lassen. Ebenso ist *Xenopus* der einzige Vertreter, bei dem sich im Laufe der Entwicklung die Tcf-4 Expression über das gesamte Mittelhirn erstreckt [Kunz et al., 2004]. Im Gegensatz zu *Xenopus* offenbaren Zebrafisch- [Young et al., 2002] und Maus-Embryonen [Cho und Dressler, 1998] eine vorübergehende Tcf-4 Expression im Hinterhirn. In den späteren Entwicklungsstadien weisen alle drei Spezies eine Expression im Gastrointestinal-Trakt auf.

In *Xenopus* entstehen vermutlich durch die Nutzung verschiedener Spleiß-Donor und Akzeptorstellen die drei Isoformen XTcf-4A, XTcf-4B und XTcf-4C, die sich sowohl in ihrer Funktion, als auch in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression unterscheiden [Gradl et al., 2002]. Maternal sind bereits die Transkripte der XTcf-4A und XTcf-4B Isoformen gleichmäßig in der Oozyte lokalisiert [Houston et al., 2002, Standley et al.,

2006]. Als erste zygotische Isoform wird XTcf-4C ab dem Neurulastadium exprimiert, gefolgt von XTcf-4A in der späten Neurula. Ab dem Entwicklungsstadium 21 [nach Nieuwkoop und Faber, 1967] lassen sich schließlich alle drei Isoformen nachweisen. Die *XTcf-4* Expression erstreckt sich von der dorsalen Spitze zu den oberen Seitenbereichen des anterioren Mittelhirns und erscheint daher als zwei punktförmige Stellen im Gehirn. Während der frühen Embryogenese beschränkt sich die *XTcf-4* Expression auf das anteriore Mittelhirn und die Vorderhirn-/Mittelhirngrenze mit dem Prätectum als posteriorer Begrenzung [König et al., 2000]. Ab dem Kaulquappen-Stadium lassen sich *XTcf-4* Transkripte schließlich im gesamten Mittelhirn, sowie im Gastrointestinal-Trakt, der Leber und dem Pankreas detektieren [König, Dissertation 2003].

In *Danio rerio* wird *zTcf-4* in den frühen Somiten-Stadien zunächst in der anterioren Neuralplatte und später im Stadium 24 hpf (hours post fertilization, Stunden Postfertilisation) im dorsalen Diencephalon und rostralem Mesencephalon exprimiert. Ab Stadium 48 hpf ist die *zTcf-4* mRNA im dorsalen Thalamus, dem Prätectum, dem optischen Tectum und im *Torus semicircularis* des Mittelhirns lokalisiert. Darüber hinaus lassen sich Transkripte in den Rhombomeren 4 und 5 im Hinterhirn nachweisen. Drei Tage alte Embryonen exprimieren *zTcf-4* schließlich im sich entwickelnden Darm [Young et al., 2002].

In der Maus wird *Tcf-4* im Neuralplatten-/Präsomitenstadium noch vor der Bildung der Kopffalten im anterioren Entoderm exprimiert [Galceran et al., 1999]. In späteren Stadien markiert *mTcf-4* das Diencephalon, sowie die Grenze zwischen Di- und Mesencephalon [Cho und Dressler, 1998]. Mit fortschreitender Entwicklung verschiebt sich die *mTcf-4* Expression zum Dach des Mesencephalons (Tectum), sowie zum dorsalen Thalamus [Korinek et al., 1998b]. Zusätzlich zur Expression im zentralen Nervensystem wird *mTcf-4* ab dem Somitenstadium 13-20 im sich entwickelnden Dickdarm [Galceran et al. 1999] und später auch im Darmepithel exprimiert [Korinek et al., 1998b].

Tcf-4 wird im Menschen vor allem im Dick- und Dünndarm, sowie in Tumorzellen, die aus diesen Geweben hervorgehen, exprimiert [Barker et al., 1999]. Des Weiteren wurde in allen untersuchten humanen Krebsgeweben aus Ovarien, Prostata, Darm, Lunge, Magen, Ösophagus und Kopf Tcf-4 Transkripte nachgewiesen [Barker et al., 2000].

Über die Regulation der *Tcf-4* Expression ist bisher wenig bekannt. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass sie von Wnt-Signalen abhängig ist, da die Depletion von *XWnt-2b* eine starke Repression der *XTcf-4* Expression im Mittelhirn zur Folge hat. Diese lässt sich durch Co-Injektion von *XWnt-2b* oder *XWnt-8* wiederherstellen [Kunz et al., 2004]. Des Weiteren besitzt der *XTcf-4* Promotor eine funktionale Lef/Tcf Bindestelle, über die *XTcf-4* seine Expression in einer autoregulatorischen Schleife steuert. Neben der *XTcf-4C* Isoform konnte auch *XLef-1* als Aktivator der *XTcf-4* Expression identifiziert werden [Koenig et al., 2008].

Darüber hinaus wird die Transkription des humanen *Tcf-4* durch p53 reprimiert [Rother et al., 2004]. Allerdings ist der Mechanismus noch unklar, da sich auf dem humanen *Tcf-4* Promotor keine p53 Bindestelle befindet. Möglicherweise erfolgt die Regulation durch p53 indirekt über den cdk (cyclin dependent kinase) Inhibitor p21, ein Mechanismus der für andere p53 Zielgene beschrieben wurde [Löhr et al., 2003]. Die auf das anteriore Mittelhirn beschränkte *Tcf-4* Expression hebt sich deutlich von den großflächigeren Expressionsdomänen der anderen Familienmitglieder der Lef/Tcfs ab, was auf eine besonders restriktive transkriptionelle Regulation der *Tcf-4* Expression hindeutet.

1.2.2 Funktion von Tcf-4

Maus Embryonen mit einer *Tcf-4* Nullmutation zeigen im Stadium E16.5 eine starke Reduktion in der Anzahl der Zotten im Dünndarm, sowie den Verlust der entero-endokrinen Epithelzellen in den Intervillus Regionen, aus denen später die Krypten hervorgehen. Darüber hinaus ist im Intervillus-Bereich keine Proliferation mehr nachweisbar und die Zellen ähneln in ihrem zelltypspezifischen Charakter den Villi-Zellen [Korinek et al., 1998b]. Auf Grund dieser abnormen Dünndarm-Entwicklung sterben *Tcf-4* defiziente Mäuse kurz nach der Geburt.

Des Weiteren weisen *Tcf-4^{-/-}*-Embryonen im Stadium E14.5 eine Wucherung des anterioren Hypophysen-Lappens auf, wodurch es zu einer ventralen Ausdehnung der Hypophyse kommt [Brinkmeier et al., 2003]. Als Markergen für diese Expansion dient die *six6* (*sine oculis homeobox homolog 6*) Expression, die ektopisch nach rostral und ventral ausgeweitet ist [Brinkmeier et al., 2007].

In *Xenopus laevis* übernimmt *Tcf-4* sowohl für die Entstehung von Gehirn-Strukturen, als auch für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation im dorsalen Mittelhirn eine

wesentliche Rolle [Kunz et al., 2004]. Durch den Einsatz von Morpholino antisense Oligonukleotiden ist es möglich, gezielt die Translation jeder beliebigen mRNA zu blockieren [zusammengefasst in Heasman, 2002]. Je nach maternalem Pool kann dadurch das entsprechende Protein während der frühen Embryonalentwicklung im *Xenopus*-Embryo in verschiedenen Regionen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten depletiert werden. Der knockdown von maternalem XTcf-4 führt in der Gastrula zu einer Reduktion der Wnt-Zielgene *chordin* und *Xnr3*, sowie zu einer verlangsamten Expression von *siamois*, wodurch die Embryonen im Schwanzknospen-Stadium einen ventralisierten Phänotyp aufweisen [Standley et al., 2006].

Hingegen ist zygotisches XTcf-4 für die Zellproliferation im Mittelhirn unerlässlich, wo seine Morpholino-vermittelte Depletion in einer reduzierten Zellproliferation im Mesencephalon und dem Verlust von dorsalem neuronalem Gewebe resultiert. Dabei nehmen die XTcf-4 Isoformen distinkte Funktionen wahr. So sind die Isthmus-spezifischen Markergene *en-2* (*engrailed-2*) und *fgf-8* (*fibroblast growth factor-8*) von der aktivierenden XTcf-4C Isoform abhängig, während XTcf-4A als Repressor der kanonischen Wnt-Signalkaskade für die Aufrechterhaltung des dorsalen Mittelhirns und die Expression der Mittelhirn-spezifischen Markergene *pax-6* (paired homeobox-6) und *wnt-2b* benötigt wird [Kunz et al., 2004].

Das humane *Tcf-4* Gen umfasst 17 Exons, von denen fünf alternativ gespleißt werden, wodurch über 400 potentielle Genprodukte vorhergesagt werden. Des Weiteren besitzt es einen putativen Transkriptionsstartpunkt innerhalb des zweiten Introns, von wo aus ein Protein ohne die N-terminale β -Catenin Bindedomäne transkribiert werden könnte [Duval et al., 2000].

In Brusttumorzellen (MCF-7) wird Tcf-4 als einziger Lef/Tcf Vertreter im Vergleich zu gesunden Brustzellen signifikant reprimiert. Eine Tcf-4 Depletion durch siRNA in Brustgewebe aktiviert die Expression des Wnt-Zielgens CD24 in Abhängigkeit von Wnt responsiven Elementen (WRE) [Shulewitz et al., 2006]. Somit scheint Tcf-4 in der Brust als Repressor des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zu fungieren. Interessanterweise konnten in Mammakarzinom-Zellen (MCF-7) Transkripte detektiert werden, die sowohl für das vollständige Tcf-4 Protein, als auch für ein dominant negatives Protein kodieren. Da jedoch beide Transkripte in Tumorzellen nahezu vollständig unterdrückt wurden, erfolgt die Tcf-4 Repression unabhängig vom Vorhandensein der β -Catenin Bindedomäne.

1.3 Neuralinduktion und Musterung des ZNS

Die Neuralentwicklung lässt sich in verschiedene aufeinander folgende und teilweise überlappende Teilschritte gliedern. Bereits während der Gastrulation werden Positionsinformationen in antero-posteriorer Richtung erstellt. Im Verlauf der Neurulation, die eine dorso-ventrale Musterung festlegt, geht aus dem Neuroektoderm das Neuralrohr hervor, welches selbst die Strukturen des Zentralen Nervensystems (ZNS) bildet. Daran schließt sich die antero-posteriore Musterbildung des ZNS mit der Gliederung in Vorderhirn (Prosencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon) und Hinterhirn (Rhombencephalon) an. Als letzter Schritt erfolgt die Verfeinerung der A-P Musterung durch sekundäre Organisationszentren.

1.3.1 Neuralinduktion in *Xenopus laevis*

In *Xenopus laevis* entsteht die früheste dorso-ventrale Asymmetrie durch die vom Spermien Eintritt induzierte kortikale Rotation. Dadurch werden Determinanten wie Dishevelled auf die dem Spermien-Eintrittspunkt gegenüberliegende, nun als dorsal determinierte Seite transportiert [Miller et al., 1999], was die Stabilisation und die Translokation von β -Catenin in den Nukleus in den dorsalen Zellen der Blastula zur Folge hat [Schneider et al., 1996]. In Abhängigkeit der β -Catenin Translokation beginnt mit einsetzender zygotischer Transkription während der Mid-Blastula Transition (MBT) die Bildung zweier Organisationszentren, das Blastula Chordin und Noggin exprimierende Zentrum (BCNE) und das Nieuwkoop Zentrum [DeRobertis und Kuroda, 2004]. Das BCNE im animalen Bereich der Blastula ist maßgeblich an der Ausbildung von anteriorem Neuralgewebe beteiligt und differenziert sich im Laufe der Embryonalentwicklung zu Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn, sowie zur Bodenplatte und dem Neuralrohr. Das Nieuwkoop Zentrum im vegetalen Teil der Blastula entsendet hingegen Signale, die im dorsalen Mesoderm den Spemann Organisator induzieren. Dieser wird mit dem Einsetzen der Gastrulationsbewegungen, welche zur Bildung der drei Keimblätter und der antero-posterioren Körperachse führen, als dorsale Blastoporus-Lippe morphologisch erkennbar.

Bereits 1924 konnten Hans Spemann und Hilde Mangold durch ihre bahnbrechenden Transplantations-Experimente beweisen, dass die dorsale Blastoporus-Lippe in der

Lage ist eine vollständige zweite Körperachse zu induzieren [Spemann und Mangold, 1924]. Dabei transplantierten sie die dorsale Blastoporus-Lippe einer frühen Molch-Gastrula in das ventrale Mesoderm einer Wirts-Gastrula desselben Stadiums. Die Zellen des Transplantates veränderten die Differenzierung des ventralen Mesoderms, welches anstelle von epidermalemem Gewebe, nun ein vollständiges zweites Nervensystem bildete.

Somit wird bereits während der Gastrulation die Differenzierung des dorsalen Ektoderms zu Neuroektoderm durch Signale aus dem einwandernden Mesoderm induziert [Lumsden und Krumlauf, 1996]. Auf molekularer Ebene wird die Kompetenz sich zu Neuroektoderm zu entwickeln durch β -Catenin Signale verliehen, welche sowohl BMP (Bone Morphogenic Proteins) inhibieren, als auch die Expression von *chordin*, *nodal-related-3* und *noggin* im Ektoderm aktivieren. Darüber hinaus ist dieser Bereich vermutlich Fgf Signalen ausgesetzt, welche ebenfalls BMP inhibieren. Ohne eine Fgf Expression ist das Ektoderm nicht in der Lage, eine Neuralplatte zu formen [Schohl und Fagotto, 2002, Delaune et al., 2005].

Die ersten eingewanderten Zellen bilden das anteriore Entoderm am anterioren Ende des Embryos, während das sich daran anschließende Prächorda-Mesentoderm in der späten Gastrula unterhalb der anterioren Neuralplatte zum liegen kommt. Derweil formen die zuletzt eingewanderten Zellen des Organisators das bis zum posterioren Ende des Embryos reichende Chorda-Mesoderm.

Nieuwkoop postulierte das Zwei-Stufen-Modell zur Erklärung der Organisator-Fähigkeit, das Nervensystem sowohl zu induzieren als auch zu mustern [Nieuwkoop et al., 1952, Nieuwkoop und Nigtevecht, 1954]. Danach wird im „Aktivierungsschritt“ durch das früh eingewanderte Endomesoderm anteriores Schicksal (Vorderhirn) spezifiziert, während im nachfolgenden „Transformationsschritt“ Signale aus dem später einwandernden Mesoderm (Fgf, Wnt und Retinolsäure) caudales Schicksal (Mittelhirn, Hinterhirn und Rückenmark) induzieren. Claudio Stern erweiterte dieses Modell um einen stabilisierenden Zwischenschritt, da der „Aktivierungsschritt“ zu einem zunächst noch instabilen Prä-Vorderhirn-Zustand führt, welcher zur Konsolidierung des Neuralschicksals spätere Stabilisierungssignale erfordert [Stern et al., 2006].

1.3.2 Dorso-ventrale Musterung

Bereits im Stadium der offenen Neuralplatte vollzieht sich die anfängliche Musterung im dorsalen Ektoderm entlang der medio-lateralen Achse. Die dorso-ventrale Musterbildung wird von zwei entgegengesetzten Gradienten determiniert.

Die ventrale Hälfte des zukünftigen Neuralrohrs wird zunächst durch Sonic hedgehog (Shh) und BMP Antagonisten (Chordin, Noggin und Follistatin) aus dem Notochord spezifiziert [Wessley und de Robertis, 2002]. Nach Schließen des Neuralrohrs trägt Retinolsäure aus den Somiten zur weiteren Spezifizierung bei [Gilbert, 2006]. In Amnioten induzieren die Shh Signale aus dem Notochord ein zweites Shh produzierendes Zentrum in der Bodenplatte des Neuralrohrs [zusammengefasst in Dessaud et al., 2008]. Die Differenzierung der ventralen Neurone zu Inter- und Motoneuronen im Rückenmark wird durch den Gradienten der sezernierten Shh-Glykoproteine bestimmt.

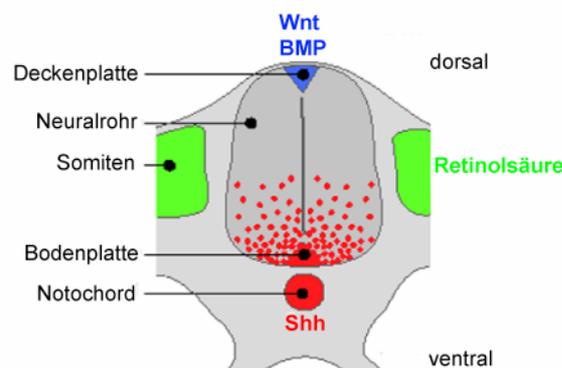


Abb. 1.3 Dorso-ventrale Spezifikation des Vertebraten Neuralrohrs. Das Morphogen Shh (Sonic hedgehog) wird aus dem Notochord und der darüber liegenden Bodenplatte sezerniert, wodurch ein Shh-Gradient innerhalb des ventralen Neuralrohrs gebildet wird (rote Punkte). Dorsal werden Wnt und BMP Signale in der Deckenplatte exprimiert, während die lateral flankierenden Somiten Retinolsäure produzieren [verändert nach Dessaud et al., 2008].

Der dorsale Bereich wird durch sezernierte BMP, Wnt und Fgf Signale aus dem benachbarten Ektoderm und später aus der Deckenplatte des Neuralrohrs spezifiziert, die zur Proliferation und Differenzierung der dorsalen neuronalen Zellen führen [Lee und Jessell, 1999]. Die Mitglieder der Wnt-Familie spezifizieren hauptsächlich die Neuralleistenzellen, wobei sie sowohl an der Determination des Zellschicksals, als auch an der Expansion dorsaler Progenitorzellen durch Proliferation involviert sind [Chang und Hemmati-Brivanlou, 1998].

1.3.3 Anterio-posteriore Musterung des ZNS

Die frühe Neuralplatte wird in *Xenopus* zusätzlich von einem Wnt/ β -Catenin-Signalgradienten transformiert [Kiecker und Niehrs, 2001]. Der endogene Wnt-Gradient resultiert aus der Expression posteriorisierender Wnts wie Wnt-3a und Wnt-8 im Chordamesoderm und lateroventralen Mesoderm einerseits und der Expression von Wnt-Antagonisten im anterioren Neuroektoderm und Mesentoderm andererseits.

An den Seitenrändern der Neuralplatte entstehen die ektodermalen Plakoden, sowie die Neuralleistenzellen. Im Verlauf der Neurulation faltet sich die Neuralplatte entlang ihrer antero-posterioren Achse zu einem Rohr zusammen. Während aus dem anterioren Ende des Neuralrohrs die drei primären Vesikel hervorgehen, die die Anlagen für Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Hinterhirn) darstellen, bildet der posteriore Teil das Rückenmark [Lumsden und Krumlauf, 1996].

Aus den drei frühen Blasen werden durch Unterteilung des Pros- und Rhombencephalon die fünf sekundären Vesikel Telencephalon (Endhirn, cerebrale Hemisphäre, Neocortex), Diencephalon (Zwischenhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Metencephalon (Hinterhirn, Cerebellum) und Myelencephalon (Nachhirn, Medulla oblongata). Diese morphologischen Einschnürungen der Neuralachse werden von der Expression von Transkriptionsfaktoren begleitet, wobei die jeweilige Konzentration und die verschiedenen Kombinationen das Schicksal dieser Regionen bestimmen. Aus jeder Region entspringt eine große Vielzahl neuronaler Zellen, die sich aufgrund ihrer Morphologie, axonaler Lenkung, synaptischen Spezifikationen, Neurotransmitter, usw. unterscheiden.

Die antero-posteriore Musterung innerhalb der einzelnen Hirnareale wird durch vier im sich entwickelnden Gehirn liegende sekundäre Signalzentren weiter verfeinert. Von anterior nach posterior sind dies die anteriore Neuralrippe (ANR), die *Zonula Limitans Intrathalamica* (ZLI), die Mittelhirn-/Hinterhirngrenze, auch Isthmus genannt und Rhombomer 4. Die ANR ist eine morphologisch definierte Struktur an der Verbindung der anterioren Neuralplatte mit dem nicht-neuralen Ektoderm. Molekular wird sie durch die Expression von Fgf-8 charakterisiert, welches zur Induktion und Aufrechterhaltung der Bf-1 (Brain factor-1) Expression in der anterioren Neuralplatte nötig ist [Shimamura und Rubenstein, 1997].

Das Vorderhirn untergliedert sich in sechs transversale Prosomere, wobei die Prosomere P1 und P2 das die Augen versorgende posteriore Diencephalon bilden und die Prosomere P3 bis P6 das der Nase zugeordnete anteriore Telencephalon [Rubenstein und Puelles, 1994]. Die ZLI ist ein Shh sezernierender Bereich zwischen Prosomer P2 und P3, der die Grenze zwischen Diencephalon und Telencephalon bildet.

Transplantationsexperimente zwischen Hühnchen und Wachteln führten zur Identifizierung des Isthmus-Organisators an der Mesencephalon/Metencephalon Grenze. Transplantiertes Gewebe aus dem Bereich des Isthmus induziert an ektopischen Stellen im Gehirn mesencephale/metencephale Differenzierung und Expressionsmuster. Dabei offenbart das induzierte Gewebe das gleiche antero-posteriore Muster wie es im intakten Gehirn beobachtet wird [zusammengefasst in Nakamura und Watanabe, 2005].

Auf molekularer Ebene werden die Grenzen zwischen den drei primären Gehirnvesikeln durch die aufeinander folgenden Expressionsmuster der paired Homöobox Transkriptionsfaktoren Pax-2/5 und Pax-6 festgelegt. Während *Pax-6* ein Markergen für das Vorderhirn darstellt, werden daran angrenzend *Pax-2* und *Pax-5* im Mesencephalon/Metencephalon exprimiert [Rowitch und McMahon, 1995]. *Pax-2* ist das früheste Gen, das in der zukünftigen Mittelhirn/Hinterhirn Region während dem späten Gastrulastadium in der Maus exprimiert wird und spielt eine herausragende Rolle in der Etablierung des Isthmus Organisators. Während sich im Stadium E7.5 die Pax-2 Expression noch über das gesamte zukünftige Mittel- und Hinterhirn ausdehnt, wird seine Expression während der Somitenentstehung auf einen schmalen Ring an der Mesencephalon/Metencephalon Grenze beschränkt. In dieser Domäne wird im 3-4 Somiten-, bzw. 6-7 Somiten-Stadium die Expression der nahe verwandten *Pax-5* und *Pax-8* Gene induziert [Rowitch und McMahon, 1995]. Pax-2 reguliert hierbei direkt die Expression von Pax-5 durch die transkriptionelle Aktivierung eines *Pax-5* Enhancer Elements [Pfeffer et al., 2000]. Diese aufeinander folgende Expression der *Pax-2/5/8* Gene, die in Vertebraten alle von einem Ursprungsgen abstammen [Bassham et al., 2008], ist ebenfalls in *Xenopus* zu beobachten. So wird *XPax-2* ab dem späten Gastrula-Stadium (St. 13) in dem zukünftigen Isthmusgewebe exprimiert, gefolgt von der *XPax-5* Expression ab dem Neurula-Stadium St. 16 [Heller und Brändli, 1999].

Morphologisch resultiert der Pax-2/5 Doppel-knockout in der Maus im vollständigen Verlust des Mittelhirns, auf molekularer Ebene zeichnet er sich durch eine erweiterte Pax-6 Expression aus [Schwarz et al., 1999].

Die überlappenden Expressionsfelder von Otx-2, Pax-2 und En-1 definieren das Mesencephalon. Die zusätzliche Expression von Pax-3 und Pax-7 führt zur Differenzierung zum Tectum [Matsunaga et al., 2001].

Die Position des Isthmus Organisators wird durch die frühen Expressionsdomänen des anterioren Otx-2 (orthodenticle homologe 2) und dem posterioren Gbx-2 (gastrulation brain homeobox 2) markiert.

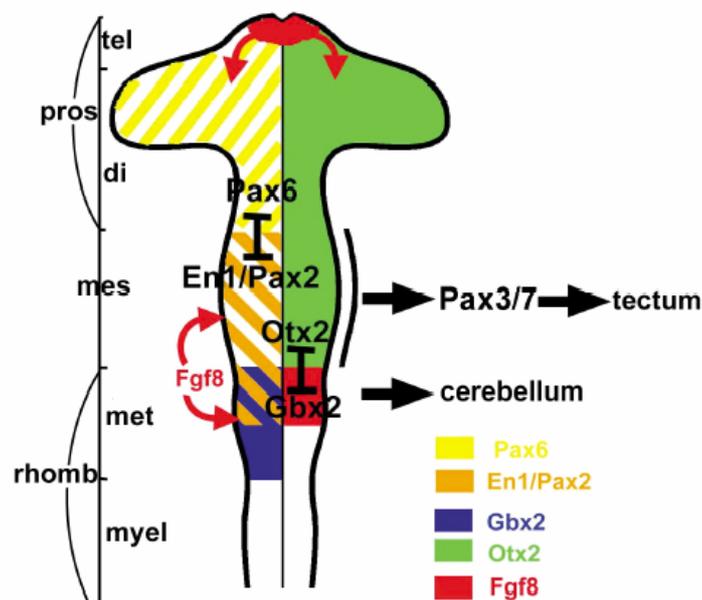


Abb. 1.4 Schemazeichnung der Gehirn-Vesikel im Hühnchen. Aus den drei primären Vesikeln Prosencephalon (pros), Mesencephalon (mes) und Rhombencephalon (rhomb) gehen die fünf sekundären Vesikel Telencephalon (tel), Diencephalon (di), Mesencephalon (mes), Metencephalon (met) und Myelencephalon (myel) hervor. Das Schicksal dieser Regionen wird durch die Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren bestimmt. Die anteriore Spitze des Prosencephalons und die Mes-/Metencephalon Grenze (Isthmus) übernehmen Organisator Funktionen. Dabei wird die Grenze zwischen Diencephalon und Mesencephalon durch die reprimierenden Interaktionen zwischen Pax6 und En1/Pax2 gebildet. Überlappende Expressionsfelder von Otx2, Pax2 und En1 definieren das Mesencephalon. Die zusätzliche Expression von Pax3 und Pax7 führt zur Differenzierung zum Tectum. Der Isthmus Organisator wird durch reprimierende Wechselwirkungen zwischen Otx2 und Gbx2 determiniert, wobei ein starkes Fgf8 Signal im Mesencephalon die Gbx2 Expression induziert und die Otx2 Expression reprimiert. [Aus Nakamura und Watanabe, 2005].

Die frühesten Mittelhirn Marker sind die *En* (*Engrailed*) Gene. En-1 und En-2 werden in Gradienten im Mesencephalon exprimiert, die von caudal nach rostral abnehmen, während das Diencephalon expressionsfrei ist [Patel et al., 1990]. Experimente am Hühnchen zeigten, dass durch die Transplantation des Diencephalons in die Nähe des Isthmus' eine En-2 Expression im Diencephalon induziert wird [Bally-Cuif und Wassef, 1994]. Darüber hinaus regulieren die Signale aus dem Isthmus die En-1

Expression. Während *En-1*^{-/-} Mäuse den vollständigen Verlust des Tectums (dorsales Mittelhirn) und des Cerebellums (anteriores Hinterhirn) aufweisen, führt der *En-2* knockout lediglich zum Fehlen cerebraler Strukturen [Wurst et al., 1994]. Allerdings kann der *En-1*^{-/-} Phänotyp durch die Insertion der *En-2* cDNA in den *En-1* Locus aufgehoben werden [Hanks et al., 1995]. Somit sind die beiden Proteine biochemisch redundant und die ungleichen knockout Phänotypen lassen sich daher auf eine unterschiedliche zeitliche und räumliche Expression zurückführen.

In *Xenopus* wird *En-2* ab St. 14, einem frühen Neurula-Stadium, in dem über dem anterioren Mesoderm gelegenen Neuroektoderm exprimiert [Hemmati-Brivanlou et al., 1991]. Die *En-2* Expression besteht anfangs in zwei durch die Neuralfurche unterbrochenen Streifen an der anterioren Neuralplatte, welche durch das Schließen des Neuralrohrs im St. 22 zueinander benachbart zu liegen kommen. In späteren Stadien beschränkt sich die *En-2* Expression weitgehend auf die Mittelhirn-/Hinterhirngrenze [Landesman und Sokol, 1997]. Die *XEn-1* Expression setzt im späten Neurula-Stadium St. 17 ein und zeigt eine Co-Lokalisation mit *XEn-2* als zwei dünne Streifen an der anterioren Neuralplatte. Jedoch ist die *XEn-1* Expression deutlich geringer als die *XEn-2* Expression. Im St. 22 wird *XEn-1* ringförmig an der zukünftigen Mittelhirn-/Hinterhirn Grenze exprimiert. Im Gegensatz zu *XEn-2* schliesst die *XEn-1* Expression die Bodenplatte des Neuralrohrs mit ein. Von der späten Neurula an bis zum Schwanzknospenstadium erfolgt eine transiente *XEn-1* Expression in ventro-lateralen Zellen der Wirbelsäule und des Hinterhirns [Eizema et al., 1994].

Die graduelle *En-2* Expression im Mittelhirn wird durch die am Isthmus sezernierten Proteine *Wnt-1* und *Fgf-8* kontrolliert. *Fgf-8* besitzt sowohl das Mittelhirn induzierende, als auch polarisierende Eigenschaften und ist darüber hinaus in der Lage, die Expression von *En-1* und *Wnt-1* zu induzieren [Martinez et al., 1999]. *Fgf-8* ist der bedeutendste Vermittler der Organisator-Aktivität, der teilweise die Eigenschaften des Isthmus-Organisators nachahmt, aber keinen ektopischen Organisator induziert. *Fgf-8* ausschließlich posterior und *Wnt-1* ausschließlich anterior des Isthmus exprimiert, kontrollieren vermutlich die Aufrechterhaltung oder Aktivität des Organisators [Wurst und Bally-Cuif, 2001].

Neben *En-1/2* sind auch *Pax-2* und *Pax-5* Zielgene von *Fgf-8*. Diese Moleküle bilden eine positive Rückkopplungsschleife ihrer Expressionen [Araki und Nakamura, 1999, Okafuji et al., 1999]. Die ektopische Expression jedes dieser Moleküle im

Diencephalon resultiert in einer Induktion des Tectums, das normalerweise aus dem dorsalen Mesencephalon hervor geht [Crossley et al., 1996, Funahashi et al., 1999]. Darüber hinaus führt eine ektopische Expression von Shh, das normalerweise nur im Diencephalon exprimiert wird, im Mesencephalon zu einer dorsalen Expansion des Tegmentums und einer Verkleinerung des Tectums. Auf molekularer Ebene ist die Expression der tectalen Gene *En-1/2*, *Pax-2/5* und *Fgf-8* reprimiert [Watanabe und Nakamura, 2000]. Folglich ventralisiert Shh das Mesencephalon.

Für den Isthmus Organisator sind bisher zwei negative Rückkopplungsmechanismen beschrieben, die die Aktivität auf das Mesencephalon einschränken könnten. Während Fgf-8 die Expression seines eigenen Inhibitors Sprouty im Mittel- und Hinterhirn fördert [Minowada et al., 1999], wird der transkriptionelle Co-Repressor Grg-4 (Groucho) über das Mesencephalon/Metencephalon exprimiert. Einerseits reprimiert Grg-4 die En Expression und ist ein Antagonist der Pax-5 Aktivität, andererseits induziert Grg-4 die Pax-6 Expression und fördert somit die diencephale Entwicklung [Sugiyama et al., 2000].

Unabhängig vom Isthmus Organisator ist das Metencephalon durch ein niedriges Retinolsäure-Niveau gekennzeichnet, während das Myelencephalon, dessen Entwicklung von Retinolsäure abhängig ist, ein hohes Retinolsäure-Niveau aufweist. Neben ihrer generell posteriorisierenden Wirkung ist Retinolsäure vor allem für die antero-posteriore Musterung des Hinterhirns, sowie der anterioren Bereiche des Rückenmarks entscheidend [Maden, 2002].

Aus dem Hinterhirn entstehen nach dem Schließen des Neuralrohrs acht aufeinander folgende Einschnürungen, die Rhombomere [Lumsden und Krumlauf, 1996]. Dabei wird jedes Rhombomer durch eine spezifische Kombination an *Hox*-Genen molekular charakterisiert [Itasaki et al., 1996]. Bei *Xenopus* wird *Krox-20* (*krüppel box-20*) von frühen Neurula-Stadien an in Bereichen exprimiert, die später den Rhombomeren 3 und 5 entsprechen. Die Expression besteht bis zu späten Kaulquappen-Stadien fort [Bradley et al., 1993].

In *Xenopus* kommt es im Mesencephalon zu einer Anhäufung vieler Mitglieder der Wnt-Familie, wie XWnt-1, XWnt-2b, XWnt-3A und XWnt-8b [Cui et al., 1995, König et al., 2000]. Tatsächlich zeichnet sich dieser Bereich durch im Zellkern lokalisiertes β -Catenin aus [Schohl und Fagotto, 2002]. Während diese Region der aktiven kanonischen Wnt-Signalkaskade im anterioren Mesencephalon mit der XTcf-4

Expression überlappt [König et al., 2000], finden sich im posterioren Mesencephalon und am Isthmus Überschneidungen mit der Expression von XLeF-1 [Molenaar et al., 1998]. Hingegen wird XTcf-3 überwiegend im Vorderhirn exprimiert, also in einem Bereich, der wenig Wnt-Liganden produziert. XTcf-1 zeigt eine diffuse Expression über das gesamte ZNS [Roël et al., 2003]. Die Abb. 1.5 zeigt die Expressionsfelder von Tcf-3, Tcf-4 und Lef-1 in *X. laevis* Embryonen im Schwanzknospenstadium und gibt schematisch die Überlappungsbereiche der Lef/Tcfs mit den Wnt Signal-molekülen wieder.

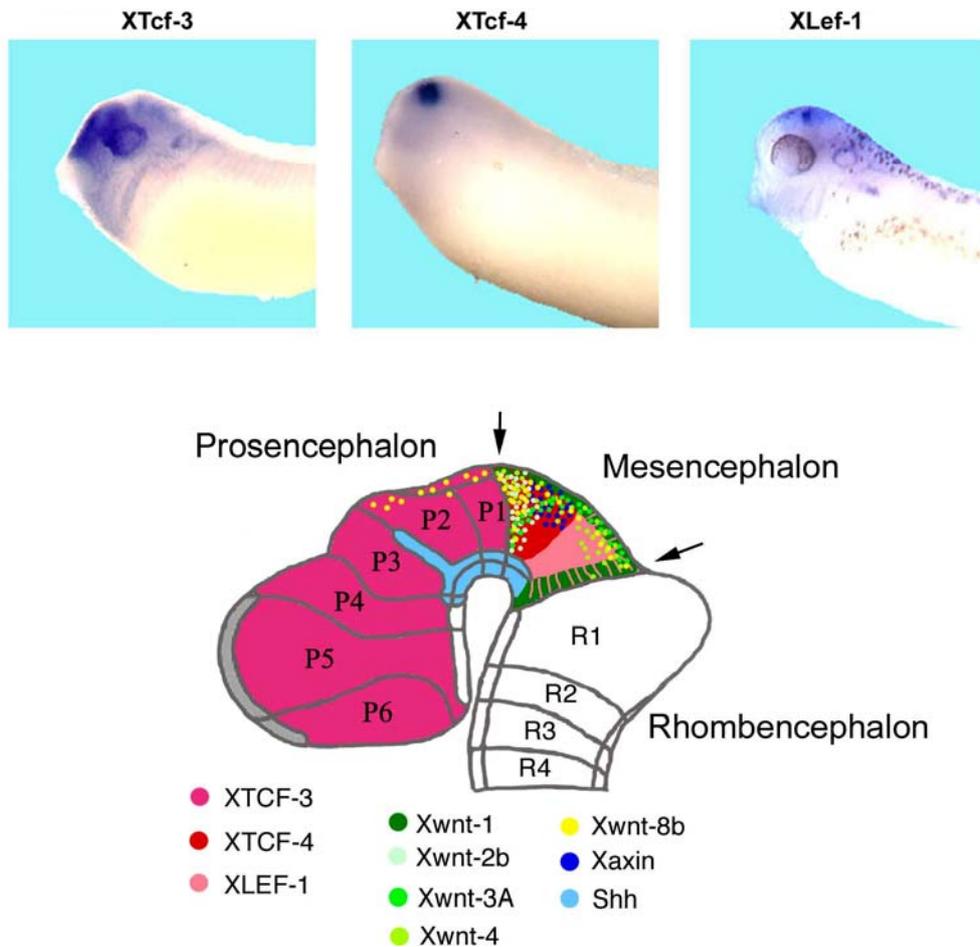


Abb. 1.5 Expressionsfelder einiger Mitglieder der Lef/Tcf und Wnt-Familie. Der Nachweis der Lef/Tcf Transkripte in *Xenopus laevis* offenbart eine stark begrenzte XTcf-4 Expression auf das anteriore Mittelhirn, während die Expressionsdomänen von XTcf-3 und XLeF-1 weiter ausgedehnt sind [*In-situ* Hybridisierungen von D. Gradl]. Die Schemazeichnung zeigt ein embryonales Maus Gehirn. Die Pfeile markieren die Grenzen zwischen Diencephalon und Mesencephalon bzw. Mesencephalon und Metencephalon. Im Mesencephalon sind XTcf-4, Xwnt-1, Xwnt-2b, Xwnt-3A, Xwnt-8b und Xaxin colokalisiert [verändert nach Wurst und Bally-Cuif, 2001].

2. Zielsetzung der Arbeit

XTcf-4 offenbart als einziges Mitglied der Lef/Tcf Familie eine räumlich stark begrenzte Expression als einzelner Streifen im anterioren Mittelhirn, was auf eine auffällig restriktive Regulation dieses Gens hindeutet.

Daher ist das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, Enhancer Elemente des *XTcf-4* Gens, insbesondere solche mit repressivem Charakter, zu identifizieren und charakterisieren, um so zum Verständnis der Regulationsmechanismen der *XTcf-4* Expression auf molekularer Ebene beizutragen. Hierzu soll der *XTcf-4* Promotor isoliert und durch die Expression von Reportergenen, sowohl im Embryo als auch in Zellkultur analysiert werden. Da die Expression von *XTcf-4* von kanonischen Wnt-Signalen abhängt [Kunz et al., 2004], soll der zugrunde liegende Mechanismus dieser autoregulatorischen Schleife durch Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) auf molekularer Ebene untersucht werden.

Durch Mikroinjektionsstudien und der Analyse transgener *Xenopoden* soll geklärt werden, welche regulatorischen Sequenzbereiche des *XTcf-4* Gens die Aktivität eines EGFP Reportergens auf das Mittelhirn eingrenzen. Putative Enhancer-Elemente auf dieser „Lokalisations“-Sequenz sollen durch eine molekulare Analyse auf ihre funktionelle Relevanz hin getestet werden.

Darüber hinaus soll die Funktion der auf Promotorebene charakterisierten *XTcf-4* Regulatorproteine in *Xenopus laevis* mittels Funktionsgewinn und –verlust Studien eingehender untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll nicht nur der Effekt auf die endogene *XTcf-4* Expression analysiert werden, sondern auch der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich *XTcf-4* und seine Regulatoren gegenseitig im Mittelhirn kontrollieren.

3. Materialien

Antikörper

- anti-c-Myc 9E10 (aus Maus) (Zellkulturüberstand)
- anti-Digoxygenin-AP (aus Schaf) (Roche Diagnostics, Mannheim)
- anti-Fibronektin 6D9 (aus Maus) [Danker et al., 1993]
- anti-Maus-Cy3 (aus Ziege) (Dianova, Hamburg)
- anti-Ratte-Peroxidase (aus Ziege) (Dianova, Hamburg)
- anti- β -Catenin 7D12 (aus Ratte) (R. Rupp, München)

Bakterien

- *E.coli* Stamm JM109 (Promega, Mannheim)
Genotyp: *endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17* ($r_k-m_k^+$) *relA1 supE44* $\Delta(lac-proAB)$
[F' *traD36 proAB lacI^qZ* Δ M15]

Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über folgende Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KgaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

- Agarose (Biozyme, Rockland, USA)
- Select Agar (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BM Purple AP Substrat (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- Complete, EDTA-frei Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Desoxyribonukleotide (Promega GmbH, Mannheim)
- Dextran, Oregon Green[®] 488 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- 2-log DNA Marker (New England Biolabs, Frankfurt)
- DTT (Dithiothreitol) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cambrex, Belgien)
- Fetal Calf Serum (FCS) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Luziferin (GE Healthcare, München)
- Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Pferdeserum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Phenol/Chloroform-Lösung (Tris gesättigt, pH 8,2) (Promega, Mannheim)
- Protein G Sepharose™ (GE Healthcare, München)
- Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Trypsin EDTA (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Tween 20 (Serva, Heidelberg)

Enzyme

- Alkalische Phosphatase (AP) (Promega, Mannheim)
- DNase I (Ambion Ltd, Warrington, UK)
- Go-Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim)
- *I-SceI* Meganuklease (New England Biolabs, Frankfurt)
- Phusion™ DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot)
- Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim)
- Turbo-*Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Kits

- ECL+Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, München)
- FirstChoice® RLM-RACE (Ambion Ltd, Warrington, UK)

- mMESSAGE mMACHINE™ High Yield
Capped RNA Transcription Kit (Ambion Ltd, Warrington, UK)
- Nucleo Spin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH, Düren)
- pGEM®-T Easy Vector System (Promega GmbH, Mannheim)
- Probe Quant™ G50 Micro Columns (GE Healthcare, München)
- Pure Yield™ Plasmid Midiprep (Promega GmbH, Mannheim)
- QuickChange™ Site directed
Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- Universal GenomeWalker™ Kit (BD Biosciences Clontech, USA)
- Wizard® Plus SV Gel and PCR
Cleanup System (Promega GmbH, Mannheim)
- Wizard® Plus SV Minipreps DNA
Purification System (Promega GmbH, Mannheim)

Morpholinos

Alle Morpholino antisense Oligonukleotide wurden von der Firma Gene Tools (LLC, Philomath, Oregon, USA) ohne weitere Modifikationen bezogen.

- XEn-2 Morpholino 5'- CATTCTCTTC CATGCTGTTC CCC -3'
- XLef-1 Morpholino1 5'- TACGGAGTCG AGAGACCTCG TCCC -3'
- XLef-1 Morpholino2 5'- CAAGACCTCG GTACGGAGTC GAGAG -3'
- XPax-2 Morpholino 5'- TGCAGTGCAT ATCCATGGGG AGGCA -3'
- XPax-5 Morpholino 5'- GGTCGTGCTT ACAGTGTATT TCCAT -3'
- XTcf-3 Morpholino 5'- CGCTGTTGAG CTGAGGCATG ATGAG -3'
- XTcf-4 Morpholino 5'- CGCCATTCAA CTGCGGCATC TCTGC -3'

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über www.biomers.net (Ulm) bezogen.

Amplifikation der XPax-2a cDNA

- XPax-2a *EcoRI*_forw 5'- AACGAATTCA ATGGAAATAC ACTGTAAGCA CGACCC -3'
- XPax-2a *XhoI*_back 5'- AACCTCGAGT CAGTGCGCAT CATAGGCGGC GGCTGT -3'

Amplifikation unbekannter *XTcf-4* Sequenzen (GenomeWalker™)

- Adapter Primer 1 5'- GTAATACGAC TCACTATAGG GC -3'
- Adapter Primer 2 5'- ACTATAGGGC ACGCGTGGT- 3'
- *XTcf-4* -2698back 5'- CAACAGAGCA AGAGGCTGAC AATC -3'
- *XTcf-4* -2754back 5'- CATACTAGGA GAAACCCAAT CCACTTGG -3'

Amplifikat zur EGFP Sondensynthese

- EGFP*NcoI*_back 5'- TTACCATGGG CTTGTACAGC TCGTCCATGC -3'
- SP6 5'- CAAGCTTGATTTAGGTGAC -3'

Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

- 5'RACE AP außen 5'- GCTGATGGCG ATGAATGAAC ACTG -3'
- 5'RACE AP innen 5'- CGCGGATCCG AACACTGCGT TTGCTGGCTT TGATG -3'
- *XTcf-4* +501back 5'- ACAGATCTTC TCGTCTTGTT CCCCCTC -3'
- *XTcf-4* +316back 5'- CCTCCGCCC CGGCCGCTCG TGCAGATGT -3'

Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) Analyse

- Lef/Tcf (-1485forw) 5'- TAATGAACCT GTGCGGGGTC ACTG -3'
- Lef/Tcf (-1136back) 5'- GGAGGGAGA GGCAATGGGA GAG -3'
- Tcf-4 ORF (+655forw) 5'- GAGTCCGAGA CCCCCACAG -3'
- Tcf-4 ORF (+829back) 5'- CGGGGATCAT GATGAAGGGG TAACC -3'

Sequenzspezifische Mutagenese

- En-2 Motiv back 5'- GCAATGGAGA AATGTGCGAT ATCTGGATGC ACCGTATCC -3'
- En-2 Motiv forw 5'- GGATACGGTG CATCCAGATA TCGCACATTT CTCCATTGC -3'
- *NotI* Motiv back 5'- GATCTAGAGT CTCGAGCGCT TTA CTTGTAC -3'
- *NotI* Motiv forw 5'- GTACAAGTAA AGCGCTCGAG ACTCTAGATC -3'
- Pax-5 Motiv back 5'- CCGAATAGGA TCCTGTGCGAT ATCTAATCCC TAGTATTA -3'
- Pax-5 Motiv forw 5'- TAATACTAGG GATTAGATAT CGACAGGATC CTATTCGG -3'

XTcf-4 genspezifische Amplifikation

- -3855*XhoI*_forw: 5'- AACCTCGAGA CATGACCATC ACCAGCTAAT TG -3'
- -2720*XhoI*_forw: 5'- AACCTCGAGA TTGTCAGCCT CTTGCTCTGT TG -3'
- -1775*XhoI*_forw. 5'- AACCTCGAGG GAAGTGCCCA AGCTGGCTTC AG -3'
- +500*BamHI*_back 5'- TAGGGATCCC AGATCTTCTC GTCTTGTTC C -3'
- +822*BamHI*_back 5'- CGGATCCATG ATGAAGGGGT AACCC -3'

Klonierungsvektoren

- pCS2 [Rupp et al., 1994]
- pEGFP+N1 (BD Biosciences Clontech, USA)
- pGEM[®]-T (Promega GmbH, Mannheim)
- pGL3 basic (Promega GmbH, Mannheim)

Vektoren mit Reporteragen/*XTcf-4*-Promotorfusionen

- -680/+95 *XTcf-4* pEGFP+N1 (R. Lattanzio, Karlsruhe)
- -680/+96 *XTcf-4* pGL3 basic (R. Lattanzio, Karlsruhe)

Vektoren zur Generierung transgener *Xenopoden*

- pBS-*I-SceI* (J. Wittbrodt, Heidelberg)
- pCMV-GFP-*I-SceI* (T. Pieler, Göttingen)
- pBin.V2 (K. Vleminckx, Ghent, Belgien)

Plasmide zur *in-situ* Sondensynthese

- | | Linearisierung | Transkription | |
|--------------------------------|----------------|---------------|---|
| • XTcf-4 in pBSK | <i>SacI</i> | T7 | (A. König, Ulm) |
| • XEn-2 in pBSK | <i>NotI</i> | T3 | (A. Hemmati-Brivanlou, Berkeley, Kalifornien, USA) |
| • XPax-2 in pBSK | <i>EcoRI</i> | T3 | (A. Brändli, Zürich, Schweiz) |
| • XPax-5 in pBSK | <i>NotI</i> | T7 | (A. Brändli, Zürich, Schweiz) |
| • EGFP in pGEM [®] -T | PCR | SP6 | (D. Gradl, Karlsruhe) |

Vektoren zur Expression rekombinanter Proteine

- CMV- β -Galaktosidase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- XEn-2 in pCS2myc (D. Fichtner, Karlsruhe)
- XLef-1 in pCS2myc (D. Gradl)
- XTcf-3 in pCS2myc (D. Gradl)
- XTcf-4A in pCS2myc (D. Gradl)
- XTcf-4C in pCS2myc (D. Gradl)

Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und aqua bidest. bzw. DEPC-H₂O angesetzt. Bei der Verwendung nicht autoklavierbarer Chemikalien wie z.B. Methanol, Glucose, Triton-X-100 oder Tween 20 werden die Lösungen bei Bedarf durch Sterilfiltration (Ø 0,2 µm) entkeimt.

Allgemeine Gebrauchslösungen

- 5x SDS-Ladepuffer
0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin,
5% (v/v) β-Mercaptopropandiol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau.
- 6x Ladepuffer für DNA-Auftrennung (Orange G)
0,25% (w/v) Orange G, 40% (w/v) Saccharose in aqua bidest., bei 4°C lagern.
- APBS (Amphibian Phosphate Buffered Saline)
2,7 mM KCl, 0,15 mM KH₂PO₄, 103 mM NaCl, 0,7 mM Na₂PO₄, pH 7,5.
- DEPC-H₂O
1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht in einem Liter aqua bidest.
schütteln und anschließend durch Autoklavieren inaktivieren.
- Elektrophorese-Laufpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS.
- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline)
137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,5.
- PBST
1x PBS, 0,1% (v/v) Tween 20.
- Ponceau-Färbelösung
1% (v/v) Essigsäure, 0,5% (v/v) Ponceau S.
- TAE-Puffer
40 mM Tris/Acetat pH 8,3, 1 mM EDTA.
- TE
10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5.
- Transferpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol.

Chromatin-Immunpräzipitation

- ChIP Verdünnungspuffer
0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 8,1, 167 mM NaCl, Protease Inhibitoren.
- Elutionspuffer
1% SDS, 0,1 M NaHCO₃.
- LiCl-Puffer
250 mM LiCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5 mM Na-Deoxycholat.
- Lysis Puffer
1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1, Protease Inhibitoren.

Entwicklungsbiologie

- Cysteinlösung
2% (w/v) Cystein in 0,1x MBSH, mit 10 M NaOH pH 8,2.
- 1x MBSH (Modified Barth's Solution)
880 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 100 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 3,3 mM Ca(NO₃)₂, 100 mM HEPES, 8 mM MgSO₄, pH 7,4.
- 1x MEM
100 mM MOPS pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, DEPC-H₂O.
- MEMFA
MEM, 0,1% (v/v) Tween 20, 3,7% (v/v) Formaldehyd, DEPC-H₂O.
- Nilblau-Färbelösung
Nilblau-Sulfat 0,01% (w/v) über Nacht in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,8 lösen und die noch vorhandenen Partikel durch einen Filter abtrennen.
- ***In-situ* Hybridisierung**
 - Antikörperlösung (für anti-Digoxigenin Antikörper)
0,05% (v/v) anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente in Blockierungspuffer.
 - Alkalische Phosphatasepuffer für NBT/BCIP (AP Puffer)
0,1 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,05 mM MgCl₂, 0,1 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, DEPC-H₂O.
 - Blockierungspuffer
1x BMB, 10% (v/v) Pferdeserum, 0,05% (v/v) Tween 20, DEPC-H₂O.

-
- 5x BMB
10% (w/v) Blockierungsreagenz in 5x MAB.
 - Hybridisierungspuffer
50% (v/v) Formamid deionisiert, 5x SSC, 2% (v/v) Torula RNA Lösung, 0,1% (v/v) Heparinlösung, 1x Denhardt's, 0,1% (v/v) Tween 20, 0,1% (w/v) CHAPS, 5 mM EDTA.
 - NBT/BCIP-Färbelösung
1% (v/v) NBT/BCIP Stammlösung (Roche) in AP Puffer.
 - Proteinase K-Lösung
1% (w/v) Proteinkinase K in TBST.
 - 20x SSC
3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat pH 7,0.
 - 2x SSC-T
2x SSC, 0,05% (v/v) Tween 20.
 - 0,2x SSC-T
0,2x SSC, 0,05% (v/v) Tween 20.
 - 10x TBS
25 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂.
 - TBST
1xTBS, 0,1% (v/v) Tween 20.
 - Torula RNA-Lösung
50 mg/ml in DEPC-H₂O bei 80°C lösen und bei – 20°C lagern.
 - Triethanolamin-Lösung
1 M Triethanolamin, pH 7,5.
 - **Transgene Embryonen**
 - 1x MMR (Marc's Modified Ringer's)
1 M NaCl, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,5.
 - 2x NPB (Nuclear Preparation Buffer)
500 mM Saccharose, 30 mM HEPES, 1 mM Spermidine Trihydrochlorid, 0,4 mM Spermine Tetrahydrochlorid, 2 mM Dithiothreitol, 2 mM EDTA.

- SSB (Sperm Storage Buffer)
1x NPB + 30% (w/v) Glycerin + 0,3% BSA).
- 1x XB (Extract Buffer)
100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 50 mM Saccharose, 10 mM HEPES, pH 7,7.

Mikrobiologie

- Ampicillin-Stammlösung (1000x)
100 mg Ampicillin pro ml aqua bidest., bei -20°C lagern.
- LB_{AMP/KAN}-Agar-Platten
1,5% (w/v) Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren. Nach Abkühlen auf 55°C 1 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen (Ø 9,4 cm) gießen. Die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4°C gelagert.
- LB_{AMP/KAN}-Medium
1 ml Ampicillin- oder Kanamycinlösung pro Liter LB-Medium.
- LB-Medium (Luria Bartani Medium)
10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H₂O, pH 7,5.
- Kanamycin-Stammlösung (1000x)
100 mg Kanamycin pro ml aqua bidest., bei -20°C lagern.
- SOB-Medium
20 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 g MgCl₂, ad 1 l aqua bidest., pH 7,0.
- SOC-Medium
SOB, 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.
- TFB1
30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin, pH mit Essigsäure auf 5,8 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.
- TFB2
100 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% (v/v) Glycerin, pH mit 1 M KOH auf 6,5 einstellen, bei Raumtemperatur lagern.

Zellbiologie

- DAPI-Kernfärbelösung
Stammlösung: 1 mg/ml in APBS
Gebrauchslösung: Stammlösung 1:1000 in APBS, lagerfähig bei 4°C im Dunkeln.
- DMEM Komplettmedium für humane (HEK 293) Zellen
100 ml hitzeinaktiviertes FCS, 10 ml Penicillin/Streptomycin, mit DMEM-Medium ad 1 l.
- DMEM Komplettmedium für *Xenopus* (XTC) Zellen
100 ml hitzeinaktiviertes FCS, 10 ml Penicillin/Streptomycin, 600 ml DMEM-Medium (High Glucose 4,5 g/l), mit sterilem H₂O ad 1 l.
- Elvanol-Gebrauchslösung
5 g Polyvinylalkohol über Nacht bei Raumtemperatur in 60 ml PBS rühren. Anschließend 15 Minuten bei 1000x rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen und darin 1 mg/ml Phenylendiamin über Nacht lösen. Den pH-Wert auf 8,0 einstellen und durch Zugabe von bis zu 200 µl 2-Mercaptoethanol die Lösung klar werden lassen. Die Elvanol-Gebrauchslösung ist bei -20°C über zehn Monate lagerfähig.
- 1x HeBS
Verdünnung herstellen aus 10x HeBS. Einstellen des pH auf 7,12 mit 1 M NaOH. Die Lösung anschließend steril filtrieren.
- 10x HeBS
1,36 M NaCl, 0,05 M KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 0,2 M HEPES und 1% Glucose. Anschließend den pH mit 1 M NaOH auf 7,1 einstellen.
- Reporteragen-Analysen
 - **β-Galaktosidase-Assay**
 - 100x Mg-Lösung
0,1 M MgCl₂, 4,5 M β-Mercaptoethanol.
 - 1x ONPG -Lösung
4 mg/ml ONPG in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,5.
 - 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,5
41 ml 0,2 M Na₂ HPO₄*2H₂O, 9 ml 0,2 M NaH₂PO₄*H₂O, 50 ml aqua bidest.

- **Luziferase-Assay**

- Lysepuffer
25 mM Tris/H₃PO₄, pH 7,8, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glycerin, 1% Triton X-100.
- Assay-Puffer
33,3 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂*5H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 20 mM Tricine, pH 7,8.
- Substrat für 10 ml Assay Puffer
2,12 mg Coenzym A, 1,32 mg Luziferin, 2,92 mg ATP.

Geräte

- Abzugshaube
 - Mircoflow 2 Advanced Bio Safety (NUNC, Wiesbaden)
- Begasungsbrutschrank für Gewebekultur
Sterile Cycle CO₂ Incubator (Thermo Forma, Marietta, USA)
- Binokular
 - Leica L2 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
 - Leica S6E (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
- Brutschrank, APT LineSerieBD/ED/FD (Binder, Tuttlingen)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- Fluoreszenzbinokular
 - Leica S8AP0 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
 - Digitalkamera Retiga Color 12 bit (QImaging, Burnaby, Kanada)
 - Elektrische Vorschaltquelle für Quecksilber-Kurzbogenlampe (Leistungselektronik Jena, Jena)
 - Kaltlichtquelle KL 1500 LDD (Schott Glas, Wiesbaden)
 - Software, Openlab 3.1.1 (Openlab, Heidelberg)
- Geldokumentationsanlagen
 - Diana II (Raytest, Straubenhardt)
 - Gel Max (Intas, Göttingen)
- Kühlbrutschrank BK-600 (Kendro, Langenselbold)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold Technologies)
- Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand)
- Micropipette Puller Model P-97 (Sutter Instruments, Novato, USA)

-
- Mikroinjektionsanlage (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen)
 - Kaltlichtquelle, EK-1 (Euromex)
 - Membranpumpe MZ2 (Vacuubrand)
 - Pneumatische Picopumpe PV 820
 - Stereomikroskop MIC 1630 ZS (Euromex)
 - PCR Cyclers, iCycler (Bio-Rad, München)
 - PCR/UV Work station, Cleanspot (Coy, Michigan, USA)
 - pH-Meter (WTW, Neuhofen)
 - Photometer
 - Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg)
 - Ultraspec 2100pro (Amersham, Freiburg)
 - Schüttelinkubator, Orbital Shaker (Thermo Forma, Marietta, USA)
 - Thermoschüttler (Thermo Forma, Dreieich)
 - Waage (Sartorius, Göttingen)
 - Wasserbad (Mettler, Schwabach)
 - Zentrifugen
 - Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold)
 - Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
 - Multifuge[®] 3 S-R (Kendro, Langenselbold)

permanente Zellkulturlinien

- HEK 293 (humane Nierenepithelzellen, Human Epithelial Kidney)
- XTC (*Xenopus* Tissue Culture) Zellen,
Fibroblasten aus *Xenopus* Kaulquappen

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Fällern von DNA/RNA

Durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol kann die Hydrathülle von Nukleinsäuren zerstört werden, was zu ihrer Präzipitation führt. DNA/RNA wird aus einer wässrigen Lösung isoliert, indem man sie mit einem Zehntel ihres Volumens 3 M Natriumacetat Lösung pH 5,2, sowie 2,5 Volumina absoluten Ethanol versetzt und 30 min bei -80°C , oder mindestens 2 h bei -20°C fällt. Anschließend werden die gefällten Nukleinsäuren während einer 15-45-minütigen Zentrifugation (je nach Maßstab der Präparation) bei 13 000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat mit dem Doppelten des Ausgangsvolumens an 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 5-20-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C wird der Überstand verworfen und das Präzipitat getrocknet, um es anschließend in einem geeigneten Volumen Puffer oder in sterilem aqua bidest. zu resuspendieren.

Alternativ kann die Fällung auch mit Isopropanol erfolgen. Dazu benötigt man 0,7 Volumina Isopropanol. Die Fällung erfolgt ohne Wartezeit bei Raumtemperatur. Nach 15-45-minütigen Zentrifugation (je nach Maßstab der Präparation) bei 13 000 rpm und 4°C wird das Präzipitat in 70%igem Ethanol gewaschen, und in einem geeigneten Volumen sterilem aqua bidest. aufgenommen.

4.1.2 Aufreinigung von DNA/RNA mit Phenol/Chloroform

Beim Ausschütteln mit Phenol/Chloroformlösung (1:1) werden Nukleinsäuren von Proteinen gereinigt. Dabei werden die Proteine denaturiert und erscheinen in der unteren, organischen Phase.

Dazu schüttelt man für etwa 5 min gleiche Volumina der zu reinigenden Lösung mit Phenol/Chloroformlösung aus. Nach anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und Raumtemperatur wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß

überführt. Zur Entfernung von Phenolresten schüttelt man den Ansatz mit dem gleichen Volumen Chloroform aus. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und Raumtemperatur können aus der oberen Phase die Nukleinsäuren gefällt werden.

4.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Der Vergleich der Intensität der Nukleinsäure-Banden mit den Banden des DNA-Größenstandards (Abb.4.1) kann zum Abschätzen der Nukleinsäure-Menge herangezogen werden

Nukleinsäuren können aufgrund ihres spezifischen Absorptionsmaximums bei $\lambda = 260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Dabei können Verunreinigungen mit Proteinen stören. Da Proteine aber im ultravioletten Bereich erst bei $\lambda = 280$ nm ihr Absorptionsmaximum haben, können solche Kontaminationen zuverlässig mit dem Quotienten $A_{\lambda 260}$ zu $A_{\lambda 280}$ abgeschätzt werden. Bei sauberen Nukleinsäurelösungen sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion proportional der Schichtdicke und der Konzentration der absorbierenden Substanz. Einer Extinktion von $E=1$ bei $\lambda=260$ nm entsprechen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige RNA.

4.1.4 DNA-Restriktionsanalyse

Die biologische Funktion der bakteriellen Restriktionsendonukleasen liegt darin, fremde DNA (z.B. die DNA eines infizierenden Virus) zu spalten. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen, meist Palindrome aus 4-8 Basenpaaren, und schneiden dort das Phosphatzuckerrückgrat. Dabei entstehen je nach Enzym 5' bzw. 3' überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) Enden.

Zur Restriktionsanalyse werden pro 1 μg der zu verdauenden DNA 1-10 Einheiten Restriktionsendonuklease und ein Zehntel Volumen des entsprechenden 10-fach konzentrierten Puffers zugesetzt. Der Verdau erfolgt für mindestens 1 Stunde in einem Ansatzvolumen von 10-20 μl bei der für das Enzym optimalen Reaktions-

temperatur. Die Restriktionsanalyse wird auf einem analytischen Agarosegel durchgeführt.

4.1.5 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

DNA Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp werden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, während für größere Fragmente ein 1%iges Gel verwendet wird. Durch Aufkochen wird die Agarose in TAE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid im Verhältnis 10 000:1 versetzt. Die auf ca. 50°C abgekühlte Suspension wird in eine vorbereitete Gelform gegossen. Nach Aushärtung werden die mit Ladepuffer versetzten Nukleinsäureproben in die Geltaschen gegeben und durch Anlegen einer Gleichspannung von 60-120 V aufgetrennt. Als Polyanionen wandern DNA-Fragmente auf die Anode zu. Anhand der Lauffront kann der Fortschritt der Auftrennung verfolgt werden. Ist die gewünschte Position der Lauffront erreicht, wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel ausgewertet.

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und emittiert nach Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 312 \text{ nm}$ oder $\lambda = 254 \text{ nm}$, so dass das durch die Auftrennung entstandene Bandenmuster dokumentiert werden kann.

Die Größenordnung der DNA-Banden erfolgt durch den Laufstreckenvergleich mit einem parallel auf dem Gel aufgetrennten DNA-Größenstandard.

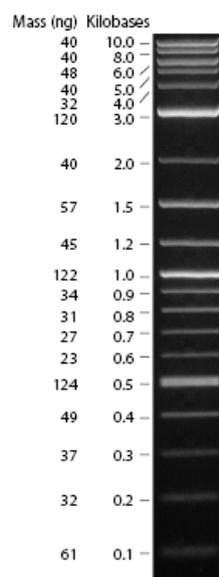


Abb. 4.1 DNA-Größenstandard zum Abschätzen der DNA-Größe und Masse. Gezeigt ist der 2-log DNA Marker der Firma New England Biolabs GmbH.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck der 2-log DNA Marker der Firma New England Biolabs verwendet (Abb. 4.1).

4.1.6 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wird das zu isolierende DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Über das SV Wizard[®] Gel Cleanup System (von Promega) kann die DNA entsprechend den Herstellerangaben extrahiert werden. Zu einem ausgeschnittenen Gelstück wird das gleiche Volumen des Membran-Bindepuffers (100 mg Gel \cong 100 μ l Puffer) gegeben und der Ansatz für zehn Minuten bei 50°C geschmolzen. Dieser Puffer enthält chaotrope Salze, die die Struktur von Wasser modifizieren, und senkt den pH-Wert unter 7,5 ab, so dass die DNA-Fragmente im nächsten Schritt an eine Silika-Gel-Membran adsorbiert werden können. Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid und Farbstoffe fließen während der einminütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm durch die Matrix. Der Durchfluss wird verworfen. Alle folgenden Zentrifugationsschritte werden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die verbliebenen Agarose- und Salzurückstände werden in zwei Schritten mit 700 μ l, bzw. 500 μ l ethanolhaltigem Waschpuffer von der Silika-Membran gewaschen. Das noch in der Matrix vorhandene Ethanol wird durch eine einminütige Zentrifugation entfernt. Anschließend gibt man 50 μ l steriles aqua bidest. direkt auf die Silika-Membran und eluiert nach ein bis zwei Minuten die DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm.

4.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende

Um eine Rezirkularisierung linearisierter Vektormoleküle zu verhindern, wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende mithilfe einer alkalischen Phosphatase (AP) abgespalten. Dazu werden 3 μ g linearisierte Plasmid-DNA mit 1 μ l (\cong 1 u) alkalischer Phosphatase in einem Zehntel Volumen eines 10x AP-Puffers für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wird erneut 1 μ l Phosphatase hinzugegeben und der Ansatz nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch eine 15-

minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Durch eine anschließende Phenol/Chloroform Extraktion wird die Phosphatase wieder entfernt.

4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Aufgereinigte DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können mit linearisierten Vektormolekülen durch Schließen der Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch ligiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Klonierungsvektor für PCR-Produkte der pGEM[®]-T Vektor der Firma Promega eingesetzt. Dieser Vektor liegt bereits linearisiert vor und besitzt an seinen 5' Enden T-Überhänge, welche mit den durch die *Taq*-Polymerase erzeugten A-Überhängen an den 3' Enden der PCR Produkte hybridisieren. Für einen Ligationsansatz werden 0,5 µl Vektor (\cong 25 ng), 5 µl 2x Reaktionspuffer, 0,5 µl (\cong 5 u) T4-DNA Ligase, \cong 25-50 ng des PCR Produkts eingesetzt und mit nuklease-freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 4°C.

Bei der enzymatischen Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren wird ein molares Verhältnis zwischen DNA-Fragment und Vektor von 5:1 bei überhängenden Enden, bzw. von 10:1 bei glatten Enden gewählt.

4.1.9 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Bakterien des *E. coli*-Stamms JM109 werden auf einer Antibiotika-freien LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 5 ml LB-Medium werden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur werden 0,5 ml in 50 ml mit 20 mM MgSO₄ versetztem LB-Medium gegeben und solange inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht hat. Anschließend wird die Bakterienkultur auf Eis gekühlt und für fünf Minuten bei 4 500 x rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellen werden in 20 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen erneut für fünf Minuten bei 4 500 x rpm und 4°C zentrifugiert und dann in 2 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden je 100 µl Bakteriensuspension pro Reaktionsgefäß aliquotiert und bei – 70°C eingefroren.

4.1.10 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in prokaryotische Wirtszellen. Dazu muss man die Wirtszellen zur Aufnahme der Plasmid-DNA anregen. Dies erfolgt bei chemokompetenten Bakterien durch einen Hitzeschock.

Dazu werden 50 µl kompetenter *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut, zu 1 µl Plasmid-DNA oder 1-2 µl Ligationsansatz pipettiert und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock für exakt 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Danach werden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 450 µl SOC-Medium hinzugegeben und es folgt eine 60-90-minütige Ruhepause im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm. Anschließend werden je nach Anzahl der zu erwartenden Kolonien 50-250 µl der Bakterien-suspension auf selektivem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.11 Blau-Weiß-Selektion

Nach der Transformation müssen Bakterien, die das rekombinante DNA-Molekül tragen selektioniert werden. Eine nützliche Methode ist die Blau-Weiß-Selektion. Viele Klonierungsvektoren wie beispielsweise der pGEM[®]-T Vektor sind so konzipiert, dass die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) innerhalb des kodierenden Bereichs des *lacZ* Gens, dem Gen für die β -Galaktosidase, liegt. Wird keine Fremd-DNA eingebaut, so kann vom 5' liegenden *lac*-Promotor aus das Enzym β -Galaktosidase exprimiert werden. Als Substrat für dieses Enzym dient das farblose X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid). Dieses wird in das entsprechende Indoxylderivat überführt, das an der Luft zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Die Bakterien, die lediglich ein leeres Vektormolekül aufgenommen haben, können somit einfach durch ihre blaue Farbe erkannt werden. Da einige Bakterienstämme in hohem Maße den *lac* Repressor exprimieren, der die Expression des *lacZ*-Gens verhindert, wird der Agarplatte zusätzlich als Induktor das Lactose-Analogon IPTG (Isopropylthiogalaktosid) zugegeben. Wurde durch die Insertion eines DNA-Fragments in die MCS das für die β -Galaktosidase kodierende Gen inaktiviert, bleiben die Kolonien weiß. Diese Zellen können als Träger eines rekombinanten Plasmids identifiziert und gezielt weiter verwendet werden. Zur

Durchführung werden 40 µl XGal-Lösung und 80 µl IPTG ausgestrichen und die Platten vor dem Ausplattieren der Bakterien für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.1.12 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien werden Kits der Firma Promega benutzt, mit denen die Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert wird. Bei diesen Produkten wird die Plasmid-DNA nach selektiver Fällung der chromosomalen DNA an eine Affinitätsmatrix (Silika-Gel-Membran) adsorbiert, wodurch DNA mit hohem Reinheitsgrad gewonnen wird.

Bei einem Ansatz im Kleinmaßstab werden mit rekombinanten Plasmiden transformierte JM109 *E. coli* Bakterien in 5 ml LB_{AMP}-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Diese Zellen werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm sedimentiert. Der Zellniederschlag wird in 250 µl RNase-haltigem Resuspensions-Puffer gelöst. Zur alkalischen Lyse werden 250 µl NaOH-SDS-haltiger Lyse-Puffer zugegeben, wodurch Phospholipide und Membranproteine gelöst und DNA sowie Proteine denaturiert werden. Anschließend gibt man 350 µl hochsalzhaltigen Neutralisations-Puffer zu und invertiert die Probe ca. fünfmal. Durch den hohen Salzgehalt der Lösung wird Kaliumdodecylsulfat präzipitiert und die Komplexbildung mit denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern gefördert. Die kleinere ringförmige Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung. Die Präzipitate werden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm abgetrennt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wird auf eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an die Silika-Membran absorbiert. Der Durchfluss wird nach kurzer Zentrifugation verworfen und die Membran mit 500 µl PB-Puffer gewaschen, wodurch die Restriktionsendonukleasen der *endA*⁺ Stämme entfernt werden. Nach erneuter Zentrifugation wird mit 750 µl ethanolhaltigem Wasch-Puffer gewaschen, um die chaotropen Salze des Neutralisations-Puffers, die eine Elution unterbinden, zu entfernen. Mit 100 µl sterilem aqua bidest. wird die Plasmid-DNA eluiert.

Für einen Ansatz im Mittelmaßstab werden rekombinante *E. coli* Bakterien in 100 ml LB_{AMP}-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Zellen werden bei 5 000 rpm sedimentiert und der Zellniederschlag in 3 ml RNase-haltigem Resuspensions-Puffer aufgenommen und anschließend mit 3 ml Lyse-Puffer versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gibt man zur Neutralisierung 5 ml hochsalzhaltigen

Neutralisations-Puffer zu und invertiert den Ansatz fünf- bis zehnmal. Anschließend wird der Ansatz zehn Minuten bei 5 000 rpm zentrifugiert und durch einen Faltenfilter filtriert. Der Durchfluss mit der gelösten Plasmid-DNA wird mithilfe einer Vakuumpumpe zunächst durch einen Filter aufgereinigt, bevor die DNA auf der darunter liegenden Silikamembran gebunden wird. Anschließend wird die Silikamembran zweimal gewaschen und für ca. eine Minute getrocknet, um den Ethanol aus dem Waschpuffer vollständig zu verdampfen. Die Säule wird dann in ein frisches 50 ml-Röhrchen übertragen, die Plasmid-DNA in 600 µl aqua bidest. gelöst und in einem abschließendem Zentrifugationsschritt eluiert.

4.1.13 *In vitro*-Transkription von sense und antisense RNA

Plasmide zur RNA Synthese besitzen eine Bindestelle für eine SP6-, T3- und/oder T7-RNA-Polymerase. Als Matrize setzt man linearisierte Plasmid-DNA ein. Durch das mMMESSAGE mMACHINE™ High Yield Capped RNA Transcription Kit der Firma Ambion kann eine RNA für die Mikroinjektion synthetisiert werden, die an ihrem 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe analog zu eukaryotischer mRNA besitzt. Dadurch ist eine sehr hohe Stabilität der RNA gewährleistet. Ein 20 µl Ansatz beinhaltet 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 10 µl Ribonukleotide (2x NTP/Cap), 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl RNA-Polymerase. Es folgt eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Die DNA-Matrize wird unter Zugabe von 1 µl DNase I in einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C verdaut. Die Aufreinigung der RNA erfolgt über eine Größenausschlusschromatographie über die Probe Quant G50 Micro Columns der Firma GE Healthcare gemäß den Herstellerangaben.

Für die Ganzkeimfärbung werden markierte *antisense*-Nukleotid-Sonden benötigt. Diese werden mit dem Fluorescein/Digoxygenin RNA-Labeling Kit der Firma Roche synthetisiert. Für einen 20 µl Reaktionsansatz werden 1 µg linearisiertes Plasmid, 2 µl 10x Fluorescein- oder Digoxygenin-Labeling-Mix, 2 µl RNA-Polymerase und 1 µl RNase-Inhibitor benötigt. Die eingesetzten Ribonukleotide enthalten markiertes UTP, das am C5-Atom der Uridinbase mit Fluorescein oder Digoxygenin verknüpft ist. Die weiteren Versuchsschritte entsprechen der Vorgehensweise im vorherigen Absatz.

4.1.14 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA. Sie setzt sich aus den drei Schritten Denaturierung der DNA, Primer-Hybridisierung und Polymerisation zusammen, durch die eine DNA-Matrize in mehreren Zyklen exponentiell vervielfältigt wird. Dabei synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von einem Startermolekül auf einer einzelsträngigen Nukleinsäuren-Matrize einen neuen komplementären DNA-Strang. Als Startermoleküle dienen synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer), die sequenzspezifisch mit der Matrizen-DNA hybridisieren. An den freien 3'-OH-Primer-Enden dieser kurzen doppelsträngigen Abschnitte kann die DNA-Polymerase ansetzen und mit der Synthese komplementärer DNA-Sequenzen beginnen. Durch Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den Primern amplifiziert werden.

Ein Zyklus beginnt mit dem Aufschmelzen der DNA in Einzelstränge bei 95°C. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig vom CG/AT-Verhältnis der Primer. Für eine Primer-Länge zwischen 18 und 24 Nukleotiden gilt als Faustregel für die Schmelztemperatur (T_m):

$$T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T).$$

Nach dem Binden der Primer kann die DNA-Polymerase ansetzen und mit der Synthese des DNA-Moleküls beginnen. Die optimale Temperatur für die Polymerisation beträgt 72°C, wobei die Dauer von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig ist. Nach der Verlängerung der Primer wird die nun erneut doppelsträngige DNA aufgeschmolzen und der Zyklus beginnt von neuem.

In der vorliegenden Arbeit werden neben der *Taq*-Polymerase, aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, die „proof-reading“ Polymerasen *Pfu* (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) und *Phusion* (gentechnisch veränderte *Pyrococcus* DNA Polymerase mit einer produktivitäts-steigernden Domäne) benutzt, welche Fehlpaarungen in der DNA erkennen und durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität diese falsch eingebauten Nukleotide ausschneiden und korrigieren. Um lange Sequenzen mit möglichst wenigen Fehlpaarungen zu erhalten, kommen daher hauptsächlich die *Pfu* und *Phusion* Polymerasen zum Einsatz. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, hängt aber im Gegensatz

zu den Proofreading-Polymerasen an die 3'-Enden der neu synthetisierten Produktstränge ein Adenosin an, so dass die PCR-Produkte effektiv in TA-Vektoren kloniert werden können.

Ein Standard PCR Ansatz besteht aus 100 ng der DNA Matrize, 2 µl Primermix [10 µM], 2,5 µl dNTPs [10 mM], 5 µl 10x Polymerase Puffers, 0,5 µl DNA-Polymerase und wird mit nuklease-freiem H₂O ad 50 µl aufgefüllt.

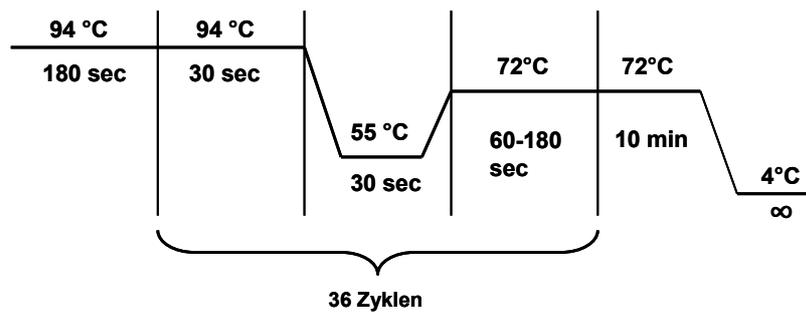


Abb. 4.2 Standard PCR Protokoll. Die Dauer des Elongationsschritts richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

4.1.14.1 Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese mit Hilfe der PCR macht man sich zu Nutze, dass bei geringer Hybridisierungstemperatur die verwendeten Primer nicht exakt zur Vorlage passen müssen und dabei 10-15 komplementäre Basen für eine Primerhybridisierung ausreichend sind. So lassen sich Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen einfach in bakterielle Plasmid-DNA einführen.

Für die Mutagenese werden Primer entworfen, die zueinander revers komplementär sind und die gewünschte Mutation möglichst mittig tragen, so dass sie 5' und 3' davon noch von 10-15 korrekten Basen flankiert werden. Die Primer sollten 25-45 Basen lang sein und eine Schmelztemperatur (T_m) von mindestens 78°C besitzen, die sich durch die folgende Formel errechnen lässt:

$$T_m = 81.5 + 0.41 * (\%GC) - 675 / (N - \%Fehlpaarungen)$$

N steht hierbei für die Anzahl der Basen. Der GC-Gehalt sollte einen Wert unter 40% nicht unterschreiten. Da bei der PCR-Reaktion revers komplementäre Primer eingesetzt werden, wird das ringförmige Plasmid vollständig abgelesen. Somit erhält man doppelsträngige Plasmide mit einer offenen Phosphodiesterbindung („nick“), die erst

während der anschließenden Transformation in *E. coli* ligiert wird. Für die PCR wird die Turbo-*Pfu* Polymerase benutzt, da sie mit sehr hoher Genauigkeit beide Plasmidstränge repliziert ohne dabei die mutierten Primer vom Plasmid zu verdrängen. Die Matrizen-DNA wird in einer Konzentration von 25-50 ng eingesetzt. Die Dauer des Elongationsschritts richtet sich nach der Länge des zu mutierenden Plasmids. Dabei werden pro Kilobase 2 min berechnet. Bei der Einführung von Punktmutationen sind 12 PCR Zyklen ausreichend, während bei der Mutation mehrerer Basen 18 Zyklen benötigt werden.

Nach dem letzten PCR-Zyklus wird der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt und mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut, um spezifisch die parentale Matrizen-DNA zu schneiden, welche aus Bakterien stammt und somit im Gegensatz zur PCR-amplifizierten DNA methyliert ist. Zielsequenz des Enzyms ist die bakterielle Sequenz 5'-G^{m6}ATC-3'. Für den Verdau wird der komplette 50 µl PCR-Ansatz mit 1 µl *DpnI* für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau werden chemokompetente *E. coli* JM109 Bakterien mit 2 µl des PCR-Ansatzes transformiert. Der Erfolg der Mutagenese wird durch Sequenzierung verifiziert.

4.1.15 Amplifikation teilweise unbekannter DNA Sequenzen

Mithilfe der GenomeWalkerTM Methode (BD Biosciences Clontech) kann man ausgehend von einer bekannten Sequenz (z.B. cDNA) in unbekannte benachbarte Sequenzen sowohl stromaufwärts in potentielle Promotor-/Enhancerregionen, als auch stromabwärts (z.B. zur Analyse von Intronsequenzen) auf einer genomischen DNA-Bibliothek „laufen“, um so mehr Sequenzinformationen zu gewinnen. Dies ist notwendig bei Organismen, deren Genome noch nicht sequenziert sind, wie beispielsweise *Xenopus laevis*.

Bei der genomischen DNA-Bibliothek handelt es sich dabei um vier Bibliotheken, wobei jede Bibliothek aus genomischer DNA besteht, die mit einem anderen Restriktionsenzym geschnitten und anschließend mit Adaptoren versehen wurde. Hierbei wurden Restriktionsendonukleasen mit einer Erkennungssequenz von sechs Basenpaaren gewählt, die demnach statistisch gesehen einmal pro 4⁶ (=4096) Basenpaare schneiden. Bei den Bibliotheken handelt es sich also nicht um konventionelle Bibliotheken, wie man sie z.B. von cDNA kennt. Dennoch stellt die genomische DNA-Bibliothek der GenomeWalkerTM Methode einen DNA-Pool dar,

aus dem spezifische DNA-Fragmente durch genspezifische Primer und statistisch verteilten Adapterprimern amplifiziert werden können.

Isolierung von genomischer DNA aus *Xenopus* Embryonen

Durch das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) lässt sich genomische DNA aus Embryonen extrahieren. Zunächst werden 20 Embryonen aus dem Schwanzknospentadium St. 30 [nach Nieuwkoop und Faber, 1967] mit 75 µl 1x PBS versetzt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze werden die Embryonen zunächst homogenisiert. Das Gewebe wird nach Zugabe von 180 µl SDS-haltigem Puffer T1 und 25 µl Proteinase K für 1,5 Stunden bei 56°C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgt die Lyse während einer zehnmütiger Inkubation bei 70°C mit 200 µl Puffer B3, welcher chaotrope Ionen für die anschließende DNA Fällung enthält. Eventuell noch vorhandene Gewebereste und unlösliche Bestandteile des Lysates werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 11 000 rpm sedimentiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 210 µl 95% Ethanol wird die DNA gefällt. Die Probe wird auf eine Silikat-Membran gegeben und durch einminütige Zentrifugation bei 11 000 rpm wird die gebundene DNA vom restlichen Lysat abgetrennt. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, folgen Waschschrte, um vorhandene Kontaminationen zu entfernen. Zunächst wird die Membran mit 500 µl BW-Puffer und nachfolgend mit 600 µl B5-Puffer gewaschen und jeweils für 1 Minute bei 11 000 rpm zentrifugiert. Um die Ethanolreste der Waschpuffer vollständig zu entfernen, folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die Zugabe von 100 µl 70°C warmen BE-Puffers setzt die Ionenstärke herab und erleichtert so die Elution der gebundenen DNA durch Zentrifugation bei 11 000 rpm.

Herstellung der genomischen Bibliothek

Die DNA-Bibliotheken werden aus sehr reiner genomischer DNA hergestellt. Mit Hilfe der vier Restriktionsenzyme *DraI*, *StuI*, *PvuII* und *EcoRV*, die alle glatte Enden beim Schneiden produzieren, wird die DNA in getrennten Ansätzen über Nacht bei 37°C verdaut. Pro Reaktionsansatz werden 2,5 µg genomische DNA, 8 µl Restriktionsenzym und 10 µl 10x Restriktionspuffer mit nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C werden die Proben kurz gemischt und anschließend weiter inkubiert. Zur weiteren Verarbeitung müssen in den darauf

folgenden Schritten die Restriktionsenzyme und die verwendeten Puffer aus den Ansätzen wieder entfernt werden.

Über eine Phenol/Chloroform-Extraktion wird die DNA gereinigt und mit Ethanol gefällt. Dies erfolgt durch die Zugabe von 2 Volumen eiskaltem 95%igem Ethanol, 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 9,5) und 20 µg Glykogen und anschließender zehnmütige Zentrifugation bei 13 000 rpm. Die DNA wird nun mit 1 Volumen 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 µl TE-Puffer (pH 7,5) gelöst.

Im letzten Schritt der Herstellung wird die verdaut und aufgereinigte DNA mit Adaptern ligiert. Für den Reaktionsansatz werden 4 µl DNA, 1,9 µl Genome Walker™-Adapter, 1,6 µl 5x Ligationspuffer und 0,5 µl T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C ligiert. Im Anschluss daran wird die Reaktion durch fünfminütiges Erwärmen auf 70°C abgestoppt. Jeder Ansatz wird durch Zugabe von 72 µl TE-Puffer (pH 7,5) auf ein Endvolumen von 80 µl aufgefüllt. Die Qualität der einzelnen Schritte der Herstellung kann über analytische Gelelektrophorese überprüft werden.

Amplifikationen aus der genomischen Bibliothek

Ziel der GenomeWalker™ Methode ist es, den Bereich zwischen einer bekannten DNA-Sequenz und dem GenomeWalker™-Adapter zu amplifizieren. Als korrespondierende Primerpaare dienen zum einen genspezifische Primer (GSP), die auf der bekannten DNA-Sequenz binden, und Primer die auf dem Adapter (Abb. 4.3) binden können (Adapterprimer = AP).

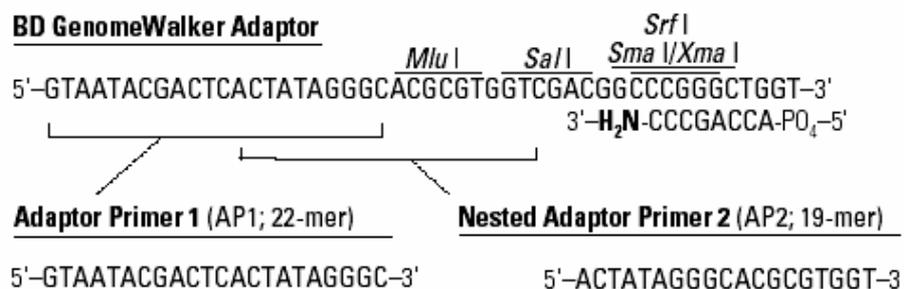


Abb. 4.3 Struktur eines GenomeWalker™ Adapters und der Adapter-Primer 1 und 2.

Das Protokoll besteht aus jeweils zwei PCR Reaktionen pro Ansatz. Für die primäre PCR dient die genomische DNA-Bibliothek als Matrize und es wird der äußere Adapterprimer 1 (AP1) und ein äußerer genspezifischer Primer 1 (GSP1) verwendet. Für die primäre PCR genügt ein 25 µl Ansatz, da lediglich ein zehnfach verdünntes Aliquot dieser PCR als Template für die zweite Amplifikation dient. Die „nested“ PCR

dagegen erfolgt in einem 50 µl Ansatz, um ausreichend Material für die Klonierung der Amplifikate zu haben. Der innere genspezifische Primer sollte so gewählt sein, dass er nicht mit dem äußeren überlappt. Die Primer sollten so konzipiert sein, dass sie eine Länge von 25-28 bp haben, einen GC-Gehalt von mindestens 40 % aufweisen und eine Schmelztemperatur (T_M) von 67°C besitzen. Allerdings dürfen die letzten 6 Nukleotide des 3'-Endes nicht mehr als 3 Guanodin- oder Cytosin-Basen enthalten. Die benötigten Adapter-Primer für die beiden PCR Reaktionen sind im GenomeWalker™ Kit der Firma BD Biosciences / Clontech enthalten.

Mit der sekundären „nested“ PCR Reaktion wird die Spezifität und Quantität der Reaktion erhöht. Erhält man nach der ersten PCR häufig undeutliche Banden auf dem Agarosegel, so erkennt man nach der sekundären Reaktion distinkte Banden in den vier Ansätzen. Die größten PCR Produkte werden aus dem Gel extrahiert und in einen Klonierungsvektor inseriert.

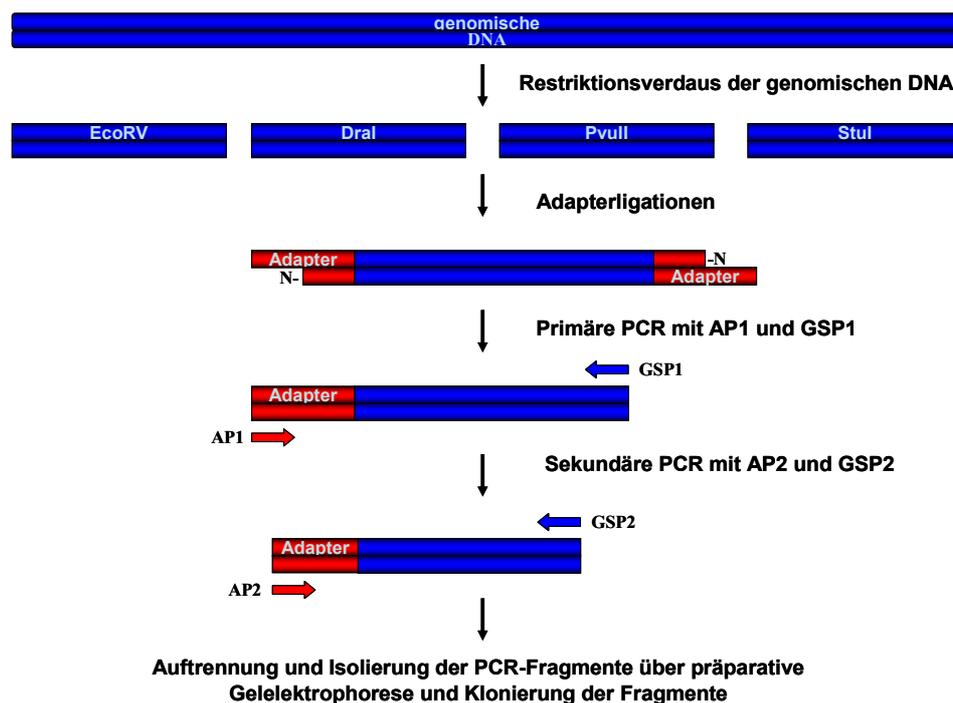


Abb. 4.4. Schematische Darstellung der GenomeWalker™ Methode. Aus genomischer DNA (aus *X. laevis*) werden mittels Restriktionsendonukleasen vier „Bibliotheken“ hergestellt, an deren 5' Enden die Adapter ligiert werden. Durch zwei Amplifikationszyklen mit Adapter spezifischen Primern (AP) und genspezifischen Primern (GSP) können die gewünschten Sequenzbereiche amplifiziert werden.

4.1.16 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

Um den Transkriptionsstartpunkt eines Gens zu bestimmen, wurde die auf PCR Amplifikation beruhende 5' RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends) Methode gewählt. Hierbei handelt es sich um eine Abwandlung der klassischen RACE, bei der der cDNA Synthese ein zweistufiger mRNA Selektions-schritt vorgeschaltet wird (Abb. 4.5).

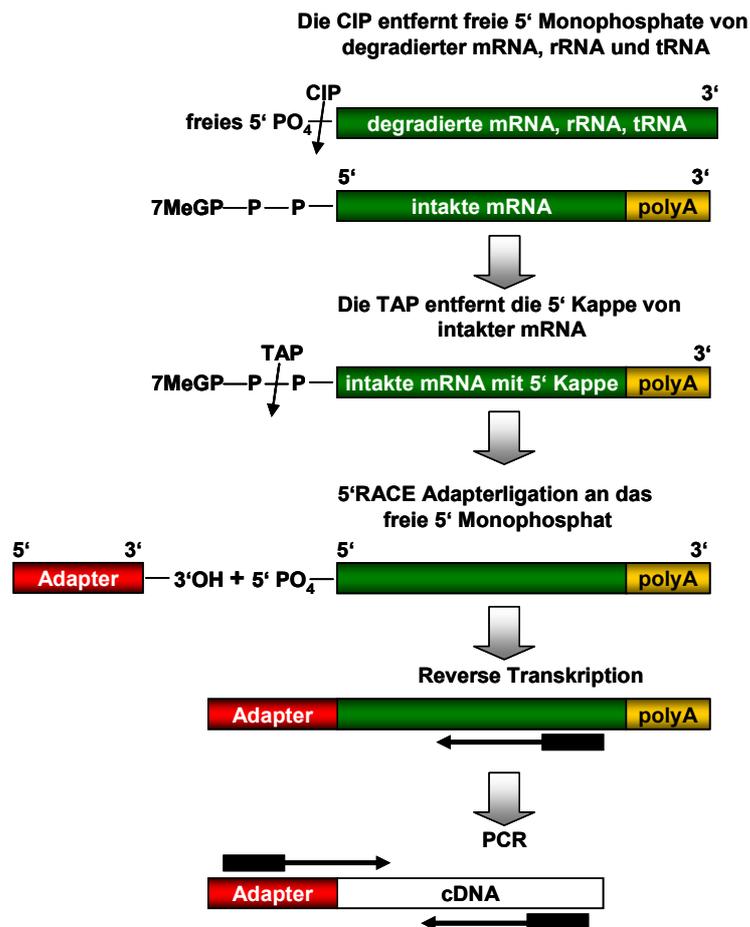


Abb. 4.5 Schematischer Ablauf der 5'RLM-RACE. Die alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine alkaline phosphatase) entfernt freie 5' Monophosphate. Die Pyrophosphatase (TAP, tobacco acid pyrophosphatase) eliminiert die 5' 7-Methylguanosinkappe (7MeG) der mRNA und schafft so ein freies 5' Monophosphat, an das ein RNA Adaptermolekül ligiert wird. Diese modifizierte RNA wird revers transkribiert und mit Hilfe einer „nested“ PCR lässt sich der Transkriptionsstartpunkt des zu untersuchenden Gens bestimmen.

Die aus XTC Zellen isolierte Gesamt-RNA wird zuerst mit einer alkalischen Phosphatase (CIP, Calf Intestine alkaline Phosphatase) behandelt, um die freien 5' Monophosphate von Molekülen wie beispielsweise ribosomaler RNA, transfer RNA oder fragmentierter mRNA zu entfernen. Lediglich intakte mRNA Moleküle bleiben durch ihre 5' Kappe (eine ungewöhnliche 5'-5'-Bindung einer 7-Methylguanosin-gruppe an den Rest der RNA) vor der alkalischen Phosphatase geschützt. Im

nächsten Schritt wird die 5' Kappe der mRNA Moleküle durch eine Pyrophosphatase (TAP, Tobacco Acid Pyrophosphatase) abgespalten, wodurch 5'-Monophosphate entstehen, an die ein 45 bp langes RNA Adaptermolekül ligiert wird. Die so behandelte RNA wird revers transkribiert. Durch eine „nested“ PCR mit Primern die einerseits adapterspezifisch und andererseits genspezifisch binden, lässt sich das 5' Ende des gesuchten Transkripts amplifizieren.

Isolierung von Gesamt-RNA aus XTC (*Xenopus* Tissue Culture) Zellen

Konfluente XTC Zellen aus einer 100 ml Gewebekulturflasche werden in einem Volumen von 1,5 ml APBS geerntet, durch Zentrifugation pelletiert und das Medium durch 500 µl RNA tidyG ersetzt. Die Homogenisierung der Zellen erfolgt durch den Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen). Vor jedem Gebrauch werden die Messer mit Trizol gereinigt. Nach der Homogenisierung wird der Ansatz mit 100 µl Chloroform versetzt und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach dreiminütiger Inkubation werden die beiden Phasen durch Zentrifugation (15 min bei 13 000 rpm) voneinander getrennt. An der Interphase zwischen der oberen RNA-haltigen Phase und der unteren Chloroform-Phase sammelt sich die genomische DNA. In der unteren Chloroform-Phase verbleiben Zelltrümmer und Proteine. Die wässrige obere Phase wird erneut mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Anschließend wird die RNA mit Ethanol gefällt und in einem Volumen von 20 µl sterilem DEPC-H₂O aufgenommen.

RNA Prozessierung

Für die weitere Bearbeitung werden ca. 10 µg der isolierten RNA mit 2 µl 10x CIP Puffers und 2 µl der alkalischen Phosphatase in einem Gesamtvolumen von 20 µl und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat wird die Phosphatase Reaktion gestoppt. Anschließend wird die alkalische Phosphatase durch eine Phenol/Chloroform Extraktion vollständig entfernt und die RNA mit Ethanol gefällt. Der RNA Niederschlag wird luftgetrocknet und danach in einem Volumen von 12 µl nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Davon werden 2 µl für die Negativkontrolle (-TAP) zurückgehalten. 5 µl der RNA werden in die Pyrophosphatase Reaktion eingesetzt und dafür mit 1 µl 10 x TAP Puffer, 2 µl TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) und 2 µl nuklease-freiem Wassers gemischt. Die Reaktion wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Adapter-Ligation, cDNA Synthese und nested PCR

An die freien 5'-Monophosphatenden werden die RNA Oligonukleotide ligiert. Dazu werden 2 µl der RNA mit 1 µl RNA Adaptern, 1 µl 10 x RNA Ligase-Puffer, 2 µl T4 RNA Ligase (2,5 U/µl) und 4 µl DEPC-H₂O gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird die RNA revers transkribiert. Dazu werden je 2 µl der ligierten RNA, bzw. der minus-TAP Kontrolle, 4 µl dNTPs (2,5 mM), 2 µl random decamers, 2 µl 10 x RT Puffer, 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase und 8 µl nuklease-freies Wasser für eine Stunde bei 42°C inkubiert.

Mit Hilfe zweier aufeinander folgender PCR Reaktionen mit Adapter Primern, welche an das reverse Transkript der an die mRNA ligierten RNA Adapter binden und den genspezifischen Primern erhält man ein Amplifikat, das den gesuchten Transkriptionsstartpunkt beinhaltet. Das PCR Produkt der zweiten Reaktion wird mittels T/A Klonierung in den pGEM[®]-T Vektor kloniert und sequenziert.

4.1.17 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt nach der Kettenabbruch-Methode [Sanger et al., 1977] unter Verwendung von Fluoreszenz-markierter dNTP's. In Auftrag gegeben wurden die Sequenzierungen bei GATC, Konstanz.

Das MacMolly Tetra[®] Software Package [Schöneberg et al., 1993] ermöglicht die Analyse und Interpretation von DNA- und Proteinsequenzen. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Programm-Komponenten: „Analyse“, „Complign“, „Align“ und „Interpret“ für die Sequenzanalyse genutzt. Mit „Analyse“ können grundlegende Operationen, wie das Manipulieren und Darstellen von DNA-Sequenzdaten oder Restriktionsanalysen durchgeführt werden. Dagegen finden „Complign“ und „Align“ beim Vergleichen von Sequenzdaten ihre Anwendung. Mit den Programmen „Interpret“ und TESS (Transcription Element Search Software) können Bindestellen von Transkriptionsfaktoren, so genannte Sequenzmotive, identifiziert werden. Im Gegensatz zu „Interpret“ gewichtet das Programm TESS [Schug und Overton, 1997] die potentiellen Treffer statistisch, wobei die statistische Wahrscheinlichkeit des Auftretens der betreffenden Nukleotidabfolge in der gegebenen Sequenz mit der Übereinstimmung zur Konsensus Sequenz verrechnet wird. TESS nutzt die Transfac-Datenbank [Wingender et al., 2001], in der Konsensus Sequenzen und funktionale Motive verwaltet werden.

4.2 Zellbiologische und biochemische Methoden

4.2.1 Kultivierung und Passagieren von humanen HEK 293-Zellen

Humane Nierenepithelzellen der Linie HEK 293 (Human Epithelial Kidney) werden in DMEM Komplettmedium bei 37°C und 7% CO₂ in 50 ml Gewebekulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren der Zellen werden die konfluenten Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst. Dazu wird zunächst das in den Flaschen vorhandene Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette über eine Vakuumpumpe abgesaugt und durch 1,5 ml Trypsin/EDTA ersetzt. Nach etwa fünf Minuten liegen die Zellen vereinzelt vor und können in geeigneter Verdünnung in neuen Gewebekulturflaschen ausgesät werden.

4.2.2 Transiente Transfektion von humanen Kulturzellen

Unter Transfektion versteht man allgemein die Einbringung von fremder DNA in eukaryotische Zellen. Die Transfektion von Zellen mittels Kalziumphosphat-präzipitierter DNA ist die am häufigsten verwendete Methode und kommt in dieser Arbeit in einer modifizierten Form nach Gorman [1985] zum Einsatz. In einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu transfizierende DNA an ausfallendes Kalziumphosphat und bildet dabei Präzipitate. Die ausgefallenen Kristalle können anschließend von den Zellen aufgenommen werden. Bei der Bildung der Präzipitate ist der pH-Wert entscheidend, da nur bei einem pH-Wert von 6,9 – 7,5 die Präzipitate die richtige Größe aufweisen, um von der Zelle aufgenommen zu werden. Die HEK 293 Zellen werden am Tag vor der Transfektion passagiert und etwa semikonfluent auf 50 ml Gewebekulturflaschen ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion erhalten die Zellen exakt 5 ml frisches Komplettmedium, wodurch der Stoffwechsel der Zellen angeregt wird und somit die Transfektionseffizienz erhöht wird.

Die zu transfizierende DNA wird zunächst in 1 ml 1x HeBS (pH 7,12) verdünnt, wobei je 1 µg des CMV-β-Galaktosidase-Plasmids, je 2 µg des Reporteragen-Konstrukts und je 3 µg der zu co-transfizierenden Überexpressionsvektoren eingesetzt werden. Dem DNA-Gemisch werden langsam 50 µl CaCl₂ (2,5 M) hinzu pipettiert und während

einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Präzipitatbildung aus DNA und CaPO_4 . Dieses Gemisch wird auf die Zellen gegeben und für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das Präzipitat adheriert an den Zelloberflächen und wird von den Zellen aufgenommen. Um überschüssige Präzipitate zu entfernen, erfolgt erneut ein Mediumswechsel. Bei der transienten Transfektion werden die Zellen 48 h nach der DNA Zugabe in einem nahezu konfluenten Zustand geerntet.

4.2.3 Transiente Transfektion von *Xenopus* tissue culture (XTC) Zellen

Da die Transfektionsrate der Kalziumphosphat Methode in XTC Zellen sehr gering ist, wurde die Transfektion in diesen Zellen mithilfe eines Transfektionsreagenz (TransPassTM COS/293, New England Biolabs) durchgeführt, welches aus einem nicht-lipidischen kationischem Polymer besteht. Die Zellen sind zum Zeitpunkt der Transfektion 70-80% konfluent und die Transfektionsreaktion erfolgt in einem serumfreien Medium. Für die Transfektion in 6-well Platten wird 1 μg DNA mit 250 μl serumfreiem DMEM Medium (60% DMEM, 39% H_2O , 1% Pentamycin/Streptomycin) und 6 μl TransPass Reagenz vorsichtig vermischt. Nach einer 20-30 minütigen Inkubation wird der Transfektionskomplex in 1 ml Zellmedium gegeben und die Zellen für weitere 24-48 h inkubiert. Die transiente Transfektion für Reporteragen-Analysen erfolgt in einem entsprechend größerem Maßstab in kleinen Zellkulturflaschen. Insgesamt werden 6 μg DNA (entsprechend dem Ansatz in HEK 293 Zellen) mit 500 μl serumfreien DMEM Medium vermischt, 20-30 min inkubiert und auf ein Volumen von 2 ml Zellmedium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h können die Zellen für die Reporteragen Analyse geerntet werden.

4.2.4 Ernten von Gewebekultur-Zellen

Nach Ablauf von 48 h Inkubationszeit nach erfolgter Transfektion können die Zellen in einem konfluenten Zustand geerntet werden. Dazu wird das Medium abgenommen, die Zellen mit einem Schaber in 750 μl PBS/APBS abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die noch in der Gewebekulturflasche verbleibenden Zellen werden erneut in 750 μl PBS/APBS aufgenommen und mit den Zellen im

Reaktionsgefäß vereinigt. 900 µl dieser Zellsuspension werden für den β-Galaktosidase Assay eingesetzt, während 450 µl in den Luziferase Assay eingehen.

4.2.5 Reportergen-Analyse in Zellkultur

Ziel des transienten Transfektions-Assays in dieser Arbeit ist es, quantitative Aussagen über die Aktivität eines zu untersuchenden Promoters zu machen.

Hierfür wird der Promoter vor ein Reportergen kloniert, welches selbst keinen Promoter aufweist. Reportergene sind Enzyme, deren katalytische Aktivität in einer Chemilumineszens- oder Farbreaktion quantifiziert werden kann. Die „Firefly“ Luziferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) ist das am häufigsten verwendete Reportergen im Zellkultursystem. Ein generelles Problem beim Quantifizieren der Promoter-Aktivitäten ist die meist geringe und extrem schwankende Transfektionseffizienz. Daher werden die Zellen zusätzlich mit einem zweiten Vektor co-transfiziert, der ebenfalls ein Reportergen enthält (z.B. β-Galaktosidase). Der CMV-β-Galaktosidase-Vektor enthält dieses Reportergen und steht unter der Kontrolle eines ubiquitären, starken CMV-Promoters. Dieses Konstrukt dient als Transfektionskontrolle zur Normalisierung der Ansätze. Dies ermöglicht eine Aussage über die Aktivität des Promoters.

4.2.5.1 Messung der Luziferase-Aktivität

Das Enzym Luziferase produziert bei der Umsetzung des Substrates Luziferin zu Oxyluziferin Lichtquanten, die in einem Luminometer gemessen werden können. Das Luminometer detektiert die bei der Umsetzung des Substrates entstehenden Lichtblitze pro Sekunde und ermittelt daraus die relativen Lichteinheiten [RLU, relative light units]. Die Menge der Lichtquanten ist dabei der Enzymaktivität direkt proportional.

450 µl der Zellsuspension werden 5 min bei 5 000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 125 µl Lysepuffer resuspendiert und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer Kanüle (Ø 0,4 mm) homogenisiert. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität werden 20 µl des Zelllysates mit 100 µl Luziferase Test Reagenz gemischt.

4.2.5.2 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

900 μ l der Zellsuspension werden 5 min bei 5 000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 150 μ l 0,25 M Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert und auf dieselbe Weise wie die Zellen des Luziferase-Tests homogenisiert. Das Zelllysate wird kurz abzentrifugiert, um mögliche Zelltrümmer zu entfernen, die bei der späteren Messung im Spektralphotometer stören würden. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgt über eine Farbreaktion. Beim Abbau des Substrats o-Nitrophenyl- β -Glucopyranosid durch die β -Galaktosidase erfolgt eine Farbreaktion, die spektralphotometrisch gemessen werden kann. Dazu werden 60 μ l des Zelllysates mit 6 μ l 100x Mg-Lösung, 132 μ l 1x ONPG und 402 μ l 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 7,5 gemischt und bei 37°C inkubiert. Je nach Enzymmenge erfolgt eine leichte Gelbfärbung nach 5 min bis 2 h. Die Reaktion wird mit 1 ml 1 M NaHCO₃ Lösung gestoppt und bei $\lambda = 420$ nm im Spektralphotometer gemessen. Der lineare Bereich liegt dabei bei einer optischen Dichte von 0,2-0,8. Für den Nullwertabgleich dient eine Probe ohne Zelllysate. Die relativen Lichteinheiten aus der Luziferasemessung werden per Division durch die Absorptionsmessung aus dem β -Galaktosidase-Test normalisiert.

4.2.6 Reporteragen-Analyse im Embryo

Die Aktivität eines Reporteragens zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung, ihr zeitlicher Verlauf und der Einfluss bestimmter Faktoren auf die Reporteragen-Aktivität kann im Embryo analysiert werden. Dazu werden in beide Blastomere von *X. laevis* Embryonen im Zwei-Zell-Stadium insgesamt 200 pg des zu untersuchenden Promotorkonstrukts, 200 pg CMV- β -Galaktosidase-Vektor und gegebenenfalls 100 pg eines Überexpressionsvektors injiziert. Je zehn Embryonen werden im zu analysierenden Entwicklungsstadium in 150 μ l eiskaltem 0,25 M Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer Kanüle (\varnothing 0,4 mm) homogenisiert. Anschließend erfolgt eine zweiminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C. Von dem Überstand werden 20 μ l für den Luziferase-Test und 60 μ l für den β -Galaktosidase-Test, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, eingesetzt.

4.2.7 Statistische Auswertung der Reporteragen-Analyse

Pro Versuchsreihe erfolgt jede Transfektion als Vierfachbestimmung. Jede Versuchsreihe wird dabei mindestens zweimal wiederholt.

Die Mehrfachbestimmungen werden im F-Test auf Normalverteilung untersucht. Mögliche Ausreißer werden im Grubbs-Test ermittelt und gehen nicht in die Berechnungen mit ein. Hierbei wird für einen verdächtigen Wert die Prüfgröße PG berechnet, die den Abstand vom Mittelwert im Verhältnis zur Standardabweichung beschreibt. Ist dieses Verhältnis zu groß (größer als der entsprechende Wert in der Grubbs-Tabelle), wird der Vergleichswert als Ausreißer bezeichnet.

Signifikanzunterschiede zwischen den einzelnen Messungen werden im zweiseitigen Student t-Test geprüft.

4.2.8 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von XTC Zellen

Die nachzuweisenden Proteine wurden mit einem sechsfachen myc Tag fusioniert, über welches sie mit einem spezifischen primären Antikörper markiert werden können. Über einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper, der an die schwere Kette des primären Antikörpers bindet, lässt sich im Fluoreszenzmikroskop die subzelluläre Lokalisation des markierten Proteins ermitteln.

Sterile Deckgläschen werden in Gewebekulturschalen für ca. 30 min mit Alzianblau-Lösung beschichtet. Mit APBS wird die blaue Lösung solange abgewaschen bis keine Färbung mehr sichtbar ist. Daraufhin werden die Zellen semikonfluent auf die feuchten Deckgläschen ausgesät, über Nacht kultiviert und mithilfe des Transfektionsreagens TransPass mit dem Überexpressionskonstrukt transfiziert.

Alle bei der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzten Lösungen werden vor dem Gebrauch durch einen Faltenfilter filtriert. Zwei Tage nach der Transfektion werden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer überführt. Dort wird langsam von Kompletmedium auf APBS/Ca²⁺ umgepuffert und die Zellen werden für 10 min mit 4%iger PFA-Fixierlösung bei Raumtemperatur fixiert.

Anschließend werden PFA-Reste mit APBS/Ca²⁺ gründlich abgewaschen. Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wird die Membran durch 8 minütiges Einwirken von 0,1% Triton X-100 in APBS/Ca²⁺ permeabilisiert. Tritonreste werden in APBS/Ca²⁺ in

drei Waschschritten abgewaschen. Unspezifische Bindungsstellen und freie Glasstellen werden während 30 min bei Raumtemperatur mit 1% BSA in APBS/Ca²⁺ blockiert. Der primäre Antikörper (9E10, Anti myc-Epitop) wird 15 min bei 13 000 rpm und 4°C abzentrifugiert und unverdünnt (aus Zellkulturüberstand) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. Ungebundener Antikörper wird durch viermaliges Waschen mit APBS/Ca²⁺ entfernt. Anschließend wird mit dem Sekundärantikörper (GAM-Cy3, 1:400 verdünnt) 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wird mit APBS/Ca²⁺ abgewaschen. Zur Visualisierung der Kerne werden die Zellen für 5 min mit DAPI-Gebrauchslösung behandelt. Nach Anregung bei $\lambda = 365$ nm emittiert in DNA interkaliertes DAPI Licht der Wellenlänge $\lambda = 420$ nm. Auf Objektträgern wird je ein Tropfen Elvanol vorgelegt. DAPI wird mit APBS/Ca²⁺ entfernt, die Deckgläschen werden kurz in aqua bidest. eingetaucht und verbleibende Flüssigkeitstropfen auf Filterpapier abgestreift. Mit dem Zellrasen nach unten wird das Deckglas auf den Elvanoltropfen gelegt, ohne dass Luftblasen eingeschlossen werden. Man lässt die Präparate möglichst über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln trocknen und dokumentiert das Ergebnis am Fluoreszenzmikroskop.

4.2.9 Chromatin Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) Technik lässt sich die Assoziation von Transkriptionsfaktoren an einen bestimmten genomischen Bereich *in vivo* verfolgen. Die Methode umfasst die Fixierung der Proteine an die DNA, die Fragmentierung der Chromatin DNA (z.B. durch Ultraschallbehandlung), die Immunpräzipitation der zu untersuchenden Transkriptionsfaktor/DNA-Komplexe, sowie die Aufreinigung und Analyse der präzipitierten DNA Fragmente via PCR (Abb. 4.6).

Die Chromatin Immunpräzipitation wird in *Xenopus* Tissue Culture (XTC) Zellen durchgeführt. Dazu wird das Vollmedium einer konfluenten 50 ml Zellkulturflasche durch 5 ml serumfreies, formaldehydhaltiges (Endkonzentration = 1%) Medium ersetzt und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit eiskaltem APBS gewaschen und in 1,5 ml APBS aufgenommen und für 5 min bei 5 000 rpm bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wird nun in 200 μ l Lyse Puffer resuspendiert und mit einer feinen Kanüle (\varnothing 0,4 mm) gut

homogenisiert. Zur vollständigen Lyse lässt man die Zellen 10 min auf Eis stehen. Zur Fragmentierung des Chromatins wird die Zellsuspension fünfmal für je zehn Sekunden mit Ultraschall (75-80% Intensität) behandelt. Durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C werden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und Aliquots für eine DNA-Gelelektrophorese, sowie für den Proteininput des Western Blots abgetrennt. Der restliche Überstand wird mit ChIP Verdünnungspuffer auf 2 ml aufgefüllt. Danach erfolgt ein Aufreinigungsschritt durch die Zugabe von 70 µl blockierter Protein G Sepharose für 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehrad. Anschließend werden die Sepharose-Beads durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 2 000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird über Nacht mit dem α-β-Catenin Antikörper (7D12) bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgt am nächsten Tag durch Zugabe von 70 µl blockierter Protein G Sepharose für zwei Stunden bei 4°C auf dem Drehrad. Die Sepharose-Beads mit den über den Antikörper gebundenen DNA/Protein Komplexen werden durch Zentrifugation (2 Minuten, 2 000 rpm, 4°C) pelletiert und über mehrere Waschschriffe mit ansteigender Salzkonzentration gewaschen. Inkubiert wird für 15 min bei 4°C auf dem Drehrad jeweils zweimal mit 1 ml der folgenden Puffer: Lyse-Puffer mit 0,1% SDS, Lyse-Puffer mit 0,1% SDS und 500 mM NaCl, LiCl-Puffer und TE-Puffer. Zwischen jedem Waschschriff werden die Sepharose-Beads für zwei Minuten bei 2 000 rpm und 4°C pelletiert. Die Elution der gebundenen Protein/DNA Komplexe erfolgt durch zweimalige Zugabe von 250 µl frisch angesetztten Elutionspuffers (1% SDS, 0,1 M NaHCO₃). Um die Protein/DNA Vernetzung wieder aufzuheben, werden die Proben mit 20 µl 5 M NaCl Lösung (Endkonzentration 200 mM) versetzt und über Nacht bei 65°C geschüttelt. Am nächsten Morgen können die Proben bei -20°C eingefroren werden. Ein Aliquot zur Überprüfung der Immunpräzipitation wird für eine Western Blot Analyse abgenommen. In der restlichen Probe werden RNA und Proteine enzymatisch verdaut. Bei 37°C erfolgt zunächst ein 30-minütiger RNase Verdau mit 1 µl RNase A (1 mg/ml), gefolgt von einem zwei-stündigen Proteinase K (20 mg/ml) Verdau. Dafür gibt man zu jedem 500 µl Ansatz 10 µl 0,5 M EDTA (Endkonzentration 10 mM), 10 µl 2 M Tris pH 6,8 (Endkonzentration 40 mM), und 2,5 µl Proteinase K. Die DNA wird über eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt. Das DNA Präzipitat wird zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 50 µl aqua bidest. resuspendiert.

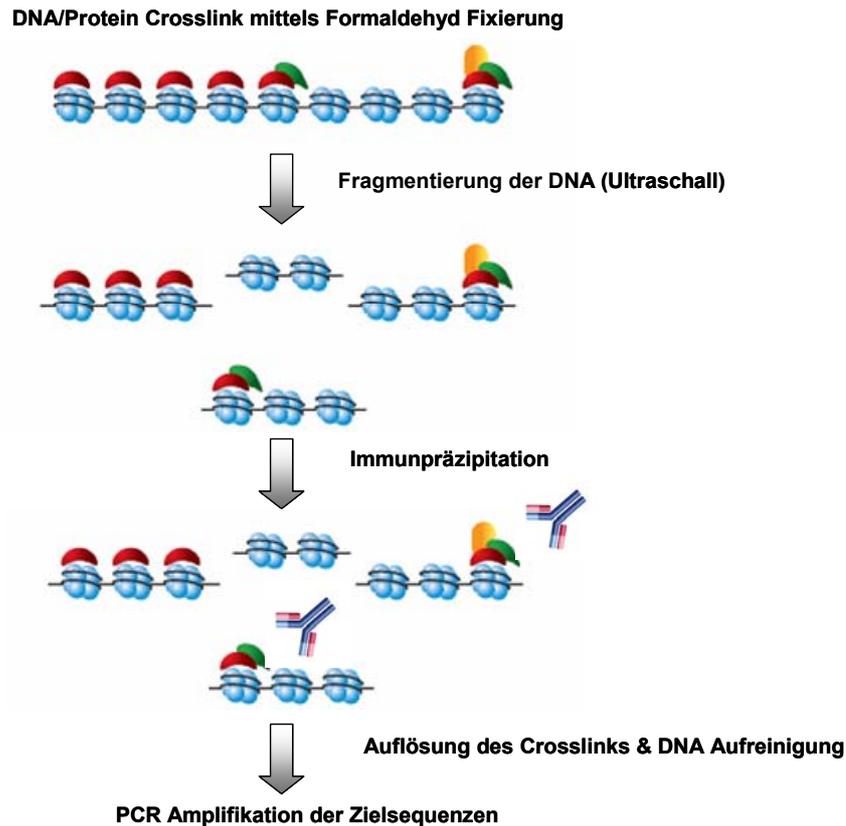


Abb. 4.6 Schematischer Ablauf der Chromatin Immunpräzipitation (ChIP). Chromatin assoziierte Proteine werden mit der DNA durch Formaldehyd vernetzt und die DNA in ca. 500 bp große Stücke fragmentiert. Über die an die DNA gebundenen Proteine erfolgt eine Immunpräzipitation. Die so gewonnene DNA wird nach Auflösung der DNA/Protein Vernetzung aufgereinigt und mittels PCR analysiert.

Die so gewonnene DNA kann nun über die sensitive PCR Methode analysiert werden. Hat man bereits eine Vermutung, an welche DNA Sequenz der präzipitierte Transkriptionsfaktor binden könnte, kann diese mit entsprechenden Primern überprüft werden, die die putative Bindestelle flankieren. Erhält man damit in der PCR Reaktion ein Amplifikat, so bedeutet dies, dass durch die direkte Immunpräzipitation des Transkriptionsfaktors oder alternativ durch indirekte IP eines an den Transkriptionsfaktor bindenden Proteins (wie z.B. β -Catenin) der assoziierte Chromatin Bereich präzipitiert wurde.

4.2.10 TNT[®] *in vitro*-Translation

Proteine können durch das TNT[®] *in vitro*-Translation Kit (Promega) synthetisiert werden. Mit dieser Methode kann unter anderem die Funktionalität eines Morpholino-Oligonukleotids getestet bzw. gezeigt werden. Das Reticulocytenslysat beinhaltet Ribosomen, die *in vitro*-transkribierte RNA translatieren. Dabei wird radioaktiv

markiertes ^{35}S -Methionin eingebaut, durch das das Protein später anhand eines Phosphoimagers (BAS1500, Fujifilm) detektiert werden kann.

Für einen 50 μl TNT[®]-Ansatz werden 25 μl Reticulocytenlysate, 2 μl Reaktionspuffer, 1 μl T7-RNA-Polymerase, 1 μl Aminosäure-Mix ohne Methionin, 2 μl ^{35}S -Methionin (1200 Ci/mmol), 1 μl RNase-Inhibitor und 1 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) benötigt. Das restliche Volumen wird mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Für den Morpholino-Funktionstest wurden in der vorliegenden Arbeit je 10 μl Morpholino-Oligonukleotide (300 nM) verwendet. Die Reaktion läuft für zwei Stunden bei 30°C. Anschließend wird der Ansatz mit 10 μl 5x SDS-Ladepuffer versetzt und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels über Nacht kann das radioaktiv markierte Protein mithilfe des Phosphoimagers detektiert werden.

4.2.11 Proteinextraktion aus Embryonen

Je 10 Embryonen werden in 75 μl NOP-Puffer (mit Protease-Inhibitoren versetzt) mithilfe einer Kanüle (\varnothing 0,4 mm) auf Eis homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wird 1 Volumen Freon (1,1,2-Trichlortrifluorethan von Merck) zugesetzt, um Dotterlipide abzutrennen. Nach sorgfältigem Durchmischen wird der Reaktionsansatz zehn Minuten bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, fünf Minuten lang mit 5x SDS-Ladepuffer bei 95°C gekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.2.12 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgt die Trennung der Proteine im elektrischen Feld in einem denaturierenden Puffer. Die Proteine werden nur nach ihrer Größe aufgetrennt, denn das ionische Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) bildet mit den meisten löslichen Proteinen und Membranproteinen lösliche Komplexe in konstanten Massenverhältnissen mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit. Die negative Ladung verhält sich proportional zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts des Proteins, wodurch man einen linearen Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit der Polypeptidketten und dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts erhält. Dadurch lässt sich die Masse von Proteinen bestimmen. Dithiothreitol (DTT) bzw. Mercaptoethanol führt

zum Bruch der Disulfidbrücken. Als Größenmarker dienen Proteine mit einem definierten Molekulargewicht. Bei der SDS-PAGE wird ein Polyacrylamidgel verwendet. Dieses besitzt nach der Zugabe von N,N-Methylen-bisacrylamid eine dreidimensionale Vernetzung. Die Größe der dabei entstehenden Poren hängt vom Mengenverhältnis zwischen Polyacrylamid und Bisacrylamid ab. Als Katalysator und Stabilisator der Radikale wird TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese passiert die Protein-Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Der Sammelpuffer enthält Chlorid-Ionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteinprobe. Der Elektrophorese-Puffer enthält dagegen Glycin-Ionen die langsamer wandern. Die Proteine reihen sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im elektrischen Feld zwischen den Glycin-Ionen mit einer niedrigen und den Chlorid-Ionen mit einer hohen Mobilität ein. Durch diese Vortrennung und Aufkonzentrierung kann eine scharfe Protein-Bande erzeugt werden. Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel. Beim Einwandern der Protein-Proben in das Gel werden die großen Proteine zunächst zurückgehalten bis die Glycin-Ionen vorbeigewandert sind. Im Puffersystem des Trenngels werden die Proteine dann auf Grund ihrer molekularen Größe getrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für 10 ml eines 8%igen Trenngels 2,7 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) und 0,1 ml SDS (10%) sowie 4,6 ml aqua bidest. verwendet, für 4 ml eines 5%igen Sammelgels wurde 0,67 ml 30% Acrylamid, 0,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) und 0,04 ml 10% SDS sowie 2,7 ml aqua bidest. eingesetzt. Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 100 µl APS und 6 µl TEMED zum Trenngel bzw. 40 µl APS und 4 µl TEMED zum Sammelgel gestartet.

Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten bis ca. 1 cm unterhalb der oberen Kante im Gelgießstand gegossen und dann mit Aqua bidest. überschichtet. Ist das Trenngel ausgehärtet, kann das darüber stehende Wasser wieder abgenommen werden. Über das Trenngel wird nun das Sammelgel gegossen und ein Kamm für die Ladetaschen in das noch flüssige Gel gesteckt. Die Gelelektrophorese-Kammer wird mit 1x Elektrophoresepuffer mit 0,1% SDS gefüllt. Das ausgehärtete, zwischen den Glasplatten eingespannte Gel wird in die Gel-Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wird der Kamm gezogen und die

entstandenen Taschen durch Ausspülen mit Elektrophorese-Puffer gereinigt. Anschließend können die Proteinproben in die Taschen geladen und das Gel zunächst mit 80 V gestartet werden. Sind die Proben ins Trenngel gelaufen, erhöht man die Spannung auf 100 V und lässt die Elektrophorese fortfahren bis die Probenpufferbande bis zum unteren Ende des Gels gelaufen ist. Nach dem Abstoppen der Elektrophorese entnimmt man das zwischen den Glasplatten eingespannte Gel der Kammer und hebt die kleinere Glasplatte vom Gel ab. Das Sammelgel wird entfernt und das Trenngel für die Proteinanalyse durch Western Blot weiterverwendet.

4.2.13 Proteinanalyse mittels Western Blot

Die Western Blot Analyse ist eine sehr sensitive Technik, mit deren Hilfe ein spezifisches Protein im picomolaren Bereich detektiert werden kann. Unter Western Blot versteht man den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Nitrocellulose oder auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF). Auf dem Gel sind die Proteine noch relativ beweglich, sodass sie schnell ausgewaschen werden können. Die Membran ist hydrophob und besitzt eine gleichmäßige Porenstruktur. Die Proteine sind auf der Membran bewegungsunfähig und so leichter für Antikörper zugänglich. Der Transfer erfolgt mittels der „wet-Blot“-Methode im elektrischen Feld. Anschließend werden die Proteine mittels eines Antikörper-Komplexes nachgewiesen. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert, bei der es zur Lichtemission kommt.

Für den wet-Blot bereitet man ein Sandwich bestehend aus einer Lage Vlies, zwei Watman-Filterpapieren, dem Gel, der PVDF-Membran, zwei weiteren Watman-Filterpapieren und einer abschließenden Lage Vlies vor. Dabei ist das Gel der Kathode zugerichtet und die Membran der Anode. Das Sandwich muss blasenfrei gehalten und mit 1x Elektrophorese-Puffer und 10% Methanol feucht gehalten werden. Der eigentliche Transfer erfolgt für ca. 1,5 Stunden bei 111 Volt und 0,3-0,4 Ampère in der eisgekühlten Blotapparatur. Anschließend wird die PVDF-Membran zunächst mit dem Farbstoff Ponceau S für ca. 30 Sekunden gefärbt. Diese Färbelösung wird mit aqua bidest. wieder abgespült und die sichtbaren Banden des Molekulargewichtsmarkers mit einem Kugelschreiber auf der Membran eingezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteinstandard SDS-6H2 der Firma Sigma

verwendet, der Proteine mit den folgenden definierten Molekulargewichten enthält: 29 kDa, 45 kDa, 66 kDa, 97,4 kDa, 116 kDa und 205 kDa. Anschließend wird die Membran für fünf Minuten mit PBST gewaschen und eine Stunde mit 5%igem Magermilchpulver in PBST blockiert. Danach wird die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen, in eine Plastiktüte eingeschweißt und bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper (anti-myc 9E10 bzw. anti-β-Catenin 7D12, beide unverdünnt) inkubiert. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper für die Wiederverwendung zurückgewonnen und die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Ratte Antikörper, 1:20 000 in 1x PBS verdünnt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit wird die Membran erneut für dreimal zehn Minuten mit PBST gewaschen. Zum Nachweis der spezifischen Proteine mit Hilfe des sekundären Antikörpers wird die von der Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz untersucht. Als Substrat für die Reaktion werden zwei Lösungen aus dem ECL+plus Western Blotting Detection System-Kit im Verhältnis 1:40 gemischt und auf die PVDF-Membran gegeben. Mit einer CCD-Kamera der DIANA II wird die auf der Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol beruhende Chemilumineszenz dokumentiert.

4.3 Entwicklungsbiologische Methoden

4.3.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Die ca. 400 Frösche des Zoologischen Instituts II werden in Gruppen von maximal zehn adulten Tieren nach Geschlechtern getrennt in 100 Liter fassenden Aquarien bei einer Wassertemperatur zwischen 18°C und 20°C gehalten. Das in der Anlage zirkulierende Wasser wird mit Hilfe eines Bakterienfilters und durch UV-Bestrahlung entkeimt. Die Tiere erhalten über eine Zeitschaltuhr gesteuert 12 Stunden Licht pro Tag. Gefüttert werden sie zweimal pro Woche mit Fertigfutter, dazu kommt einmal wöchentlich klein geschnittenes Rinderherz.

Um Hautreizungen und Infektionen möglichst gering zu halten, werden die Weibchen nach ihrer Eiablage über Nacht in einem Salzwasserbad aus 3 g/l Meersalz gehalten,

bevor sie am nächsten Tag zurück in die Aquarien gesetzt werden. Zwischen den Eiablagen liegt eine dreimonatige Schonfrist, in der keine erneute Eiablage induziert wird.

4.3.2 Eiablage

Bei *Xenopus laevis* kann die Eireifung durch subkutane Injektion des humanen Hormons Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack der Tiere induziert werden. Soll die Eiablage morgens erfolgen, so injiziert man dem Tier am Abend zuvor (etwa 14-16 h vor der gewünschten Ablagezeit) 600 Einheiten hCG. Tiere, deren Eier am Nachmittag benötigt werden, werden zweimal injiziert. Am Vorabend erhalten sie 50 Einheiten hCG und am nächsten Morgen, etwa sechs Stunden vor der gewünschten Ablagezeit noch einmal 600 Einheiten. Zur Eiablage selbst wird das Weibchen im Froschgriff gehalten. Mit der freien Hand wird die Lendenregion sanft massiert, wobei die Bewegung Richtung Kloake ausgeführt wird. Die aus der Kloake austretenden Eier werden in einer Petrischale aufgefangen. Die Eiablage kann stündlich, jedoch höchstens viermal hintereinander pro Weibchen durchgeführt werden. Für die weiteren Experimente werden nur gesunde Gelege mit reifen Eiern und normaler Gallerthülle verwendet.

4.3.3 Testisextraktion

Die Betäubung eines Männchens erfolgt durch Umsetzen in eine eiskalte 0,25% (v/v) Aminobenzoesäure-Ethylester-Lösung. Nach ca. 20-25 Minuten kann das narkotisierte Tier durch ein schnelles Durchschneiden der Halswirbelsäule getötet werden. Zusätzlich wird der Rückenmarkskanal mit einer Kanüle ausgebohrt. Die Bauchdecke wird durch einen medianen Schnitt geöffnet. Die Hoden liegen als hellgelbe, ovale Körper im dorsalen Fettgewebe ventral der Nieren. Nach ihrer Präparation werden sie von Fett- und Blutresten gereinigt und in 1x MBSH bei 4°C gelagert. So können aus ihnen für maximal sieben Tage Spermien guter Qualität gewonnen werden.

4.3.4 *In-vitro* Fertilisation

Durch *in-vitro* Fertilisation wird eine gleichmäßige und synchrone Entwicklung möglichst vieler Embryonen sichergestellt. Dazu wird etwa ein Drittel des Hodens in 1 ml 1x MBSH mazeriert. 100 µl dieser Suspension werden mit 900 µl sterilem aqua bidest. verdünnt und auf das frische Gelege gegeben. Nach ca. 20 Minuten äußert sich eine erfolgreiche Befruchtung durch eine Drehung der Eier, so dass die pigmentierte animale Seite der Oberfläche zugewandt ist. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wird das Gelege mit 0,1x MBSH überschichtet.

4.3.5 Entfernen der Gallerthülle

Frühstens eine Stunde nach der Befruchtung, aber vor Beginn der ersten Zellteilung werden die Eier durch eine maximal fünfminütige Behandlung mit einer 2%-igen Cysteinhydrochlorid-Lösung (pH 8,2) von ihrer Gallerthülle befreit. Mit Hilfe zweier Pipettenspitzen, die durch das Gelege geführt werden, kann der Prozess der Vereinzelung mechanisch unterstützt werden. Haften keine Zygoten mehr aneinander, werden sie zur Entfernung des verbliebenen Cysteinchlorids dreimal gründlich mit 0,1x MBSH gewaschen. Offensichtlich beschädigte oder unbefruchtete Eier werden aus dem Gelege entfernt. Die vereinzelter Eier sind nun für eine Manipulation von außen zugänglich.

4.3.6 Anfärben von unpigmentierten Eiern

Um die Entwicklung der unpigmentierten Eier von Albinos besser beobachten zu können, werden diese nach Entfernung der Gallerthülle für ca. 10 Minuten in Nilblau-Färbelösung angefärbt. Anschließend werden auch sie mehrmals mit 0,1x MBSH gewaschen.

4.3.7 Mikroinjektion

Mit Hilfe der Mikroinjektion lassen sich sehr geringe Mengen an Molekülen (wie z.B. DNA, RNA oder Morpholino Oligonukleotide) definiert in Embryonen verschiedener

Entwicklungsstadien einbringen, wodurch Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Studien durchgeführt werden können. Das Injektionsvolumen wird über ein genormtes Platinnetz auf 4 nl geeicht, wobei das abgegebene Flüssigkeitsvolumen vom Durchmesser der Kapillarenöffnung und der Injektionsdauer abhängt. Die applizierte Molekülkonzentration, sowie Ort und Zeit der Injektion richten sich nach der jeweiligen Fragestellung des Experiments. Zur Betrachtung der Überexpressions- und Depletions-Phänotypen in der Ganzkeimfärbung wird in den animalen Pol einer Blastomere eines Embryos im Zwei- bzw. Vier-Zellstadium injiziert. Dadurch kann die injizierte Seite mit der nicht-injizierten Seite innerhalb eines Embryos verglichen werden. Erfolgt die Analyse dagegen im Western Blot oder im Luminometer, wird die mRNA, bzw. die Reporter-genkonstrukte in beide Blastomere appliziert.

Während durch die Teilungsebene im Zwei-Zellstadium die zukünftigen Körperhälften entlang des Medians getrennt sind, können in Embryonen ab dem Vier-Zellstadium dorsale und ventrale Bereiche unterschieden werden. Zur Untersuchung von spezifischen Phänotypen, die die spätere Kopfregeion betreffen, wird entweder im Vier-Zellstadium dorsal injiziert oder im 16-Zellstadium in eine der dorsal-animalen Blastomeren. Dabei tragen die Abkömmlinge der dorsal-animalen Blastomere vorwiegend zu den Geweben des ZNS, der Zementdrüse, dem anterioren Mesoderm und Endoderm bei.

Zur Injektionskontrolle wird die Injektionslösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dextran (Endkonzentration $1/25 = 4 \text{ pg}$) versetzt. Dadurch kann man die im Zwei-Zellstadium einseitig injizierten Embryonen ab dem Neurula Stadium nach rechts- bzw. linksseitig injiziert sortieren (Abb. 4.7).

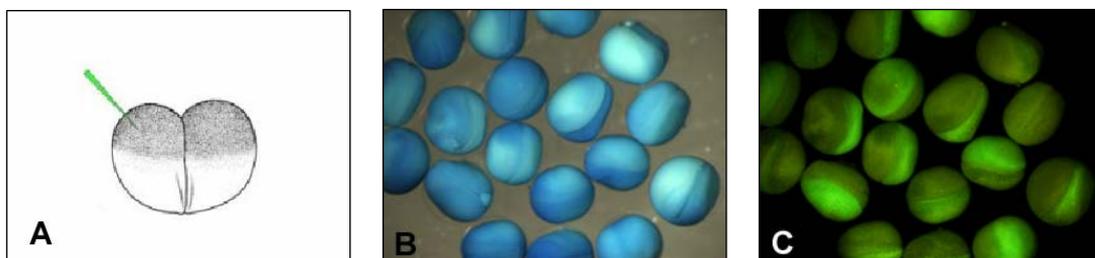


Abb. 4.7. Links/rechts Sortierung von *Xenopus laevis* Embryonen im Neurulastadium (St.18). Den Embryonen wurde im Zwei-Zellstadium in eine Blastomere der Fluoreszenzfarbstoff Dextran co-injiziert (A). Die Hellfeldaufnahme zeigt mit Nilblau angefärbte Albino Embryonen (B). Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mit UV-Licht leuchtet die injizierte Hälfte des Embryos und kann aufgrund der vorhandenen Neuralstrukturen als linke, bzw. rechte Körperseite eindeutig identifiziert werden (C).

Für die weiteren Experimente werden nur Embryonen ausgewählt, die eine ausgeprägte einseitige grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Embryonen werden bis zum Erreichen des gewünschten Entwicklungsstadiums in 0;1x MBSH bei 18°C inkubiert. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber (1967).

4.3.7.1 Mikroinjektion von EGFP-Reportergenkonstrukten

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) lässt sich als Reportermolekül zur Überwachung der Genexpression einsetzen, da es einfach durch blaues oder ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann. GFP ist ein spontan fluoreszierendes Protein aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria*, das erstmals 1962 von Osamu Shimomura beschrieben wurde [Shimomura et al., 1962]. Da die GFP cDNA einfach kloniert und als funktionales Transgen in anderen Organismen exprimiert werden kann, dient GFP als nützliches Werkzeug zur Untersuchung von räumlichen und zeitlichen Genexpressionsmustern in Zellen, Geweben und lebenden Organismen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) benutzt, welches eine in den roten Absorptionsbereich verschobene Variante des Wildtyp GFPs kodiert und daher eine stärkere Fluoreszenz und eine höhere Expressionsrate aufweist.

Es werden verschiedene *XTcf-4* Promotorkonstrukte vor das EGFP-Gen kloniert und in eine Blastomere im Zwei-Zellstadium injiziert. Somit steht die zeitliche und räumliche Expression des EGFPs unter der Kontrolle der regulatorischen *XTcf-4* Sequenzen. Das EGFP-Signal wird über einen Zeitraum von einer Woche mit einem Fluoreszenz-Binokular (MZFLIII der Firma Leica) verfolgt. Zur Dokumentation wird die Software Openlab 3.1.1 und die Digitalkamera Retiga Color 12 bit der Firma QImaging eingesetzt.

4.3.8 Gen-Suppression durch Morpholino antisense Oligonukleotide

Eine weitverbreitete Methode zum gezielten Ausschalten eines Gens stellt die *knockout* Technologie dar. *Xenopus laevis* besitzt ein pseudo-tetraploides Genom, wodurch ein *knockout* nahezu unmöglich ist. Um dennoch die Expression eines

Zielgens herunterzuregulieren, bedient man sich der sogenannten *antisense*-Technologien.

In der vorliegenden Arbeit wurden Morpholino antisense Oligonukleotide (MO) eingesetzt. Sie stellen chemisch modifizierte Nukleinsäure-Analoga dar. Gegenüber Nukleinsäuren, die ein Ribose- oder Desoxyribose-Rückgrat besitzen, sind sie durch einen heterozyklischen Morpholinring charakterisiert. Zusätzlich besitzen die Phosphatbrücken eine Amidatgruppe, sodass sie im Gegensatz zur DNA ungeladen sind (Abb. 4.8).

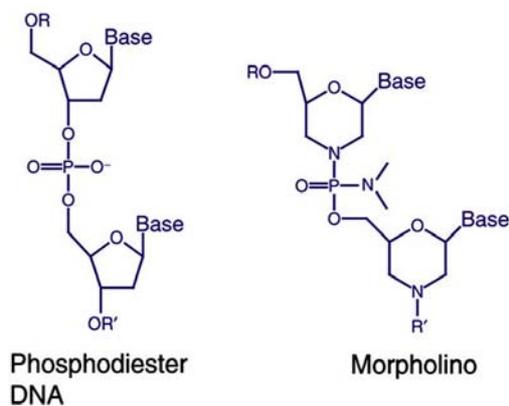


Abb. 4.8. Unterschied zwischen DNA- und Morpholino-Nukleotide [Corey und Abrams, 2001].

Um die Funktion eines Gens im sich entwickelnden Embryo zu charakterisieren, werden zu der endogenen RNA komplementäre MOs injiziert. Diese lagern sich im Bereich des Startkodons an die Ziel-RNA an und bilden gemeinsam mit ihr einen Doppelstrang. Da Ribosomen nicht an einen RNA-Doppelstrang binden können, wird die Translation gehemmt. Somit kann die Expression des maternalen mRNA Pools sehr effektiv unterdrückt werden, während späte Effekte aufgrund der Verdünnung der MO-Konzentration mit zunehmenden Zellteilungen, nur bedingt erzielt werden können. Man spricht daher von einem *knockdown* statt einem *knockout*.

Der chemisch modifizierte Aufbau der MO bietet viele Vorteile: Die MO binden durch Watson-und-Crick-Basenpaarungen sehr effektiv an die Ziel-RNA und zeigen zusätzlich wenig Tendenz zu unspezifischen Basenpaarungen. Des Weiteren besitzen sie im Embryo eine hohe Stabilität, da sie von endogenen Nukleasen nicht erkannt und somit nicht abgebaut werden. Da ihr Rückgrat durch die Amidatgruppe ungeladen ist, reagieren sie kaum mit intrazellulären Proteinen.

4.3.9. Generierung transgener *Xenopoden*

4.3.9.1 Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI)

Kristen Kroll und Enrique Amaya entwickelten 1996 erstmals eine effiziente Methode, um DNA stabil in die Keimbahn von *X. laevis* und *X. tropicalis* einzubringen (Kroll und Amaya, 1996). Dabei wird die Integration eines Reportergens in Spermienzellkerne durch die Zugabe eines „Interphasen“ Eiextraktes und einer Restriktionsendonuklease vermittelt. Unbefruchtete *Xenopus* Eier sind in der Metaphase der zweiten meiotischen Teilung arretiert. Der daraus unter Cyclin degradierenden Bedingungen gewonnene Eiextrakt besitzt „Interphasen“ Charakter. Das im Eicytoplasma enthaltene Nucleoplasmin bewirkt eine partielle Dekondensation des Spermien Chromatins und die Restriktionsendonuklease erleichtert durch Doppelstrangbrüche im Chromatin die Insertion des mit demselben Enzym geschnittenen DNA Fragments. Die so genetisch veränderten Nuclei werden in unbefruchtete Eizellen transplantiert. Da das DNA Konstrukt bereits vor der Befruchtung in das männliche Genom integriert wird, erzielt diese Methode eine sehr hohe Transmissionsrate (Abb. 4.9).

Präparation des Interphasen Eiextrakts

Der Interphasen Eiextrakt wurde, wie in Murray et al. (1991) beschrieben, präpariert. Durch CSF (crude cytostatic factor) wird ein Zellzyklusarrest in der meiotischen Metaphase bewirkt. Die Zugabe von Kalzium überführt den Eiextrakt in die Interphase. Durch eine Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation erhält man eine sehr reine cytoplasmatische Fraktion.

Für die Präparation des Eiextraktes werden 8-12 Weibchen zur Eiablage stimuliert. Diese erfolgt über Nacht in 1x MMR, durch dessen hohe Salzkonzentration die Eier inaktiv und gesund bleiben. Die Gallerthülle der Eier wird entfernt und es werden nur Gelege mit gesunden Eiern weiterverwendet. Die Eier werden gründlich (fünf Mal) mit 1x Extract Buffer (XB) gewaschen. Anschließend werden sie zweimal mit 35 ml CSF-XB (mit Protease Inhibitoren) gewaschen und in Zentrifugationsröhrchen überführt. Das CSF-XB wird komplett abgezogen und die Eier für 10 Minuten bei 10 000 rpm und 2°C zentrifugiert, wobei sich drei Phasen bilden: In der Unteren sammeln sich Dotterproteine, in der Oberen die Lipide und dazwischen liegt die

cytoplasmatische Fraktion, welche vorsichtig mit einer Spritze abgenommen wird. Dieser Fraktion wird nun CaCl_2 in einer Endkonzentration von 0,4 mM zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Dadurch wird das CSF inaktiviert und der Eiextrakt in die Interphase überführt. Anschließend erfolgt die Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation für 90 Minuten bei 70 000 rpm und 4°C. Nach dieser Zentrifugation erhält man vier Schichten (von oben nach unten): Lipide, Cytoplasma, Membranen/Mitochondrien, Glykogen/Ribosomen. Die cytoplasmatische Fraktion wird mit einer Spritze abgenommen und erneut für 20 Minuten bei 70 000 rpm zentrifugiert. Der Interphasen Extrakt wird aliquotiert (je 15 μl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Präparation der Spermien-Zellkerne

Die Testisextraktion erfolgt wie unter Kapitel 4.3.3 beschrieben. Allerdings wird anstelle von 1x MBSH, 1x MMR verwendet. Für die Präparation von *X. laevis* Zellkernen sind die Spermien eines Hodens ausreichend, wohingegen man für die *X. tropicalis* Präparation 6-8 Hoden benötigt. Der isolierte Hoden wird rückstandsfrei von Fettkörpern und Blut gereinigt und in eine neue Petrischale mit 5 ml eiskaltem 1x Nuclear Preparation Buffer (NPB) überführt und für 2-5 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Hoden in einer neuen Petrischale mit zwei sauberen Pinzetten mazeriert und in 2 ml 1x NBP gründlich resuspendiert. Diese Suspension wird durch zwei bis vier Lagen eines Sehtuches gespritzt, und das Tuch mit 8 ml 1x NBP gewaschen und die Restflüssigkeit gründlich mit den Fingern aus dem Sehtuch gedrückt. Die Spermien werden während einer zehninütigen Zentrifugation bei 3 000 rpm und 4°C sedimentiert und der Überstand wird verworfen. Die Spermien werden in 1 ml 1x NBP resuspendiert, mit 50 μl L- α -Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin 10 mg/ml) versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 10 ml eiskalter 1x NBP + 3% BSA zugegeben und für 10 Minuten bei 3 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellkerne in 5 ml 1x NBP + 0,3% BSA resuspendiert und erneut sedimentiert. Nun werden die Zellkerne in 250 μl Sperm Storage Buffer (SSB) resuspendiert und bei 4°C für maximal 48 Stunden gelagert. 2 μl der Zellkern-Suspension wird mit Sperm Dilution Buffer (SDB) auf ein Volumen von 200 μl verdünnt und mit 2 μl einer 1:100 verdünnten Hoechst-Lösung versetzt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Zellkerne in einem Hämacytometer gezählt. Anschließend wird anhand dieser

Zählung eine Konzentration von ca. 125-200 Zellkerne / nl für die Zellkern-Suspension eingestellt.

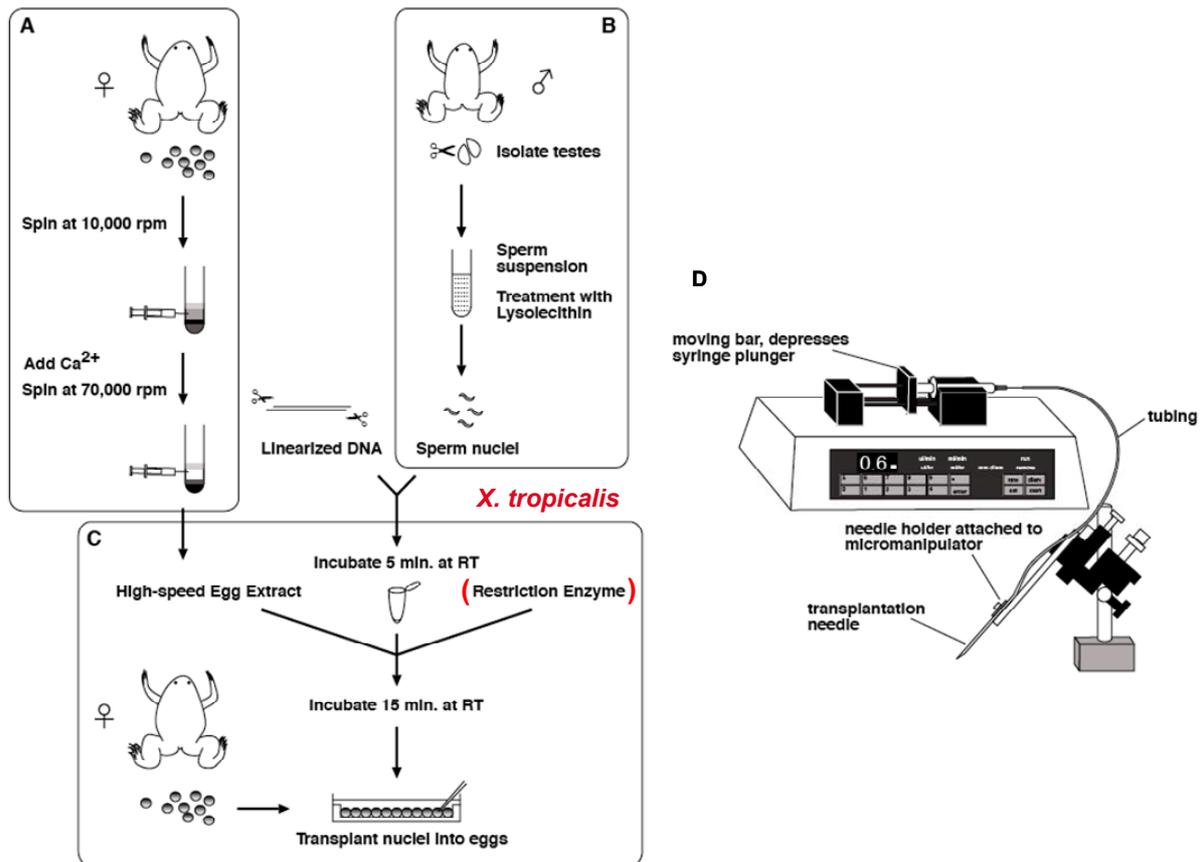


Abb. 4.9. Schematischer Ablauf der REMI Methode. Durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation wird aus den Eiern ein cytosolischer Extrakt gewonnen (A). Aus den Testikeln werden die Spermienzellkerne isoliert und ihre Membran permeabilisiert (B). Das linearisierte DNA Fragment wird kurz mit den permeabilisierten Spermienzellkernen inkubiert und anschließend mit einer geringen Menge der Restriktionsendonuklease (die Zugabe ist bei *X. tropicalis* nicht erforderlich) und dem Eiextrakt gemischt. Es erfolgt eine partielle Dekondensation des Spermien Chromatins durch den Eiextrakt. Die durch das Restriktionsenzym eingeführten Doppelstrangbrüche erleichtern die Integration des Transgens. Die manipulierten Zellkerne werden nun einzeln in unbefruchtete Eier transplantiert (C). Die Transplantation der Zellkerne erfolgt über ein ölgefülltes Injektionssystem (D). [Verändert nach E. Amaya, Transgenesis Protocol].

Präparation der DNA und Integration in den Spermienzellkern

Das zu integrierende DNA Fragment wird durch ein geeignetes Restriktionsenzym aus dem Vektor geschnitten, über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Seine Konzentration wird auf 150-250 ng/ μl eingestellt.

4 μl der Zellkern Suspension (ca. 4×10^5 Nuclei) werden mit 2,5 μl der linearisierten DNA gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 18 μl SDB, 2 μl des Eiextraktes, 2 μl 100 mM MgCl_2 und 0,5 μl einer 1:10 Verdünnung des Restriktionsenzymys zugegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer abgeschnitten gelben Spitze gemischt. Der Ansatz wird

für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die am Vorabend mit HCG injizierten Weibchen zur Eiablage stimuliert. Die Eier werden unverzüglich cysteinisiert und gründlich mit 1x MMR gewaschen. Anschließend werden sie in mit 0,4x MMR und 6% Ficoll gefüllten Agaroseschalen, die mittig vier-eckige Vertiefung aufweisen, überführt (ca. 500 Eier pro Schale). Es erfolgt die Transplantation der Spermienzellkerne in die unbefruchteten Eier. Dazu werden 5 µl des Reaktionsansatzes vorsichtig in 150 µl SDB gegeben. Bei diesem Schritt darf nicht gemischt werden, da dies zur Scherung der dekondensierten Zellkerne führen würde. Man lässt die Zellkern/Eiextrakt Mischung für wenige Minuten im SDB äquilibrieren und belädt damit die Injektionsnadel.

Transplantation der Spermienzellkerne

Die mit den Zellkernen befüllte Transplantationsnadel wird an ein mit Mineralöl gefülltes Infusionssystem angeschlossen. Die Öffnung der Nadel besitzt bei der Transplantation in *X. laevis* einen Durchmesser von 80 -100 µm, bei *X. tropicalis* 40 - 60 µm. Die Durchflussrate der Infusionspumpe wird auf 10 nl/sec eingestellt. Die Verweildauer der Transplantationsnadel pro Ei sollte eine Sekunde betragen, wobei darauf zu achten ist, dass man schnell in das Ei hinein sticht, kurz innehält und dann die Nadel relativ langsam aus dem Ei herauszieht. Nur Eier denen genau ein Zellkern transplantiert wurde, können die erste Zellteilung korrekt durchlaufen, während sich Eier mit mehreren Zellkernen zu diesem Zeitpunkt bereits zu Drei- oder Vierzellern fehlentwickeln. Im Durchschnitt teilt sich ein Fünftel bis zu einem Drittel korrekt. Diese Embryonen werden bereits im Zwei- oder Vierzellstadium aussortiert und in frische Agaroseschalen mit 0,1x MMR mit 6% Ficoll überführt. Haben die Embryonen das Entwicklungsstadium 12 erreicht, werden sie in 0,1x MMR ohne Ficoll umgesetzt.

Die Überprüfung der Integrationseffizienz und die Analyse der Expression des Reportergens erfolgt am Fluoreszenzbinokular.

4.3.9.2 *I-SceI* Meganuklease vermittelte Integration

In einem neueren Ansatz zur Generierung transgener Vertebraten benutzt man die Meganuklease *I-SceI*, die durch das mobile Gruppe I Intron aus dem großen rRNA kodierenden Gen aus den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert

wird. Diese Methode wurde erstmals von Violette Thernes für den Medakafisch (*Oryzias latipes*) beschrieben [Thernes et al., 2002] und vier Jahre später von der Arbeitsgruppe um Tomas Pieler für *Xenopus laevis* adaptiert [Pan et al., 2006]. Die Besonderheit dieser Meganuklease liegt darin, dass ihre Erkennungssequenz 18 Basenpaare (TAGGGATAACAGGGTAAT) umfasst und sie somit statistisch gesehen nur einmal in $6,9 \cdot 10^{10}$ bp einer zufälligen DNA Sequenz schneidet.

Die zu integrierende DNA wird an beiden Enden von einer *I-SceI* Restriktionschnittstelle flankiert. Direkt vor der Injektion wird das Transgen für 40 min mit der *I-SceI* Meganuklease verdaut und in befruchtete *Xenopus* Eier innerhalb einer Stunde nach der Befruchtung injiziert. Die Injektion der linearisierten DNA erfolgt zwischen der Spermien-Eintrittsstelle und dem Zentrum des animalen Pols. An dieser Stelle verschmelzen der männliche und weibliche Pronukleus miteinander. Somit wird die zu integrierende DNA in die räumliche Nähe des sich bildenden Zellkerns gebracht. Über eine Kühlplatte wird die Temperatur während der Injektion konstant auf 12,5°C gehalten, um so die Integration des DNA Fragments noch vor der ersten Zellteilung zu ermöglichen. Ist die erste Zellteilung erfolgt, können sich die Embryonen bei 18°C bis zur Analyse weiterentwickeln.

Die DNA integriert in das Genom als Konkatermer von bis zu acht Kopien und wird an die F1 Generation weitergegeben.

Diese Methode ist sehr trivial und unterscheidet sich im Aufwand kaum von der Standard-Mikroinjektion. Das Hauptproblem dieser Methode liegt in der rechtzeitigen Integration der DNA vor der ersten Zellteilung. Sehr häufig kommt es zu einer mosaikartigen Expression des Reportergens, da es zu spät in das Genom insertiert wurde.

4.3.10 Embryonenpflege und Fixierung

Da die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen temperaturabhängig ist, kann das Tempo durch die Wahl einer Inkubationstemperatur zwischen 14°C und 25°C gesteuert werden. Dabei entwickeln sich Embryonen bei niedrigen Temperaturen langsamer bzw. bei höheren Temperaturen schneller. Abgestorbene Embryonen und unbefruchtete Eier werden regelmäßig entfernt und das Kulturmedium täglich gewechselt. Die Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt nach Nieuwkoop und Faber [1967].

Haben die Embryonen das für das jeweilige Experiment gewünschte Stadium erreicht, werden sie für eine Ganzkeimfärbung eine Stunde in MEMFA fixiert oder für eine Reporteragen-Analyse mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Zunächst in MEMFA fixierte Embryonen werden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Methanol bzw. Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

4.3.11 Ganzkeimfärbung oder *in-situ* Hybridisierung

Die *in-situ* Hybridisierung ist eine Methode, die es erlaubt mittels spezifischer antisense RNA-Sonden das zeitliche und räumliche Expressionsprofil einzelner Gene im Embryo farblich sichtbar zu machen. Dazu hybridisieren Antigen-markierte antisense RNA-Sonden mit der entsprechenden endogenen mRNA. Als Sonde dient eine zu der spezifischen RNA-Sequenz komplementäre Nukleotid-Sequenz mit einer Länge von 20 bis 1000 Basen. Durch *in-vitro*-Transkription linearisierter Plasmid-DNA mit RNA-Polymerasen werden solche RNA-Sonden hergestellt. Zur Markierung der RNA-Sonden dient Digoxigenin, ein aus *Digitalis purpurea* isoliertes Steroid, das nur in den Blüten und Blättern dieser Pflanzen vorkommt. Digoxigenin ist mit dem C₅-Atom der Uridinbase verbunden und kann so in die RNA-Sequenz eingebaut werden. Der Digoxigenin-spezifische Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase verbunden, die das Substrat NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/5-Brom-4-Chlor-3-iodolyl-Phosphat) zu einem blauen Präzipitat umsetzt.

Hybridisierung

Die in MEMFA fixierten Embryonen werden über eine absteigende Alkohol-Reihe rehydratisiert. Dazu werden sie in ein 4 ml-Schraubdeckelgefäß überführt und je fünf Minuten in 75% (v/v), 50% (v/v) bzw. 25% (v/v) Methanol in TBST unter Wippen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST können die Embryonen 7-8 min mit Proteinase K (6 u/ml) permeabilisiert werden. Die enzymatische Reaktion wird durch zweimal fünf-minütiges Waschen mit frisch angesetztem 0,1 M Triethanolamin pH 7,5 abgestoppt. Durch zweimalige Zugabe von 5 µl Essigsäureanhydrid für je fünf Minuten werden die in den Embryonen vorhandenen basischen Proteine angesäuert, um deren unspezifische Bindung an die RNA-Sonde zu unterbinden. Anschließend werden die Embryonen zweimal fünf Minuten mit TBST gewaschen und mit frisch

angesetztem MEMFA 30 Minuten nachfixiert. Durch fünfmaliges Waschen mit TBST für je fünf Minuten wird die Fixierlösung wieder entfernt.

Zur Hybridisierung werden die Embryonen zunächst in 500 µl Hybridisierungspuffer überführt. Nach einmaligen Erneuern des Hybridisierungspuffers werden die Embryonen in diesem für vier Stunden bei 60°C inkubiert. Die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde wird in Hybridisierungspuffer aufgenommen (0,5 µg/500 µl) und für fünf Minuten bei 85°C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzutrennen. Die Embryonen werden mit 250 µl der so vorbehandelten Sonde bei 60°C über Nacht inkubiert.

Antikörperinkubation

Man entfernt die RNA-Sonde von den Embryonen und bewahrt sie bei -20°C auf. Zum Waschen wird zunächst 1 ml frischer Hybridisierungspuffer zugegeben und die Embryonen für 20 Minuten erneut bei 60°C inkubiert. Bei dieser Temperatur werden sie zweimal 20 Minuten mit 2x SSC-Tween 20 und weitere zweimal 20 Minuten mit 0,2x SSC-Tween 20 gewaschen. Vor dem Blockieren werden sie bei Raumtemperatur zweimal zehn Minuten in TBST inkubiert. Anschließend werden die Embryonen in 1 ml Blockierungspuffer über eine Stunde bei Raumtemperatur äquilibriert, dieser dann abgenommen und durch die Antikörperlösung ersetzt. In dieser Lösung werden die Embryonen bei 4°C über Nacht inkubiert.

Färbung und Fixierung

Am nächsten Tag wäscht man die Embryonen sechsmal für je 30 Minuten bei Raumtemperatur mit TBST, überführt sie dann für zweimal fünf Minuten in den Alkalische-Phosphatase-Puffer und zuletzt in kleine Petrischalen (Ø 35 mm).

Zur Färbung werden die Embryonen in 1 ml NBT/BCIP-Färbelösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bis die gewünschte Farbtiefe erreicht ist. Um die Reaktion abzustoppen, wäscht man die Embryonen zweimal fünf Minuten mit TBST und fixiert sie anschließend ein bis zwei Stunden in MEMFA bei Raumtemperatur nach. Für ein bis zwei Monate können die Embryonen bei 4°C in MEM gelagert werden. Für eine dauerhafte Aufbewahrung sollten sie schrittweise in 100% Methanol überführt und bei -20°C gelagert werden.

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung und Charakteristik der *XTcf-4* Promotor- und Enhancerregionen

Ausgehend von einer vorhergesagten TATA-Box freien Promotorregion 447 bp 5' des *XTcf-4* Translationsstarts [R. Lattanzio, Diplomarbeit 2004], galt es den Transkriptionsstartpunkt experimentell zu bestimmen, um somit die putative Promotorregion verifizieren und mögliche Enhancer Elemente eingrenzen zu können. Des Weiteren wurden EGFP fusionierte Promotorfragmente im Embryo auf ihre Fähigkeit hin getestet, die räumliche und zeitliche *XTcf-4* Expression wiederzugeben.

5.1.1 Bestimmung des *XTcf-4* Transkriptionsstartpunktes

Der Transkriptionsstart des *XTcf-4* Gens wurde mittels einer 5' RLM-RACE determiniert. Dabei entstand nach Amplifikation mit einem *XTcf-4* spezifischen Primer (-95 relativ zum Translationsstart) und einem Adapterprimer ein ca. 350 bp Produkt (Abb. 5.1).

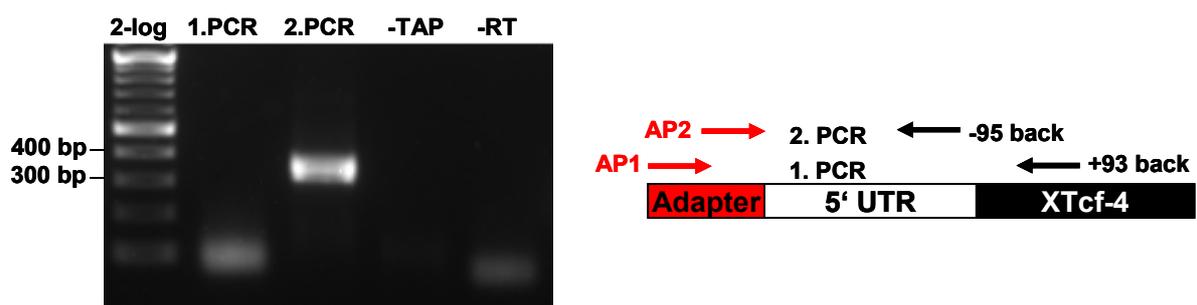


Abb. 5.1 Die nested PCR der 5'RACE zeigte ein Amplifikat von 350 bp. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Pyrophosphatase Behandlung (-TAP), sowie ein Ansatz ohne DNA (-RT) mitgeführt. Als Größenstandard wurde der 2-log Marker (New England Biolabs) eingesetzt. Die Schemazeichnung gibt die Position der verwendeten Primer wieder. Der äußere *XTcf-4* spezifische Primer hybridisiert 93 bp stromabwärts, der innere hingegen 95 bp stromaufwärts des Translationstarts. Die Adapterprimer 1 und 2 (AP1 und AP 2) binden an die Adaptersequenz, die an das 5' Ende der mRNA ligiert wurde.

Damit liegt der Transkriptionsstartpunkt (TSS, Transcription Start Site) etwa 450 bp 5' des Startkodons. Zur exakten Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts wurde das PCR-Produkt in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T inseriert und sequenziert. Die

5.1.2 Analyse eines *XTcf-4* -2720/+501 EGFP Reportergenkonstrukts

Bei *X. laevis* handelt es sich um einen Modellorganismus, dessen Genom noch nicht vollständig sequenziert ist. Daher wurde zur Isolation der bis dato unbekannt 5' regulatorischen Sequenz des *XTcf-4* Gens die Genome WalkerTM Methode gewählt. Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit lag die 5' Sequenzinformation bis zur Position -2820 vor. Diese war jedoch nicht ausreichend, um ein nachgeschaltetes EGFP Reportergen *XTcf-4* gewebespezifisch zu exprimieren [S. König, Diplomarbeit 2005]. Zudem enthielt das verwendete Reportergenplasmid zusätzlich zur regulatorischen *XTcf-4* Sequenz noch eine *CMV* (*Cytomegalovirus*) Promotorsequenz, wodurch keine Aussage über die faktische *XTcf-4* Promotoraktivität getroffen werden konnte. Des Weiteren war dieses Konstrukt ein Hybrid aus Sequenzen zweier Allele. Daher wurde zunächst eine -2720/+501 umfassende *XTcf-4* 5'Sequenz von genomischer DNA amplifiziert und mit dem Reportergen EGFP fusioniert (Abb. 5.3).

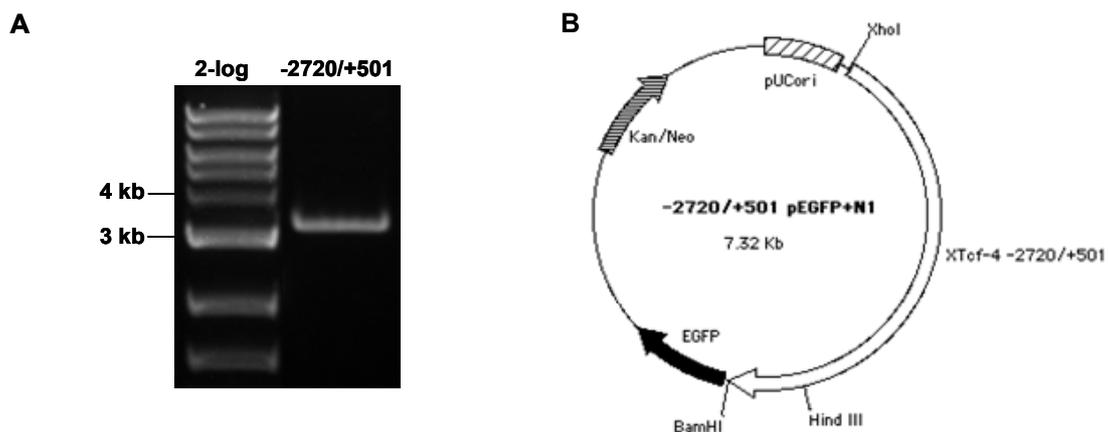


Abb. 5.3 Amplifikation eines -2720 bis +501 Fragmentes des *XTcf-4* Gens. Mit einem -2720*XhoI*_forw und einem +501*BamHI*_back Primer wurde die 3,22 kb umfassende *XTcf-4* Sequenz von genomischer DNA amplifiziert (A) und über die *XhoI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen in den Vektor pEGFP+N1 inseriert (B). Die kodierenden Sequenzen der beiden Gene liegen im selben Leserahmen.

Embryonen, die im Zweizell-Stadium einseitig mit 500 pg dieses -2720/+501 pEGFP Reportergen-Plasmids injiziert wurden, zeigten ab dem Kaulquappenstadium eine Lokalisation des Fluoreszenzsignals ausschließlich im entodermalen Bereich (Abb. 5.4. A und B). Es wurde ein repräsentatives Gelege mit 214 injizierten Embryonen ausgezählt. Davon zeigten 61,7 % (= 132 Embryonen) eine Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität in der Darmregion. Da keine Fluoreszenz im Gehirn sichtbar war, wurde versucht über die evtl. sensitivere *in-situ* Hybridisierung die EGFP mRNA nachzuweisen. Allerdings wurden auch mit dieser Methode keine

EGFP Transkripte im Mittelhirn detektiert (Abb. 5.4. D und E). Transversalschnitte der gefärbten Embryonen offenbarten die Lokalisation der EGFP mRNA im Entoderm (Abb. 5.4. E').

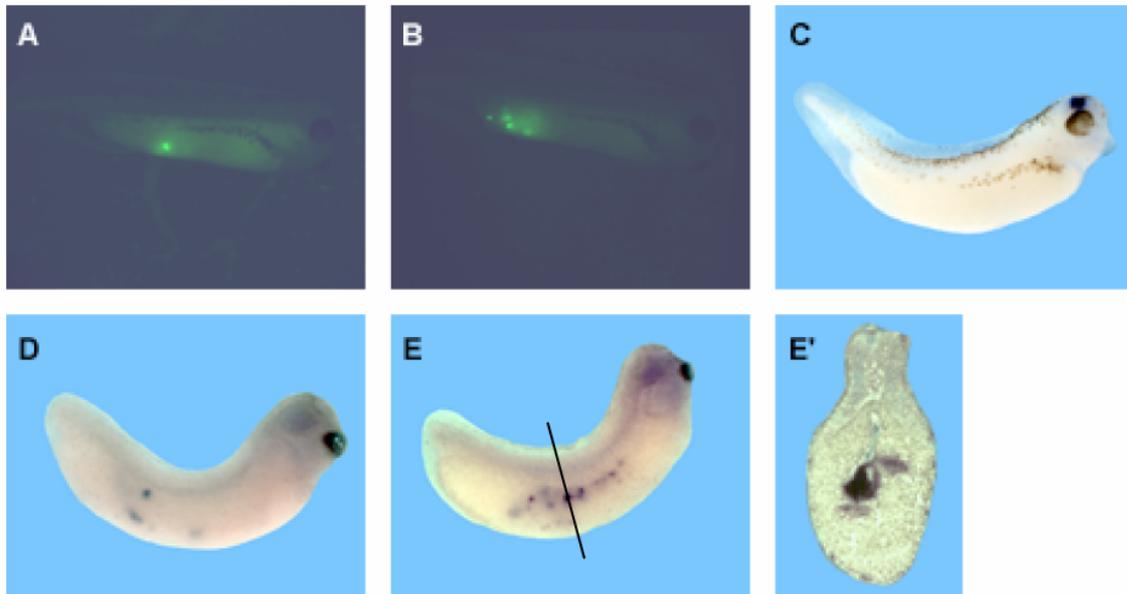


Abb. 5.4 Lokalisation der Aktivität des -2720/+501 pEGFP Reporter-gen-Konstruktes. Die einseitige Mikroinjektion von 500 pg dieses Konstruktes im Zweizell-Stadium führte zu einem Fluoreszenzsignal in der Darmregion ab dem Kaulquappenstadium (A und B). Im Gehirn war kein EGFP Protein sichtbar. Zum Vergleich ist die endogene XTcf-4 Expression im Mittelhirn eines wildtyp Embryos im Entwicklungsstadium St. 35 [nach Nieuwkoop und Faber, 1967] gezeigt (C). Auch nach der *in-situ* Hybridisierung wurde keine EGFP mRNA im Mittelhirn detektiert. Die Embryonen zeigten lediglich eine Anreicherung der EGFP mRNA im entodermalen Bereich (D und E). Der Transversalschnitt (E') offenbarte die Lokalisation der EGFP Transkripte im Entoderm. Die Ebene des Schnittes ist in (E) eingezeichnet. Die Embryonen wurden lateral fotografiert, anterior ist rechts.

5.1.3 Analyse der ersten beiden Introns des *XTcf-4* Gens

Nachdem ein -2720/+501 *XTcf-4* Konstrukt nicht hinreichend war, um eine *XTcf-4* gewebespezifische Aktivität eines nachgeschalteten Reportergens zu bewirken, wurden die ersten beiden Introns von genomischer *Xenopus* DNA mit einem -259*XhoI*_forw. und einem im dritten Exon bindenden +822*BamHI*_back Primer amplifiziert und über *HindIII/BamHI* in den -2720/+501 pEGFP Vektor inseriert, woraus das in 3' Richtung verlängerte -2720/+822 pEGFP Konstrukt hervor ging (Abb. 5.5 A).

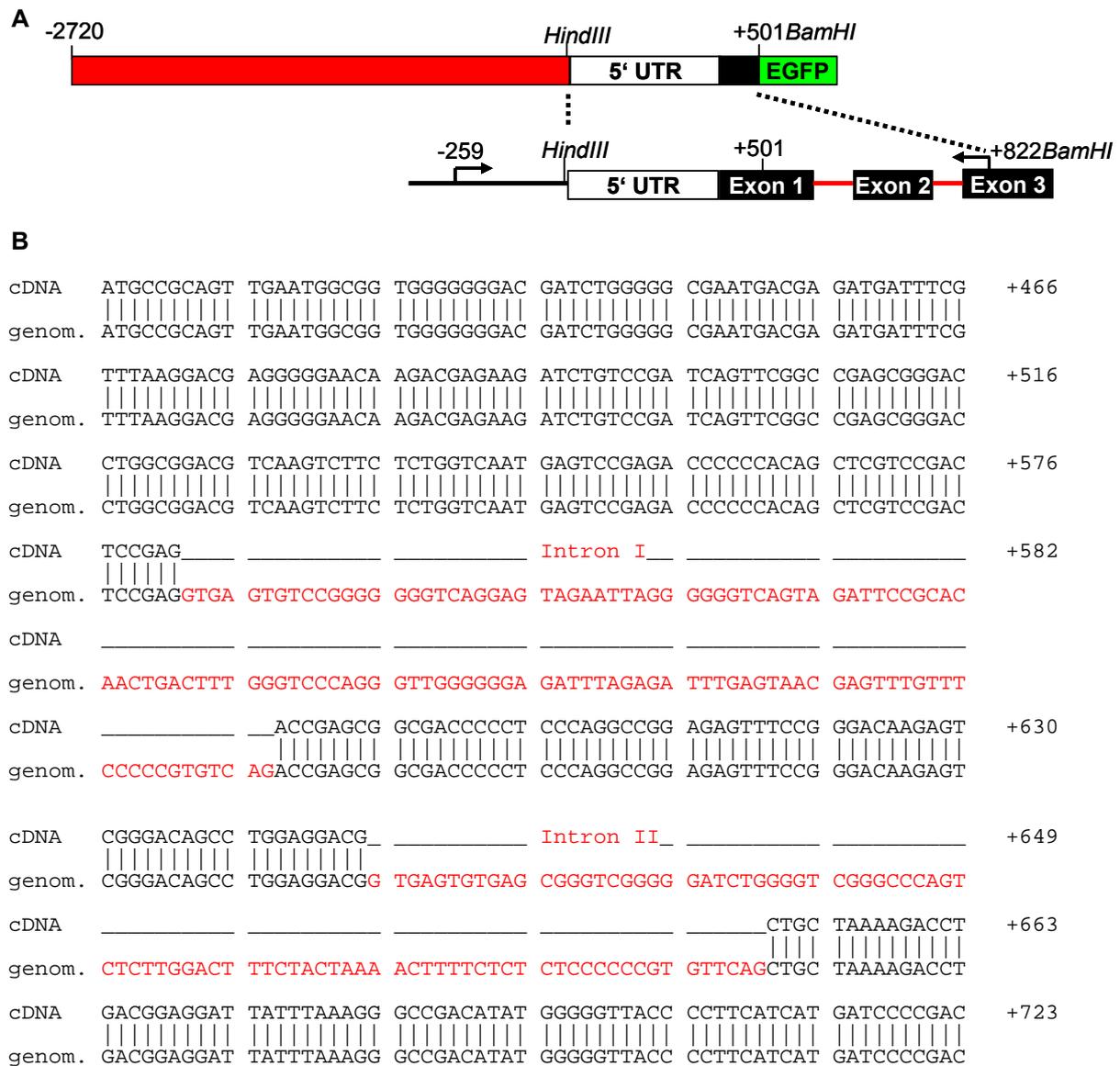


Abb. 5.5 Klonierung und Sequenz der ersten beiden Introns des *XTcf-4* Gens. Die *XTcf-4* Introns 1 und 2 wurden von genomischer DNA amplifiziert und über einen *HindIII/BamHI* Verdau in den -2720/+501 pEGFP Vektor inseriert (A). Der Sequenzvergleich zwischen der kodierenden Sequenz (obere Reihe) und der genomischen DNA (untere Reihe) zeigt Lage und Länge der Introns (B).

Der Sequenzvergleich zwischen der *XTcf-4* cDNA und der genomischen Sequenz offenbarte, dass die Introns sehr kurz sind (Abb. 5.5 B). Während das Erste 126 bp umfasst, besteht das Zweite lediglich aus 87 bp. Eine Analyse dieser Sequenzen durch das Vorhersage-Programms TESS (Transcription Element Search Software) identifizierte keine potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die an der Musterung des Mittelhirns involviert sind.

Die Mikroinjektion von 500 pg des -2720/+822 pEGFP Konstruktes in eine Blastomere von Embryonen im Zweizell-Stadium resultierte in einer dem -2720/+501 pEGFP ähnelnden Reporter-gen-Aktivität. Die Embryonen zeigten ebenfalls eine

EGFP Expression in der Darmregion (Abb. 5.6), jedoch ist diese im Schwanzknospenstadium (St. 26) diffuser und intensiver als nach der Injektion mit dem Reporter-genkonstrukt ohne Intronsequenzen. Embryonen im St. 31 wiesen überwiegend eine Fluoreszenz im entodermalen Bereich auf, die mit der EGFP Expression nach Injektion des -2720/+501 Konstruktes übereinstimmt. Einige wenige Individuen offenbarten eine Fluoreszenz außerhalb der Darmregion, wie beispielsweise entlang des Notochords (Abb. 5.6 D).

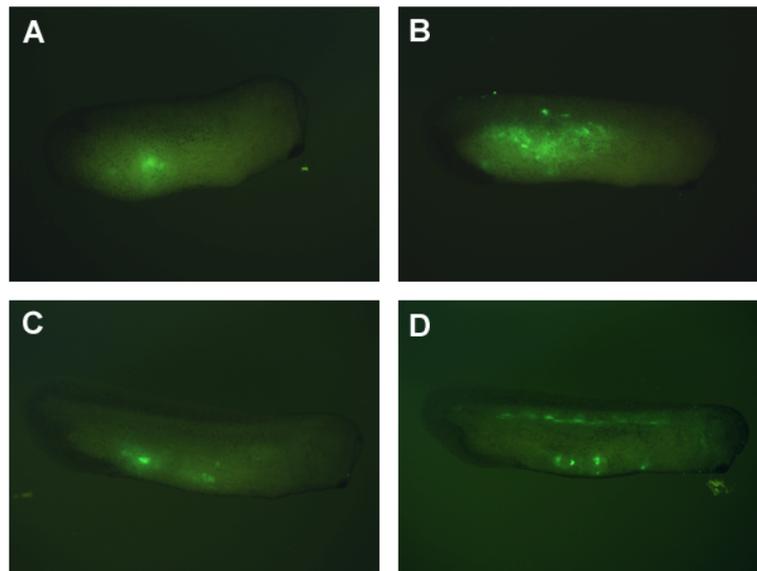


Abb. 5.6 Mikroinjektion eines um die ersten beiden Introns erweiterten Reporter-genplasmids. Die Injektion von 500 pg eines -2720/+822 pEGFP Konstruktes in eine Blastomere von Embryonen im Zweizell-Stadium führte zur Expression des EGFP Reporter-gens in der Darmregion. Embryonen im St. 26 (A und B) wiesen eine diffuse Fluoreszenz im Bauch auf. Im St. 31 zeigten die Embryonen hauptsächlich ein EGFP Signal im Darm (C). Einige wenige Vertreter offenbarten auch außerhalb des Darms eine Fluoreszenz, wie beispielsweise entlang des Notochords (D). Die Embryonen wurden lateral fotografiert, anterior weist nach rechts.

Somit ist die Sequenzinformation von -2720 bis +822 nicht ausreichend, um ein Reporter-gen dem endogenen *XTcf-4* entsprechend zu exprimieren. Da die *XTcf-4* Expression bereits ab dem Neurulastadium (St. 16) einsetzt, stimmte die zeitliche Aktivierung des Reporter-gens im Schwanzknospenstadium nicht mit der endogenen Expression überein.

Daher galt es weitere Sequenzinformationen des *XTcf-4* Gens in 5' Richtung zu isolieren und auf Enhancer-Elemente hin zu untersuchen.

Die Sequenzierung bestätigte durch eine absolute Übereinstimmung des 41 bp umfassenden Überlappungsbereichs mit der bereits bekannten Sequenz die Zugehörigkeit des Amplifikats zur 5' Region des *XTcf-4* Gens.

Ausgehend von dieser Sequenzinformation wurde mit der proofreading Phusion™ Polymerase die 4 356 bp (-3855/+501) umfassende Region von genomischer *Xenopus* DNA amplifiziert (Abb. 5.8), in den pGEM®-T Vektor inseriert und sequenziert.

Aufgrund einer zusätzlichen *Bam*HI Schnittstelle an Position -3229 erfolgte die Umklonierung in den pEGFP+N1 Vektor in zwei Schritten. Zunächst wurde das bestehende -2720/+501 pEGFP Konstrukt in 5' Richtung verlängert, indem das -2720*Xho*II-1*Hind*III durch das -3855*Xho*II-1*Hind*III Fragment ersetzt wurde. Anschließend wurde das -3855/+501 pGEM®-T Konstrukt und das verlängerte -3855/+501 pEGFP Konstrukt mit *Bam*HI verdaut und das -3229/+501 Fragment aus dem pGEM®-T Vektor in den pEGFP Vektor kloniert (Abb. 5.8). Somit wurde sicher gestellt, dass die gesamte -3855/+501 Reporter-gen-Sequenz von einem Allel stammt.

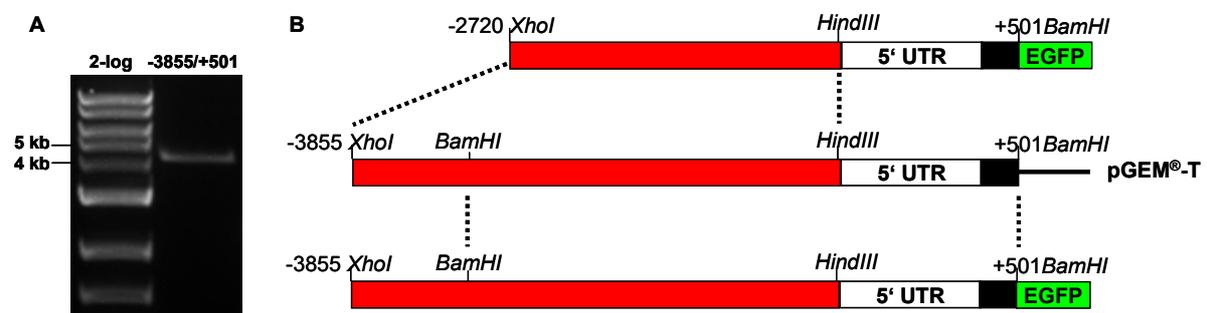


Abb. 5.8 Amplifikation der *XTcf-4* 5' Region und Klonierung in pEGFP. Die Amplifikation erfolgte von genomischer DNA aus XTC Zellen und resultierte in einer distinkten Bande, die die erwartete Fragmentgröße von etwa 4,4 kb aufwies (A). Das -3855/+501 Konstrukt wurde aufgrund einer zusätzlichen *Bam*HI Restriktionsstelle an Position -3229 sukzessive in pEGFP kloniert (B). Zunächst erfolgte eine 5' Verlängerung des -2720/+501 pEGFP Konstrukts durch die Insertion des -3855*Xho*II-1*Hind*III Fragments. Anschließend wurde das -3229/+501 *Bam*HI Fragment aus dem -3855/+501 pGEM®-T Vektor in den -3855/+501 pEGFP Vektor inseriert. Somit stammt das -3855/+501 Reporter-gen-Konstrukt von einem Allel.

Embryonen, die im Zweizell-Stadium einseitig mit 500 pg des -3855/+501 EGFP Konstrukts injiziert wurden, wiesen eine der endogenen *XTcf-4* Expression entsprechende Reporter-gen-Aktivität ab dem späten Neurulastadium auf. Embryonen im St. 18 zeigten ein Fluoreszenzsignal auf der Neuralplatte (Abb. 5.9 A') in der Region, aus der das zukünftige Mittelhirn hervorgeht. Im Schwanzknospen-Stadium (St. 23)

entspricht die Lokalisation des punktförmigen EGFP Signals der endogenen *XTcf-4* Expression im zukünftigen Mittelhirn (Abb. 5.9 B' und C).

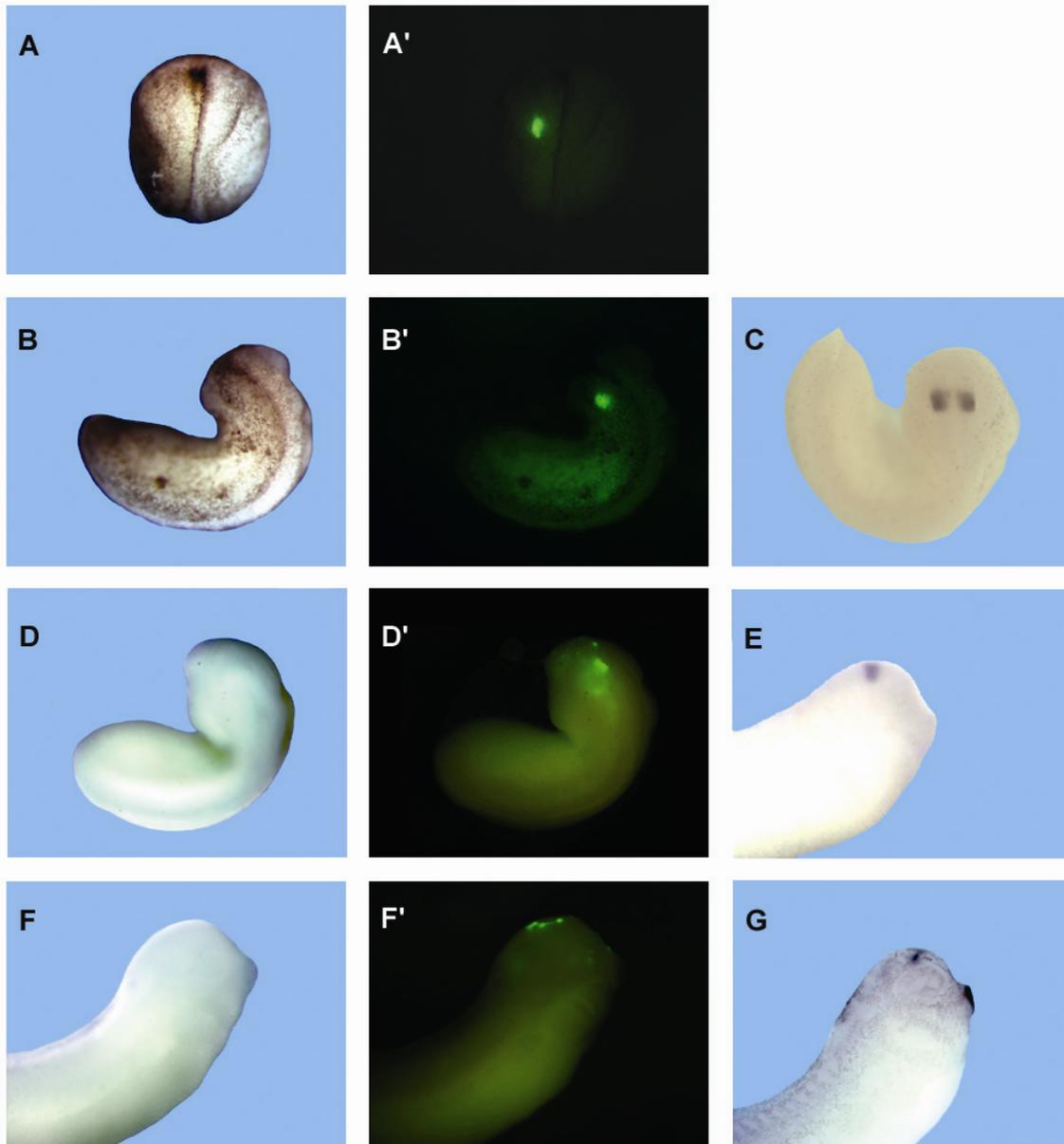


Abb. 5.9 Ein -3855/+501 EGFP Reportergen-Plasmid kopiert die endogene *XTcf-4* Expression.

Die Embryonen wurden im Zweizell-Stadium in eine Blastomere mit 500 pg des -3855/+501 EGFP Konstrukts injiziert. Ab dem späten Neurulastadium – gezeigt ist ein Embryo im Stadium 18 - (A, Hellfeldaufnahme) wurde ein punktförmiges EGFP-Signal auf der Neuralplatte beobachtet (A', Fluoreszenzaufnahme). Im Stadium 23 (B, C, D) verteilt sich die endogene *XTcf-4* Expression auf zwei punktförmige Bereiche im Gehirn (C, *XTcf-4* ISH). Die in B' gezeigte Reportergen-Aktivität stimmte exakt mit der endogenen *XTcf-4* Expression überein (C), während sie sich in D' in mediale Richtung ausdehnte. Auch das in F' gezeigte Fluoreszenzsignal eines Embryos im St. 26 breitete sich über das endogene *XTcf-4* Expressionsfeld im Mittelhirn bis auf das Hinterhirn aus. Eine EGFP RNA im Mittelhirn ließ sich über die Ganzkeimfärbung bei Embryonen detektieren, die keine Fluoreszenz zeigten (G). Zum Vergleich ist eine *XTcf-4* Ganzkeimfärbung eines wildtyp Embryos im selben Entwicklungsstadium St. 26 gezeigt (E). Die Embryonen in den Abbildungen A-D wurden von dorsal fotografiert, während die übrigen von lateral aufgenommen wurden (E, F, G).

Bei einigen Embryonen war ein verbreitetes Feld der Reporter-gen-Aktivität zu beobachten, die über die endogene *XTcf-4* Expressionsdomäne hinausreichte. Repräsentativ dargestellt sind ein Vertreter im St. 23, bei dem sich die Fluoreszenz nach posterior und in medialer Richtung ausdehnte (Abb. 5.9 D') und ein Vertreter im St. 26, der eine Reporter-gen-Aktivität im gesamten Mittelhirn und teilweise auch im Hinterhirn zeigte (Abb. 5.9 F').

Allerdings war die Penetranz der beobachteten Fluoreszenz im Gegensatz zur Injektion mit dem kürzeren -2720/+501EGFP Konstrukt deutlich geringer. So wiesen lediglich 1-3 % der injizierten Embryonen ein Fluoreszenzsignal auf. Dieses gab allerdings die räumliche und zeitliche Expression des endogenen *XTcf-4* wieder.

Zum Nachweis geringer EGFP Transkripte wurde erneut auf die sensitivere Methode der *in-situ* Hybridisierung (ISH) zurückgegriffen. Dazu wurden 30 injizierte Embryonen, die kein Fluoreszenzsignal zeigten, fixiert und in der Ganzkeimfärbung analysiert. Dabei wurde bei drei Embryonen (= 10 %) ein schwaches Signal im Mittelhirn detektiert (Abb. 5.9 G). Somit besitzt die 5' Sequenz des *XTcf-4* Gens bis an die Position -3855 alle notwendigen Enhancer-Elemente, um die Expression eines Reporter-gens im Mittelhirn ab dem Neurulastadium zu aktivieren und in anderen Bereichen zu unterdrücken.

Aufgrund der geringen Häufigkeit, mit der ein EGFP Signal nach Plasmidinjektion des -3855/+501EGFP Reporter-gens beobachtet wurde, wurde zur Erhöhung der Penetranz versucht mit diesem Konstrukt transgene *Xenopoden* zu generieren.

5.2 Generierung transgener Xenopoden

5.2.1 Integration über die Meganuklease *I-SceI*

In einem neueren Ansatz zur Generierung transgener Vertebraten insertiert man DNA über die Meganuklease *I-SceI* in das Wirtsgenom. Diese Methode wurde erstmals von Violette Thermes für den Medakafisch (*Oryzias latipes*) beschrieben [Thermes et al., 2002] und vier Jahre später von der Arbeitsgruppe um Tomas Pieler für *Xenopus laevis* adaptiert [Pan et al., 2006]. Die zu integrierende DNA muss dafür an beiden Enden von einer *I-SceI* Restriktionsschnittstelle flankiert werden.

Dafür wurde die -2720/+501 EGFP Kasette über einen *XhoI/NotI* Verdau aus dem -2720/+501 pEGFP Vektor ausgeschnitten und in den *I-SceI*_pBSII SK+ Vektor (von J. Wittbrodt) zwischen die *I-SceI*-Meganuklease Erkennungssequenzen inseriert. Durch diese Klonierung wurde das PolyA Signal des EGFP Gens abgeschnitten. Daher wurden die -2720/+501 pEGFP und -2720/+501 *I-SceI*_pBSII SK+ Vektoren nun mit *HindIII* (schneidet im *XTcf-4* 5' Bereich an Position -6 bis -1) und jeweils einem Restriktionsenzym geschnitten, das glatte Enden generiert (*SspI*, bzw. *EcoICRI*). Das den *XTcf-4* 5'UTR, die *XTcf-4* kodierende Sequenz (bis Position +501) und das EGFP Reporter gen mit dazugehörigem PolyA Signal umfassende Fragment wurde so gerichtet aus dem pEGFP Vektor in den pBSII SK+ Vektor zwischen die beiden *I-SceI* Erkennungssequenzen platziert (Abb. 5.10).

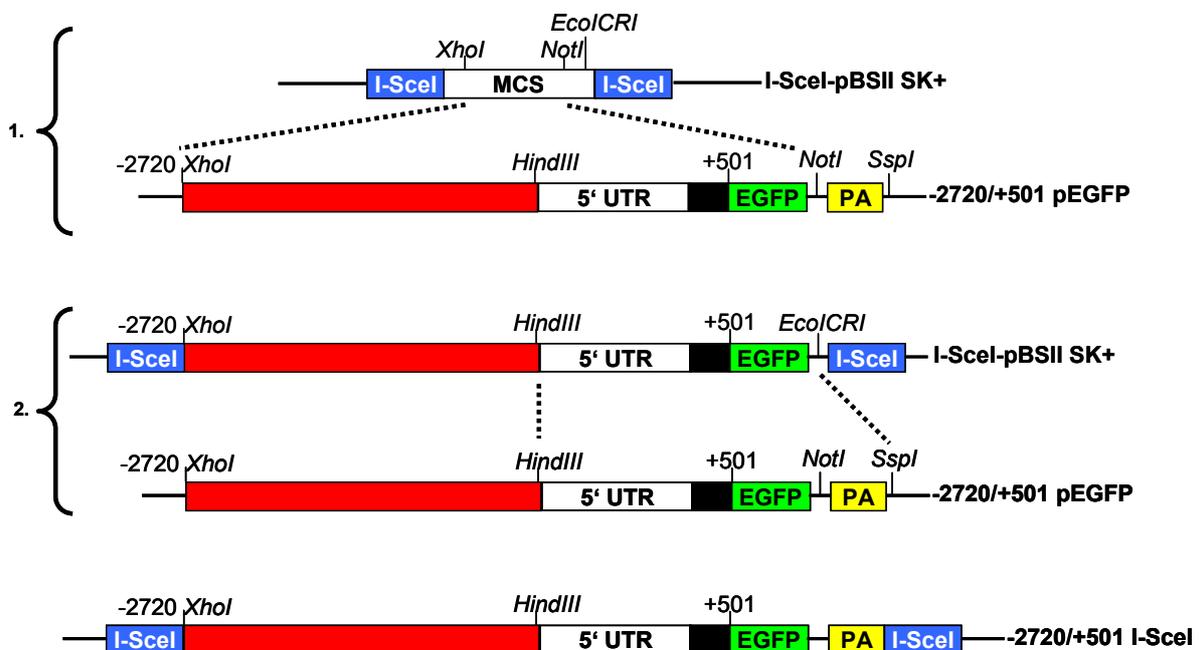


Abb. 5.10 Flankierung des -2720/+501EGFP Konstruktes mit *I-SceI* Meganuklease Erkennungssequenzen. Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die -2720/+501EGFP Kasette über *XhoI/NotI* in den *I-SceI*_pBSII SK+ Vektor inseriert (1.). Das fehlende PolyA Signal wurde über eine *HindIII*/blunt Klonierung eingefügt. Dafür wurde das *HindIII/SspI* Fragment aus dem pEGFP Vektor ausgeschnitten und in den *HindIII/EcoRI* geöffneten *I-SceI*_pBSII SK+ Vektor ligiert (2.).

Das Meganuklease Protokoll wurde wie in Pan et al. (2006) beschrieben, durchgeführt. Für einen 10 μ l Meganuklease Verdau wurden 0,5 μ l 10x *I-SceI* Puffer, 400 ng Plasmid und 10 Einheiten des *I-SceI* Enzyms für 40 min bis zur Injektion bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle des Versuchsaufbaus und der Integrationseffizienz diente ein *CMV_GFP_I-SceI_pBSII SK+* Kontrollkonstrukt (von T. Pieler), welches ein

grün fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle des CMV Promotors besitzt. Die durchschnittliche Transmissioneffizienz dieses Konstrukts sollte bei ca. 10 % liegen und in einer nicht-mosaikartigen Expression des GFPs in jeder Zelle resultieren [Pan et al., 2006]. Da in der vorliegenden Arbeit nach Injektion verschiedener Konzentrationen (von 40-400 pg) dieses Konstrukts keinerlei Fluoreszenz detektierbar war, ist es nicht erstaunlich, dass auch die Injektion des *I-SceI* flankierten -2720/+501EGFP Konstrukts nur in einer geringen Anzahl an Embryonen resultierte, die ein EGFP Signal zeigten. Dabei wiesen Embryonen, denen weniger als 300 pg DNA appliziert wurde, keine Reporter-gen-Aktivität auf. Die beobachtete Fluoreszenz war meist mosaikartig über den gesamten Embryo (Abb. 5.11 A, B) verteilt, oder in wenigen Fällen in der Darmregion lokalisiert. (Abb. 5.11 C). Bei einem Embryo ließ sich eine schwache EGFP Expression im Mittel- und Hinterhirn erkennen (Abb. 5.11 D, Pfeile). Ein weiterer Vertreter zeigte eine starke punktförmige Fluoreszenz im posterioren Mittelhirn, an der Grenze zum Isthmus (Abb. 5.11 E). Jedoch war die Reporter-gen-Aktivität nur unilateral zu beobachten, wonach das Reporter-gen vermutlich erst nach der ersten Zellteilung in das Genom integriert wurde.

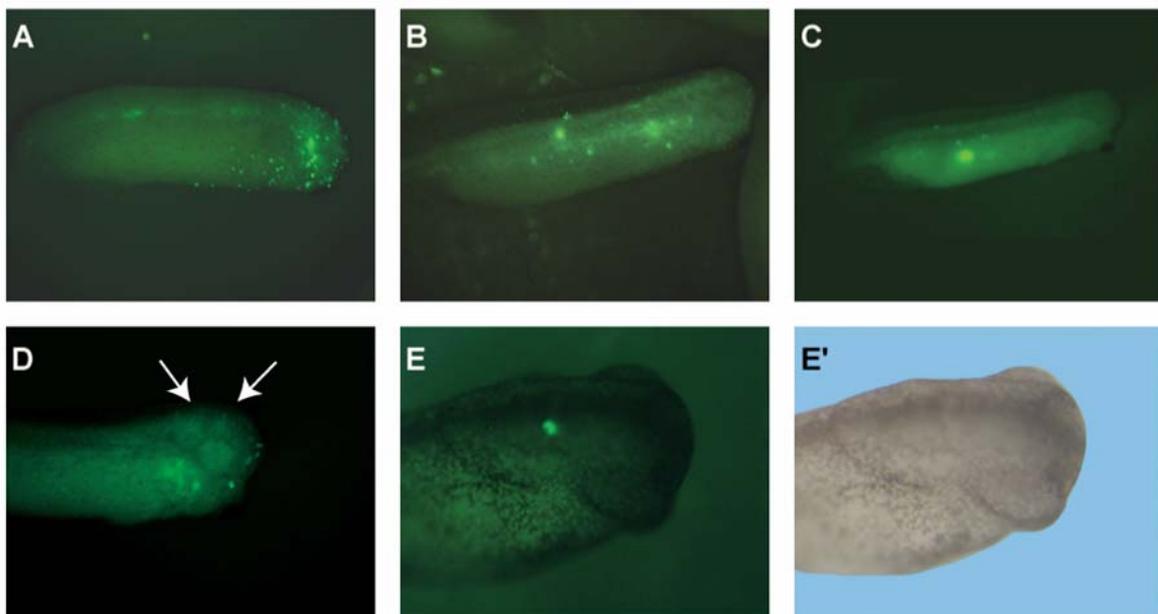


Abb. 5.11 Generierung transgener *X. laevis* über *I-SceI* vermittelte Integration. Embryonen, die als Einzeller mit 300 pg des -2720/+501EGFP_ *I-SceI* Konstrukts injiziert wurden, zeigten überwiegend eine mosaikartige Expression des Reporter-gens über den ganzen Körper verteilt (A und B), seltener in der Darmregion (C). Bei einem Vertreter ließ sich ein schwaches Fluoreszenzsignal im Mittel- und Hinterhirn erkennen (D, Pfeile). Ein anderer Vertreter zeigte eine starke punktförmige Fluoreszenz im posterioren Mittelhirn, an der Grenze zum Isthmus (E). Allerdings war diese lediglich unilateral zu beobachten, d.h. dass das Reporter-genkonstrukt frühestens nach der ersten Zellteilung in das Genom integriert wurde. Die Embryonen in den Abbildungen A-D wurden lateral fotografiert, während der Embryo in der Abbildung E von dorsolateral aufgenommen wurde. E' zeigt zur besseren Orientierung denselben Embryo in der Hellfeldaufnahme. Anterior weist nach rechts.

Da sich diese Methode als ungeeignet herausstellte, wurde auf die aufwändigere Standardmethode zur Generierung von transgenen *Xenopoden*, die Restriction Enzyme Mediated Integration (REMI), zurückgegriffen [Kroll und Amaya, 1996].

5.2.2 Generierung transgener *Xenopoden* über REMI

Die Arbeitsgruppe von Kris Vleminckx (Ghent, Belgien) hat gezeigt, dass Insulatorsequenzen ein Transgen in *Xenopus* effizient vor Chromatin Positionseffekten schützen und die Transmissionsrate deutlich erhöhen [Sekkali et al., 2008]. Daher wurde das *XTcf-4* Reporter gen mit Insulator Sequenzen aus dem Hühnchen β -Globin Locus flankiert. Dazu wurden das -3855/+501EGFP und das -2720/+501EGFP Konstrukt in den Vektor pBin.V2 (von K. Vleminckx) kloniert. Dieser Vektor enthält zweimal die 5'HS4 (DNaseI hypersensitive site) Sequenzen des β -Globin Locus, die eine MCS (multiple cloning site) zur Insertion des Reporter gens einrahmen. Um das Reporter gen zusammen mit den flankierenden Insulatoren vom Vektor Rückgrat zu befreien, stehen entweder *SacII* oder *NotI* Restriktionsschnittstellen zur Verfügung. Die Insertion der -3855/+501 EGFP und -2720/+501EGFP Konstrukte in den pBin.V2 erfolgte über eine *XhoI*/blunt Klonierung. Dazu wurden die pEGFP Vektoren zunächst mit *Bst98I* linearisiert und mit dem Klenow Fragment die überhängenden Enden aufgefüllt. Anschließend wurden mit *XhoI* die *XTcf-4* Reportersequenzen ausgeschnitten und in die *XhoI/EcoRV* (= blunt) geöffneten pBin.V2 Vektoren ligiert (Abb. 5.12 A).

Das mit Insulatoren flankierte -2720/+501EGFP Reporter gen wurde mit *SacII* aus dem Vektor geschnitten und in das Genom des Spermienzellkerns integriert. Da sich in der *XTcf-4* 5'-Sequenz an Position -3687 eine endogene *SacII* Restriktionsschnittstelle befindet, musste das -3855/+501EGFP Transgen über die Endonuklease *NotI* inseriert werden. Um dies zu ermöglichen, wurde die *NotI* Schnittstelle 5' des EGFP Gens über eine ortsspezifische Mutagenese zerstört (Abb. 5.12 B).

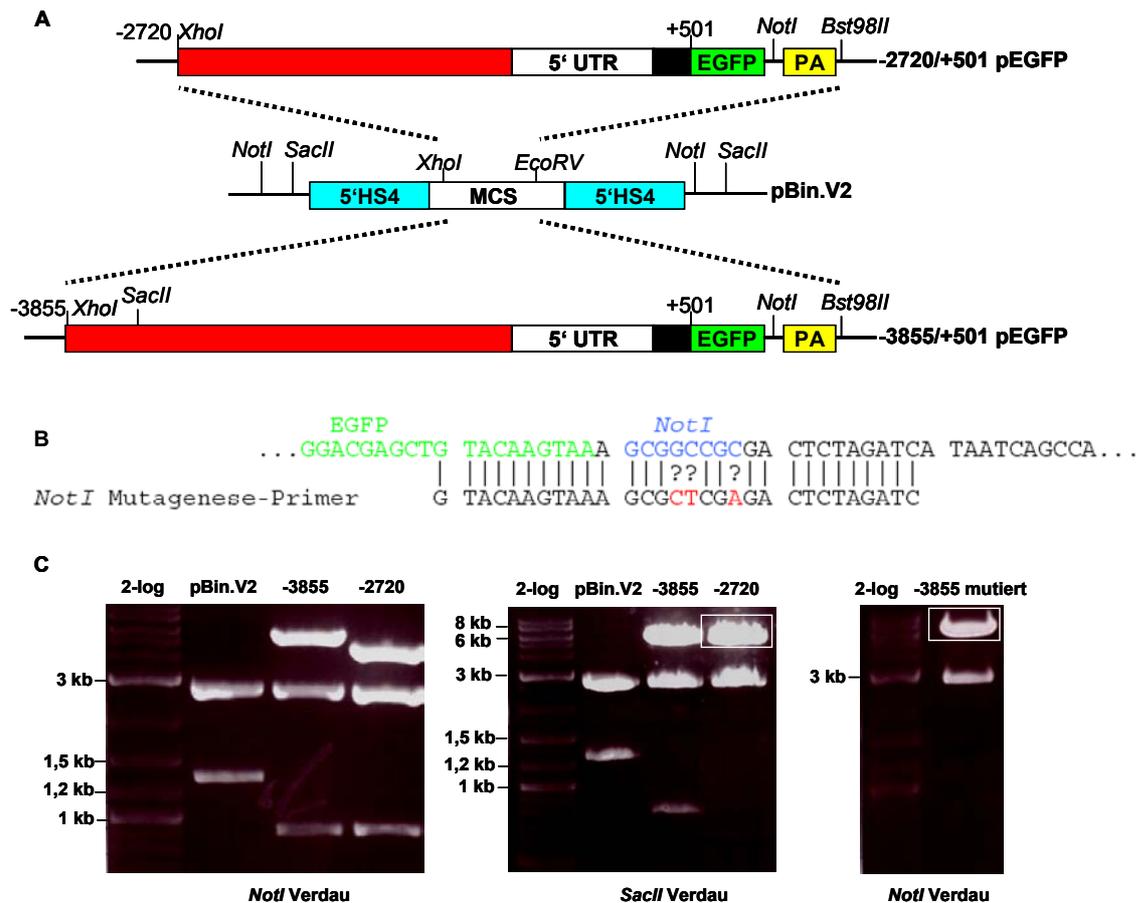


Abb. 5.12 Flankierung der *XTcf-4* Reportergene mit 5'HS4 Insulatoren. Die -2720/+501EGFP und -3855/+501EGFP Konstrukte wurden über eine *XhoI*/blunt (*Bst98II*) Klonierung zwischen die 5'HS4 Insulator-Sequenzen des *XhoI*/blunt (*EcoRV*) geöffneten pBin.V2 Vektors ligiert (A). Das mit den Insulator-Sequenzen flankierte -2720/+501EGFP Reportergen kann über die Restriktionsendonuklease *SacII* vom Vektor Rückgrat befreit und in das Genom integriert werden. Das längere Konstrukt trägt an Position -3687 eine *SacII* Restriktionsschnittstelle. Daher wurde in diesem Konstrukt die *NotI* Erkennungssequenz 5' des EGFP Gens mutiert (B). Abbildung C zeigt die Restriktionsanalysen der in den pBin.V2 Vektor klonierten Konstrukte. In den Restriktionsverdau mit *NotI* fielen neben dem pBin.V2 Vektor-Rückgrat (ca. 3 kb) zusätzlich ca. 900 bp Fragmente aus, welche der Größe eines Insulators (600 bp) plus des PloyA Schwanzes (ca. 300 bp) entsprachen. Während durch einen Verdau mit *SacII* das kürzere -2720/+501EGFP Konstrukt mit beiden Insulatoren von der Vektorsequenz befreit wurde, fiel bei dem längeren Konstrukt aufgrund der *SacII* Restriktionsschnittstelle an Position -3687 ein ca. 800 bp großes Fragment aus. Erst nach Mutation der *NotI* Schnittstelle wurde das ca. 6,5 kb umfassende -3855/+501EGFP Reportergen mit beiden Insulatorsequenzen aus dem Vektor geschnitten. Die beiden eingerahmten Sequenzen wurden für die REMI Methode aufgereinigt und in die Spermienzellkerne integriert.

Die Erlernung der REMI Methode und die Generierung der transgenen *Xenopoden* erfolgte im Labor von Kris Vleminckx in Ghent, Belgien. Dort bestand die Möglichkeit, neben transgenen *X. laevis* auch transgene *X. tropicalis* herzustellen.

Die transgenen Embryonen zeigten eine Reportergen-Aktivität im Kopf, jedoch war diese nicht ausschließlich auf das Mittelhirn begrenzt. *X. laevis*, die das -3855/+501 EGFP Konstrukt integriert hatten, zeigten erst ab dem St. 26 eine schwache Reportergen-Aktivität in der Retina (Abb. 5.13 A).

Im Laufe der Entwicklung wurde diese verstärkt und war ab St. 32 im posterioren Mittelhirn, im Vorderhirn und in den Neuralleisten zu beobachten (Abb. 5.13 B).

Ab St. 41 war eine sehr starke streifenförmige Fluoreszenz im posterioren Mittelhirn entlang der Isthmus Grenze zu sehen, sowie in den Kieferstrukturen (Abb. 5.13 C und D). *X. laevis* Embryonen, bei denen das kürzere -2720/+501EGFP Konstrukt integriert werden sollte, zeigten keinerlei Fluoreszenz.

Die Insertionen des -3855/+501EGFP (Abb. 5.13 E-H) und des -2720/+501EGFP (Abb. 5.13 I-L) Reportergens führten in *X. tropicalis* zu einem vergleichbaren EGFP Expressionsmuster. Bereits ab dem Neurulastadium ließ sich eine starke Fluoreszenz entlang des gesamten Neuroektoderms detektieren (Abb. 5.13 E und I), die sich im Falle des -3855/+501 EGFP Reportergens in der weiteren Entwicklung auf den posterioren Teil des Mittelhirns und die Retina beschränkte (Abb. 5.13 F). Die Integration des kürzeren Konstrukts zeigte in diesem Entwicklungsstadium ebenfalls eine Expression im posterioren Mittelhirn, zusätzlich auch im Vorder- und Hinterhirn, sowie im Gewebe der Neuralleisten (Abb. 5.13 J). In späteren Stadien (ab St. 37) stimmten die Expressionsdomänen der beiden Reportergen-Konstrukten wieder überein (Abb. 5.13 G, K). Die Reportergene waren im Vorderhirn, den Kieferstrukturen und im Neuralleistengewebe aktiv. Fünf Tage alte Embryonen, die das längere Konstrukt integriert hatten, zeigten ebenfalls ein streifenförmiges EGFP Signal entlang des Isthmus (Abb. 5.13 H). In der Ganzkeimfärbung zeigten die transgenen Embryonen eine EGFP mRNA Lokalisation, die der zuvor beobachteten Fluoreszenz entsprach. Ein typischer *X. tropicalis* Vertreter, der das -2720/+501 EGFP Konstrukt trägt ist in Abb. 5.13 L dargestellt. Neben der Expression im Neuralleistengewebe war eine streifenförmige Lokalisation der EGFP mRNA am Isthmus zu erkennen (Pfeil).

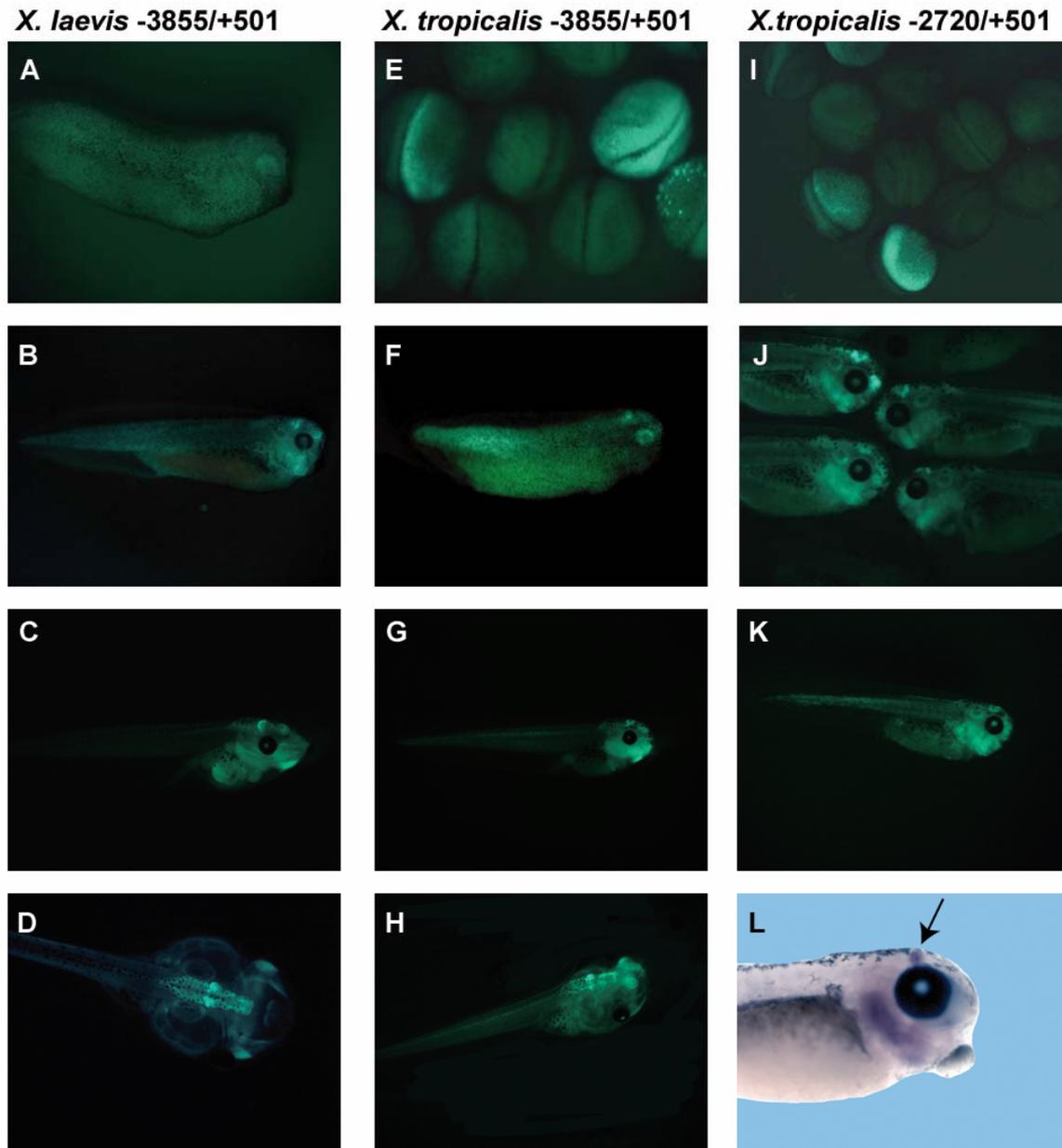


Abb. 5.13 Transgene Xenopoden zeigten eine Reporter-gen-Aktivität im Kopf. *X. laevis* Embryonen, die das -3855/+501EGFP Konstrukt tragen (A-D), offenbarten ab St. 26 eine schwache Fluoreszenz in der Retina (A). Ab St. 32 war ein deutliches EGFP Signal im posterioren Mittelhirn, im Vorderhirn und den Neuralleisten zu beobachten (B). In der weiteren Entwicklung wurde das Reporter-gen an der Mittelhirn-/Hinterhirngrenze am stärksten exprimiert (C, D). Dieses Konstrukt zeigte in *X. tropicalis* (E-H) eine vergleichbare Expression, allerdings war bereits im späten Neurulastadium eine Fluoreszenz über die gesamte Neuralplatte sichtbar (E). In St. 31 begrenzte sich diese auf die Retina und das posteriore Mittelhirn (F). Ab St. 37 dehnte sich die Reporter-gen-Aktivität auf das Vorderhirn und die Neuralleistenstrukturen aus (G) und war in älteren Stadien hauptsächlich auf Bereiche des Vorderhirns und auf die Mittelhirn-/Hinterhirngrenze beschränkt (H). Das kürzere -2720/+501EGFP Reporter-gen wies in *X. tropicalis* ein analoges Expressionsmuster auf (I-K). Die Ganzkeimfärbung eines -2720/+501 EGFP transgenen Embryos im St. 37 zeigte eine streifenförmige Lokalisation der EGFP mRNA an der Mittelhirn-/Hinterhirngrenze (L, Pfeil) und im Neuralleistengewebe.

Um die Integrationseffizienz zu bestimmen, wurden die überlebenden Embryonen aus drei Versuchstagen ausgezählt (Tabelle 5.1). Die durchschnittliche Integrationsrate lag bei *X. tropicalis* bei 35,2 % und war damit deutlich höher als bei *X. laevis* (15,2 %). Die Embryonen, in deren Genom das kürzere -2720/+501EGFP Konstrukt integriert werden sollte, offenbarten keine Reporter-gen-Aktivität. Es ist fraglich, ob hier die Integration des Transgens in das Chromatin des Spermienzellkerns missglückte oder ob dieses Konstrukt in *X. laevis* keine ausreichenden Informationen zur Aktivierung des nachgeschalteten Reporter-gens trägt.

Tabelle 5.1. Integrationseffizienz der unterschiedlichen Konstrukte in *X. laevis* und *X. tropicalis*

| Art | Konstrukt | n Embryonen | n Transgene | Anteil in % |
|----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>X. laevis</i> | -3855/+501EGFP | 112 | 17 | 15,2 |
| | -2720/+501EGFP | 94 | 0 | 0 |
| <i>X. tropicalis</i> | -3855/+501EGFP | 63 | 21 | 33,3 |
| | -2720/+501EGFP | 27 | 10 | 37,0 |

Das -3855/+501EGFP Konstrukt war somit in der Lage, sowohl in *X. laevis*, als auch in *X. tropicalis* ein Reporter-gen *XTcf-4* gewebespezifisch zu aktivieren. Allerdings beschränkte sich diese Aktivität nicht auf das Mittelhirn, sondern breitete sich auf weitere Kopfstrukturen, wie die Retina, das Vorderhirn, die Neuralleisten und Kieferstrukturen aus. Die zeitliche Aktivierung dieses Konstrukts setzte bei transgenen *X. tropicalis* entsprechend der endogenen *XTcf-4* Expression in der späten Neurula ein, während sie bei transgenen *X. laevis* erst ab St. 26 detektierbar war.

Mit diesem transgenen Ansatz wurde zwar eine höhere Penetranz erzielt als mit der Plasmidinjektion, jedoch überschritt die Reporter-gen-Aktivität die Grenzen der endogenen *XTcf-4* Expressionsdomäne.

Dennoch untermauerten die transgenen *X. laevis* Embryonen die bereits aus den Plasmidinjektionen hervorgegangene Vermutung, dass sich die regulatorischen Elemente für eine Mittelhirn-spezifische Reporter-gen-Expression auf dem *XTcf-4* 5' Sequenzbereich zwischen -3855 und -2720 befinden.

5.3 Analyse der *XTcf-4* Enhancer Elemente zwischen -3855 und -2720

In Reportergergen Analysen sollte untersucht werden, durch welche in der Gehirnmusterung involvierten Faktoren die *XTcf-4* Promotorsequenz reguliert werden kann. Über eine Sequenzanalyse wurden putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert und über deren Mutationen auf ihre funktionale Relevanz, sowohl in Zellkultur als auch im Embryo, getestet.

5.3.1 Regulation eines -3773/+501 Reportergergens über Wnt, Shh und Fgf-8

Zur Analyse der *XTcf-4* Promotor Regulation in transient transfizierten Gewebekulturzellen wurde ein -3773/+501 Konstrukt im Vektor pGL3 mit dem Reportergergen *Luziferase* fusioniert. Für die Reportergergen Analysen wurden HEK 293 Zellen mit je 2 µg des -3773/+501 *Luziferase* Plasmids und je 3 µg eines Überexpressions-Plasmids transfiziert. Die Aktivität der *Luziferase* wurde auf die Aktivität der co-transfizierten β -Galaktosidase normiert.

Zunächst wurde der Einfluss von Signalkaskaden untersucht, die die antero-posteriore (Wnts und Fgf-8), bzw. die dorso-ventrale (Shh) Musterung des Gehirns regulieren.

Während Fgf-8 das *XTcf-4* Reportergergen-Konstrukt nicht aktivierte, war sowohl durch die kanonische Wnt-Signalkaskade, vermittelt durch die Transfektion von stabilisierten β -Catenin (S33A), als auch durch die Inhibition des Shh Weges durch die Expression eines dominant negativen Patched Rezeptors, die Aktivität des -3773/+501 *Luziferase* Konstrukts 3-fach erhöht (Abb. 5.14).

Die ventralisierenden Shh Signale werden im Zellkern durch Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie (von Glioblastoma) vermittelt. Allerdings wurde auf der -3773/+501 *XTcf-4* 5'-Sequenz keine putative Bindestelle für Gli Proteine vorhergesagt (TESS Analyse). Außerdem war auch das -2720/+501 Promotorfragment durch dn Patched aktivierbar (nicht gezeigt). Damit erfolgt die Regulation über die Shh-Signalkaskade in einem Promotorbereich, der nicht für die *XTcf-4* gewebespezifische Lokalisation zuständig ist. Möglicherweise verläuft die Aktivierung des *XTcf-4* Reportergergens durch die Inhibition der Shh-Signalkaskade über einen indirekten Mechanismus.

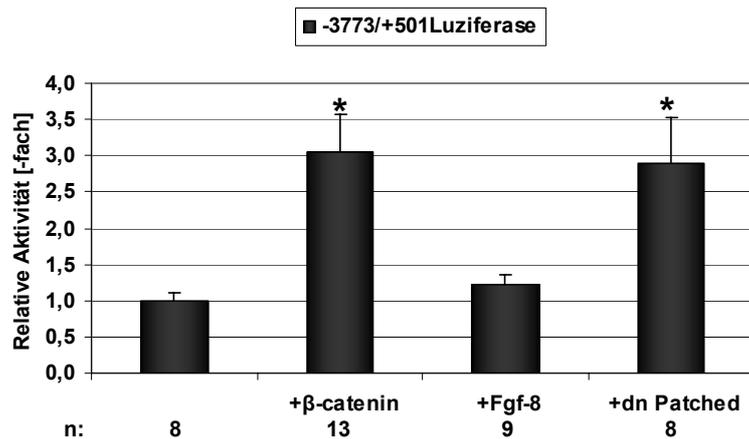


Abb. 5.14 Aktivierung des *XTcf-4* Reportergens durch Wnt-Signale und inhibierter Shh-Signalkaskade. Die Reportergen Analyse in HEK 293 Zellen offenbarte eine signifikante Aktivierung des -3773/+501*Luziferase* Reportergens durch die Co-Transfektion von β -catenin und dnPatched. Eine Regulation durch Fgf-8 wurde nicht beobachtet. Die basale Aktivität der Reportergenkonstrukte wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Messreihen. n gibt die Anzahl der durchgeführten Transfektionen wieder. * = signifikante Aktivierung im Student-T-Test ($p < 0,005$) nach Co-Transfektion von β -catenin und dnPatched in Bezug auf das -3773/+501 *Luziferase* Konstrukt.

Dagegen könnte die Wnt-abhängige Promotoraktivität Aufschluss über den molekularen Mechanismus der Autoregulation liefern. Die Sequenzanalyse (Abb. 5.16) offenbarte eine putative Lef/Tcf Bindestelle an Position -3660 bis -3649. Diese scheint jedoch nicht die Aktivierung durch β -Catenin zu vermitteln, da auch ein -2720/+501*Luziferase* Konstrukt, welches dieses Motiv nicht enthielt, durch β -Catenin aktiviert wurde (nicht gezeigt). Ein zusätzliches funktionales WRE (Wnt Responsive Element) sollte erwartungsgemäß zu einer stärkeren Stimulierbarkeit des Reportergens führen. Daher scheint dieses potentielle Lef/Tcf Motiv nicht relevant zu sein. Indessen befindet sich auf der *XTcf-4* 5'-Sequenz an Position -1437 bis -1428 eine Lef/Tcf Bindestelle, die funktionale Eigenschaften besitzt [S. König, Diplomarbeit 2005]. Inwieweit diese putative Bindestelle auf molekularer Ebene bedient wird, war allerdings noch unklar.

5.3.2 β -Catenin bindet an die Lef/Tcf Bindestelle auf dem *XTcf-4* Promotor

In Reportergen Analysen mit transient transfizierten HEK 293 Zellen wurde bereits gezeigt, dass ein -1775/+501 *Luziferase* Konstrukt über eine funktionale Lef/Tcf Bindestelle an Position -1437 bis -1428 durch Lef/Tcfs regulierbar ist [S. König Diplomarbeit, 2005]. Daher galt es zu überprüfen, ob endogene Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf Familie *in vivo* an diese Erkennungssequenz auf dem

endogenen *XTcf-4* Gen binden können. Hierzu wurde eine Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Um einen aktiven Zustand der Wnt-Signalkaskade zu untersuchen, wurde eine indirekte Co-Immünpräzipitation über einen anti- β -Catenin Antikörper (7D12, von R. Rupp, München) gewählt. Der ChIP wurde in XTC (*Xenopus* tissue culture) Zellen durchgeführt, da diese endogen *XTcf-4* exprimieren [Gradl et al., 1999].

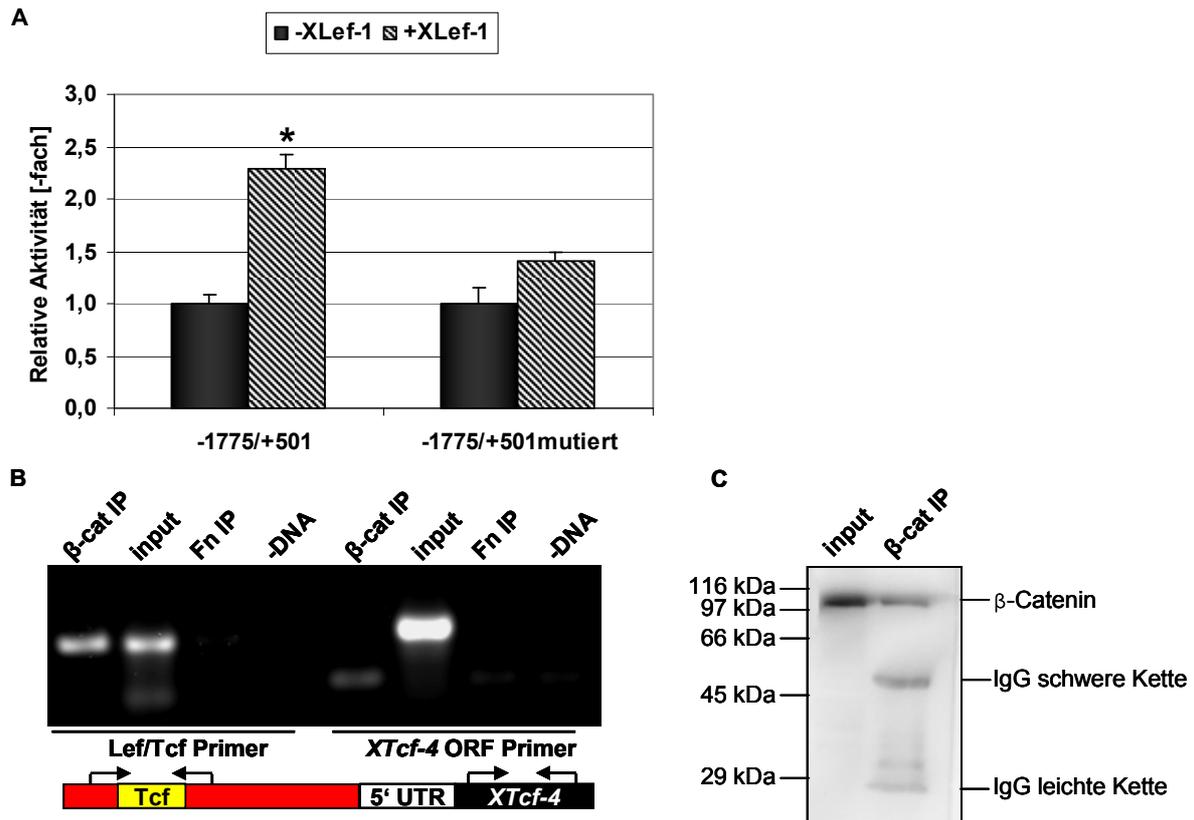


Abb. 5.15 *XTcf-4* ist ein direktes Zielgen der kanonischen Wnt-Signalkaskade. Reporteragen Analysen in transfizierten XTC Zellen resultierten in einer signifikanten Aktivierung (*= $p < 0,005$) eines -1775/+501Luziferase Konstrukts durch co-transfiziertes XLeF-1. Nach Mutation der Lef/Tcf Bindestelle wurde das -1775/+501Luziferase Konstrukt nicht mehr durch XLeF-1 reguliert (A, Daten aus Diplomarbeit). Die Chromatin Immunpräzipitation mit dem α - β -catenin Antikörper bestätigte die Interaktion zwischen endogenem β -Catenin und der Lef/Tcf Bindestelle an Position -1437 bis -1428 auf dem *XTcf-4* Promotor. Während man mit die Lef/Tcf Bindestelle flankierenden Primern ein Amplifikat auf der mit dem α - β -Catenin Antikörper (β -cat IP) co-präzipitierten DNA erhielt, zeigte die mit dem α -Fibronektin Antikörper (Fn IP) co-präzipitierte DNA kein PCR Produkt (B). Die Präzipitation von β -Catenin wurde im Western Blot bestätigt (C).

Die PCR bestätigte, dass endogenes β -Catenin mit der Lef/Tcf Bindestelle an Position -1437 bis -1428 auf dem *XTcf-4* Gen interagiert (Abb. 5.15 B). Dies spiegelt sich in dem PCR Produkt wider, das man auf der mit dem α - β -Catenin Antikörper co-präzipitierten DNA mit die Lef/Tcf Bindestelle flankierenden Primern erhält. Hingegen

zeigte die Immunpräzipitation mit dem α -Fibronectin Antikörper als Negativkontrolle kein Amplifikat auf der co-präzipitierten DNA.

XTcf-4 ist demnach ein direktes Zielgen der kanonischen Wnt-Signalkaskade, das sich selbst über eine autoregulatorische Schleife reguliert.

5.3.3 Putative Bindemotive potentieller XTcf-4 Regulatoren zwischen -3855 und -2720

Um potentielle Enhancer-Elemente für eine Mittelhirn-spezifische Expression zu identifizieren, wurde die 5' Sequenz des *XTcf-4* Gens zwischen dem Bereich von -3855 und -2720 auf potentielle Bindemotive für Transkriptionsfaktoren hin untersucht. Das Vorhersageprogramm TESS (Transcription Element Search Software, <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>) vergleicht die zu analysierende Sequenz mit Konsensus Sequenzen für Transkriptionsfaktoren in einer Datenbank und errechnet daraus eine statistische Signifikanz, die durch den „log-likelihood score“ ausgedrückt wird. Je höher der Wert des „log-likelihood score“ liegt, desto genauer stimmt die analysierte Sequenz mit der Konsensus Sequenz überein. Das Programm lieferte eine große Fülle von knapp 1500 potentiellen Bindemotiven für diese Sequenz. Darunter finden sich gehäuft und über die Sequenz verteilt Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie TFIID und TFIIA (allgemeine Transkriptionsfaktoren D und A für die RNA-Polymerase II), TBP (TATA Binding Protein), GATA-1, GATA-2, GATA-3 und GATA-4 (GATA Bindeproteine 1-4), AP1 und AP2, (Activator Protein 1 und 2) c-Fos, c-Jun, c-Myc, c-Ets-2 und NF- κ B (Nuclear Factor kappa B). Für solche putativen Bindestellen wurde von dem Programm ein log-likelihood score im Bereich von 6.0 bis 12.0 angegeben, was einer geringen Übereinstimmung der analysierten Sequenzen mit den Konsensus Sequenzen entspricht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur diejenigen Kandidaten dargestellt, die entweder an der Musterbildung des Gehirns beteiligt sind (En-2, Pax-5), oder bereits im Kontext mit der *XTcf-4* Regulation stehen (Lef/Tcfs, p53) und einen log-likelihood score von mindestens 18.0 aufweisen (Abb. 5.16).

| | | | | | | |
|-------|------------|------------|------------------|------------|------------|-------------|
| | | | En-2 (20.0) | | | |
| -3855 | CTCGAGACAT | GACCATCACC | AGCTAATTGA | TTTCTAGATA | TAATGATATT | GAATAGCTCA |
| -3800 | GCAGAGCAAT | CATGGCAGCC | CCCGTTAGAG | TCCAGTACCC | TGCGGGTTGC | GAGTAGAAGT |
| -3720 | TCCAGGTGCG | GGTATAGACG | TGGGTCGGCG | GTTCTGCGGG | TTTGCGGGTC | GGGCCGCGGG |
| -3680 | TCTTCTCAAT | ACTGATTTT | ACTCCTTTT | TC | TGATCACG | CCTACTCCG |
| | (18.0) | | | | | p53 |
| -3620 | TTCC | GATTTA | CAATGACAGC | ACTTCCTGAT | TCTTGATGGT | CAGCGGGTCG |
| | | | | | | CGGGTCTGGG |
| -3560 | TTGCGGATAA | GGTACTTGCG | GGTCGGGTT | GGGTTTGAG | ATTGCAGGT | GCAGGTATGG |
| -3500 | GTCGGGTACG | GGTTCCAAA | AATGGACCCG | TGCAGGAATC | TAGCCCCCGT | GTAGTCACAT |
| -3440 | CAGTACAGTT | GCCTGTGCC | TGTTACCTGG | GCCAATATAA | ATTACTGGAC | ATTTATAGTT |
| -3380 | GAATTAGGAA | CGGATCAAAC | CCATTATCTT | TAGATTTGTC | CAGAGAAACC | AAATTGACCT |
| -3320 | CTAATACCAA | ACCGAATACC | AAATGGAACC | CAAAATTATA | TGCTGAAATC | TGGGTACCAG |
| | | | Pax-5 (18.0) | | | |
| -3260 | TGTCTTAATA | CTAGG | GATGC AACGAATCCA | G | GATCCTATT | CGGAATTCGG |
| | | | | | | CCTTTTTTCAG |
| -3200 | CAGGATTCAA | ACCAGGCCCA | GACTGGCAAT | CTGAGGGGCC | GCTGTAAAGT | CCCATCGGCA |
| -3140 | GTCAGTATTT | AGTGGGCTGG | TGGAGGACTA | TTTGGGCCTC | TCTGTACTTA | GAATGCCAGG |
| -3080 | GCCTATTTTG | ACTCCCAGTC | CAGACCTGGG | CCAAACCGAA | TCCTAATTTG | CATATGCAAA |
| -3020 | TGAGAGGTGG | GGAGGAAAT | CGTGTGACTT | TTTGTACCA | AACAAGGAAG | TAAAAAATGT |
| -2960 | TTCCCTTCC | AATTTGCATA | TGCAAATTAG | GATTCGGAAT | TTGGCTGAAT | CTAAAAATAG |
| | | | En-2 (18.0) | | | |
| -2900 | TGGATACGGT | GCATCTCTAT | TAAATACATT | TCTCCATTGC | TTAAAGGGTC | ATATACCCCT |
| -2840 | CCAAAATATC | ACCCCCGCTC | CCTGAGTGTG | AGAAGCACTT | CTGTTACTGA | GCTTGGCACA |
| -2780 | ACCAGGCAGC | TGTACCCAG | ATTTTCCCAA | GTGGGTTGGG | TTTCTCCTAG | TATGAAAAAT |

Abb. 5.16 Putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf der *XTcf-4* Sequenz zwischen Position -3855 und -2720. Die farbig hinterlegten Bindemotive wurden von dem Vorhersageprogramm TESS (Transcription Element Search Software) berechnet. In Klammern ist der jeweilige log-likelihood score angegeben.

Die Sequenzanalyse offenbarte eine putative Lef/Tcf Bindestelle an Position -3660 bis -3649, die jedoch wie bereits in Abschnitt 5.3.1. erörtert, keinen Einfluss auf die *XTcf-4* Autoregulation zu nehmen scheint.

Des Weiteren wurde für die Position -3626 bis -3617 ein potentielles Bindemotiv für p53 vorhergesagt. Da die Überexpression von p53 in Reporter-gen Studien keinen regulatorischen Einfluss auf die beiden untersuchten -3855/+501 und -2720/+501 *XTcf-4/Luziferase* Konstrukte ausübte (nicht gezeigt), scheint auch dieses Bindemotiv nicht funktional zu sein.

Sehr interessant ist das Auftreten zweier potentieller Bindemotive (-3840 bis -3831 und -2890 bis -2871) für den Homöobox Transkriptionsfaktor Engrailed-2 (En-2), sowie einer Konsensus Sequenz für den paired-domain Homöobox Transkriptionsfaktor Pax-5 an Position -3245 bis -3230.

Obwohl ihre Expressionsfelder am Isthmus nicht mit dem von *XTcf-4* überlappen, besteht die Möglichkeit einer gegenseitigen Regulation. So wurde gezeigt, dass nach

einem XTcf-4 knockdown, die *XEn-2* Expression stark reprimiert wird [Kunz et al., 2004] und *XEn-2* ein direktes Zielgen der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade ist [McGrew et al., 1999]. Somit ist eine direkte Kreuzregulation dieser Faktoren nicht ausgeschlossen.

5.3.4 Funktionalitätstest der putativen XPax-5 und XEn-2 Bindestellen

Um die Regulation von *XTcf-4* durch die Transkriptionsfaktoren XEn-2 und XPax-5 untersuchen zu können, mussten zunächst mit den entsprechenden Überexpressionskonstrukten einerseits und Mutationen in den potentiellen Konsensus-Sequenzen andererseits, die Werkzeuge für die Analyse geschaffen werden. Daher wurden die putativen Bindemotive in dem -3773/+501 *Luziferase* Konstrukt mutiert [D. Fichtner, Diplomarbeit 2007].

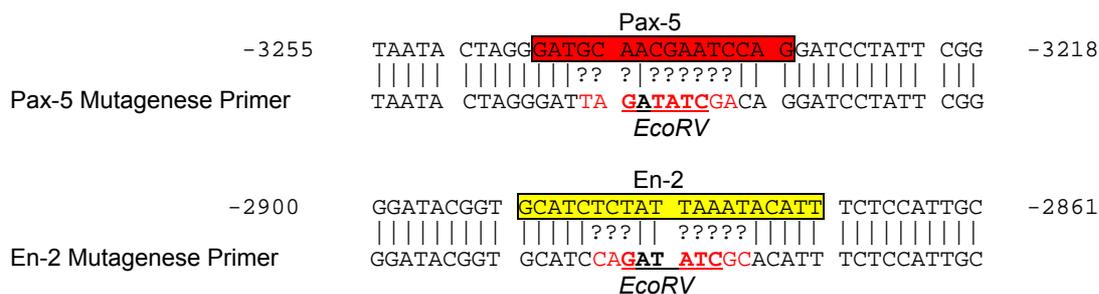


Abb. 5.17 Mutagenese der Pax-5 und En-2 Konsensus-Sequenzen. Über eine ortsspezifische Mutagenese wurden Punktmutationen in die putativen Bindemotive eingeführt. In dem 16 bp umfassenden Pax-5 Motiv wurden 9 Basen verändert (rot), in der potentiellen En-2 Bindestelle 8 bp der 20 bp umspannenden Konsensus-Sequenz. Beide Sequenzen wurden so mutiert, dass nach erfolgreicher Mutagenese eine *EcoRV* Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde.

Des Weiteren wurden myc-fusionierte Überexpressionskonstrukte von XEn-2 [D. Fichtner, Diplomarbeit 2007], sowie von XPax-2 und XPax-5 kloniert. Hierzu wurde der offene Leserahmen von XPax-2a aus einem cDNA Konstrukt im pBSSK+ Vektor (von A. Brändli, Zürich, Schweiz) amplifiziert und über *EcoRI/XhoI* in den pCS2 Vektor, der sechs Wiederholungen des c-myc Epitops trägt, inseriert.

Ein bereits in pCS2 inseriertes XPax-5 Überexpressionskonstrukt (ebenfalls von A. Brändli) wurde über eine *HindIII/XhoI* Klonierung mit sechs myc Epitopen versehen. Nach Transfektion in XTC Zellen waren die myc-Fusionskonstrukte im Zellkern lokalisiert und nach Injektion im Embryo exprimiert (Abb. 5.18 A, B).

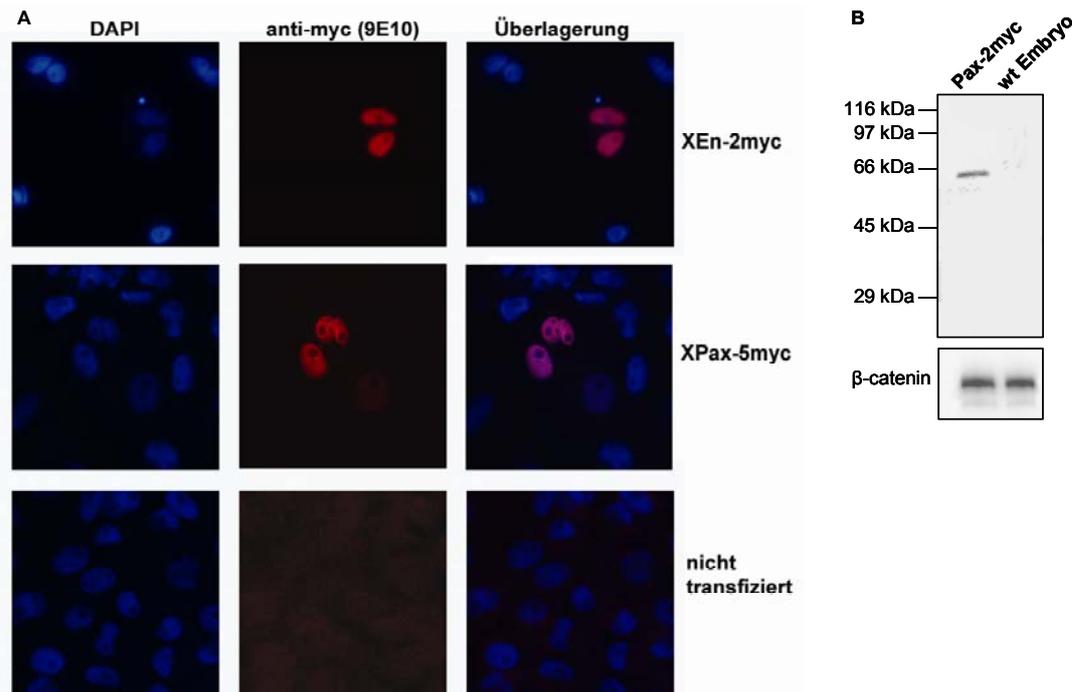


Abb. 5.18. Die rekombinanten Proteine werden in Zellkultur und im Embryo exprimiert. Die Immunfluoreszenz (A) mit einem anti-myc Antikörper (9E10) und einem Cy-3 gekoppelten sekundären Antikörper (mittlere Spalte) zeigte, dass nach Transfektion von XTC Zellen, XEn-2myc und XPax-5myc im Zellkern lokalisiert waren. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (linke Spalte). Im Western Blot (B) ließ sich das XPax-2myc Protein aus Embryonen detektieren, die mit 200 µg XPax-2myc pCS2 Vektor injiziert wurden. XPax-2 besteht aus 492 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 53 kDa. Die fusionierten myc-Epitope tragen ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa zur Gesamtgröße bei. Als Ladekontrolle diente β -catenin. Größenstandard = SDS6H2.

Somit standen die benötigten molekularen Werkzeuge zur Funktionsanalyse der potentiellen En-2 und Pax-5 Bindemotive auf der 5' Region des *XTcf-4* Gens bereit.

Zur Analyse der Funktionalität der putativen Pax-5 Bindestelle wurden XTC Zellen mit je 2 µg des -3773/+501 *Luziferase* Konstrukts mit intaktem, bzw. mutiertem Bindemotiv zusammen mit 3 µg des entsprechenden Überexpressionskonstruktes und 1 µg CMV- β -Galaktosidase Plasmids co-transfiziert. Um die Regulation im Embryo zu untersuchen wurde in Embryonen im Zweizell-Stadium je 100 µg des -3773/+501 *Luziferase* Konstrukts ohne, bzw. mit mutierter Bindemotive, 100 µg des CMV- β -Galaktosidase Plasmids und 50 µg des Überexpressionskonstrukts pro Blastomere injiziert. Die basalen Aktivitäten der Reporter genkonstrukte wurden gleich 1,0 gesetzt.

In XTC Zellen ließ sich eine signifikante Aktivierung ($p < 0,005$) des -3773/+501 *Luziferase* Konstrukts durch die Co-Transfektion von XPax-5 beobachten, welche durch die Mutation des Pax-5 Bindemotivs vollständig aufgehoben wurde. Die Überexpression von XPax-2 wies dagegen keinen signifikanten Effekt auf und

resultierte in einer nahezu unveränderten Reporteragenaktivität. Das mutierte Konstrukt zeigte eine leicht verringerte Aktivität (Abb. 5.19 A).

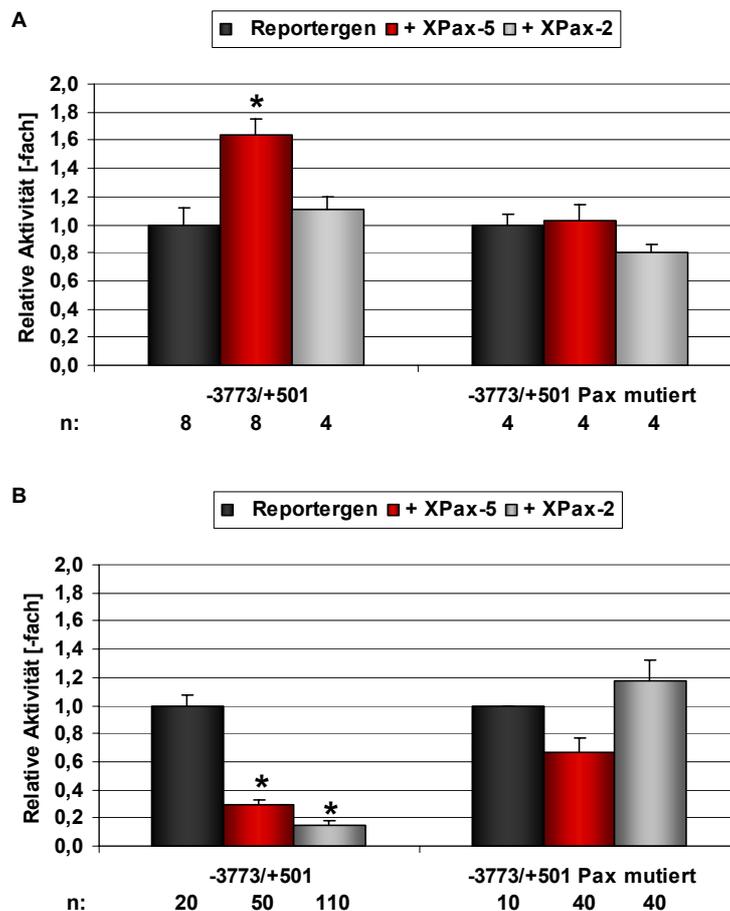


Abb. 5.19 Analyse der Funktionalität des Pax-5 Bindemotivs. Gezeigt ist die x-fache Aktivierung des -3773/+501*Luziferase* Konstrukts mit intakter und mutierter Pax-5 Konsensus Sequenz in XTC Zellen (A), bzw. im Embryo (B). Das -3773/+501*Luziferase* Konstrukt wurde in Zellkultur durch XPax-5 signifikant aktiviert. Die Mutation des Pax-5 Bindemotivs führte zu einem Verlust der Regulierbarkeit. XPax-2 zeigte keinen signifikanten Effekt auf das -3773/+501 *Luziferase* Konstrukt. Im Gegensatz dazu reprimierten XPax-5 und XPax-2 im Embryo die *XTcf-4* Reporteragen-Aktivität signifikant. Die basale Aktivität der Reporteragenkonstrukte wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Messreihen. n gibt die Anzahl der durchgeführten Transfektionen (A), bzw. die Anzahl der injizierten Embryonen (B) wieder.

* = signifikante Aktivierung/Repression im Student-T-Test zu einem Signifikanzniveau von $p < 0,005$ nach Überexpression von XPax-5/XPax-2 in Bezug auf das -3773/+501 *Luziferase* Konstrukt.

Überraschenderweise offenbarte die Co-Injektion von XPax-5 und XPax-2 im Embryo eine signifikante Repression ($p < 0,005$) des Reporters um den Faktor 0,30 bzw. 0,15 (Abb. 5.19 B). Die Mutation der Pax-5 Konsensus Sequenz führte zu einer verminderten Repression durch eine XPax-5 Co-Injektion (um den Faktor 0,66), wohingegen XPax-2 keinen Effekt mehr zeigte (Faktor 1,18). Somit wurde das -3773/+501*Luziferase* Konstrukt in Zellkultur und im Embryo unterschiedlich durch

XPax-5 und XPax-2 reguliert, wobei die Pax-5 Bindestelle in beiden Systemen einen regulatorischen Einfluss ausübte.

Die Überexpression von XEn-2 resultierte in XTC Zellen in einer signifikanten Reduktion ($p < 0,005$) des $-3773/+501$ Luziferase Konstrukts um den Faktor 0,64, die nach Mutation des En-2 Bindemotivs nicht mehr beobachtet wurde. Dementsprechend führte die Überexpression von XEn-2 im Embryo ebenfalls zu einer Repression des *XTcf-4* Reportergens um den Faktor 0,69, die durch die Mutation der En-2 Bindestelle vollständig aufgehoben wurde (Abb. 5.20 B). Somit wird das $-3773/+501$ Luziferase Konstrukt sowohl in XTC Zellen, als auch im Embryo durch XEn-2 reprimiert.

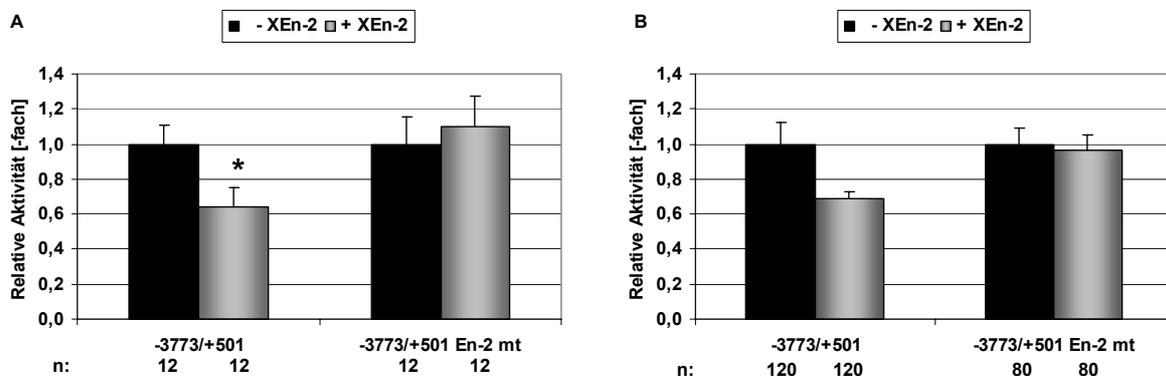


Abb. 5.20 Analyse der Funktionalität des En-2 Bindemotivs. Das $-3773/+501$ Luziferase Konstrukt wurde in XTC Zellen durch XEn-2 signifikant reprimiert (A). Eine XEn-2 Überexpression führte im Embryo ebenfalls zu einer Reduktion der Reporter-gen-Aktivität, allerdings war diese in Bezug auf das $-3773/+501$ Luziferase Konstrukt nicht signifikant. Allerdings war nach Mutation der En-2 Bindestelle in beiden Systemen keine Repression mehr zu beobachten. Die basale Aktivität der Reporter-gen-konstrukte wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Messreihen. n gibt die Anzahl der durchgeführten Transfektionen (A), bzw. die Anzahl der injizierten Embryonen (B) wieder.

* = signifikante Repression im Student-T-Test ($p < 0,005$) nach Überexpression von XEn-2 in Bezug auf das $-3773/+501$ Luziferase Konstrukt.

Somit wurde gezeigt, dass *XTcf-4* sowohl über die Pax-5 Bindestelle an Position -3245 bis -3230, als auch über die En-2 Konsensus Sequenz an Position -2890 bis -2871 regulierbar ist. Allerdings war die Regulation des *XTcf-4* Promotors durch Pax-2 und Pax-5 in Gewebekultur-Zellen und im Embryo verschieden. Aktivierende, bzw. reprimierende Eigenschaften der paired box Transkriptionsfaktoren schienen hier stark vom jeweiligen Kontext abzuhängen.

Eindeutig war hingegen der repressive Einfluss von XEn-2 auf den *XTcf-4* Promotor, der sowohl in XTC Zellen, als auch im Embryo beobachtet wurde.

5.3.5 Die *XEn-2* Promotoraktivität ist abhängig von XTcf-4

Der spezifische knockdown von XTcf-4 durch ein Morpholino antisense Oligonukleotid resultiert in einer Reduktion der XEn-2 Expression am Isthmus [Kunz et al., 2004]. *Xenopus En-2* ist selbst ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs und besitzt drei funktionale Lef/Tcf Bindestellen auf seiner 5' regulatorischen Sequenz (zwischen Position -2632 und -1945), an die rekombinantes hLef-1 *in vitro* bindet [McGrew et al., 1999]. In Reportergergen Analysen im Embryo sollte untersucht werden, inwieweit eine 2,8 kb umspannende *XEn-2* Promotorsequenz direkt durch XTcf-4 reguliert wird. Hierzu wurde zum gezielten knockdown je 4 pg eines Lef/Tcf Morpholinos, 200 pg des 2,8 kb XEn-2-Luziferase Reportergergenkonstrukts (von R. T. Moon, Seattle, Washington, USA), sowie 100 pg des CMV- β -Galaktosidase Plasmids in beide Blastomere von Embryonen im Zweizell-Stadium injiziert. Im Neurulastadium wurde die Luziferase Aktivität des XEn-2 Promotorkonstrukts bestimmt und auf die Aktivität der β -Galaktosidase normiert. Die knockdowns von XTcf-4 und XLef-1 hatten eine signifikante Reduktion (auf den Faktor 0,47 durch das XTcf-4 MO und auf 0,41 durch das XLef-1 MO) der XEn-2 Promotoraktivität im Student-T-Test zu einem Test Niveau von $p < 0,005$ zur Folge.

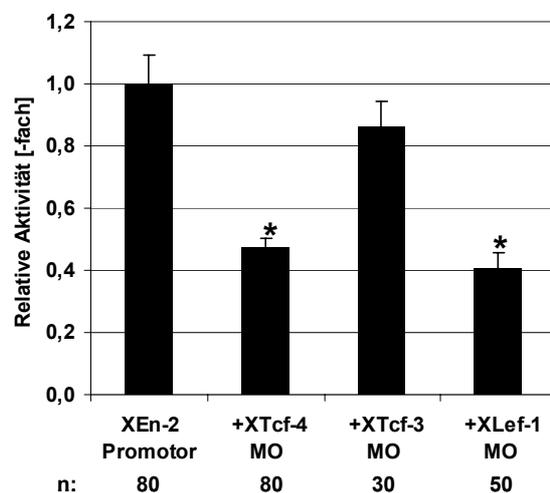


Abb. 5.21 Der *XEn-2* Promotor wird durch Lef/Tcfs reguliert. Die knockdowns von XTcf-4 und XLef-1 führten zu einer signifikanten Repression der XEn-2 Promotoraktivität, während die Inhibierung von XTcf-3 nur eine minimale Reduktion zur Folge hatte. Die basale Aktivität des XEn-2 Reportergergenkonstrukts wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Messreihen. n gibt die Anzahl der injizierten Embryonen wieder. * = signifikante Repression im Student-T-Test ($p < 0,005$).

Die Inhibition von XTcf-3 hatte hingegen keine signifikante Auswirkung auf die Aktivität des XEn-2 Reportergergens. Hier war lediglich eine schwache Repression auf

einen Wert von 0,86 zu beobachten (Abb. 5.21). Somit ist die Reduktion der *XEn-2* Expression am Isthmus nach einem *XTcf-4* knockdown durch die verminderte Aktivität auf Promotorebene zu erklären. *XTcf-4* ist demnach für die *XEn-2* Expression notwendig.

5.3.6 Regulatorische Elemente des *XTcf-4* Promotors

Das Schaubild fasst den strukturellen Aufbau des *XTcf-4* Gens von Position -3855 bis +822, sowie die Daten der Promotor-Analysen zusammen (Abb. 5.22). Es wurde sowohl durch Plasmidinjektionen in Embryonen, als auch durch die Analyse transgener *X. laevis* gezeigt, dass für eine *XTcf-4* gewebespezifische Aktivität eines Reportergens im Mittelhirn der 5' Bereich zwischen -3855 und -2720 zwingend notwendig ist. Die ersten beiden Intron-Sequenzen waren hingegen für diese Lokalisation irrelevant. Die Autoregulation von *XTcf-4* erfolgte über eine funktionale Lef/Tcf Bindestelle an Position -1437 bis -1428, während eine putative Lef/Tcf Konsensus-Sequenz an Position -3660 daran keinen Einfluss nahm.

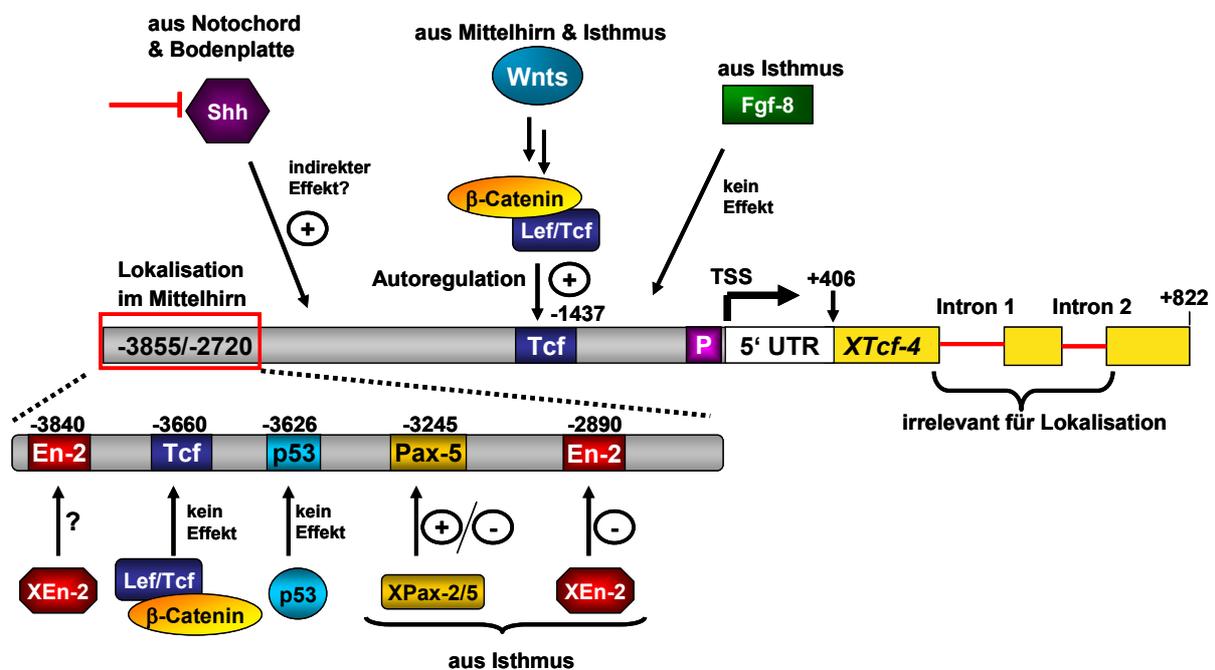


Abb. 5.22 Struktureller Aufbau und putative regulatorische Elemente des *XTcf-4* Gens. Das Schaubild fasst die Ergebnisse der *XTcf-4* Promotorstudien zusammen. TSS = Transcription Start Site, P = Promotor, 5' UTR = 5' Untranslated Region.

Fgf-8 und p53 zeigten keine regulatorischen Auswirkungen auf das -3773/+501 *Luziferase* Konstrukt, während die Inhibition des Shh Weges zu einer Aktivierung führte. Da keine Bindestellen für die Gli Transkriptionsfaktoren auf der *XTcf-4* Promotorsequenz vorhergesagt wurden, scheint diese Regulation durch einen indirekten Mechanismus zu erfolgen.

Die Reporter-gen-Studien zeigten eine Regulation des *XTcf-4* Promotors durch die Transkriptionsfaktoren XEn-2 und XPax-2/5 über funktionelle Bindestellen innerhalb der Lokalisationssequenz zwischen -3855 und -2720. Daher wird nachfolgend die endogene *XTcf-4* Regulation durch diese Faktoren, sowie die Wechselwirkungen zwischen den Transkriptionsfaktoren XTcf-4, XEn-2 und XPax-2/5 in der Musterung des Mittelhirns von *X. laevis* durch Funktionsgewinn und -verlust Experimente genauer analysiert.

5.4 Gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren XTcf-4, XEn-2, XPax-2 und XPax-5 im Gehirn von *Xenopus laevis*

5.4.1 Regulation der XTcf-4 Expression durch XEn-2, XPax-2 und XPax-5

Übereinstimmend zu den Reporter-gen-Analysen führte die Applikation von 100 pg XEn-2 mRNA in eine dorsale Blastomere im Vierzell-Stadium in 76,0 % der Embryonen zu einer reduzierten *XTcf-4* Expression. Dagegen resultierte die Überexpression von XPax-5 in 18,6 % der Embryonen in einer verstärkten Expression, während die Injektion von XPax-2 keinen Effekt offenbarte (Abb. 5.23). Dies steht ebenfalls im Einklang mit den Reporter-gen-Analysen in Zellkultur, wo die XPax-5 Überexpression den *XTcf-4* Promotor aktivierte, während überexprimiertes XPax-2 keine Auswirkungen zeigte.

Der repressive Effekt von XEn-2 war spezifisch für die *XTcf-4* Expression, da die XPax-2 Transkripte lediglich in 8 % der Embryonen (n=25) verringert waren (nicht gezeigt). Ebenso hatte die Überexpression von XPax-2 und XPax-5 nahezu keinen Einfluss auf die *XEn-2* Expression. Diese war in 5 % der XPax-2 injizierten Embryonen (n=40), bzw. in 6,2 % der XPax-5 injizierten Embryonen (n=65) reduziert (nicht gezeigt).

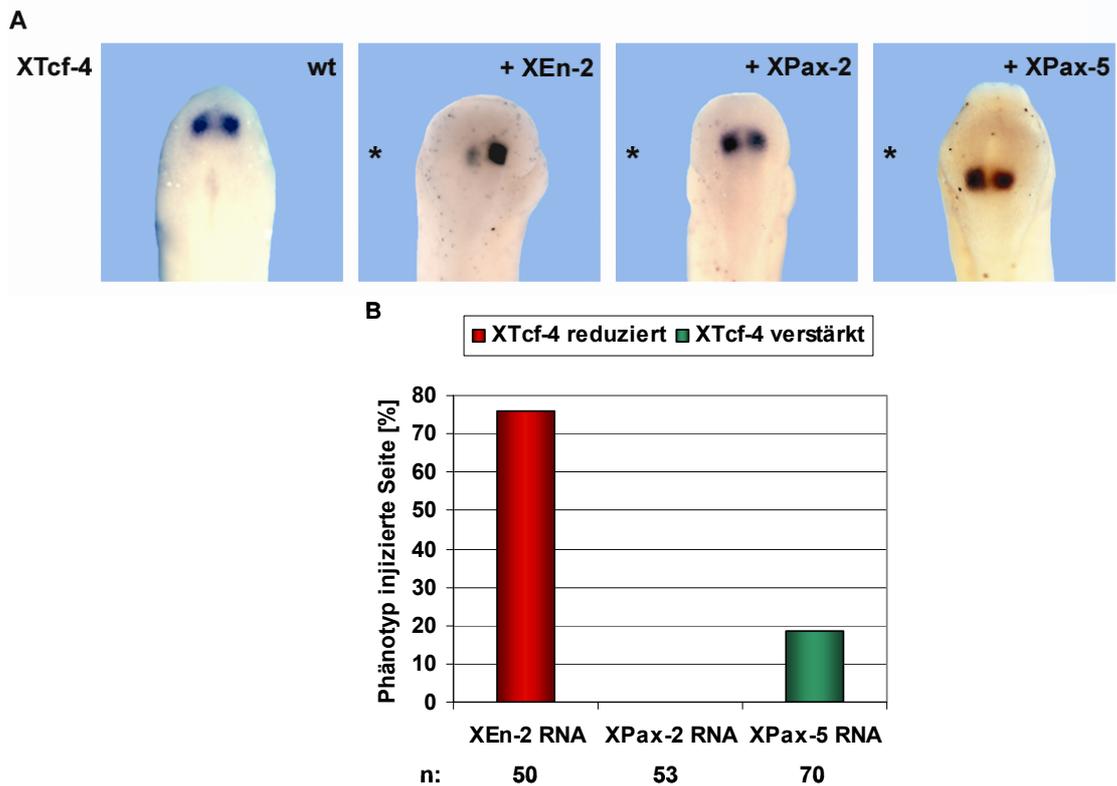


Abb. 5.23 Regulation der XTcf-4 Expression durch XEn-2, XPax-2 und XPax-5. Es wurden 100 pg mRNA in eine dorsale Blastomere im Vierzell-Stadium appliziert und die XTcf-4 Expression im St. 27 in der *in-situ* Hybridisierung analysiert. Der Stern markiert die injizierte Seite (A). Die XEn-2 Überexpression führte zu einer XTcf-4 Reduktion in 76,0 % der Embryonen, während nach XPax-5 mRNA Injektion die Expression in 18,6 % der Embryonen verstärkt war. XPax-2 zeigte keinen Einfluss auf die XTcf-4 Expression (B). n gibt die Anzahl der in der *in-situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen wieder.

5.4.2 Charakterisierung der Morpholino antisense Oligonukleotide zum spezifischen knockdown von XEn-2, XPax-2 und XPax-5

Zur Analyse der endogenen Auswirkung der Transkriptionsfaktoren XEn-2 und XPax-2/5 auf die XTcf-4 Expression wurden Morpholino antisense Oligonukleotide konzipiert, die einen spezifischen knockdown dieser Proteine vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein XEn-2 Morpholino eingesetzt, welches die ersten 13 bp der kodierenden Sequenz abdeckt und 9 Basen in den 5' UTR hineinreicht. Das Pax-2 Morpholino umfasst 16 bp des Leserahmens und 9 Basen des 5' UTRs. Da die 5' UTR Sequenz von *X. laevis* Pax-5 unbekannt ist, wurde das Morpholino so konzipiert, dass es die ersten 25 kodierenden Basen abdeckt (Abb. 5.24 A).

Die Funktionalität dieser drei Morpholinos wurde im TNT[®] *in vitro* Translationssystem überprüft. Dabei wurde die linearisierte Plasmid-DNA durch die Zugabe von RNA Polymerasen in einem Reticulozyten-Lysat transkribiert und anschließend translatiert. Durch den Einbau von radioaktivem ³⁵S-Methionin wurde das syntheti-

sierte Protein mittels eines Phosphoimagers detektiert. Als Positivkontrolle wurde lediglich die linearisierte Plasmid DNA ohne Morpholino eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde jeweils eines der Morpholinos mitgeführt, von dem man keine spezifische Translationsinhibition erwartete. Als Ladekontrolle dienten die mit Coomassie gefärbten Proteine des Reticulozyten-Lysats.

A

5' - G GGG AAC AGC **AUG** GAA GAG AAU G - 3' XEn-2 RNA
 3' - C CCC TTG TCG TAC CTT CTC TTA C - 5' XEn-2 Morpholino

5' - UGC CUC CCC **AUG** GAU AUG CAC UGC A - 3' XPax-2 RNA
 3' - ACG GAG GGG TAC CTA TAC GTG ACG T - 5' XPax-2 Morpholino

5' - **AUG** GAA AUA CAC UGU AAG CAC GAC C - 3' XPax-5 mRNA
 3' - TAC CTT TAT GTG ACA TTC GTG CTG G - 5' XPax-5 Morpholino

B

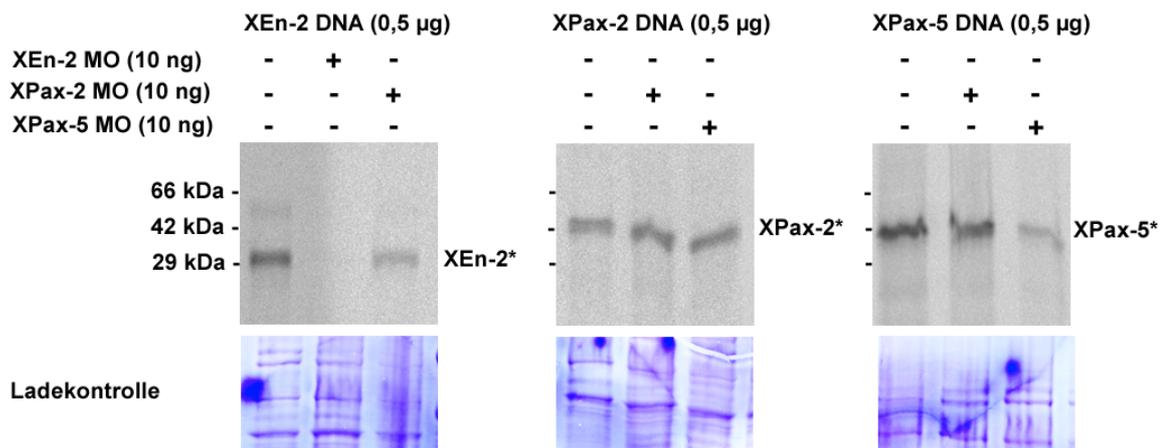


Abb. 5.24 Sequenz und Funktionalitätstest der XEn-2, XPax-2 und XPax-5 Morpholinos (MO). Die drei Morpholino antisense Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass sie das Startkodon (rot) abdecken. Die XEn-2 und XPax-2 Morpholinos ragen 10, bzw. 9 Basen in den 5' UTR hinein, während das XPax-5 Morpholino die ersten 25 Basen des Leserahmens umspannt (A). Im TNT[®] *in vitro* Translationssystem ließ sich durch Zugabe der XEn-2 Morpholino Lösung (10 ng) eine vollständige Inhibition der XEn-2 Translation erreichen. Das XPax-2 Morpholino führte zu keiner auffälligen Reduktion von XPax-2. Durch die Zugabe des XPax-5 Morpholino zeigte sich eine spezifische Reduktion der XPax-5 Translation. Als Ausgangsmaterial für die Transkription und Translation wurden je 0,5 µg des entsprechenden Plasmids eingesetzt. Gezeigt sind die Aufnahmen des Phosphoimagers der ³⁵S-Methionin markierten Proteine (mit einem Stern markiert), sowie die als Ladekontrolle dienenden Coomassie gefärbten Gele (B).

Das XEn-2 und das XPax-5 Morpholino führten zu einer spezifischen Reduktion ihrer Zielproteine (Abb. 5.24 B). Die XEn-2 Translation wurde durch die Zugabe des XEn-2 Morpholinos vollständig blockiert. Überraschenderweise war auch nach Zugabe des als Negativkontrolle eingesetzten XPax-2 Morpholinos die XEn-2 Bande verringert. Diese Beobachtung könnte zum Teil durch ungleichmäßiges Beladen des SDS Gels

begründet werden, da die Coomassie Färbung in dieser Spur ebenfalls eine verringerte Proteinmenge des Reticulozyten Lysats aufweist. Eine spezifische Unterdrückung von XEn-2 durch das XPax-2 Morpholino ist unwahrscheinlich, da keine Sequenzhomologie zwischen der XEn-2 mRNA und dem XPax-2 Morpholino besteht.

Das XPax-5 Morpholino inhibierte die XPax-5 Translation nicht vollständig, führte aber zu einer deutlichen Reduktion der XPax-5 Proteinmenge. Das XPax-2 Morpholino hatte hingegen keinen sichtbaren Einfluss auf die Translation von XPax-5 genommen. Allerdings wurde durch das XPax-2 Morpholino auch die XPax-2 Translation nicht deutlich unterdrückt. Als mögliche Ursachen könnte eine schlechte Bindung des XPax-2 Morpholinos an die XPax-2 mRNA oder ein suboptimales Verhältnis zwischen eingesetzter RNA und Morpholino angeführt werden.

Somit ist die Funktionalität des XEn-2 und des XPax-5 Morpholinos *in vitro* verifiziert, nicht aber die des XPax-2 Morpholinos.

5.4.3 Die *XTcf-4* Expression im Mittelhirn ist abhängig von XEn-2 und XPax-2/5

Um die Spezifität der Morpholino antisense Oligonukleotide *in vivo* zu verifizieren, wurden den Embryonen zusammen mit dem jeweiligen Morpholino zeitgleich das entsprechende Überexpression-Plasmid in eine dorsale Blastomere des Vierzell-Stadiums co-injiziert, um so den Effekt des knockdowns spezifisch aufzuheben. Hierbei wurden XEn-2, XPax-2 und XPax-5 Konstrukte benutzt, die N-terminal mit sechs myc-Wiederholungen fusioniert waren. Dadurch wurde eine Bindung des Morpholinos an das Startkodon der injizierten mRNA verhindert.

Die Depletion von XEn-2 führte in 39,3 % der Embryonen zu einer Reduktion der *XTcf-4* Expression, in 14,8 % sogar zu einem vollständigen Verlust der *XTcf-4* Transkripte auf der injizierten Seite. Da der Effekt des XEn-2 Morpholinos durch eine zeitgleiche XEn-2 Überexpression in 97,1 % der Embryonen aufgehoben wurde, scheint die Reduktion der *XTcf-4* Expression durch die XEn-2 Depletion spezifisch zu sein (Abb. 5.25).

Die Injektionen von 4 pg des XPax-2 oder des XPax-5 Morpholinos in eine dorsale Blastomere des Vierzell-Stadiums hatte keinen Effekt weder auf die *XTcf-4*, noch auf die *XEn-2* Expression. Um die Morpholino Konzentration im zukünftigen Gehirn zu erhöhen, wurden die einzelnen XPax Morpholinos in eine dorsale Blastomere des

16-Zell-Stadiums appliziert. Allerdings zeigte auch dies keinen Effekt: Nach Injektion des XPax-5 Morpholinos war die *XTcf-4* Expression in 95,7 % der Embryonen (n=46) unverändert, die *XEn-2* Expression in 96,4 % (n=55). Nach Applikation des XPax-2 Morpholinos blieb die *XTcf-4* Expression in 97,0 % der Embryonen (n=66) gleich, die *XEn-2* Expression in 96,3 % (n=82).

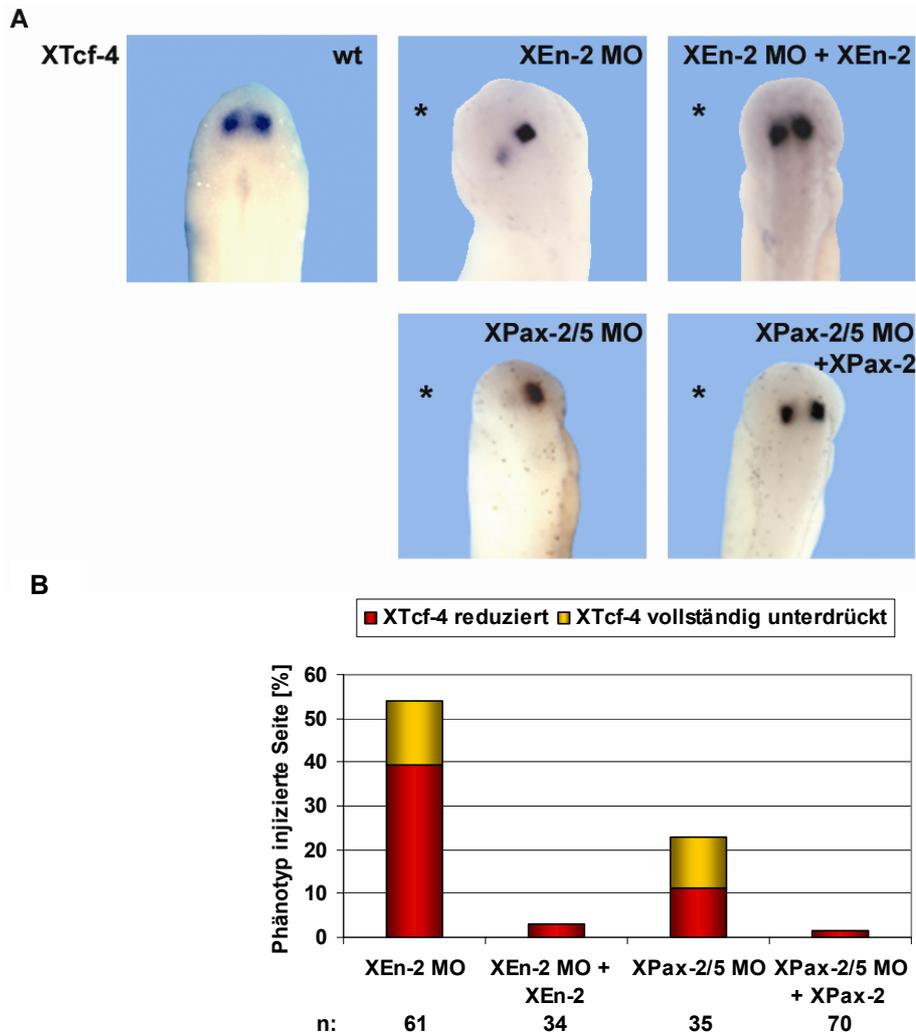


Abb. 5.25 Die *XTcf-4* Expression ist abhängig von *XEn-2* und *XPax-2/5*. Für die Funktionsverlust Analysen wurden je 4 pg des *XEn-2* Morpholinos, bzw. ein Gemisch des *XPax-2* und *XPax-5* Morpholinos in eine dorsale Blastomere in Embryonen im Vierzell-Stadium injiziert. Die *XTcf-4* Transkripte der injizierten Seite wurden mit der nicht-injizierten Seite im St. 27 mittels einer *in-situ* Hybridisierung verglichen. Der Stern markiert die injizierte Seite. Sowohl der knockdown von *XEn-2*, als auch der Doppel-knockdown von *XPax-2* und *XPax-5* führte zu einer starken Reduktion der *XTcf-4* mRNA im Mittelhirn (A). Die zeitgleiche Co-Injektion der jeweiligen mRNAs zeigten die spezifische Unterdrückung der Morpholino vermittelten Phänotypen. Die Embryonen wurden von dorsal mit einer 30-fachen Vergrößerung aufgenommen. Anterior ist oben. Das Diagramm gibt den prozentualen Anteil der Phänotypen auf der injizierten Seite wieder. n = Anzahl der in der *in-situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen (B).

Da *XPax-2* und *XPax-5* aus einem gemeinsamen Ursprungsgen durch Gen-duplikation hervorgegangen sind [Bassham, 2008] und am Isthmus co-exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie redundante Funktionen übernehmen.

Daher wurden den Embryonen für die Funktionsverlust Analysen ein Gemisch der beiden Pax Morpholinos in eine dorsale Blastomere des Vierzell-Stadiums appliziert. Dieser Doppel-knockdown führte in 11,4 % der Embryonen zu einer Repression der *XTcf-4* Expression und in ebenso vielen Fällen zu einem vollständigen Verlust der *XTcf-4* Transkripte. Dies ist insofern erstaunlich, als das XPax-2 Morpholino im TNT nicht funktionell erschien (Abb. 5.24). Da die Co-Injektion von XPax-2 mRNA die *XTcf-4* Expression in 98,6 % der Embryonen wiederherstellte, war die Reduktion der *XTcf-4* Expression durch die Pax-2/5 Depletion spezifisch (Abb. 5.25).

Somit ist die *XTcf-4* Expression im Mittelhirn sowohl von XEn-2, als auch von XPax-2 und XPax-5 abhängig. Der Pax-2/5 Doppel-knockdown zeigte lediglich in 22,8 % der Embryonen Auswirkungen auf die *XTcf-4* Expression. Diese geringe Penetranz könnte daran liegen, dass das XPax-2 Morpholino die Translation von XPax-2 im Embryo nicht effektiv inhibierte.

5.4.4 XEn-2 und XPax-2/5 regulieren sich gegenseitig am Isthmus

Nachdem gezeigt wurde, dass die *XTcf-4* Expression im Mittelhirn von XEn-2 und XPax-2/5 abhängt, stellte sich die Frage, inwieweit sich diese am Isthmus co-exprimierten Transkriptionsfaktoren gegenseitig regulieren.

Die Depletion von XEn-2 resultierte in 21,6 % der Embryonen in einer Reduktion der XPax-2 mRNA, in 14,9 % der Embryonen war die XPax-2 Expression auf der injizierten Seite vollständig verschwunden (Abb. 5.26). Durch eine zeitgleiche XEn-2 Überexpression wurde die XPax-2 Expression in 96,7 % der Embryonen wiederhergestellt.

Umgekehrt resultierte der XPax-2/5 Doppel-knockdown in 31,2 % der Embryonen in einer Reduktion der XEn-2 mRNA. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls durch eine zeitgleiche XPax-2 Überexpression in 97,3 % der injizierten Embryonen gerettet, was wiederum die Spezifität des knockdowns belegt (Abb. 5.26).

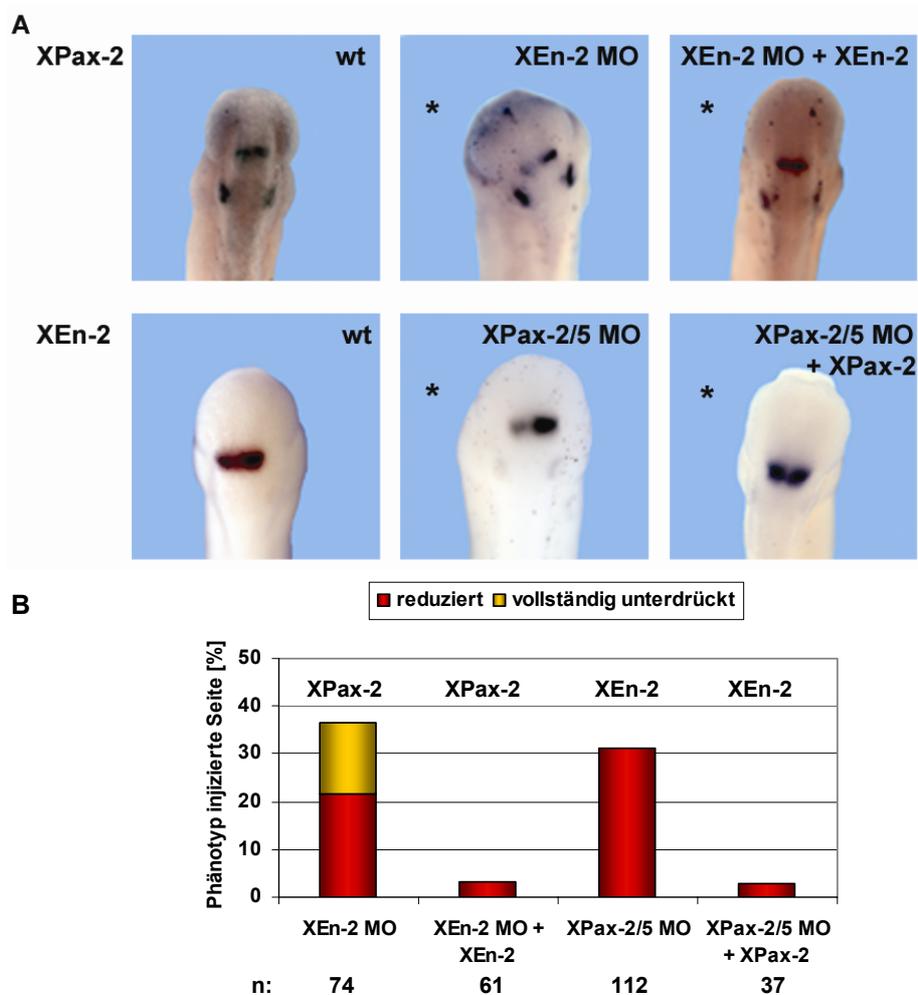


Abb. 5.26 XEn-2 und XPax-2/5 regulieren sich gegenseitig. Der knockdown von XEn-2 führte zu einer reduzierten XPax-2 Expression, während umgekehrt der Pax-2/5 Doppel-knockdown die Repression der XEn-2 Expression bewirkte. Beide Morpholino induzierten Phänotypen wurden durch die Überexpression des entsprechenden Proteins aufgehoben. Die Embryonen wurden von dorsal mit einer 30-fachen Vergrößerung aufgenommen. Anterior ist oben. Der Stern markiert die injizierte Seite (A). Das Diagramm gibt den prozentualen Anteil der Phänotypen auf der injizierten Seite wieder. n = Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen (B).

5.4.5 Hierarchische Regulation der XTcf-4, XEn-2 und XPax-2/5 Transkriptionsfaktoren in der Gehirnmusterung

Um eine hierarchische Ordnung der Regulationen von XTcf-4, XEn-2 und XPax-2/5 herauszufinden, wurden Überkreuz Wiederherstellungs (Rescue) Experimente der Morpholino vermittelten Phänotypen durchgeführt.

Da die Penetranz der Morpholino vermittelten Phänotypen teilweise relativ gering war (zwischen 23-54%), wurde zur übersichtlicheren Darstellung der Rescue Phänotypen ein Rescue Koeffizient (RK) eingeführt. Dieser beschreibt den prozentualen Anteil der nach einem Rescue erhaltenen Reduktion der Genexpression geteilt durch den Anteil der Morpholino vermittelten Reduktion. Im Diagramm wird 1 - RK-Wert aufgetragen, wodurch ein absoluter Rescue einem RK-Wert = 1 entspricht. Ein RK-

Wert $> 0,9$ ist gleichbedeutend mit einem nahezu vollständigen Rescue, während ein RK-Wert $> 0,5$ einem partiellen Rescue entspricht. RK-Werte $< 0,5$ sagen aus, dass die Morpholino vermittelte Reduktion nicht aufgehoben wurde.

Es wurde versucht, die durch das XEn-2 Morpholino vermittelte Reduktion der *XTcf-4* Expression durch Co-Injektion mit XPax-5 aufzuheben. Dieses Pax-Konstrukt erwies sich sowohl bei der Analyse des *XTcf-4* Promotors, als auch in Überexpressionsstudien als effizienter in der Aktivierung der *XTcf-4* Expression. Da nach der Co-Injektion des XEn-2 Morpholinos mit XPax-5 mRNA noch 41,3 % der Embryonen eine reduzierte *XTcf-4* Expression (entspricht einem RK = 0,24, Abb. 5.27) aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass Transkriptionsfaktoren der Pax-2/5/8 Familie den Verlust von XEn-2 nicht kompensieren können.

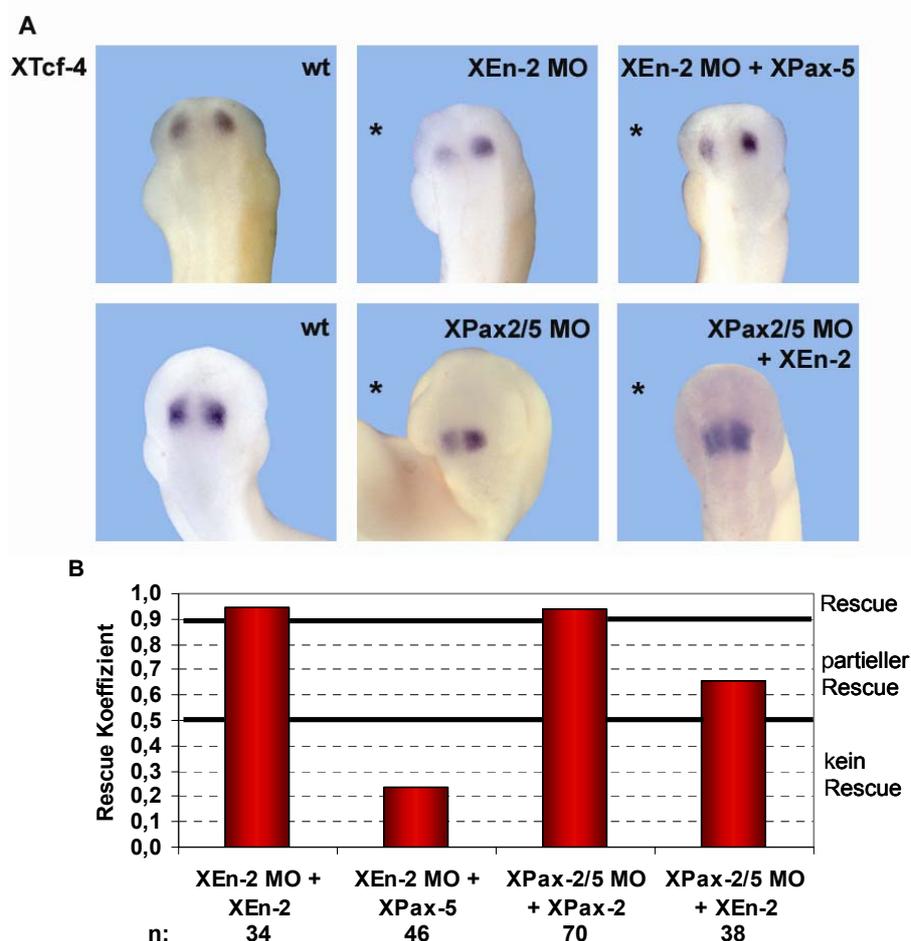


Abb. 5.27 Wechselseitige Wiederherstellungs-Experimente der *XTcf-4* Expression. Die durch den XEn-2 knockdown vermittelte Reduktion der *XTcf-4* mRNA konnte durch eine zeitgleiche XPax-5 Überexpression nicht aufgehoben werden. Es zeigten 41,3 % der Embryonen eine reduzierte *XTcf-4* Expression. Umgekehrt wurde durch eine Co-Injektion von XEn-2 der XPax-2/5 MO vermittelte Phänotyp teilweise gerettet. Es zeigten noch 7,9 % der Embryonen eine reduzierte *XTcf-4* Expression (A). Das Diagramm zeigt den Rescue Koeffizienten: $RK = 1 - \text{Reduktion nach Rescue} / \text{Reduktion durch Morpholino}$. Ein RK-Wert $> 0,9$ ist gleichbedeutend mit einem nahezu vollständigen Rescue, während ein RK-Wert $> 0,5$ einem partiellen Rescue entspricht. RK-Werte $< 0,5$ sagen aus, dass die Morpholino vermittelte Reduktion nicht aufgehoben wurde. n = Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen des Rescue Experimentes (B).

Dagegen wurde die durch Pax-2/5 Morpholinos hervorgerufene Reduktion der *XTcf-4* Expression durch Co-Injektion von XEn-2 teilweise wiederhergestellt (RK = 0,65 partieller Rescue) (Abb. 5.27). Lediglich bei 7,9 % der Embryonen war nach einer zeitgleichen XEn-2 Injektion eine reduzierte *XTcf-4* Expression zu beobachten.

Somit scheint die Regulation der *XTcf-4* Expression durch XPax-2/5 zumindest teilweise über XEn-2 zu verlaufen.

Des Weiteren war überexprimiertes *XTcf-4* nicht in der Lage, die durch XEn-2 Depletion vermittelte XPax-2 Reduktion, noch die reduzierte XEn-2 Expression nach XPax-2/5 Morpholino Injektion aufzuheben. Der Rescue Koeffizient lag jeweils deutlich unter 0,5 (Abb. 5.28).

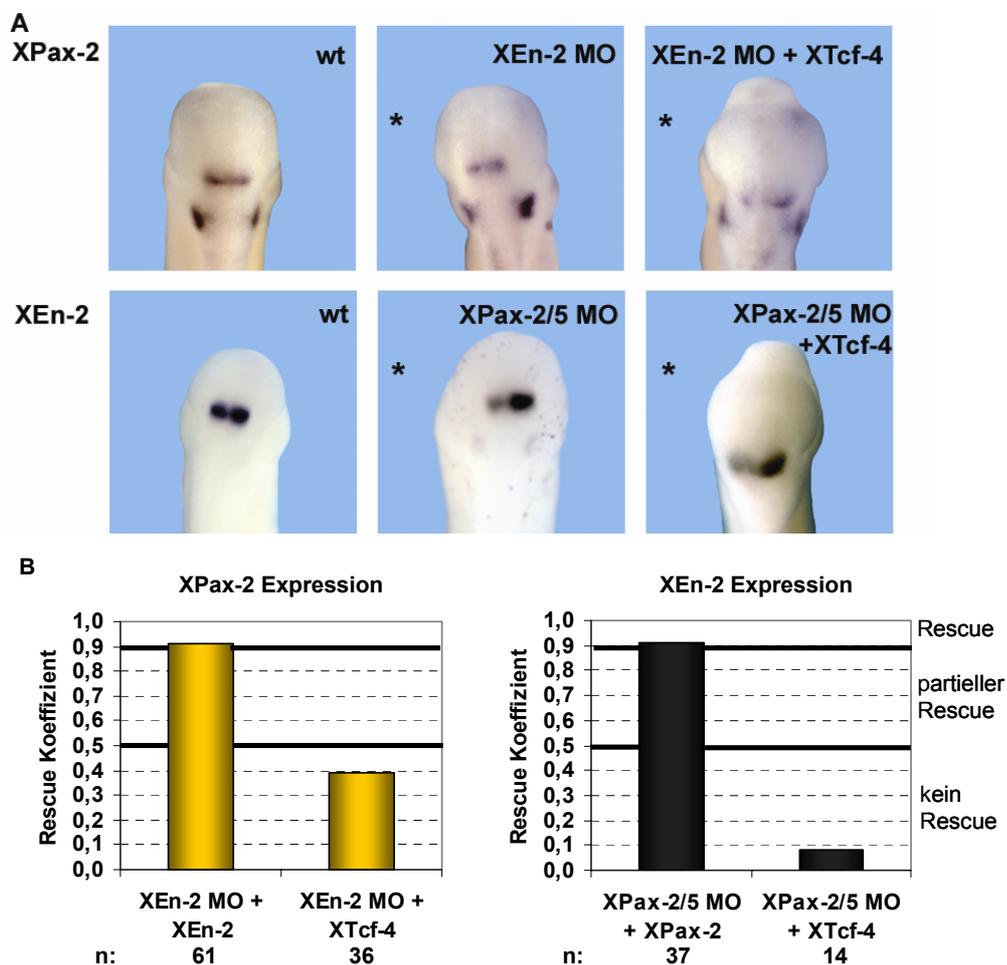


Abb. 5.28 XTcf-4 kann weder den XEn-2 MO, noch den XPax-2/5 MO Phänotyp aufheben. Die Co-Injektion von XTcf-4 zeigte einen geringen Effekt auf die XEn-2 MO vermittelte Reduktion der XPax-2 Expression. So war diese noch in 22,2% der Embryonen reduziert im Vergleich zu 36,5% nach alleiniger XEn-2 MO Injektion. Ebenfalls wurde die Reduktion der XEn-2 Expression nach XPax-2/5 Depletion nicht durch XTcf-4 aufgehoben. Die Embryonen wurden von dorsal mit einer 30-fachen Vergrößerung aufgenommen. Anterior ist oben. Der Stern markiert die injizierte Seite (A). Das Diagramm zeigt den Rescue Koeffizienten: $RK = 1 - \text{Reduktion nach Rescue} / \text{Reduktion durch Morpholino}$. Ein RK-Wert $> 0,9$ ist gleichbedeutend mit einem nahezu vollständigen Rescue, während ein RK-Wert $> 0,5$ einem partiellen Rescue entspricht. RK-Werte $< 0,5$ sagen aus, dass die Morpholino vermittelte Reduktion nicht aufgehoben wurde. n = Anzahl der in der *in situ* Hybridisierung ausgewerteten Embryonen des Rescue Experimentes (B).

Trotz der in manchen Fällen geringen Penetranz der Morpholino vermittelten Phänotypen lässt sich über den ermittelten Rescue-Koeffizienten ablesen, dass die Regulation von *XTcf-4* durch *XPax-2/5* teilweise über *XEn-2* erfolgt. Der partielle Rescue der *XTcf-4* Expression nach *Pax-2/5* Depletion schliesst allerdings eine direkte Regulation von *XTcf-4* durch *XPax-2/5* nicht aus.

6. Diskussion

6.1 *XTcf-4* ist ein direktes Zielgen der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade

Auf der in der vorliegenden Arbeit analysierten 5' regulatorischen Sequenz des *XTcf-4* Gens befinden sich zwei putative Lef/Tcf Bindestellen. Da in Reporterstudien die Lef/Tcf Bindestelle an Position -3660 die Aktivierbarkeit eines *XTcf-4* Promotorfragments mit diesem Motiv im Vergleich zu einem Promotorfragment ohne diesem Motiv durch β -Catenin nicht erhöhte, scheint sie nicht funktional oder zumindest für eine Autoregulation irrelevant zu sein. Hingegen wurde gezeigt, dass die Lef/Tcf Konsensus Sequenz an Position -1437 bis -1428 durch Lef/Tcfs regulierbar ist und mit β -Catenin co-präzipitiert [Koenig et al., 2008]. Die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) wurde in endogen *XTcf-4* exprimierenden XTC Zellen durchgeführt. Eine *in vivo* ChIP Analyse in *Xenopus laevis* gestaltet sich schwierig, da sich das *XTcf-4* Expressionsfeld auf eine geringe Zellpopulation im dorsalen anterioren Mittelhirn beschränkt. Folglich ist der Anteil transkriptionell aktiver *XTcf-4* Loci, die mit Transkriptionsaktivatoren wie β -Catenin interagieren können, im gesamten Embryo sehr gering.

Für den ChIP wurde eine indirekte Co-Immunpräzipitation über einen anti- β -Catenin Antikörper gewählt, wodurch sich eine positive Rückkopplung der Wnt-Signalkaskade bestätigen lässt. Somit ist es durch PCR Analyse der co-präzipitierten DNA gelungen, den aktiven Komplex zwischen einem Transkriptionsfaktor der Lef/Tcf Familie und dem Transkriptionsaktivator β -Catenin an der DNA nachzuweisen. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit, über Co-Immunpräzipitationen die weitere Zusammensetzung des „aktiven“ Komplexes zu untersuchen. Mit diesem Ansatz könnte man überprüfen, inwieweit andere Faktoren, wie beispielsweise Hic-5 oder Pygopus an den Komplex aus Lef/Tcfs und β -Catenin gebunden sind.

In Ermangelung ChIP tauglicher Antikörper gegen die unterschiedlichen Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren in *Xenopus* bleibt es allerdings ungewiss, welche Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren die Bindung des endogenen β -Catenins an den *XTcf-4* Enhancer vermitteln. Da jedoch eine Co-Transfektion von XLeF-1 und XTcf-4C in einer signifikanten Aktivierung des *XTcf-4* Promotors resultierte, kommen diese beiden Faktoren als mögliche β -Catenin Bindungspartner in Frage. Somit wird der

XTcf-4 Promotor durch *XLef-1* und *XTcf-4C* ähnlich reguliert wie die *Xenopus fibronectin*- und *siamois*-Promotoren [Gradl et al., 2002]. Ebenso zeigten die als Repressoren identifizierten *XTcf-3* und *XTcf-4A* keinen Einfluss auf die *XTcf-4* Promotoraktivität. Tatsächlich werden die *XTcf-4* Isoformen im Kaulquappenstadium lokal unterschiedlich exprimiert. Während *XTcf-4A* im anterioren Mittelhirn detektiert wird, ist *XTcf-4C* im posterioren Mittelhirn lokalisiert [Kunz et al., 2004].

XTcf-4 ist ein direktes Zielgen der kanonischen Wnt-Kaskade, das sich selbst durch die Expression der aktivierenden *XTcf-4C* Isoform reguliert [Koenig et al., 2008]. Da für die anderen Lef/Tcfs ebenfalls autoregulatorische Mechanismen beschrieben wurden, scheint damit Autoregulation ein generelles Prinzip der Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren zu sein. So bestehen Hinweise im Zebrafisch, die auf eine potentielle Autoregulation des *Tcf-3*-Promotors über konservierte Lef/Tcf-Bindestellen hindeuten [Kim et al., 2000]. Ebenso befindet sich innerhalb einer minimalen -372/+34 *Xenopus tropicalis Tcf-3* Promotorsequenz eine potentielle Lef/Tcf Bindestelle in reverser Orientierung, sowie eine weitere 5' davon gelegen. Die Deletion beider Konsensus-Sequenzen resultierte in Reporteragen-Analysen in einer Reduktion der Promotoraktivität während der Gastrula, hatte aber keine Auswirkungen auf die gewebespezifische Expression eines *XtTcf-3* Transgens in späteren Entwicklungsstadien [Spieker et al., 2004]. Allerdings überschritt hierbei die durch den *XtTcf-3* Promotor vermittelte Reporteragen Expression deutlich die Grenzen der endogenen *XTcf-3* Expression, wodurch die Spezifität des Reporterkonstrukts unsicher ist.

Ähnliche Rückkopplungs-Mechanismen wurden auch für *hLef-1* [Hovanes et al., 2001] und *hTcf-1* [Roose et al., 1999] beschrieben. Aufgrund der Nutzung alternativer Promotoren entsteht neben der vollständigen *hLef-1* Isoform eine N-terminal trunke Variante, welche reprimierend wirkt, da ihr die Bindestelle für β -Catenin fehlt. Daher fungiert diese dominant-negative *hLef-1* Isoform ohne β -Catenin Bindedomäne als natürlicher Antagonist des Wnt-Signalweges. Während *hLef-1* normalerweise nicht im Darm exprimiert wird, wird die ektopische Expression der vollständigen *hLef-1* Variante in Dickdarm-Krebszellen durch die hohe Konzentration an Tcf/ β -Catenin Komplexen aktiviert [Hovanes et al., 2001]. Somit wird durch die selektive Aktivierung des Promotors für β -Catenin-bindendes *hLef-1* in Krebszellen ein positiver Rückkopplungs-Mechanismus für das Wnt-Signal etabliert. Darüber hinaus ließen sich in transienten Transfektionsstudien auf dem *hLef-1* Promotor reprimierende Sequenzbereiche nachweisen [Filali et al., 2002]. Dabei

identifizierte man ein Wnt responsives Element (WRE) mit repressiven Eigenschaften, welches sich durch Wnt-3A Signale, in Abhängigkeit von β -Catenin zu einem Enhancer-Element des *Lef-1* Promotors verwandelte. Allerdings wird der *hLef-1* Promotor nicht von seinem eigenen Genprodukt reguliert, sondern wird in Anwesenheit von β -Catenin durch die Tcf-1E und Tcf-4E Isoformen aktiviert, die an die beiden WREs des *Lef-1* Promotors binden [Atcha et al., 2003]. Diese beiden Lef/Tcf-Isoformen besitzen in ihrem C-Terminus der E-Isoform eine so genannte CRARF Domäne, welche eine von β -Catenin abhängige Aktivierungsdomäne darstellt [Atcha et al., 2007].

Dagegen wird hTcf-1 über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus reguliert [Roose et al., 1999]. Ähnlich wie *hLef-1* wird auch *hTcf-1* in zwei Isoformen von benachbarten Promotoren transkribiert. In Darmepithelzellen wird überwiegend die N-terminal trunke *Tcf-1* Variante exprimiert, welche als Repressor von Tcf-4/ β -Catenin Zielgenen in epithelialen Darmzellen agiert, indem es an Lef/Tcf-Motive bindet, aber ohne gebundenes β -Catenin keine transkriptionsaktivierende Wirkung entfaltet. Daher wirkt diese N-terminal trunke Tcf-1 Isoform synergistisch mit APC (Adenomatous Polyposis Coli) als ein Tumorsuppressor-Protein. Somit wird im Gegensatz zur β -Catenin-bindenden *hLef-1* Isoform in Dickdarm-Krebszellen, durch die selektive Aktivierung des Promotors für eine N-terminal trunke hTcf-1 Variante ein negativer Rückkopplungs-Mechanismus für das Wnt-Signal etabliert.

Interessanterweise wird auch für das humane *Tcf-4* Gen ein putativer Transkriptionsstartpunkt innerhalb des zweiten Introns vorhergesagt, von wo aus ein Protein ohne die N-terminale β -Catenin Bindedomäne transkribiert werden könnte [Duval et al., 2000]. Tatsächlich wurden in Brusttumorzellen (MCF-7, Mammakarzinom) Transkripte detektiert, die sowohl für das vollständige Tcf-4 Protein kodieren, als auch für ein um die β -Catenin Bindedomäne trunke Protein. Allerdings wurden beide Tcf-4 Transkripte in Tumorzellen nahezu vollständig unterdrückt, wodurch die Tcf-4 Repression in Brustkrebszellen unabhängig von einer Selektion der Tcf-4 Isoformen erfolgt [Shulewitz et al., 2006]. Die Analyse der ersten beiden Introns des *XTcf-4* Gens offenbarte hingegen keine alternative Promotorsequenz. Daher bleibt es fraglich, ob auch in *Xenopus* eine dominant-negative Tcf-4 Isoform transkribiert wird. Wenn dem so ist, müsste diese jedoch stärker als die humane Tcf-4 Isoform trunke sein. Tatsächlich wurde bei der Isolierung der *Xenopus* Tcf-4 cDNA, auch eine 5' um 537 bp verkürzte XTcf-4D Sequenz entdeckt,

die für ein trunkiertes Protein ohne β -Catenin Bindedomäne kodiert [A. König, Dissertation 2003]. Da das dritte Exon 255 bp stromabwärts des Translationsstarts beginnt, liegt der Promotor für die Transkription dieser dominant negativen XTcf-4D Isoform möglicherweise im dritten Intron.

Über die Regulation der humanen *Tcf-4* Expression ist bisher nur bekannt, dass p53 die *Tcf-4* Expression reprimiert [Rother et al., 2004]. Allerdings bleibt der zugrunde liegende Mechanismus unentschlüsselt, da sich auf dem *hTcf-4* Promotor keine p53 Bindestelle befindet. Im Gegensatz dazu wurden auf dem *XTcf-4* Promotor zwei putative p53 Bindestellen (an Position -3626 und -1905) vorhergesagt, die aber offensichtlich keinen funktionalen Charakter besitzen.

Alle vier Mitglieder der Vertebraten Lef/Tcf Familie besitzen Lef/Tcf Konsensus-Sequenzen auf ihren Promotoren, über die sie sich gegenseitig regulieren. Hierbei wird *XTcf-4* positiv über XLef-1 und seine aktivierende XTcf-4C Isoform reguliert.

Um Aufschluß über die Regulation der lokal begrenzten Expression von XTcf-4 im anterioren Mittelhirn zu erhalten wurde der Promotor isoliert und auf Enhancer Elemente, die diese begrenzte Lokalisation vermitteln hin untersucht.

6.2 Die Restriktion der *XTcf-4* Expression im Mittelhirn wird durch regulatorische Elemente 5' von -2720 vermittelt

Da nach Injektionen von *XTcf-4* Promotorfusionen mit einem destabilisierten GFP keine Fluoreszenz im Embryo detektierbar war [R. Lattanzio, Diplomarbeit 2004], wurde ein stabilisiertes und in der Fluoreszenzintensität verstärktes grün fluoreszierendes Protein (EGFP) als Reporterprotein gewählt. Dennoch war nach der Injektion eines -3855/+501EGFP Konstrukts das fluoreszierende Protein nur selten nachzuweisen. Deshalb wurde zur Lokalisation der Promotoraktivität der Nachweis auf Transkriptionsebene erbracht. Tatsächlich stellte sich hierbei der Nachweis der EGFP mRNA als sensitiver heraus.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein -3855/+501EGFP Konstrukt das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des endogenen XTcf-4 im Mittelhirn nachahmt und darüber hinaus eine ektopische Reporter-gen-Aktivität, wie sie mit einem -2720/+501 Promotorfragment beobachtet wurde, unterdrückt. Folglich befinden sich auf der Sequenz von Position -3855 bis -2720 alle nötigen Enhancer-Elemente, um die Reporter-gen-Aktivität *XTcf-4* spezifisch zu regulieren. Allerdings

konnte eine korrekte temporale Aktivierung des Reportergens ab der späten Neurula bereits mit einem -1775/+501 Konstrukt beobachtet werden [Koenig et al., 2008].

Die Frequenz, mit der ein EGFP Signal detektiert wurde, sank jedoch mit zunehmender Länge des *XTcf-4* Promotorkonstruktes von knapp über 60 % mit dem -2720/+501 Konstrukt auf 1-3 % mit dem -3855/+501 Promotorfragment. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auf der Sequenz zwischen -3855 und -2720 neben Bindestellen für die Regulatoren der mittelhirnspezifischen Expression, auch solche für transkriptionelle Repressoren befinden. Übereinstimmend damit wurde in Reportergen-Analysen gezeigt, dass das -2720/+501 Promotorfragment im Embryo ab dem Neurula Stadium deutlich stärker aktiviert wird als das -3773/+501 Konstrukt [D. Fichtner, Diplomarbeit 2007]. Diese reprimierte Aktivierung des -3773/+501 Promotorfragments könnte durch die Besetzung der vorhergesagten En-2 Bindestelle (-2890), des Pax-5 Motivs (-3245) sowie der Lef/Tcf Konsensus-Sequenz (-3660) erfolgen, da diese Transkriptionsfaktoren alle den Co-Repressor Groucho an ihre DNA Bindestellen rekrutieren können und dadurch selbst zu starken transkriptionellen Repressoren werden [Chen et al., 1999; Eberhard et al., 2000, Jimenez et al., 1997].

Die Generierung transgener *X. laevis* steigerte die Frequenz, mit der das -3855/+501 EGFP Reportergen Konstrukt aktiviert wurde deutlich (auf 15,2 %). Allerdings beschränkte sich die EGFP Expression ab dem Schwanzknospen-Stadium nicht ausschließlich auf das Mittelhirn, sondern dehnte sich auch auf das Hinterhirn und Vorderhirn, sowie in manchen Fällen auf die Neuralleisten-Populationen aus. Ein ähnliches Phänomen wurde für die transgene Expression eines *XtTcf-3* Promotorfragmentes (-3054/+34) in *X. laevis* beschrieben, welche sich ebenfalls über die Grenzen der endogenen Expressionsdomänen ausweitete [Spieker et al., 2004]. Die Ursache hierfür könnte daran liegen, dass bei der Generierung der transgenen *Xenopoden* die Reportergene als Konkatemere im Genom integrieren, was eine Verstärkung der Reportergen-Aktivität zur Folge haben könnte.

Das räumliche Expressionsmuster des -3855/+501 *XTcf-4* Promotorkonstrukts war in transgenen *X. laevis* und *X. tropicalis* ab dem St. 32 nahezu identisch, jedoch wurde dieses Konstrukt in *X. laevis* erst ab St. 26 nachgewiesen, während es in *X. tropicalis* bereits im Neurula-Stadium detektierbar war. Darüber hinaus wurde das -2720/+501 Reportergen in *X. tropicalis* entsprechend dem -3855/+501 Konstrukt exprimiert, während es in *X. laevis* nicht aktiviert wurde. Diese differentielle Regulation von

Transgenen innerhalb einer Gattung ist nicht ungewöhnlich. So war beispielsweise der *X. tropicalis slug* Promotor aufgrund einer Deletion im *X. tropicalis* Gen nahe des Transkriptionsstartpunkts ineffizient in *X. laevis* [Vallin et al., 2001].

Ein Sequenzvergleich zwischen der *XTcf-4* -3855/+822 Region aus *X. laevis* und 5 kb 5' der kodierenden *X. tropicalis Tcf-4* Sequenz zeigte weder homologe Bereiche, noch wurden übereinstimmende Bindemotive potentieller Regulatoren gefunden. Daher könnte die leicht unterschiedliche Expression des -3855/+501 Konstrukts in den Transgenen auf einer differentiellen Regulation beruhen.

Interessanterweise beschränkte sich das EGFP Expressionsfeld ab dem St. 41 in beiden Spezies ausschließlich auf die Mes-/Metencephalongrenze, was dem posterioren Teil der endogenen *XTcf-4* Expression entspricht, die sich in diesem Stadium über das gesamte Mesencephalon erstreckt. Diese beobachtete Reportergergen Aktivität könnte daher der Expression der *XTcf-4C* Isoform entsprechen, welche im posterioren Mesencephalon exprimiert wird. Allerdings ist es unklar, wie eine differentielle Regulation dieser Isoformen möglich ist, da die Unterschiede in den drei *XTcf-4* Varianten aufgrund alternativer Spleißvorgänge zustande kommen [Pukrop et al., 2001]. Lediglich im transgenen Ansatz war die Expression des -3855/+501EGFP Konstrukts in posteriorer Richtung verschoben, während sie nach Mikroinjektion im Embryo der endogenen *XTcf-4* Expression entsprach. Da für beide Ansätze die gleiche Promotorsequenz von einem Allel benutzt wurde, ist auch eine differentielle Regulation aufgrund unterschiedlicher Pseudo-Allele ausgeschlossen.

6.3 Hierarchische Regulation der Transkriptionsfaktoren XTcf-4, XEn-2 und XPax-2/5 im sich entwickelnden Mittelhirn

Sowohl die Analysen der *XTcf-4* und *XEn-2* Promotoren, als auch die Funktionsgewinn Experimente und die Morpholino vermittelten knockdown Studien verdeutlichen die komplexen wechselseitigen Abhängigkeitsbeziehungen zwischen dem Mittelhirn-spezifischen Transkriptionsfaktor XTcf-4 und den am Isthmus exprimierten Transkriptionsfaktoren XEn-2 und XPax-2/5.

6.3.1 XEn-2 und XPax-2/5 regulieren sich gegenseitig am Isthmus

Der Morpholino vermittelte knockdown von XPax-2 oder XPax-5 zeigte keine Auswirkungen auf die Expression von XEn-2 am Isthmus. In der Maus induziert Pax-2 an der Mesencephalon/Metencephalon Grenze die Expression der nahe verwandten *Pax-5* und *Pax-8* Gene [Rowitch und McMahon, 1995]. Pax-2 reguliert hierbei direkt die Expression von Pax-5 durch die transkriptionelle Aktivierung eines *Pax-5* Enhancer Elements [Pfeffer et al., 2000]. Diese aufeinander folgende Expression der Pax-2/5/8 Gene am Isthmus ist ebenfalls in *Xenopus* zu beobachten [Heller und Brändli, 1999]. Da XPax-2 und XPax-5 aus dem gleichen Ursprungsgen abstammen [Bassham et al., 2008] und am Isthmus co-exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie redundante Funktionen übernehmen. In knock-in Mäusen wurde gezeigt, dass Pax-5 vollständig die Pax-2 Funktion am Isthmus kompensieren kann [Bouchard et al., 2000]. Des Weiteren weisen Pax-2^{-/-} und Pax-5^{-/-} Mäuse keine schwerwiegenden Defekte am Isthmus auf. Erst der Doppel-knockout führt zu einem Verlust des Cerebellums und zu Veränderungen des Tectums und Tegmentums [Schwarz et al., 1997]. Entsprechend dieser Redundanz zeigte erst ein Doppel-knockdown von XPax-2 und XPax-5 eine Reduktion der XEn-2 Expression. Diese Beobachtung ist insofern erstaunlich, als das XPax-2 Morpholino *in vitro* funktionslos erschien. Offensichtlich inhibiert es aber im Embryo die XPax-2 Translation. Eventuell liegt im Embryo weniger XPax-2 mRNA vor, als *in vitro* im TNT eingesetzt wurde, womit eine effektivere Inhibition *in vivo* möglich wäre. Die Spezifität der Reduktion der *XEn-2* Expression konnte durch den Rescue durch co-injizierte XPax-2 mRNA gezeigt werden. Überraschenderweise unterdrückte das XPax-2

Morpholino im TNT teilweise die XEn-2 Expression. Daher könnte die Reduktion der *XTcf-4* Expression nach Pax-2/5 Depletion auf eine verringerte XEn-2 Expression zurückzuführen sein. Allerdings hätte dann Pax in der Lage sein sollen, die Reduktion der *XTcf-4* Expression nach XEn-2 Depletion aufzuheben.

Ebenso resultierte der Doppel-knockout von Pax-2 und Pax-5 in der Maus auf molekularer Ebene im vollständigen Verlust der En-2 Expression im Stadium E9.5 [Schwarz et al., 1999]. Auch in Zebrafisch *no isthmus* Mutanten (*Pax-2.1*), denen das Mittelhirn und das Cerebellum fehlt, war die Expression von den drei analysierten *En* Genen *Eng1*, *Eng2* und *Eng3* nicht initiiert [Brand et al., 1996].

Des Weiteren wurde durch einen Microarray Vergleich zwischen wildtyp und Pax2^{-/-} Isthmus Zellen *En-2* als ein direktes Pax-2 Zielgen identifiziert [Bouchard et al., 2005]. Die korrekte Initiation der murinen En-2 Expression im Stadium E8.0 am Isthmus ist von zwei funktionalen Pax-2/5/8 Bindestellen auf einem 1 kb Enhancer-Element abhängig. Die Deletion dieser beiden Bindemotive im endogenen *En-2* Locus resultierte in einer transienten Reduktion der initialen En-2 Expression [Song und Joyner, 2000]. Allerdings ließen sich auf einem 2,8 kb umfassenden *Xenopus En-2* Promotor [McGrew et al., 1999] durch das Vorhersageprogramm TESS keine putativen Pax-2/5/8 Bindestellen identifizieren. Somit ist es fraglich, ob auch in *Xenopus En-2* ein direktes Zielgen von Pax-2 darstellt. Möglicherweise befinden sich in distalen Regionen des *XEn-2* Promotors Bindestellen für die Pax-2/5/8 Transkriptionsfaktoren.

Umgekehrt resultierte der knockdown von XEn-2 in einer Reduktion der XPax-2 Expression. Ähnliches wurde für *Danio rerio* beschrieben, wo eine Depletion von Eng2 und Eng3 zu demselben Phänotyp wie die *no isthmus (noi)* Mutante (*Pax-2.1*) führt [Scholpp und Brand, 2003]. Des Weiteren zeigte der Vergleich der Expression eines pax2.1 Reportergens in wildtyp und homozygoten *noi* Mutanten, dass die transgene *pax2.1* Expression entweder endogenes Pax.2.1 benötigt, oder aber die Expression der Zielgene *Eng2* oder *Eng3* [Picker et al., 2002]. Somit kann im Zebrafisch der Verlust der Pax2.1 Funktion durch Eng2 oder Eng3 kompensiert werden. Auf dem analysierten *pax2.1* Promotor-/Enhancer Element befinden sich putative Eng-Bindestellen, die darauf hindeuten, dass die Aktivierung der pax2.1 Transkription über einen direkten Mechanismus erfolgen könnte [Picker et al., 2002].

Übereinstimmend mit Maus und Zebrafisch, wird auch in *Xenopus En-2* durch Pax-2 reguliert, ob es sich hierbei wie in der Maus gezeigt, um ein direktes Zielgen

handelt, bleibt fraglich. Ähnlich der Kompensation der Pax2.1 durch Eng2 oder Eng3 im Zebrafisch, scheint auch in *Xenopus* En-2 in der Lage zu sein nach einem Pax-2/5 knockdown, partiell dessen Funktion zu übernehmen.

6.3.2 XEn-2 und XTcf-4 regulieren sich gegenseitig

Die Analyse des *XTcf-4* Promotors offenbarte zwei putative En-2 Bindestellen, wobei das Motiv an Position -2890 einen funktionalen Charakter besitzt. Reporterstudien zeigten sowohl in XTC Gewebekulturzellen, als auch im Embryo eine Reduktion der *XTcf-4* Promotoraktivität durch überexprimiertes XEn-2. Dementsprechend resultierte eine XEn-2 Überexpression ebenfalls in einer Reduktion der endogenen XTcf-4 Transkription im Mittelhirn. Offensichtlich übernimmt XEn-2 eine Repressorfunktion am *XTcf-4* Locus. Daher wäre es denkbar, dass die posteriore Begrenzung der *XTcf-4* Expressionsdomäne durch den Repressor XEn-2 vermittelt wird, wodurch XTcf-4 aus dem Isthmus ausgeschlossen wird.

Überraschenderweise resultierte die Depletion von XEn-2 ebenfalls in einer reduzierten XTcf-4 Expression im Mittelhirn. Folglich scheint die Initiation der XTcf-4 Transkription von der Anwesenheit seines Repressors abhängig zu sein. Jedoch ist solch eine direkte Regulation sehr unwahrscheinlich, da die Expressionsfelder von XTcf-4 im Mittelhirn und von XEn-2 am Isthmus zwar aneinander angrenzen, aber nicht überlappen.

Während En-1 knockout Mäusen der größte Teil des Mittelhirns und das Cerebellum fehlt, äußert sich der En-2^{-/-} Phänotyp in einer reduzierten Größe des Cerebellums [Joyner et al., 1991]. Der Doppel-knockout von En-1 und En-2 führt zu einem Verlust der Pax-5, Fgf-8 und Wnt-1 Expression an der Mesencephalon-/Metencephalon Grenze ab dem 11 Somiten Stadium [Liu und Joyner, 2001].

Vermutlich führt in *Xenopus* die En-2 Depletion ebenfalls zu einer Störung der positiven Autoregulation der Isthmusorganisatoren Pax-2/5, Fgf-8 und Wnt-1. In *Xenopus* war nach En-2 Depletion lediglich in 15% der Embryonen die Pax-5 Expression reduziert (nicht gezeigt). Dies wirft die Frage nach der Redundanz der *En* Gene in *Xenopus* auf. XEn-1 ist mit XEn-2 am Isthmus co-lokalisiert, zeigt dort aber eine deutlich kleinere Expressionsdomäne [Eizema et al., 1994]. Somit ist es möglich, dass XEn-1 teilweise den Verlust von XEn-2 kompensieren kann. Da XPax allerdings nicht in der Lage war, die reduzierte *XTcf-4* Expression nach XEn-2

Depletion aufzuheben, scheint XPax-2/5 nicht entscheidend zu sein. Eine indirekte XTcf-4 Regulation über Fgf-8 erscheint unwahrscheinlich, da in Reporter-Gen-Analysen die Überexpression von Fgf-8 keinen Effekt auf den XTcf-4 Promotor zeigte. Im Gegensatz dazu wäre eine Regulation über Wnt denkbar, da das stabilisierte β -Catenin den XTcf-4 Promotor aktiviert. Folglich könnte die reduzierte XTcf-4 Expression nach einer XEn-2 Depletion ein sekundärer Effekt sein, der aus einer Reduktion des sezernierten Wnt-1 Signalmoleküls hervorgeht. En-1/2 und Wnt-1 kontrollieren sich gegenseitig, jedoch ist unklar, ob diese Regulationen direkt oder über Fgf-8 verlaufen [Lee et al, 1997]. Darüber hinaus führt im Hühnchen eine ektopische En-2 Expression zu einer ektopischen Wnt-1 Expression [Araki und Nakamura, 1999]. Demnach müsste En-2 als transkriptioneller Aktivator der Wnt-1 Expression fungieren oder aber einen unbekanntem Repressor inhibieren. Der Homöobox Transkriptionsfaktor En-2 besitzt bifunktionale Eigenschaften sowohl als Repressor als auch als Aktivator seiner Zielgene [Serrano et al., 1997, Serrano und Maschat, 1998]. Dabei ist die Repressor Funktion unabhängig von seiner DNA Bindedomäne [Hanna-Rose und Hansen, 1996] und wird teilweise durch die Bindung über seine eh1 Domäne an den C-Terminus des Co-Repressors Groucho vermittelt [Tolkunova et al., 1998]. Die Aktivierung von Zielgenen erfolgt ebenfalls indirekt über die Bindung von Co-Aktivatoren. *Drosophila En* stellt selbst nach seiner initialen Aktivierung durch die Paarregel-Gene über eine autoregulatorische Schleife ein positives Zielgen dar, benötigt aber die Anwesenheit von Extradenticle (Exd) als Co-Aktivator [Peifer und Wieschaus, 1990]. Ein weiterer Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung der En Zielgene *En* und *Hh* (*Hedgehog*) erfolgt durch die Unterdrückung der Repressoren sloppy paired 1 und 2 [Alexandre und Vincent, 2003]. Somit wäre durch eine mögliche Funktion von En-2 als transkriptioneller Aktivator eine direkte Regulation der XTcf-4 Expression denkbar. Jedoch spricht die fehlende Co-Lokalisation dieser beiden Transkriptionsfaktoren gegen diese Vermutung.

XEn-2 ist ebenso wie XTcf-4 ein direktes Zielgen der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade, das putative Bindestellen für Lef/Tcfs auf seiner Promotorsequenz besitzt [McGrew et al., 1999]. Ein knockdown der Lef/Tcfs zeigte, dass die XEn-2 Promotoraktivität von XLeF-1 und XTcf-4 abhängt. Die Abhängigkeit der XEn-2 Expression von XLeF-1 lässt sich durch die Co-Lokalisation am Isthmus erklären, wo XLeF-1 als

prominentester Vertreter der Lef/Tcfs die Funktion des Kernmediators der kanonischen Wnt-Signalkaskade übernimmt.

Die Depletion von XTcf-4 resultierte in einer Reduktion der XEn-2 mRNA am Isthmus [Kunz et al., 2004]. Dies könnte ein sekundärer Effekt sein, da der Verlust von XTcf-4 eine Abnahme des dorsalen Neuralgewebes nach sich zieht und dadurch auch Defekte im posterioren Mittelhirn und am Isthmus induzieren könnte. Ebenso führt der XTcf-4 knockdown zu einer Reduktion der sezernierten Faktoren Wnt-1 und Fgf-8 [Kunz et al., 2004], welche wiederum die En-2 Expression regulieren [McMahon et al., 1992, Liu and Joyner, 2001].

Somit demonstrieren die knockdown Studien, dass in *Xenopus* die Expression von Tcf-4 und En-2 gegenseitig voneinander abhängt, was ebenfalls durch das Vorhandensein putativer Bindestellen dieser Transkriptionsfaktoren in den jeweiligen Promotoren gestützt wird. Ob die gegenseitigen Regulationen direkt verlaufen muss durch Chromatin Immunpräzipitationen geklärt werden.

6.3.3 Regulation der XTcf-4 Expression durch XPax-2/5

Der *XTcf-4* Promotor besitzt eine putative Pax-5 Bindestelle an Position -3245, über die die *XTcf-4* Promotoraktivität differentiell reguliert wird. Während in XTC Zellen der *XTcf-4* Promotor durch XPax-5 aktiviert wurde, resultierte im Embryo eine Überexpression von XPax-5 und XPax-2 in einer signifikanten Repression. Somit scheint die Regulation stark kontext-bezogen zu sein. Die Mutation der Pax-5 Konsensus-Sequenz führte allerdings sowohl im Zellkultur System, als auch im Embryo zum Verlust der Regulierbarkeit durch die paired domain Homöobox Transkriptionsfaktoren.

Entsprechend der Reporter-gen Studie in XTC Zellen, wurde in einem geringen Anteil (19 %) von XPax-5 injizierten Embryonen eine verstärkte XTcf-4 Expression beobachtet, während die Überexpression von XPax-2 keinen Effekt ausübte. Somit scheint XPax-5 bezüglich der Regulation der *XTcf-4* Expression aktiver zu sein als das paraloge Pax-2.

Der Doppel-knockdown von XPax-2/5 resultierte in einer Reduktion der XTcf-4 Expression. Das Wiederherstellungs-Experiment durch das inaktivere XPax-2 zeigte die Spezifität der Morpholinos. Interessanterweise ließ sich die XTcf-4 Reduktion nach Pax-2/5 Depletion durch co-injizierte XEn-2 mRNA teilweise aufheben. Dies

deutet darauf hin, dass *En-2* auch in *Xenopus* ein Zielgen von Pax-2 darstellt und dass die XTcf-4 Regulation durch XPax-2/5 via XEn-2 erfolgt. Die Schemazeichnung gibt diese hierarchische Ordnung der Transkriptionsfaktoren und ihre in diesem Kapitel diskutierten wechselseitigen Regulationen wieder (Abb. 6.1).

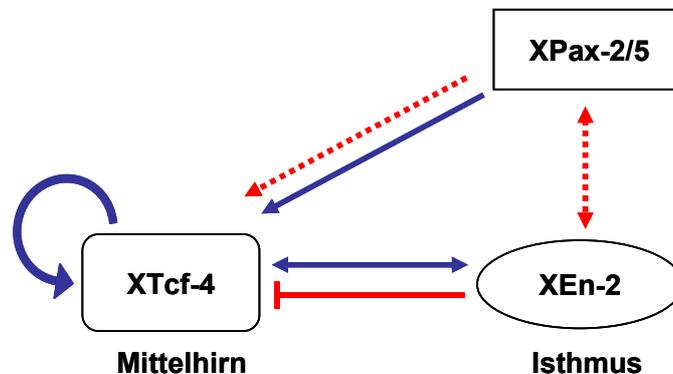


Abb. 6.1 Schema der wechselseitigen Regulation der Transkriptionsfaktoren XPax-2/5, XEn-2 und XTcf-4. Die auf Promotorebene erhaltenen Daten sind mit blauen Pfeilen dargestellt, während die Überexpressions- und knockdown Studien im Embryo durch rote Pfeile repräsentiert werden. Die gestrichelte Linie soll die Möglichkeit einer indirekten Regulation andeuten.

Somit scheint die endogene XTcf-4 Regulation durch Pax-2/5 zumindest teilweise indirekt zu sein, womit sich die Frage nach der funktionalen Relevanz der auf dem XTcf-4 Promotor identifizierten Pax-5 Bindestelle stellt. Es könnte sein, dass XPax-2 und XPax-5 die potentielle Bindestelle auf dem XTcf-4 Promotor bedienen, aber noch weitere Co-Faktoren für eine transkriptionelle Regulation benötigen. Als möglicher Co-Faktor kommt der Co-Repressor Groucho in Frage.

Die Bindung des Co-Repressors Groucho an Pax-2/5 würde eine transkriptionelle Repression der XPax-2/5 Proteine vermitteln, wie sie in Reporter-gen-Studien im Embryo beobachtet wurden. Grg-4 (in Vertebraten auch Transducin Like Enhancer of split-4 (TLE-4) genannt) wird im Hühnchen im posterioren Diencephalon und Mesencephalon exprimiert und stellt einen Antagonisten der Aktivität des Isthmus Organisators dar. Eine Überexpression von Grg-4 reprimiert die Expression von En-2, Pax-5 und Fgf-8, während Pax-6 ektopisch im Mesencephalon reprimiert wird, wodurch Grg-4 offensichtlich die Entwicklung des Diencephalons fördert [Sugiyama et al., 2000]. Im Gegensatz dazu besteht die Funktion sowohl von Pax-2/5 als auch von En-2 in der Aufrechterhaltung der Mes-/Metencephalon Entwicklung durch die Repression der Diencephalon Entwicklung, was sich durch die Repression des Markergens Pax-6 offenbart [Schwarz et al., 1999, Araki und Nakamura, 1999].

Darüber hinaus wurde im Hühnchen gezeigt, dass die Überexpression einer En-2 Mutante, die durch den Austausch einer Aminosäure nicht mehr an Groucho binden kann, ihre Fähigkeit verliert, das Vorderhirn zu transformieren und Mittelhirn/Hinterhirn Markergene zu induzieren. Des Weiteren führte die Expression eines chimären En-2 Proteins, in dem die Repressor-Domäne durch die VP16 Transaktivierungs-Domäne ersetzt wurde, zu einer starken Reduktion des Mittelhirns und zu einer posterioren Verschiebung der Expression des Vorderhirn Markergens *Pax-6* [Araki und Nakamura 1999].

Daher kann man spekulieren, dass auch in *Xenopus* Grg-4 eine Hauptrolle in der Regulation des Mittelhirns übernimmt, indem es die Expression von XEn-2 und XPax-2/5 außerhalb des Isthmus unterdrückt. Interessanterweise interagiert XGrg-4 auch mit den Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren, um die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade in Abwesenheit von nukleären β -Catenin zu unterdrücken [Roose et al., 1998].

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Analyse von Mikroinjektions-Studien an Embryonen und transgenen Embryonen gezeigt werden, dass für die Restriktion der *XTcf-4* Expression im anterioren Mittelhirn regulatorische Elemente im Bereich von -3855 bis -2720 auf dem *XTcf-4* Gen verantwortlich sind. Dabei war die Sequenz 5' von -2720 nicht nur in der Lage, ein Reporter-gen im Mittelhirn zu aktivieren, sondern unterdrückte darüber hinaus dessen ektopische Aktivierung. Da die *XTcf-4* Auto-regulation über eine funktionale Lef/Tcf Bindestelle an Position -1437 bis -1428 vermittelt wird, scheint das Wnt responsive Element für die Lokalisation von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Eine Analyse der Lokalisationssequenz zwischen -3855 bis -2720 offenbarte potentielle Bindedomänen für die Transkriptionsfaktoren Pax-2/5 und En-2, deren funktionelle Relevanz auf Promotorebene mittels Reporter-gen-Studien bewiesen wurde. Hierbei zeigte sich eine kontext-abhängige Regulation durch XPax-2/5. Während in Zellkultur der *XTcf-4* Promotor durch XPax-5 aktiviert wurde, wurde dieser im Embryo durch XPax-2 und XPax-5 reprimiert. Dagegen wurde XEn-2 als Repressor der *XTcf-4* Promotoraktivität identifiziert. Darüber hinaus resultierte die Depletion von XEn-2 und XPax-2/5 durch Morpholino-Applikation in einer Reduktion der endogenen *XTcf-4* Expression im Mittelhirn. Folglich hängt die *XTcf-4* Expression von der Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren XEn-2 und XPax-2/5 ab.

Des Weiteren wurde eine wechselseitige Abhängigkeit der XEn-2 und XPax-2/5 Expression am Isthmus nachgewiesen. Interessanterweise war XEn-2 in der Lage die *XTcf-4* Expression nach einer XPax-2/5 Depletion partiell wieder herzustellen. Somit erfolgt die Regulation von *XTcf-4* durch XPax-2/5 zumindest teilweise über die Aktivierung des XPax-2 Zielgens *XEn-2*. Die Regulation der *XTcf-4* Expression durch XEn-2 erfolgt also direkt über die En-2 Bindestelle an Position -2890 und indirekt über die Pax-5 Bindestelle an Position -3245.

Die Aktivierung des *XEn-2* Promotors und die endogene XEn-2 Expression benötigt die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors *XTcf-4*. Folglich ist die Expression dieser beiden Zielgene des Wnt/ β -Catenin Signalwegs über eine regulatorische Schleife miteinander gekoppelt, die Isthmus und Mittelhirn miteinander verbindet.

8. Literaturverzeichnis

- **Alexandre, C. und Vincent, J.-P.** (2003). Requirements for transcriptional repression and activation by Engrailed in *Drosophila* embryos. *Development* **130**, 729-739.
- **Araki, I. und Nakamura, H.** (1999). Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* **126**, 5127–5135.
- **Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L.** (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492-7504.
- **Atcha, F. A., Munguia, J. E., Li, T. W. H., Hovanes, K., Waterman, M. L.** (2003). A New β -Catenin-dependent Activation Domain in T Cell Factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 16169-16175.
- **Atcha, F. A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N., Yokoyama, N. N., Ting, J. H., Munguia, J. E., Mangalam, H. J., Marsh, J. L., Waterman, M. L.** (2007). A unique DNA binding domain converts TCFs into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol.* **27**, 8352–8363.
- **Bally-Cuif, L. und Wassef, M.** (1994). Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**, 3379-3394.
- **Barker, N., Morin, P. J., Clevers, H.** (2000) The Yin-Yan of TCF/ β -Catenin Signaling. *Advances in Cancer Research* **77**, 1-24.
- **Barker, N., Huls, G., Korinek, V., Clevers, H.** (1999). Restricted High Level Expression of Tcf-4 Protein in Intestinal and Mammary Gland Epithelium. *Am J Pathol*, **154**, 29-35.
- **Bassham, S., Canestro, C., Postethwait, J. H.** (2008). Evolution of developmental roles of Pax2/5/8 paralogs after independent duplication in urchordate and vertebrate lineages. *BMC Biology* **6**:35.
- **Blauwkamp, T. A., Chang, M. V., Cadigan, K. M.** (2008). Novel TCF binding sites specify transcriptional repression by Wnt signalling. *EMBO J* **27**, 1436-1446.
- **Bouchard, M., Grote, D., Craven, S. E., Sun, Q., Steinlein, P., Busslinger M.** (2005). Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development* **132**, 2633-2643.
- **Bouchard, M., Pfeffer, P., Busslinger M.** (2000). Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development. *Development* **127**, 3703-3713.
- **Bradley L. C., Snape, A., Bhatt, S., Wilkinson, D. G.** (1993) The Structure and Expression of the *Xenopus* Krox-20 Gene: Conserved and Divergent Patterns of Expression in Rhombomeres and Neural Crest. *Mech Dev* **40**, 73-84.
- **Brand, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., van Eeden, F. J. M., Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123**, 179-190.
- **Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D., Moon, R. T.** (1999). XctBP is a XTcf-3 Co-Repressor With Roles Throughout *Xenopus* Development. *Development* **126**: 3159-3170.

-
- **Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T., Kimelman, D.** (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the *siamois* promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* **11**, 2359-2370.
 - **Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Cha, K. B., Gridley, T., Stifani, S., Meeldijk, J., Clevers, H., Camper, S. A.** (2003). TCF and Groucho-related genes influence pituitary growth and development. *Mol Endocrinol* **17**, 2152-61.
 - **Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Davis, S. W., Camper, S. A.** (2007). TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev. Biol.* **311**, 396-407.
 - **Bruhn, L. Munnerlyn, A., Grosschedl, R.** (1997). ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev.* **11**, 640-653.
 - **Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., Basler, K.** (1997). Pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 289-833.
 - **Chang, C., und Hemmati-Brivanlou, A.** (1998). Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **194**, 129-134.
 - **Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A. J.** (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* **13**, 2218-2230.
 - **Cho, E. A. und Dressler, G. R.** (1998). TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* **77**, 9-18.
 - **Corey, D., Abrams, J.** (2001) Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol.* **2**(5) REVIEWS 1015.
 - **Crossley, P. H., Martinez, S., Martin, G. R.** (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, 66-68.
 - **Danker, K., Hacke, H., Ramos, J., DeSimone, D., Wedlich, D.** (1993). V(+)-fibronectin expression and localization prior to gastrulation in *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.* **44**, 155-65.
 - **De Robertis, E. M. und Kuroda, H.** (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 285-308.
 - **Delaune, E., Lemaire, P., Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.
 - **Dessaud, E., McMahon, A. P., Briscoe, J.** (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
 - **Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G., Hamelin, R.** (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* **60**, 3872-3879.
 - **Eberhard, D., Jiménez, G., Heavey, B., Busslinger, M.** (2000). Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho Family. *EMBO* **18**, 2292-2303.

- **Eizema, K., Koster, J. G., Stegeman, B. I., Baarends, W. M., Lanser, P. H., Destrée, O. H. J.** (1994). Comparative analysis of Engrailed-1 and Wnt-1 expression in the developing central nervous system of *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.*, **38**, 623-632.
- **Fichtner, D.** (2007). Regulation der XTcf-4 Expression in der frühen Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Universität Karlsruhe (TH).
- **Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., Engelhardt, F.** (2002). Wnt-3A/ β -Catenin Signaling Induces Transcription from the *LEF-1* Promoter. *J. Biol. Chem.* **277**, 3398-410.
- **Funahashi, J.-I., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., Nakamura H.**, (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev. Growth Differ.* **41**, 59–72.
- **Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H., Grosschedl, R.** (1999) Wnt3a^{-/-}-Like Phenotype and Limb Deficiency in Lef1^{-/-} Tcf1^{-/-} Mice. *Genes Dev.* **13**, 709-717.
- **Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R., Grosschedl, R.** (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* **9**, 995-1008.
- **Gilbert, S. F.** (2006). Developmental Biology (8th edition). *Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts USA*.
- **Gorman, C.** (1985). High efficiency gene transfer into mammalian cells. A cloning: a practical approach, IRL press Oxford.
- **Gradi, D., König, A., Wedlich, D.** (2002). Functional Diversity of *Xenopus* Lymphoid Enhancer Factor/T-cell Factor Transcription Factors Relies on Combinations of Activating and Repressing Elements. *J. Biol. Chem.* **277**, 14159-14171.
- **Gradi, D., Köhl, M., Wedlich, D.** (1999) The Wnt/Wg signal transducer β -catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol.* **19**, 5576-5587.
- **Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A. B., Joyner, A. J.** (1995). Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science* **269**, 679–682.
- **Hanna-Rose, W., und Hansen, U.** (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* **12**, 229–234.
- **Heasman, J.** (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* **243**, 209-14.
- **Heller, N. und Brändli, A. W.** (1997). *Xenopus* Pax-2 displays multiple splice forms during embryogenesis and pronephric kidney development. *Mech. Dev.* **69**, 83-104.
- **Heller, N. und Brändli, A. W.** (1999). *Xenopus* Pax-2/5/8 Orthologues: Novel Insights Into Pax Gene Evolution and Identification of Pax-8 as the Earliest Marker for Otic and Pronephric Cell Lineages. *Dev. Gen.* **24**, 208-219.
- **Hemmati-Brivanlou, A., de la Torre, J. R., Holt, C., Harland, R. M.** (1991). Cephalic expression and molecular characterization of *Xenopus* En-2. *Development* **111**, 715-724.
- **Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U., Holstein, T. W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* **407**, 186-9.

- **Houston, D. W., Kofron, M., Resnik, E., Langland, R., Destrée, O., Wylie, C., Heasman, J.** (2002). Repression of organizer genes in dorsal and ventral *Xenopus* cells mediated by maternal XTcf-3. *Development* **129**, 4015-4025.
- **Hovanes, K., Li, T. W., Muguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Marsh, J. L., Holcombe, R. F., Waterman, M. L.** (2001) β -catenin sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat. Genet.* **28**, 53-57.
- **Hoverter, N. P. und Waterman, M. L.** (2008). A Wnt-fall for Gene Regulation: Repression. *Sci Signal* **1**, pe43.
- **Hurlstone, A. und Clevers, H.** (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* **21**, 2303-2311.
- **Itasaki, N., Sharpe, J., Morrison, A., Krumlauf, R.** (1996). Reprogramming Hox Expression in the Vertebrate Hindbrain. Influence of Paraxial Mesoderm and Rhombomere Transposition. *Neuron* **16**, 487-500.
- **Jamora, C, DasGupta, R., Kocieniewski, P., Fuchs, E.** (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* **422**, 317–322.
- **Joyner A. L., Herrup K., Auerbach B. A., Davis C. A., Rossant J.** (1991). Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* **251**, 1239–43.
- **Kahler, R. A. und Westendorf, J. J.** (2003). Lymphoid enhancer factor-1 and β -catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 11937–11944.
- **Kiecker, C. und Niehrs, C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189-201.
- **Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W., Chitnis, A. B.** (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.
- **Koenig, S. F., Lattanzio, R., Mansperger, K., Rupp, R. A. W., Wedlich, D., Gradl, D.** (2008). Autoregulation of XTcf-4 Depends on a Lef/Tcf Site on the XTcf-4 Promoter. *Genesis* **46**, 81-86.
- **König, A.** (2003). Isolierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors XTcf-4 in *Xenopus laevis*. Dissertation am Institut für Biochemie. Medizin. Universität Ulm.
- **König, A., Gradl, D., Köhl, M., Wedlich, D.** (2000). The HMG-box transcription factor XTcf-4 demarcates the forebrain-midbrain boundary. *Mech. Dev.* **93**, 211-214.
- **König, S. F.** (2005). Analyse regulatorischer Elemente im 5' nicht-translatierten Bereich des XTcf-4 Gens. Diplomarbeit am Zoologischen Institut II. Chemie und Biowissenschaften. Universität Karlsruhe (TH).
- **Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donsellar, E., Huls, G., Peters, P. J., Clevers, H.** (1998b) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* **19**, 379-383.

- **Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destrée, O., Clevers, H.** (1998a) Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ β -Catenin Signaling During Embryogenesis in the Mouse. *Mol. Cell Biol.* **18**: 1248-1256.
- **Kroll, K. L. und Amaya, E.** (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**, 3173-3183.
- **Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D., Gradl, D.** (2004). Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Dev Biol* **273**, 390-401.
- **Landesman, Y. und Sokol, S. Y.** (1997) Xwnt-2b is a Novel Axis-Inducing *Xenopus* Wnt, Which is Expressed in Embryonic Brain. *Mech Dev* **63**, 199-209.
- **Lattanzio, R.** (2004). Isolierung und Charakterisierung des *XTcf-4* Promotors. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe TH.*
- **Lee, S. M., Danielian, P. S., Fritsch, B., McMahon, A. P.** (1997). Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* **124**, 959-69.
- **Lee, K. J. und Jessell, T. M.** (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 261-294.
- **Levanon, D., Goldstein, R. E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z. und Groner, Y.** (1998). Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11590-5.
- **Lin, R., Thompson, S., Priess, J. R.** (1995). pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 599-609.
- **Liu, A. und Joyner, A. L.** (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* **128**, 181-191.
- **Liu, F., van den Broek, O., Destrée, O., Hoppler, S.** (2005). Distinct roles for *Xenopus* Tcf/Lef genes in mediating specific responses to Wnt/ β -catenin signalling in mesoderm development. *Development* **132**, 5375-85.
- **Logan, C. Y. und Nusse, R.** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781-810.
- **Löhr, K., Möritz, C., Contente, A., Dobbstein, M.** (2003). p21/CDKN1A Mediates Negative Regulation of Transcription by p53. *J. Biol. Chem.* **278**, 32507-32516.
- **Lumsden, A. und Krumlauf, R.** (1996). Patterning the Vertebrate Neuraxis. *Science* **274**, 1109-1115.
- **Maden, M.** (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Rev.* **3**, 843-853.
- **Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubinstein, J. L., Martin, G. R.** (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development* **126**, 1189-1200.
- **Matsunaga, E., Araki, I. Nakamura, H.** (2000). Pax6 defines the dimesencephalic boundary by repressing *En1* and *Pax2*. *Development* **127**, 2357-2365.

- **Matsunaga, E., Araki, I., Nakamura, H.** (2001). Role of Pax3/7 in tectum regionalization. *Development* **128**, 4069-4077.
- **McGrew, L. L., Takemaru, K., Bates, R., Moon, R. T.** (1999). Direct regulation of the *Xenopus engrailed-2* promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech. Dev.* **87**, 21-32.
- **McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., McMahon, J. A.** (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, 581-95.
- **Miller, J. R., Rowing, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L., Moon, R. T.** (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* **146**, 427-37.
- **Minowada, G. et al.** (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signalling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* **126**, 4465-4475.
- **Molenaar, M., Roose, J., Peterson, J., Venanzi, S., Clevers, H., Destrée, O.** (1998) Differential expression of the HMG box transcription factors XTcf-3 and XLef-1 during early *xenopus* development. *Mech Dev.* **75**, 151-154.
- **Nakamura, H. und Watanabe, Y.** (2005). Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 231-235.
- **Nieuwkoop, P. D. und Faber, J.** (1967). Normtabelle von *Xenopus laevis*. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- **Nieuwkoop, P. D. und Nigtevecht, G. V.** (1954). Neural activation and transformation in explants of competent ectoderm under the influence of fragments of anterior notochord in urodeles. *J Embryol Exp Morphol* **2**, 175-193.
- **Okafuji, T., Funahashi, J.-I., Nakamura, H.** (1999). Roles of Pax-2 in initiation of the chick tectal development. *Dev Brain Res* **116**, 41-49.
- **Pan, F.-C., Yonglong, C., Loeber, J., Henningfeld, K., Pieler, T.** (2006). *I-SceI* Meganuclease-Mediated Transgenesis in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* **235**, 247-252.
- **Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B., Goodman, C. S.** (1989). Expression of engrailed Proteins in Arthropods, Annelids, and Chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- **Peifer, M. und Wieschaus, E.** (1990). Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeodomain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev.* **4**, 1209-1223.
- **Pfeffer, P. L., Bouchard, M., Busslinger, M.** (2000). Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435 bp enhancer of the mouse Pax5 gene at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **127**, 1017-1028.
- **Picker, A., Scholpp, S., Böhli, H., Takeda, H., Brand, M.** (2002). A novel positive transcriptional feedback loop in midbrain-hindbrain boundary development is revealed through analysis of the zebrafish pax2.1 promoter in transgenic lines. *Development* **129**, 3227-3239.

- **Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., Jäckle, H.** (2000). *Drosophila* Segment Borders Result from Unilateral Repression of Hedgehog Activity by Wingless Signaling. *Mol Cell* **6**, 203–209.
- **Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K. A., Knöchel, W., Wedlich, D., Kühl, M.** (2001). Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTCF-4. *J Biol Chem* **276**, 8968–78.
- **Roël, G., van den Broeck, O., Spieker, N., Peterson-Maduro, J., Destrée, O.** (2003). Tcf-1 expression during *Xenopus* development. *Gene Expr Patterns* **3**, 123–126.
- **Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destrée, O., Clevers, H.** (1998) The *Xenopus* Wnt effector Tcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608–612.
- **Rother, K., Johne, C., Spießbach, K., Haugwitz, U., Tschöp, K., Wasner, M., Klein-Hitpass, L., Möry, T., Mössner, J., Engeland, K.** (2004). Identification of Tcf-4 as a transcriptional target of p53 signalling. *Oncogene* **23**, 3376–3384.
- **Rowitch, D. H. und McMahon, A. P.** (1995). Pax2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mech. Dev.* **52**, 3–8.
- **Rubenstein, J. L. und Puelles, L.** (1994). The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science* **266**, 578–580.
- **Rupp, R. A. W., Snider, L., Weintraub, H.** (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* **8**, 1311–1323.
- **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 1992; **24**,104–8.
- **Schneider, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. Hausen, P.** (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* **57**, 191–8.
- **Schohl, A. und Fagotto, F.** (2002) β -Catenin, MAPK and Smad signalling during early *Xenopus* development. *Development* **129**, 37–52.
- **Scholpp, S. und Brand, M.** (2003). Integrity of the midbrain region is required to maintain the diencephalic-mesencephalic boundary in zebrafish no isthmus/pax2.1 mutants. *Dev. Dyn.* **228**, 313–322.
- **Schöneberg, U., Vahrson, W., Priedemuth, U., Wittig, B.** (1993). Analysis and Interpretation of DNA and Protein Sequences Using MacMolly Tetra[®].
- **Schug, J. und Overton, G. C.** (1997). TESS: Transcription Element Search Software on the WWW.
- **Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Dressler, G., Urbánek, P., Busslinger, M., Gruss, P.** (1999). Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech. Dev.* **82** 29–39.
- **Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbánek, P., Busslinger, M., Gruss, P.** (1997). Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: Evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 14518–14523.
- **Sekkali, B., Tran, H.T., Crabbe, E., De Beule, C. Van Roy, F., Vlemminckx, K.** (2008). Chicken β -globin insulator overcomes variegation of transgenes in *Xenopus* embryos. *FASEB* **22**, 2534–40.

- **Serrano, N. und Maschat, F.** (1998). Molecular mechanism of polyhomeotic activation by Engrailed. *EMBO* **17**, 3704-3713.
- **Serrano, N., Brock, H. W., Maschat, F.** (1997) β 3-Tubulin is directly repressed by the Engrailed protein in *Drosophila*. *Development*, **124**, 2527–2539.
- **Shimamura, K. und Rubenstein, J. L.** (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.
- **Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y.** (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-39.
- **Shulewitz, M., Soloviev, I., Wu, T. Koeppen, H., Polakis, P., Sakanaka, C.** (2006). Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene* **25**, 4361–4369.
- **Solovyev, V. V., und Shakhmuradov, I. A.** (1993). PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences. *Nucleic Acids Res* **31**, 3540-3545.
- **Song, D. L. und Joyner, A. L.** (2000). Two Pax2/5/8-binding sites in *Engrailed2* are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech. Dev.* **90**, 155-165.
- **Spemann, H. und Mangold, H.** (1924) Über Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **100**, 599-638.
- **Spieker, N., Peterson, J., Reneman, S., Destrée, O.** (2004). Analysis of the *Tcf-3* Promoter During Early Development of *Xenopus*. *Dev. Dyn.* **231**, 510–517.
- **Standley, H. J., Destrée, O., Kofron, M., Wylie, C., Heasman, J.** (2006). Maternal XTcf1 and XTcf4 have distinct roles in regulating Wnt target genes. *Dev Biol* **289**, 318-28.
- **Stern, C. D.** (2006). Neural induction: 10 years on since the 'default model'. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 692-7.
- **Sugiyama, S., Funahashi, J.-I., Nakamura, H.** (2000). Antagonizing activity of chick *Grg4* against tectum organizing activity. *Dev. Biol.* **221**, 168–180.
- **Theisen, H., Syed, A., Nguyen, B. T., Lukacsovich, T., Purcell, J., Srivastava, G. P., Iron, D., Gaudenz, K., Nie, Q., Wan, F. Y., Waterman, M. L., Marsh, J. L.** (2007). Wingless directly represses DPP morphogen expression via an armadillo/TCF/Brinker complex. *PLoS One* **2**, e142.
- **Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., Joly, J.-S.** (2002). *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* **118**, 91-98.
- **Tolkunova, E. N., Jujioka, M., Kobayashi, M., Deka, D., Jaynes, J. B.** (1998). Two Distinct Types of Repression Domain in Engrailed: One Interacts with the Groucho Corepressor and Is Preferentially Active on Integrated Target Genes. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2804-2814.
- **Travis, A., Amsterdam, A., Belanger C., Grosschedl, R.** (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev.* **5**, 880-894.

-
- **Vallin, J., Thuret, R. I., Giacomello, E., Faraldo, M. M., Thiery, J. P., Broders, F.** (2001). Cloning and Characterization of Three *Xenopus* Slug Promoters Reveal Direct Regulation by Lef/ β -Catenin Signaling. *J Biol Chem* **276**, 30350–30358.
 - **van de Wetering, M. und Clevers, H.** (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J* **11**, 3039-44.
 - **van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H.** (1996). Extensive alternative splicing and dual promotor usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol. Cell Biol.* **16**, 745-752.
 - **van de Wetering, M., Oesterwegel, M., Dooijes, D., Clevers, H.** (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* **10**, 123-132.
 - **Veien, E. S., Grierson, M. J., Saund, R. S., Dorsky, R. I.** (2005). Expression pattern of zebrafish *tcf7* suggest unexplored domains of Wnt/ β -catenin activity. *Dev Dyn* **233**, 233-239.
 - **Wessely, O. und De Robertis, E. M.** (2002). Neural Plate patterning by secreted signals. *Neuron* **33**, 489-494.
 - **Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Ohnhauser, R., Pruss, M., Schacherer, F.** (2001). The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 281-283.
 - **Wurst, W. und Bally-Cuif, L.** (2001) Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* **2**, 99-108.
 - **Wurst, W., Auerbach, A. B. Joyner, A. L.** (1994). Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, 2065–2075.
 - **Young, R. M., Reyes, A. E., Allende, M. L.** (2002). Expression and splice variant analysis of the zebrafish *tcf4* transcription factor. *Mech. Dev.* **117**, 269-273.

9. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Doris Wedlich nicht nur für die Möglichkeit, meine Dissertation an ihrem Institut anzufertigen bedanken, sondern auch für ihre stetige Unterstützung, Förderung und konstruktive Kritik.

Ich danke Privatdozent Dr. Harald König für die freundliche Übernahme des Co-Referats.

Mein besonderer Dank gebührt Dietmar Gradl für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit, seinen unermüdlichen Enthusiasmus und sein großes persönliches Engagement. Ohne seine Motivation und unerschütterlichen Optimismus wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht zustande gekommen.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine treuen Gefährten Roberto Lattanzio, Jubin Kashef, Fränzi Klein und Micha Dietzsch für den vielen Spaß während der Mittagspausen, wodurch der oftmals frustrierende Laboralltag erfolgreich kompensiert wurde.

Gerne möchte ich allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts II für die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die fachlichen Ratschläge und zahlreichen Diskussionen danken.

Publikationen

Veröffentlichungen

Koenig, S. F., Lattanzio, R., Mansperger, K., Rupp, R. A. W., Wedlich, D., Gradl, D. (2008). Autoregulation of XTcf-4 Depends on a Lef/Tcf Site on the XTcf-4 Promoter. *Genesis* **46**, 81-86.

Koenig, S. F., Fichtner, D., Wedlich D., Gradl, D. (2009). En2, Pax2/5 and Tcf-4 transcription factors cooperate to regulate brain development in *Xenopus laevis*.
In Bearbeitung.

Vortrag

Koenig, S. F., Wedlich, D. Gradl, D. Regulation of XTcf-4 during the development of *Xenopus laevis*. 6th German – Italian *Xenopus* Meeting, Villa Vigoni (Lovenno di Menaggio), Italien, Oktober 2007.

Poster

Koenig, S. F., Wedlich, D., Gradl, D. Regulation of XTcf-4 during the development of *Xenopus laevis*. 17. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE). Marburg, März 2007.

Koenig, S. F., Wedlich, D., Gradl, D. Regulation of XTcf-4 in the developing midbrain. 12th international *Xenopus* conference. Leiwun, September 2008.

Sonstiges

Forschungsaufenthalt zur Erlernung der REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) Methode zur Herstellung transgener *X. laevis* und *X. tropicalis* im Labor von Kris Vleminckx am Flanders Institute for Biotechnology (VIB Department for Molecular Biomedical Research) in Ghent, Belgien. Der Forschungsaufenthalt vom 4.-17. November 2007 wurde durch eine Reisebeihilfe der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE) ermöglicht.

Lebenslauf**Sabrina F. König**

geboren am 08. November 1978 in Karlsruhe

- 09/85-07/89 **Rennbuckel-Grundschule, Karlsruhe**
- 09/89-06/98 **Humboldt-Gymnasium, Karlsruhe**
- 08/98-09/99 Au-pair in Palo Alto, Kalifornien, USA
- 10/99-03/02 **Universität Karlsruhe (TH)**
Studiengang Diplom-Biologie
Hauptfächer: Zoologie und Botanik
Nebenfächer: Chemie und Mathematik
Abschluss: Vordiplom
- 03/02-11/04 **Universität Karlsruhe (TH)**
Studiengang Diplom-Biologie
Hauptfächer: Zoologie und Genetik
Nebenfächer: Organische Chemie und Biochemie
- 12/04-09/05 **Universität Karlsruhe (TH)**
Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie
Diplomarbeit „Analyse regulatorischer Elemente im 5'
nicht- translatierten Bereich des *XTcf-4* Gens“
Abschluss: Diplom (Gesamtnote: 1,3)
- seit 11/05 **Universität Karlsruhe (TH)**
Institut für Molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie
Promotion