



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 6775

# **Konditionale ubiquitäre Expression des Homöoboxgens *gooseoid* im Primitivstreifen der Maus**

**K. Deißler**

**Institut für Toxikologie und Genetik**

**Oktober 2002**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6775

Konditionale ubiquitäre Expression des  
Homöoboxgens *gooseoid* im Primitivstreifen der  
Maus

Kirsten Deißler

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität

Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2002

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

# **Konditionale ubiquitäre Expression des Homöoboxgens *gooseoid* im Primitivstreifen der Maus**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften

der

Universität Karlsruhe

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Kirsten Deißler**

Karlsruhe

2001

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2001

Referent: PD Dr. M. Blum

Korreferent: Prof. Dr. W. Hanke



## Zusammenfassung

Gastrulation bezeichnet eine Phase der frühen Embryonalentwicklung. In der Maus entsteht dabei aus dem bis dahin einschichtigen, zylinderförmigen Embryo ein dreischichtiger Keim aus Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Gleichzeitig werden die Körperachsen und der Grundbauplan festgelegt. Mit dem Auftreten des Primitivstreifens wird die anterior-posteriore Achse erstmals sichtbar. Von dort wandern im Verlauf der Gastrulation präsumptive mesodermale und entodermale Zellen aus. Die Zellen des Primitivstreifens weisen morphologisch auf diesem Stadium keinerlei Unterschiede auf. Die spätere Differenzierung in spezifische Derivate entlang der cephalo-caudalen Achse läßt sich noch nicht erkennen. Dennoch bestehen auf molekularem Niveau bereits deutliche Unterschiede, die sich in Form spezifisch positionierter Expression von Genen manifestieren.

Um diesen Vorgang der regionalen Spezifizierung des Primitivstreifens auf molekulembryologischer Ebene zu untersuchen wurde eine transgene Maus hergestellt, die das Homöoboxgen *gooseoid* im Primitivstreifen räumlich missexprimierte. Zur konditionalen Missexpression wurde ein Kontrollelement aus dem Promotor des Gens *Brachyury* verwendet, das für dessen Aktivität im gesamten Primitivstreifen von der frühen Gastrulation bis zu Organogenesestadien verantwortlich ist. Es wurde eine transgene Maus erzeugt, die das Markergen  $\beta$ -Galaktosidase, von loxP-Sequenzen flankiert, unter der Kontrolle des *Brachyury*-Promotors exprimiert, und in der ein benachbartes *gooseoid*-Gen nicht zur Ausprägung kommt. In einem zweiten Schritt wurde das Markergen nach Kreuzen mit einer *CRE*-produzierenden Mauslinie durch Sequenz-spezifische Rekombination entfernt, und das *gooseoid*-Gen unter *Brachyury*-Promotor Kontrolle gebracht.

Die ektopische Expression des *gooseoid* Gens führte zu einem veränderten Wanderungsverhalten der mesodermalen Zellen des Primitivstreifens. Daraus resultierte eine Verbreiterung des Prächordalplattenmesoderms, welches im darüberliegenden Neuroektoderm eine verbreiterte Grundplatte induzierte. Dies behinderte den Neuralrohrverschluss und verursachte Exencephalie. Die molekulare Analyse ergab, dass in den transgenen Embryonen eine Repression der endogenen *Brachyury* Transkription durch *GOOSEOID* im Primitivstreifenmesoderm *in vivo* bestätigt werden konnte. Desweiteren resultierte die *gooseoid* Missexpression in einer Aktivierung der endogenen Genexpression von *Fgf-8* und *Hnf-3* im präsumptiven Mesoderm des Primitivstreifens als auch im anterioren Neuroektoderm.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellte konditionale transgene Mauslinie eignet sich nicht nur für die Untersuchung der Regionalisierung des Primitivstreifenmesoderms und der Mechanismen der Zellwanderung im Mausembryo, sondern bietet ein Modell für Missbildungen des Neuralrohrverschlusses, nicht zuletzt auch beim Menschen an.

## Abstract

### Conditional Misexpression of the Homeobox gene *gooseoid* in the Primitive Streak of the Mouse

Gastrulation is an important phase of early embryogenesis. It is during this phase that the three germ layers arise – ectoderm, mesoderm and endoderm – and the primary body axes and basic body plan are established. In the mouse, gastrulation begins when the primitive streak forms in the cylindrical embryo. This is the first visible marker of the anterior-posterior axis. As gastrulation proceeds, presumptive mesodermal and endodermal cells delaminate from the streak. Although at this stage these mesendodermal cells of the primitive streak do not show any morphological signs of anterior-posterior determination or differentiation, regional differences already exist on a molecular level in the form of specifically localised gene expression.

In order to study the process by which the primitive streak becomes regionalised, the homeobox gene *gooseoid* was misexpressed in the entire primitive streak in transgenic mice. By bringing *gooseoid* under the control of the *Brachyury* promoter element responsible for activity within the whole primitive streak from early gastrulation until the onset of organogenesis, *gooseoid* expression was spatially expanded in the primitive streak and temporally prolonged to last throughout gastrulation. For conditional misexpression, transgenic animals have been generated that express the marker gene  $\beta$ -galactosidase, flanked by loxP sites, under the control of the *Brachyury* promoter. The downstream *gooseoid* transgene was silent until the intervening marker gene was removed by sequence-specific recombination following genetic crossing with mice producing the CRE recombinase.

The ectopic *gooseoid* expression resulted in a change in the migratory behaviour of mesodermal streak cells. This led to extension of the prechordal plate mesoderm, which induced a broader floor plate in the overlying neuroectoderm. This interfered with the closure of the neural tube and thus caused exencephaly. Molecular analysis of the transgenic embryos confirmed the repression of endogenous *Brachyury* transcription by *gooseoid* *in vivo*. In addition, misexpression of *gooseoid* caused activation of endogenous *Fgf-8* and *Hnf-3* expression in the presumptive mesoderm of the streak and in the anterior neuroectoderm.

The conditional transgenic mouse generated in this study allows investigation of the process of regionalisation in the primitive streak mesoderm and of the mechanisms of cell migration in the mouse embryo. In addition, this transgenic mouse could serve as a model for neural tube closure defects in humans.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Gastrulation .....	1
1.2 Die Entstehung der Körperachsen .....	2
1.2.1 Der Spemann Organisator .....	3
1.2.2 Eigenschaften des Organisators .....	4
1.3 Gastrulation bei der Maus .....	5
1.3.1 Regionalisierung des Mesoderms im Primitivstreifen .....	7
1.3.2 Der Primitivknoten .....	9
1.3.3 Der Primitivknoten besitzt die Eigenschaften des Spemann'schen Organisators .....	10
1.3.4 Zellbewegungen im Primitivstreifen .....	11
1.3.5 Zellmigration im Mesoderm .....	12
1.4 Das Organisatorprinzip .....	14
1.4.1 Die <i>BMP-4</i> Interaktion .....	15
1.4.2 Die <i>WNT</i> Interaktion .....	17
1.5 Der Transkriptionsfaktor <i>GOOSECOID</i> reguliert ein organisatorspezifisches Genprogramm .....	19
1.6 Expression des <i>gooseoid</i> -Gens in der Maus .....	21
1.7 <i>gooseoid knock-out</i> Mutation der Maus .....	22
1.8 Ziel der Arbeit: Analyse der Regionalisierung durch eine Miss- expression des <i>gooseoid</i> -Gens in der Maus .....	23
1.8.1 Ein Promotorelement des <i>Brachyury</i> -Gens kontrolliert die Missexpression des <i>gooseoid</i> -Gens in der Maus .....	24
1.8.2 Experimentelles System zur Missexpression des <i>gooseoid</i> - Gens in der Maus: Transgene Mäuse .....	24

1.8.3	Missexpression des <i>gooseoid</i> -Gens in der Maus durch konditionale Mutagenese	
1.9	Arbeitshypothese - spezifische Fragestellung.....	29
<b>2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
2.1	Charakterisierung und Expression des Transgenkonstrukts.....	31
2.2	Konditionale Aktivierung des Transgens <i>in vitro</i> .....	35
2.3	Repression der <i>Brachyury</i> -Expression durch das Genprodukt des Transgens .....	37
2.4	Herstellung von transgenen Mäusen mit stabiler Integration des Transgens.....	40
2.4.1	Blastozysteninjektion.....	40
2.4.2	Integration der transgenen ES-Zellklone in die Keimbahn.....	41
2.4.3	Genotypisierung der transgenen Tiere.....	44
2.5	Analyse der Expression des Transgens in Embryonen.....	46
2.5.1	Analyse der LacZ-Markergenexpression in transgenen Embryonen .....	46
2.5.2	Analyse der Expression des <i>gooseoid</i> -Transgens in doppelt transgenen Embryonen .....	49
2.5.2.1	Aktivierung des <i>gooseoid</i> -Transgens <i>in vivo</i> .....	49
2.5.2.2	Expression des <i>gooseoid</i> -Transgens in doppelt transgenen Embryonen .....	51
2.6	Analyse des Phänotyps bei Expression des <i>gooseoid</i> -Transgens.....	53
2.6.1	Unvollständiges Auftreten des NTD-Phänotyps .....	55
2.6.2	Doppelt transgene Embryonen exprimierten zwei transgene <i>gooseoid</i> -Transkripte.....	56
2.7.1	Analyse von Wechselwirkungen mit anderen embryonalen Markergenen in doppelt transgenen Embryonen .....	60
2.7.1	Repression der endogenen <i>Brachyury</i> -Transkripte in doppelt transgenen Embryonen .....	60
2.7.2	Erhöhte Expression des <i>Hnf-3</i> Gens in doppelt transgenen Embryonen .....	62
2.7.3	Die <i>Fgf-8</i> -Genexpression ist in <i>gooseoid</i> miss-exprimierenden Embryonen erhöht.....	63
2.8	Generalisierte Überexpression eines <i>gooseoid</i> -Transgens in chimären Embryonen .....	64

<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
3.1	Expressionsmuster des endogenen und transgenen <i>goosecoid</i> -Gens.....	70
3.1.1	Doppelt transgene Embryonen exprimierten zwei transgene <i>goosecoid</i> Transkripte.....	76
3.2	Einfluss der Expression des <i>goosecoid</i> -Transgens auf andere embryonale Regulationsgene	
3.2.1	Repression der endogenen <i>Brachyury</i> Transkription.....	77
3.2.2	Verstärkung der endogenen <i>Hnf-3</i> -Expression.....	81
3.2.3	Weitere embryonale Markergene für die Analyse der veränderten Musterbildung im anterioren ZNS.....	83
3.3	Phänotypische Veränderungen durch die <i>goosecoid</i> Missexpression.....	85
3.3.1	Entstehung und Verschluss des Neuralrohres.....	86
3.3.2	Fehlentwicklung des Neuralrohrverschlusses.....	89
3.3.3	Neuralrohrdefekte in verschiedenen Mausmutanten.....	90
3.3.4	Neuralrohrdefekte in <i>goosecoid</i> missexprimierenden Embryonen.....	94
3.3.5	Häufigkeit des NTD-Phänotyps in <i>goosecoid</i> missexprimierenden Embryonen.....	95
3.3.6	Spezifität des NTD-Phänotyps in <i>goosecoid</i> missexprimierenden Embryonen.....	99
3.3.7	<i>goosecoid</i> Missexpression und Neuralrohrdefekte: ein Modell.....	101
<b>4</b>	<b>Material</b> .....	<b>105</b>
4.1	Bezugsquellen.....	105
4.2	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien.....	109
4.3	Kulturmedien.....	109
4.4	Puffer und Lösungen.....	110
4.5	Plasmide.....	111
4.6	Mausstämme und Mauslinien.....	112
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>113</b>
5.1	Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren.....	113
5.2	Präparation von DNA.....	113

5.3	Klonierungstechniken .....	115
5.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele.....	117
5.5	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegele.....	117
5.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte.....	118
5.7	Präparation von polyadenylierter RNA.....	119
5.8	Das Transgenkonstrukt .....	120
5.9	Zellkultur .....	122
5.10	Herstellung transgener Mäuse.....	127
5.11	Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien.....	128
5.12	Isolierung und Fixierung von Embryonen .....	129
5.13	Analytische Methoden .....	129
	5.13.1 Southern Blot Analyse.....	129
	5.13.2 Polymerasen Kettenreaktion .....	130
	5.13.3 Das Anfertigen von histologischen Schnitten.....	133
	5.13.4 <i>In situ</i> Hybridisierung im Ganzpräparat .....	134
	5.13.5 Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....	136
	5.13.6 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit dem Substrat X-gal im Ganzpräparat und in ES-Zellen.....	137
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>139</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CHAPS	(3-[(Cholamimidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
C-terminal	carboxyterminal
CTP	Cytidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
d.p.c.	<i>days post coitum</i>
DTT	Dithiothreitol
E	<i>embryonic day</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenguanintrtraessigsäure
et al.	<i>et alii</i>
FCS	Fötale Käberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GBq	Gigabequerel
gsc	<i>goosecoid</i> -Gen
G418	Geneticin[ ]-sulphat
h	Stunde/n
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2

HCl	Ethansulfonsäure
HPRT	Salzsäure
KAc	Hypoxanthinribosyltransferasegen
kb	Kaliumacetat
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kilobasen
K-MES	Kaliumdihydrogenphosphat
LacZ	K-Morpholin-Ethansulfonsäure
LB	β-Galaktosidasegen
LIF	Luria-Bertani-Medium
M	Leukemia Inhibitory Factor
mA	molar
mg	Milliampere
MgCl <sub>2</sub>	Milligramm
min	Magnesiumchlorid
ml	Minuten
mM	Milliliter
MOPS	millimolar
mRNA	N-Morpholinopropansulfonsäure
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Boten-RNA
NaAc	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumacetat
Na-Desoxycholat	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdesoxycholat
NaOH	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Natriumhydroxid
nm	Nanogramm
NTD	Nanometer
N-terminal	<i>neural tube defect</i>
°C	aminoterminal
OD	Grad Celsius
PAGE	optische Dichte
PBS	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	Phosphat gepufferte Salzlösung
	( <i>phosphate buffer saline</i> )
PBS <sup>-/-</sup>	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerasen Kettenreaktion
pH	<i>potentium hydrogenium</i> , negativ
	dekadischer Logarithmus der
	Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT <sup>+</sup> -PCR	Reverse Transkriptase-PCR

sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
SSC	<i>standard saline citrat</i>
T	<i>Brachyury</i>
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
tg	transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.	und
U	Enzymeinheiten (Units)
u.a.	und andere
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UTP	Uridintriphosphat
u. U.	unter Umständen
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentral Nervensystem
z. T.	zum Teil

Gene wurden mit kursiven Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Alle Gene, die für ein Genprodukt kodieren, das bei Heterozygotie zu einem Merkmal führt (dominant) wurden am Anfang großgeschrieben wie, z. B. *Brachyury*. Alle Gene die für ein Genprodukt kodieren, das bei Heterozygotie zu keinem Merkmal führt (rezessiv), wurden generell kleingeschrieben wie z. B. *gooseoid*. Zur Unterscheidung wurden Protein-Namen mit kursiven Großbuchstaben beschrieben, wie z. B. *BRACHYURY* oder *GOOSECOID*.



# 1 Einleitung

Die Embryonalentwicklung der Wirbeltiere von der befruchteten Eizelle bis zum reifen Organismus wird in verschiedene Stadien eingeteilt. Durch die auf die Befruchtung folgenden Furchungsteilungen entsteht ein mehr oder weniger geordneter Zellverband. Dieser wird während der Gastrulation grundlegend umgestaltet, so dass die drei Keimblätter entstehen. Das zentrale Nervensystem entsteht während der Neurulation, und während der Organogenese werden die übrigen Organsysteme angelegt und ausgestaltet. Alle diese Vorgänge sind durch hohe Zellteilungsrate gekennzeichnet. Die Potenz einzelner Zellen, verschiedene Zellschicksale anzunehmen, von der totipotenten Zygote bis zur terminal differenzierten Zelle, wird dabei zunehmend eingeschränkt.

Dieser Prozeß lässt sich mit dem Konzept der zunehmenden Determinierung und Differenzierung von embryonalen Zellen beschreiben (Slack, 1991). Eine embryonale Zelle gilt als determiniert, wenn sie sich autonom außerhalb des Embryos in einer neutralen Umgebung, z.B. einer Petrischale, zu einer spezialisierten Zelle differenzieren kann. Die Differenzierung der Zelle muß allerdings nicht mit ihrer prospektiven Bedeutung übereinstimmen, d. h. die prospektive Potenz ist zunächst noch größer als die prospektive Bedeutung. So entwickelt sich das zukünftige neurale Gewebe eines Froschembryos *in vitro* zu epidermalen Zellen (Dale und Slack, 1987). Weitere induktive Signale sind nötig für die Differenzierung in neurale Zellen. Werden undifferenzierte Zellen in einen Embryo transplantiert, so entwickeln sie sich ortsgemäß, d. h. ihr Zellschicksal kann noch verändert werden. Unter Determinierung versteht man die irreversible Festlegung des Zellschicksals. Wird determiniertes Gewebe an verschiedenen Stellen eines Empfängerembryos transplantiert, so kann es sich autonom innerhalb verschiedener Regionen des Embryos herkunftsgemäß entwickeln (Slack, 1991).

## **1.1 Gastrulation**

Die Gastrulation nimmt in der frühen Embryonalentwicklung eine besondere Stellung ein. Durch koordinierte Zellbewegungen wird der Blastula-Embryo dramatisch umgestaltet. Es entsteht eine mehrschichtige Struktur mit einem zentralen Darmrohr und bilateraler Symmetrie. Durch eine Einstülpung (Invagination), werden die Epithelzellen von der Außenseite des Embryos in sein Inneres verlagert. Alle sich anschließenden Entwicklungsereignisse hängen von den Wechselwirkungen zwischen diesen neu gebildeten Zelllagen ab. Gastrulation – die Bildung eines Urdarms durch Invagination – ist ein grundlegender Entwicklungsprozeß bei allen Chordaten. In der neu entstandenen dreischichtigen Struktur bildet die innere Schicht den Urdarm oder das Mesentoderm, die äußerste Schicht, d.h. die nicht invaginierten Epithelzellen, das Ektoderm und das intermediäre embryonale Bindegewebe aus Mesenchymzellen das Mesoderm. Dies entspricht den in allen Vertebraten präsenten drei Keimblättern. Durch die Gastrulationsbewegungen wird somit der Grundbauplan des Vertebratenkörpers angelegt. Auch die Grundlagen für die induktiven Ereignisse, wie z. B. die Körperachsenbildung, werden im Embryo während der Gastrulation geschaffen.

## **1.2 Die Entstehung der Körperachsen**

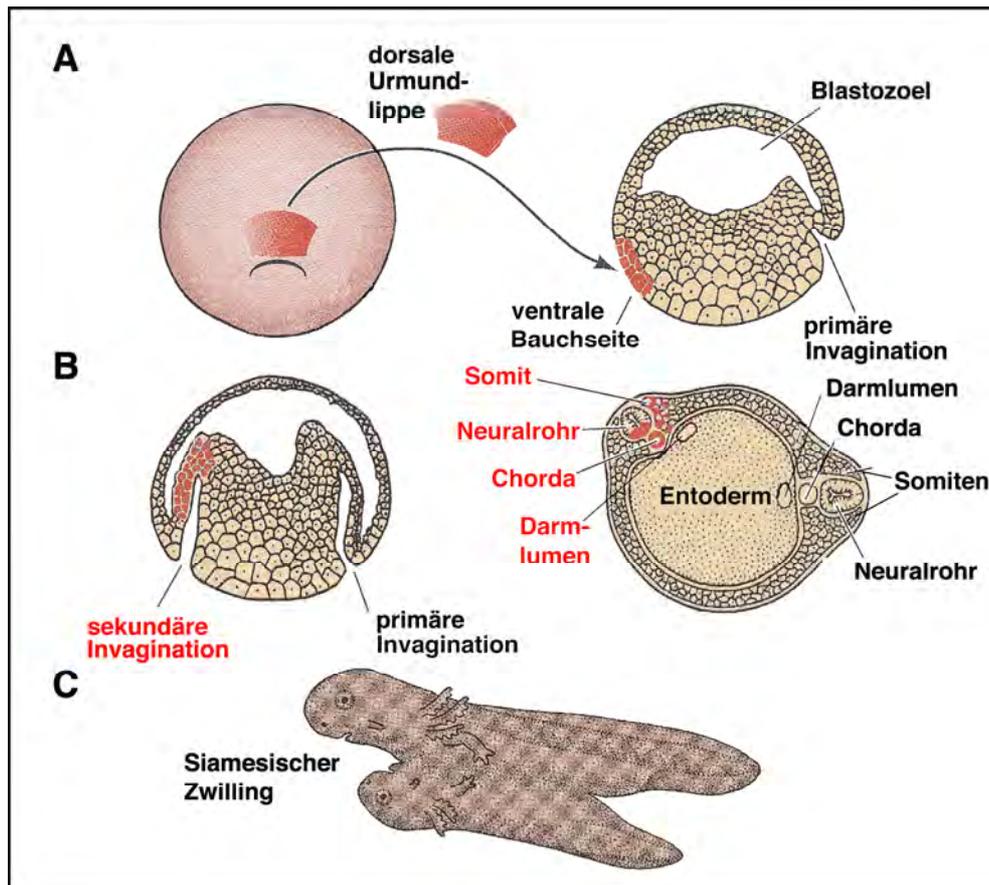
Die Körperachsen im Wirbeltierembryo werden schrittweise durch eine Reihe von Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zellen entwickelt. Die Achsenbildung bei Amphibien stellt ein Beispiel für das Konzept der regulierten Entwicklung dar. Eine einzelne Blastomere besitzt die Potenz, ein anderes Schicksal anzunehmen, als es ihr in der normalen embryonalen Entwicklung vorgegeben ist. Das Schicksal einer Zelle wird bestimmt durch die Interaktionen zwischen benachbarten Zellen. Diese Interaktionen werden als Induktionen bezeichnet. Hans Spemann konnte Anfang des letzten Jahrhunderts in seinen Experimenten aufzeigen, dass solch induktive Wechselwirkungen für die Achsenbildung in Amphibien verantwortlich

sind, und dass die dorsale Urmundlippe als Organisator der Körperachsen und des Grundbauplans fungiert.

### 1.2.1 Der Spemann Organisator

Ein für die Entwicklungsbiologie wegweisendes Experiment veröffentlichte Hans Spemann zusammen mit Hilde Mangold im Jahre 1924. Dieses Experiment wies nach, dass von allen Geweben der frühen Gastrula eines schon eine Determinierung erfahren hat. Dieses sich autonom entwickelnde Gewebe ist die dorsale Urmundlippe, der Ort, an dem die Zellen während der Gastrulation in das Innere des Embryos invaginieren.

Für ihre Experimente verwendeten Spemann und Mangold unterschiedlich pigmentierte Embryonen zweier Molch-Arten (*Triturus taeniatus* und *Triturus cristatus*). Dies erlaubte ihnen, zwischen transplantiertem Gewebe und Wirtsgewebe zu unterscheiden. Die dorsale Urmundlippe eines dunkel pigmentierten Embryos wurde auf die ventrale Seite (zukünftige Bauchseite) eines zweiten nicht pigmentierten Embryos transplantiert. Das dorsale Urmundlippengewebe begann, gemäß seiner Herkunft, zu invaginieren und verhielt sich demnach autonom. Im weiteren Verlauf der Gastrulation entwickelten sich die transplantierten Zellen autonom zu Chordamesoderm. Auch die umliegenden Wirtszellen wurden durch das Transplantat in ihrem Zellschicksal verändert. Innerhalb des neuen Embryos entstanden Somiten aus dunkel- (Transplantat) und nicht pigmentiertem (Wirts-) Gewebe. Das dorsale Urmundlippengewebe besaß die Fähigkeit, eine zweite vollständige Neuralplatte im Wirtsektoderm zu induzieren. Im Endergebnis entstand ein zweiter Embryo, der über eine sekundären Achse mit dem anderen verwachsen war (siehe Abb. 1).



**Abb. 1 Induktion einer zweiten Körperachse durch das dorsale Urmundlippengewebe.**

(A) Transplantation der dorsalen Urmundlippe (rot) einer frühen Molch-Gastrula auf die ventrale Seite (zukünftige Bauchseite) eines zweiten Gastrula-Embryos.

(B) Das transplantierte Gewebe invaginierte, bildete ein sekundäres Archenteron und induzierte eine zweite embryonale Achse. Transplantierte Zellen (rot) und Wirtszellen trugen zur Bildung der induzierten sekundären Strukturen wie Neuralrohr, Chorda und Somiten bei.

(C) In seltenen Fällen entstand ein vollständiger zweiter Embryo, der wie ein siamesischer Zwilling mit dem Primärembryo verwachsen war. (modifiziert nach Gilbert et al., 2000).

### 1.2.2 Eigenschaften des Organisators

Die Eigenschaften der dorsalen Urmundlippe als Organisator zu funktionieren, können in vier Punkten zusammengefasst werden:

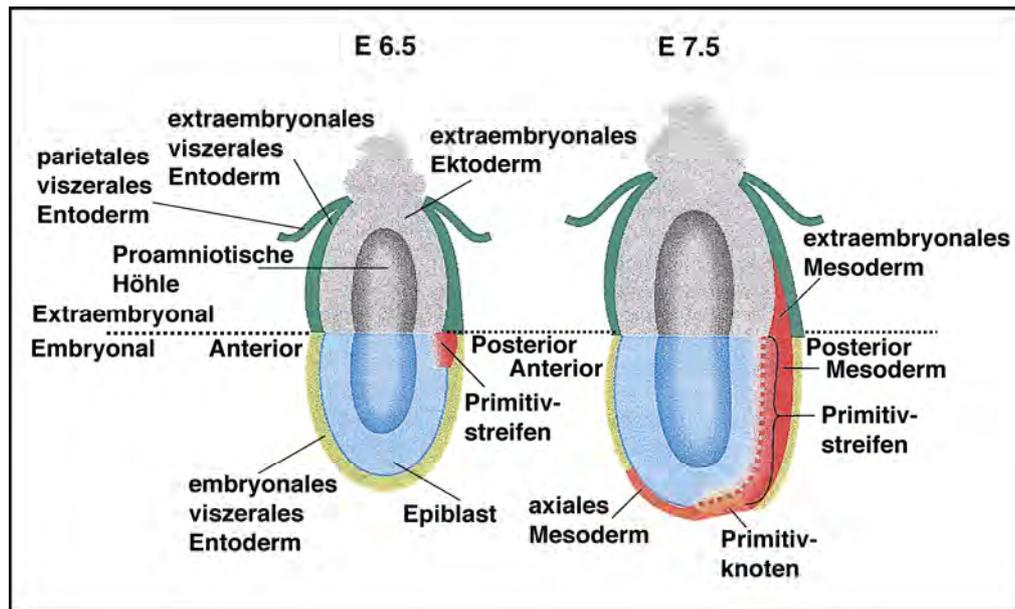
- die Fähigkeit, sich autonom in dorsales Mesoderm (Chorda- und Prächordalplattenmesoderm) zu differenzieren;
- die Fähigkeit, angrenzendes laterales Mesoderm zu dorsalisieren und ihm eine dorso-laterale Identität zu verleihen (Somiten);

- die Fähigkeit, im angrenzenden Ektoderm neurales Gewebe zu induzieren, das sich später durch die Auffaltung der Neuralplatte in die archencephale, deuterencephale und spinocaudale Anteile des Neuralrohrs differenziert;
- die Fähigkeit, Gastrulationsbewegungen zu initiieren.

### 1.3 Gastrulation bei der Maus

Die Vorgänge während der Gastrulation lassen sich relativ einfach an Amphibien-, Fisch- und Vogelembryonen studieren. Aufgrund ihrer Größe, ihrer Robustheit und ihrer Entwicklung außerhalb der Mutter sind sie zugänglich für experimentelle Manipulationen, wie z. B. *in vitro* Kultivierung, Transplantations- und Missexpressionsexperimente. Selbst mikroskopische Zeitlupenaufnahmen der Zellwanderungen lassen sich hier durchführen. Die frühe uterine Implantation und die geringe Größe früher Entwicklungsstadien von Säugetierembryonen erschwert den Einblick in diese frühen Prozesse ihrer Entwicklung. Mittlerweile ist es zwar gelungen, Mausembryonen *in vitro* zu kultivieren, doch ist dies nur über einen relativ kurzen Zeitraum hinweg möglich (Robertson, 1987).

Im Unterschied zu Amphibien besitzt der frühe Mausembryo die Form eines Eizylinders. In Abb. 2 sind Embryonen zu Beginn und am Ende der Gastrulation schematisch dargestellt. Zu diesen Zeitpunkten lässt sich der zweischichtige Mausembryo in einen embryonalen und einen extraembryonalen Anteil gliedern. Die extraembryonale Region bildet später den embryonalen Teil der Plazenta, das Versorgungsgewebe zur Mutter. Der embryonale Bereich besteht aus primitivem Ektoderm (Epiblast) und dem viszeralem Entoderm, welches der Nährstoffversorgung des Epiblasten dient. Nur aus dem Epiblastengewebe werden während der Gastrulation die drei primären Keimblätter des Embryo hervorgehen (Hogan et al. 1994).



**Abb. 2 Gastrulation in der Maus.**

Schematische Darstellung von Maus-Gastrulastadien (Sagittalschnitte); (modifiziert nach Beddington und Robertson, 1998). Der frühe Maus-Embryo besitzt die Form eines Eizylinders. Die extraembryonale Region besteht aus extraembryonalem Ektoderm (grau) und extraembryonalem viszeralem Entoderm (grün). Epiblast (blau) und embryonales viszerales Entoderm (gelb) bilden den embryonalen Anteil des Eizylinders. Der Primitivstreifen entsteht am Tag E6.5 an der Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Gewebe und markiert dabei das zukünftige posteriore Ende des Embryos. Mesenchymale Zellen (zukünftiges Mesoderm) (rot) beginnen, durch die Primitivstreifenregion hindurch zu wandern. Der Primitivstreifen dehnt sich im Verlauf des Gastrulationsprozesses bis zur Eizylinderspitze aus. Der Primitivknoten wird als morphologische Struktur am anterioren Ende des Primitivstreifens sichtbar (E7.5). Aus ihm entsteht das axiale Mesoderm (Chorda und Prächordalplatte).

Die Gastrulation beginnt am Tag 6.5 der embryonalen Entwicklung (E6.5), an der Grenze zum extraembryonalen Ektoderm mit der Entstehung des Primitivstreifens im Epiblasten. Dabei lockert sich die kompakte Epithelschicht des Epiblasten und präsumptive mesenchymale Zellen beginnen, durch diese Region hindurch zu wandern. Diese Zellen bilden nun zwischen Epiblast und viszeralem Entoderm eine neue Zellschicht, das Mesoderm. Einige Zellen interkalieren auch in das viszerale Entoderm und werden hierbei zu Vorläufern des definitiven (Darm-) Entoderms (Hogan et al., 1994).

Das Erscheinen des Primitivstreifens erfolgt am zukünftigen posterioren Ende des Embryos. Während des weiteren Gastrulationsprozesses dehnt sich der Primitivstreifen in anteriorer Richtung bis zur Eizylinderspitze aus (siehe Abb. 2). Somit stellt der Primitivstreifen die erste morphologische Struktur der zukünftigen anterioren-posterioren oder cephalo-caudalen Achse dar. Auch die dorso-ventrale

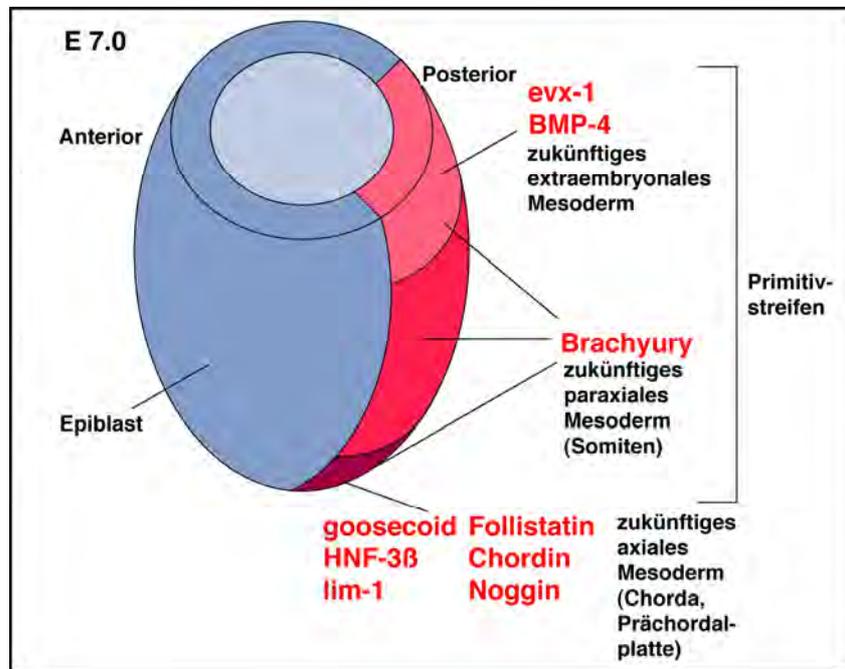
Achse wird sichtbar: die migrierenden Zellen wandern auf der dorsalen Seite des Embryos ein und auf der ventralen Seite wieder aus dem Primitivstreifen heraus. Da die anteriore-posteriore und dorso-ventrale Achse festgelegt sind, lässt sich dem Gastrulaembryo auch eine rechte und eine linke Hälfte zuweisen. Der Primitivstreifen definiert somit die drei Hauptachsen im Embryo (Beddington und Robertson, 1998).

### **1.3.1 Regionalisierung des Mesoderms im Primitivstreifen**

Aus dem während der Gastrulation entstandenen Mesoderm differenzieren sich später zahlreiche Gewebetypen wie beispielsweise Blut, Muskulatur oder Chorda. Allerdings lassen sich diese mesodermalen Zellpopulationen während der Gastrulation morphologisch nicht voneinander unterscheiden. Durch Zellmarkierungsexperimente wurde eine Anlagekarte des frühen Maus-Epiblasten erstellt (Lawson et al., 1991; Lawson und Peterson, 1992). Anhand dieser Anlagekarte konnte die Position, an welcher die mesodermalen Zellen den Primitivstreifen verlassen, mit deren Zellschicksal korreliert werden. Zellen der posterioren Region des Primitivstreifens tragen zur Bildung der extraembryonalen Strukturen wie Allantois, Amnion und Chorion bei. Zellen, die lateral den intermediären Bereich des Streifens verlassen, differenzieren sich in das paraxiale Mesoderm der Somiten und in Seitenplattenmesoderm, wohingegen Zellen aus der anterioren Region des Primitivstreifens das axiale Mesoderm, die Chorda und das Prächordalplattenmesoderm bilden. Damit unterscheidet sich diese Anlagekarte eines Maus-Embryos kaum von Hühnchen, Frosch oder Fisch. Im Verlauf der Evolution der Vertebraten blieben demnach die Lagebeziehungen zwischen den einzelnen zukünftigen Organanlagen erhalten (Beddington und Smith, 1993).

Obwohl die mesodermalen Zellen morphologisch identisch erscheinen, erwerben sie abhängig von der Position (lateral oder cranio-caudal) im Primitivstreifen unterschiedliche Zellschicksale. Diese Regionalisierung des Primitivstreifens lässt sich auf molekularer Ebene schon früh nachweisen. Die mesodermalen Zellen in

den verschiedenen Bereichen zeichnen sich durch unterschiedliche Genaktivitäten aus. Es entsteht ein charakterisches Expressionsmuster, welches die tatsächliche Regionalisierung des Primitivstreifenmesoderms aufzeigt. Dies ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.



### Abb. 3 Die Regionalisierung des Primitivstreifens.

Schematische Darstellung einer Maus-Gastrula am 7. Tag der Embryonalentwicklung (E7.0), wobei der Epiblast blau und der Primitivstreifen rot markiert ist. Extraembryonales Gewebe ist nicht eingezeichnet. Zellen der posterioren Primitivstreifenregion (hellrot) werden zu extraembryonalem Mesoderm, Zellen am anterioren Ende des Primitivstreifens zu axialem Mesoderm (Chorda und Prächordalplatte). Aus der intermediären Region (mittelrot) wird das paraxiale Mesoderm (Somiten und Seitenplatten). Das zukünftige Mesoderm in den verschiedenen Bereichen des Primitivstreifens zeichnet sich durch eine unterschiedliche Genexpression aus. So werden in der posterioren Region u. a. die Gene für den Transkriptionsfaktor *EVX-1* und das Signalmolekül *BMP-4* exprimiert. Die Expression des Gens für den Transkriptionsfaktor *BRACHYURY* markiert als pan-mesodermal exprimiertes Gen das gesamte Primitivstreifenmesoderm. Der anteriore Bereich des Streifens wird durch die Expression der Gene die für die organisatorspezifischen Signalmoleküle *FOLLISTATIN*, *CHORDIN* und *NOGGIN*, sowie der Transkriptionsfaktoren *GOOSECOID*, *HNF-3 $\beta$*  und *LIM-1* kodieren, charakterisiert.

Im Primitivstreifenmesoderm einer sieben Tage alten Maus-Gastrula (E7.0) zeichnet sich z.B. der anteriore Teil durch die Expression der organisatorspezifischen Homöoboxgene *goosecoid* und *lim-1* sowie des Gens für den Transkriptionsfaktor *HNF-3 $\beta$*  (*Hepatic Nuclear Factor-3 $\beta$* ) aus. Zusätzlich sind hier die Gene, die für die organisatorspezifisch sezernierten Signalmoleküle

*FOLLISTATIN*, *CHORDIN* und *NOGGIN* kodieren, exprimiert. Das *Brachyury*-Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der zur Familie der T-Box-Gene gehört, ist im gesamten Primitivstreifen exprimiert. Die posteriore Region des Primitivstreifens wird u. a. charakterisiert durch die Expression der Gene für den Transkriptionsfaktor *EVX-1* und des Signalmoleküls *BMP-4* (Blum et al., 1992; Barnes et al., 1994; Sasaki und Hogan, 1993; Albano et al., 1994; Bachiller et al., 2000; McMahon et al., 1998; Wilkinson et al., 1990; Dush und Martin, 1992; Jones et al., 1991).

### **1.3.2 Der Primitivknoten**

Der Primitivknoten in der Maus stellt das Äquivalent zur dorsalen Urmundlippe im Amphibienembryo dar. Der Primitivknoten ist im 7.5 Tage alten Embryo als Verdickung am cranialen Ende des Primitivstreifens zu erkennen. In diesem Bereich invaginieren Zellen aus dem Epiblasten. Diese mesodermalen Zellen schieben sich zwischen Ektoderm und definitivem Entoderm nach cranial. Dabei vermischen sie sich zunächst mit den Entodermzellen und bilden als mesentodermale Zellschicht die sogenannte Chordaanlage. Einige Zellen der Chordaanlage wandern entlang der Mittellinie noch weiter nach cranial, um dort den mesodermalen Teil der Prächordalplatte zu bilden. (Jurand et al., 1962; Poelman, 1981; Tam et al., 1983). In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen heben sich die mesodermale Chordaanlage- und die Prächordalplattenzellen durch ihre geringe Größe und den Besitz eines einzelnen, motilen Zentralsciliums morphologisch deutlich von den Entodermzellen ab. Die funktionale Bedeutung dieser Cilien ist noch unklar. Eine Rolle bei der Entstehung der links-rechts Asymmetrie wird diskutiert (Afzelius et al., 1995; Nonaka et al., 1998; Chen et al., 1998).

Die Region des Primitivknotens wird nicht wie im restlichen Embryo von viszeralem Entoderm bedeckt. Sie ist eine zweischichtige Struktur, mit einer dorsalen und einer ventralen Zelllage, wobei der dorsale Anteil sich später zur

Grundplatte des Neuralrohrs entwickelt und die ventrale Region zur Chordaanlage bzw. zum Mesoderm der Prächordalplatte differenziert. Damit liegen diese mesodermalen Zellen direkt unter dem zukünftigen Arch- und Deuterenkephalon (Sulik, 1994).

Im Laufe der embryonalen Entwicklung verlängert sich die Chordaanlage durch fortlaufende Invagination von Zellmaterial durch den Primitivknoten nach anterior. Die Struktur des Primitivknotens wandert dabei in caudaler Richtung (Drews, 1993). Vor dem Primitivknoten gliedert sich das paraxiale (neben der Mittellinie gelegene) Mesoderm von cranial nach caudal fortschreitend in die Somiten. Das axiale (in der Mittellinie liegend) Mesoderm löst sich aus dem mesentodermalen Zellverband und bildet die Chorda. Durch konvergierende Ausdehnung verlängert sich dieser Stab aus mesodermalen Zellen entlang der cephalo-caudalen Achse (Jurand et al., 1974; Poelman, 1981; Sausedo und Schoenwolf, 1994; Sulik et al., 1994).

Der Primitivknoten induziert demnach die Differenzierung des axialen Mesoderms (Chorda), welches dann das paraxiale (Somiten) und Seitenplattenmesoderm organisiert (Hogan et al., 1994).

### **1.3.3 Der Primitivknoten besitzt die Eigenschaften des Spemann'schen Organisators**

Transplantations-Experimente, die an die von Spemann und Mangold erinnern, zeigten, dass das Primitivknotengewebe die Eigenschaften des Spemann'schen Organisators besitzt. Wurde die Eizylinderspitze eines frühen Maus-Embryos (E6.7) in das ventrale Blastozoele einer *Xenopus laevis*-Gastrula transplantiert, dann wurden wie beim Spemann-Transplantat zusätzliche anteriore Strukturen wie z.B. Klebdrüsen und Hirnbläschen induziert (Blum et al., 1992).

Die heterotopische Transplantation des Primitivknotens eines Maus-Embryos (E7.5) in die posteriorlaterale Region eines zweiten Maus-Embryo induzierte eine vollständige zweite neurale Achse (Beddington, 1994). Zusätzlich differenzierten sich Zellen des Transplantats autonom zu Chordamesoderm und integrierten in die sekundär gebildeten Strukturen wie Somiten und Neuralrohr.

Somit weist der Primitivknoten bzw. das durch ihn hindurch wandernde Material in der Maus typische Charakteristika eines Organisators auf, nämlich:

- die Fähigkeit, sich autonom in dorsales Mesoderm zu differenzieren;
- die Fähigkeit, angrenzendes Mesoderm zu dorsalisieren und ihm eine dorso-laterale Identität zu verleihen;
- die Fähigkeit, im angrenzenden Ektoderm neurales Gewebe zu induzieren.

#### **1.3.4 Zellbewegungen im Primitivstreifen**

Das letzte Kriterium, das einen Organisator auszeichnet, ist die Fähigkeit, Gastrulationsbewegungen zu initiieren, d. h. das Wanderungsverhalten benachbarter Zellen zu beeinflussen. Koordinierte Zellbewegungen und aktive Migration sind charakteristische Eigenschaften des naszierenden Mesoderms während des Gastrulationsprozesses.

Die Bildung des Primitivstreifens und damit die Mesoderminduktion geht mit einer lokalen Umorganisation des posterioren Epiblastenepithels einher. Die Zellen verlieren dabei ihren epithelialen Charakter und verlassen als mesenchymale Zellen den Primitivstreifen. Das neu entstandene präsumptive Mesoderm dehnt sich lateral zu beiden Seiten des Primitivstreifen aus. Gleichzeitig bewegt sich die mesodermale Zellschicht in anteriore Richtung.

Im Epithelverband sind die Epiblastenzellen polarisiert. Sie sitzen einer Basalmembran auf, die hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und den Glykoproteinen Fibronectin und Laminin aufgebaut ist. Die Zellen sind dicht

gepackt und über zahlreiche interzelluläre Verbindungen, wie Tight Junctions und Desmosomen miteinander verknüpft. Der Beginn des epithelial-mesenchymalen Übergangs wird begleitet vom Verlust der Basalmembran und der Zellpolarität. Die Zellen runden sich ab, bilden lange Zellfortsätze (Filopodien) aus und nehmen eine mesenchymale Identität an (Lawson et al., 1991; Klinowska et al., 1993; Burdsal et al., 1994).

Der Umwandlungsprozess von epithelialen in mesenchymale Zellen geht mit einer veränderten Zell-Zelladhäsion einher. So verlieren die mesenchymalen Zellen die epithelspezifische Genexpression für das calciumabhängige Zelladhäsionsprotein *E-CADHERIN* (Damjanov et al., 1986). Cadherine vermitteln die interzellulären Kontakte von Epithelzellen und sind in den Desmosomen und im Adhäsionsgürtel dieser Zellen lokalisiert. Der cytoplasmatische Anteil dieser Transmembranproteine ist über Anheftungsmoleküle wie etwa Cateninproteine mit dem Aktin des Cytoskeletts verbunden (Alberts et al., 1995). Eine wichtige Rolle von *E-CADHERIN* bei der Umwandlung von Epithelzellen in mesenchymale Zellen während der Gastrulation konnte durch *in vitro* Studien bestätigt werden (Burdsal et al., 1993). Die Experimente beruhten auf der Beobachtung, dass kultivierte Fragmente des Epiblasten und des Primitivstreifens Unterschiede im Zellwanderungsverhalten aufwiesen. Während Zellen des Primitivstreifenexplantats aus dem Gewebe herauswanderten, behielten die Zellen des Epiblastenexplantats ihre typische, dicht gepackte Morphologie bei. Wurden die Epiblastenexplantate allerdings in Anwesenheit von *E-CADHERIN* Antikörper kultiviert, so verloren diese Zellen schnell ihre Zell-Zellkontakte und nahmen die Morphologie von wandernden mesenchymalen Zellen an.

### **1.3.5 Zellmigration im Mesoderm**

Mesodermale Zellen, die den Primitivstreifen verlassen, wandern aktiv. Später wird die weitere Verlagerung der mesodermalen Zellen durch das Nachrücken der kontinuierlich einwandernden Epiblastenzellen in den Primitivstreifen bewirkt.

Wenn das Mesoderm den Epiblasten fast vollständig bedeckt hat, verlangsamen die Zellen ihre Wanderung und stehen im engerem Kontakt zu benachbarten Zellen (Sulik et al., 1994).

Die migrierenden Zellen, die an der vordersten Mesodermfront (*leading edge*) lokalisiert sind, wandern als individuelle Zellen und verändern dabei ständig ihre Zellform. Breite Zellfortsätze (Lamellipodien und Lobopodien) schieben sich über den Epiblasten und ziehen dabei den Zellkern und das übrige Cytoplasma hinter sich her. An der Zelloberfläche entstehen zusätzliche Cytoplasma-Ausläufer (Filopodien). Diese tasten die Umgebung der Zelle ab und bilden Fokalkontakte (Gap Junctions) aus. Die Filopodien werden bei der Wanderung durch lokale Kontraktion und Relaxation von Aktin- und Myosinfilamenten im Cytoplasma ständig neu ausgebildet und wieder eingezogen (Sulik et al., 1994; Alberts et al., 1995).

Elemente des Cytoskeletts spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration von mesodermalen Zellen. Dies konnte durch Experimente im *Xenopus*-Embryo gezeigt werden, wo Substanzen, die spezifisch die Mikrotubuli- und Mikrofilamentstrukturen zerstören, die Zellwanderung während der Gastrulation inhibierten (Nakatsuji, 1979). Auch in der Maus fanden sich Hinweise für die funktionelle Bedeutung des Cytoskeletts. Eine Mutation des *Tropomyosin 4*-Gens führte zu einem gestörten Zellwanderungsverhalten des Mesoderms (Yanagisawa et al., 1981). *TROPOMYOSIN 4* ist ein Intermediärfilament-Protein. Es spielt eine wichtige Rolle im Aufbau des Cytoskeletts und ist im Leitsaum von wandernden Zellen verstärkt lokalisiert (Lees-Miller et al., 1990). Einen weiteren Hinweis auf Veränderungen des Cytoskeletts in mesenchymalen Zellen ist die Expression des *Vimentin*-Gens, das ebenfalls für ein intermediäres Filamentprotein kodiert. Mesenchymale Zellen, die den Primitivstreifen durchwandern, nicht jedoch Epiblastenzellen, zeichnen sich durch Synthese dieses Proteins aus (Jackson et al., 1981; Franke et al., 1983).

Mesenchymale Zellen müssen während ihrer Wanderung zwischen Epiblasten- und Entodermzellen mit den Komponenten der extrazellulären Matrix interagieren. Diese Zell-Substrat-Adhäsion wird über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die sogenannten Integrine, vermittelt. An ihrer cytoplasmatischen Seite sind diese membranständigen Rezeptoren über Anheftungsproteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden. In experimentellen Untersuchungen ließ sich zeigen, dass Epiblastenzellen und mesodermale Zellen, die den Primitivsteifen verlassen, unterschiedliche Substrataffinitäten besitzen. Dafür ist insbesondere die Bindung von mesodermalen Zellen an Laminin, die über das Integrindimer  $\alpha 6 \beta 1$  vermittelt wird, von Bedeutung. Epiblastenzellen zeigten keine Affinität zu diesem Substratmolekül. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch diesen Rezeptor blockieren, konnte das Anheften der mesodermalen Zellen auf Laminin-beschichteten Oberflächen inhibiert werden (Burdsal et al., 1994). Das Glycoprotein Fibronectin ist ebenfalls Bestandteil der extrazellulären Matrix. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen den Oberflächenrezeptor Integrin ( $\alpha 5 \beta 1$ ) oder gegen Fibronectin konnte die Wanderung der mesodermalen Zellen spezifisch unterbunden werden (Boucaut et al., 1992, Nakatsuji und Hashimoto, 1992).

## 1.4 Das Organisatorprinzip

Zum Verständnis des Organisatorphänomens war es wichtig zu klären, wie die transplantierte Urmundlippe und der transplantierte Primitivknoten die Transformation des umliegenden ventralen Wirtsgewebes in Neuralrohr und dorsales Mesoderm (Chorda) bewerkstelligt, d. h. wie dieses Gewebe mit seiner Umgebung kommuniziert. In den letzten Jahren wurden einige zentrale Schritte auf molekularer Ebene aufgedeckt. Überraschenderweise zeigte sich, dass der Organisator seine Aufgabe durch Inhibition von Signalkaskaden erfüllt. So werden die Wachstumsfaktoren *BMP-4* und *WNT8*, die die ventrale Seite determinieren, durch organisatorspezifische sezernierte Signalmoleküle in ihrer Wirkung unterbunden (Smith und Harland, 1992; Sasai et al., 1994; Hemmati-Brivanlou,

1992; 1994; Fainsod et al., 1996; Deißler, 1996; Zimmermann et al., 1996; Piccolo et al., 1996; Glinka et al., 1997; Piccolo et al. 1999).

#### 1.4.1 Die *BMP-4* Interaktion

Das erste in diesem Prozess identifizierte Signalmolekül war *BMP-4* (*Bone morphogenetic protein 4*). Dieses sezernierte Protein gehört zu der TGF (*Transforming growth factor*)-Familie. *BMP-4* ist in der *Xenopus*-Blastula ubiquitär exprimiert (Dale et al., 1992).

Im Frosch ließen zwei Experimente auf eine Wechselwirkung zwischen *BMP-4* und dem Organisator schließen. Erstens inhibierte die Injektion von *BMP-4* mRNA in die Organisator-Region die Bildung von dorsalem Mesoderm, die neurale Induktion und die Gastrulationsbewegungen (Dale et al., 1992; Jones et al., 1992, Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). Zweitens verursachte die Injektion einer DNA-Sequenz die für einen dominant-negativ wirkenden *BMP-4* Rezeptor kodiert, die Bildung einer sekundären Achse. Ein dominant-negativ wirkender Rezeptor konkurriert mit dem Wildtyp-Rezeptor um Ligandenbindung, jedoch ist er durch seine modifizierte intrazelluläre Struktur nicht in der Lage eine Signaltransduktion auszulösen (Graff et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Diese Experimente zeigten, dass eine der Hauptaufgaben des Organisators die Inhibition des *BMP-4* Signalwegs ist, der ventralisierende und anti-neuralisierende Eigenschaften besitzt.

Es ergab sich, dass der *BMP-4* Signaltransduktionsweg durch sezernierte Signalfaktoren des Organisators blockiert wird. Die Proteine *NOGGIN*, *CHORDIN* und *FOLLISTATIN* gehen eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem *BMP-4* Protein ein. Sie interagieren im extrazellulären Raum und verhindern dadurch die Bindung von *BMP-4* an seinen Rezeptor (Smith und Harland, 1992; Sasai et al., 1994; Hemmati-Brivanlou, 1992; 1994; Fainsod et al., 1996; Deißler, 1996; Zimmermann et al., 1996; Piccolo et al., 1996).



dass das *bmp-4*-Gen im posterioren Primitivstreifen und die drei Gene für die organisatorspezifischen Faktoren im Primitivknoten exprimiert werden. Die gezielte Inaktivierung des *bmp-4*-Gens (*knock-out* Mutation) führte zu einem letalen Phänotyp während der Gastrulation. Mutante Embryonen wiesen nur wenige oder keine mesodermalen Zellen auf (Dunn et al., 1997). Die Deletion der Gene, die für die organisatorspezifischen Signalmoleküle *CHORDIN*, *NOGGIN* und *FOLLISTATIN* kodieren, führte jedoch nicht zu einem gestörten Gastrulationsphänotyp (Bachiller et al., 2000 ; McMahon et al., 1998; Matzuk et al., 1995). Doppelt mutante Embryonen des Genotyps *chd<sup>-/-</sup>/Nog<sup>-/-</sup>* zeigten jedoch den Verlust von Vorderhirnstrukturen, Missbildungen der Chorda und der Somiten, sowie Inversionen de Herzsitus, was für eine zumindest partiell redundante Funktion dieser Gene spricht. Die organisatorspezifischen Faktoren *NOGGIN* und *CHORDIN* spielen somit eine wichtige Rolle bei der antero-posterioren, dorso-ventralen und lateralen Musterbildung (Bachiller et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass die Musterbildung im Primitivstreifenmesoderm der Maus einem ähnlichen antagonistischen Mechanismus wie im Frosch unterliegt.

Die Wechselwirkung zwischen Mitgliedern der BMP-Familie und *CHORDIN* ist evolutionär stark konserviert. Auch bei Invertebraten wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* findet sich diese Interaktion. So wird dort ebenfalls die dorso-ventrale Achse durch das antagonistische Wirkprinzip von *DECAPENTAPLEGIC* (*BMP* ) und *SHORT GASTRULATION* (*CHORDIN* ) determiniert (Holley et al., 1995; Schmidt et al., 1995; De Robertis und Sasai, 1996).

#### **1.4.2 Die *WNT8* Interaktion**

Otto Mangold zeigte in einem 1933 publizierten Experiment, dass die dorsale Urmundlippe zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene induktive Potenzen aufweist. Der frühe Organisator kann anteriore Kopfstrukturen wie Vorderhirn induzieren, während der späte Organisator lediglich für die Induktion von Rumpf- und Schwanzstrukturen verantwortlich ist.

Wie erwähnt führte die Überexpression eines dominant-negativen *BMP* Rezeptor-DNA-Konstrukts im Froschembryo zu einer sekundären Achse ohne Kopfstrukturen (Graff et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Es zeigte sich, dass eine weitere antagonistische Interaktion mit Signalmolekülen der *WNT*-Familie nötig ist, um anteriores Neuroektoderm zu bilden. 1993 zeigten Christian und Moon, dass das Protein *XWNT8* eine anti-neuralisierende Funktion besitzt. Dieser sezernierte Wachstums- und Differenzierungsfaktor gehört zu der Familie der *WNT*-Proteine und wird im ventralen Mesoderm des Froschembryos synthetisiert. Auch in diesem Falle sezerniert der Organisator Signalstoffe wie *CERBERUS*, *FRZB* und *DICKKOPF*, die spezifisch die anti-neuralisierende Wirkung von *XWNT8* aufheben (Glinka et al., 1997; Piccolo et al., 1999; Leyns et al., 1997; Wang et al., 1997; Glinka et al. 1998). Es zeigte sich, dass alle drei Moleküle extrazellulär mit *XWNT8* interagieren und somit die Bindung an dessen membranständigen Rezeptor inhibieren können. Die *WNT*-Signaltransduktion in den Zellen wird damit blockiert. Für die Induktion einer vollständigen sekundären Achse mit anterioren Kopfstrukturen und korrekter Musterbildung ist somit das Inhibieren des *WNT*- und des *BMP-4*-Signalwegs nötig (Glinka et al., 1997).

In der Maus konnte ein *CERBERUS* ähnliches Molekül identifiziert werden, das *CERBERUS-LIKE* (*CER-L*) Protein. Das Gen, das für dieses Protein kodiert, ist im anterioren viszeralem Entoderm des Mausembryos exprimiert. Es wird diskutiert, dass dieses entodermale Gewebe ein Signalzentrum für die Induktion von anterioren Kopfstrukturen und für deren korrekte Musterbildung darstellt, das in seiner Funktion den mesentodermalen Zellen im Froschembryo entspricht (Belo et al., 1997).

## 1.5 Der Transkriptionsfaktor *GOOSECOID* reguliert ein organisatorspezifisches Genprogramm

Als erstes organisatorspezifisches Gen, wurde *gooseoid*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, aus der dorsalen Urmundlippe in *Xenopus leavis* kloniert (Blumberg et al. 1991). Die Expressionsdomäne des *gooseoid*-Gens korreliert mit der Position der dorsalen Urmundlippe, dem Organisator, im *Xenopus* Gastrula-Embryo (Blumberg et al., 1991; Cho et al., 1991).

Eine gezielte Expression von *gooseoid* an uncharakteristischer Position im *Xenopus*-Embryo löste ein genetisches Programm aus, wie Induktionsereignisse und Zellwanderung, das dem Organisatorphänomen von Spemann und Mangold entsprach.

Eine ektoische Translation von *GOOSECOID* durch Mikroinjektion von *gooseoid* mRNA in die ventrale Seite eines *Xenopus*-Embryos, in der das *gooseoid*-Gen endogen nicht exprimiert wird, führte zur Induktion einer sekundären Körperachse, in den meisten Fällen allerdings ohne vollständige Kopfstrukturen (Cho et al., 1991). Damit verhielten sich die *gooseoid* mRNA injizierten Zellen wie die transplantierten Zellen der dorsalen Urmundlippe im Experiment von Spemann und Mangold. Die ektoische Synthese von *GOOSECOID* verlieh den Zellen somit die Fähigkeit, die Rolle eines Organisators zu übernehmen.

Die Fähigkeit, das Schicksal mesodermaler Zellen zu beeinflussen, d. h. ihnen eine dorsale Identität zu verleihen (Dorsalisierung), stellt eine organisatorspezifische Eigenschaft dar. Ein weiterer experimenteller Ansatz bewies, dass *GOOSECOID* dazu in der Lage ist. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an *gooseoid* mRNA in Zellen der ventralen Randzone eines frühen *Xenopus*-Embryo injiziert. Anschließend wurden diese Gewebe herausgeschnitten und kultiviert. Die Analyse dieser Explantate bewies die Bildung von dorsalem Mesoderm. Der Grad der Dorsalisierung war dabei abhängig von der eingesetzten Menge an *gooseoid* mRNA (Niehrs et al., 1994).

In einem ähnlichen Experiment wurde die *gooseoid* mRNA zusammen mit einem Farbstoff in die ventrale Seite einer *Xenopus*-Blastula injiziert (Niehrs et al., 1993). Dies erlaubte das Detektieren der injizierten Zellen im späteren Embryo. Die *gooseoid* mRNA injizierten Zellen differenzierten sich in dorsale mesodermale Gewebe und rekrutierten dabei benachbarte ventrale Wirtszellen in eine zweite Achse. Somit verfügten die ektopisch *GOOSECOID* synthetisierenden Zellen über die organisatorspezifischen Eigenschaften, autonom dorsales Mesoderm zu bilden und den angrenzenden mesodermalen Zellen eine dorsale Identität zu verleihen. Die injizierten und markierten Zellen fanden sich ausschließlich im anterioren Mesoderm dieser zweiten Achse. In der Hauptachse und in der induzierten Achse wurden keine markierten Zellen gefunden. Dieser Befund legte eine durch *GOOSECOID* veränderte Zellmigration während der Gastrulation nahe.

Ein weiteres Experiment zeigte, dass Zellen die ektopisch *gooseoid* mRNA translatierten, tatsächlich über die organisatorspezifische Eigenschaft, die Initiation von Gastrulationsbewegungen auszulösen, verfügen. Hierzu wurde entweder *gooseoid* mRNA oder eine mutierte *gooseoid* mRNA, in der die Homöobox-Sequenz und damit die DNA-Bindedomäne fehlte, in ventrale Zellen eines frühen *Xenopus*-Embryos injiziert. Mit Hilfe von zeitlupenmikroskopischen Aufnahmen konnte das Zellwanderungsverhalten dieser injizierten Zellen beobachtet werden. Wie erwartet induzierten nur die *gooseoid* mRNA-injizierten Zellen eine zweite Urmundlippe, durch die sie dann allerdings schneller ins Innere des Embryos wanderten als die Wirtszellen an der dorsalen oder primären Urmundlippe. Diese rasche Invagination der *gooseoid* mRNA-injizierten Zellen könnte die Ursache für ihre anteriore Position im Mesoderm der induzierten Achse sein (Niehrs et al., 1993).

Das vierte Kriterium, das den Organisator auszeichnet, die Eigenschaft im Ektoderm neurales Gewebe zu induzieren, konnte *GOOSECOID* ebenfalls erfüllen. Blitz und Cho (1995) zeigten in ihren Experimenten, dass *GOOSECOID* die Genexpression des Transkriptionsfaktors *XOTX2* aktiviert. Dieses

Homöoboxgen spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung von Gehirnstrukturen, anteriorem Mesoderm und Ektoderm.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Missexpression des Gens für den Transkriptionsfaktor *GOOSECOID* den mesodermalen Zellen organisatorspezifische Fähigkeiten verlieh. Diese Zellen verfügten durch *GOOSECOID* über das Potenzial

- sich autonom in dorsales Mesoderm zu differenzieren;
- angrenzendes Mesoderm zu dorsalisieren und ihm eine laterale Identität zu verleihen;
- im angrenzenden Ektoderm neurales Gewebe zu induzieren;
- das Zellwanderungsverhalten zu beeinflussen bzw. Gastrulationsbewegungen auszulösen.

*GOOSECOID* fungiert somit als ein Effektor des Organisators im Frosch-Embryo. Unklar blieb, ob *GOOSECOID* auch im Säugetierorganismus diese Rolle zugewiesen werden kann.

## **1.6 Expression des *gooseoid*-Gens in der Maus**

*GOOSECOID* konnte in allen bisher untersuchten Wirbeltierorganismen identifiziert werden (Blumberg et al., 1991; Blum et al., 1992; Izpisua-Belmonte et al., 1993; Stachel et al., 1993; Blum et al., 1994). *In situ* Hybridisierungen am Ganzpräparat konnten die Expression des *gooseoid*-Gens im frühen Maus Embryo detektieren. Im 6.4 Tage alten Embryo ist das *gooseoid*-Gen in der Epiblastenregion des entstehenden Primitivstreifens exprimiert. Während sich der Primitivstreifen zur Eizylinderspitze hin verlängert, sind *gooseoid* mRNA Transkripte ausschließlich im anterioren Anteil des Primitivstreifens lokalisiert. Zum Zeitpunkt, wenn sich das Primitivstreifenmesoderm zu seiner vollen Länge ausgedehnt hat, markieren die das *gooseoid*-Gen exprimierenden Zellen den

Primitivknoten. Diese *gooseoid* mRNA positiven mesodermalen Zellen beginnen nach anterior zu wandern, um dort das Prächordalplattenmesoderm im 8.5 Tage alten Embryo zu bilden. Kurze Zeit darauf können im 8.75 Tage alten Embryo *gooseoid* mRNA Transkripte im ventralen Neuroepithelium und im Entoderm des Vorderdarms detektiert werden. Somit ist *GOOSECOID* zu diesem Zeitpunkt in allen drei Keimblättern präsent (Belo et al., 1998; Filosa et al., 1997). Später, ab ca. E10.5, ist das Gen *gooseoid* in einer Reihe von Geweben, die der Neuralleiste entstammen, in den Extremitätenanlagen und in der ventralen Körperwand exprimiert (Gaunt et al., 1993).

Die Potenz von *GOOSECOID*, neurales Gewebe zu induzieren, konnte in einem Transplantationsexperiment gezeigt werden. In einer heterotopischen Transplantation wurde die Primitivknotenregion einer Maus-Gastrula in die *Area opaca* eines frühen Hühnchen-Embryo transplantiert. Dieser periphere Bereich in der Hühnchen-Gastrula ist kompetent für neurale Induktoren. Das Primitivknotengewebe entstammte entweder Wildtyp Embryonen oder aus Embryonen, in denen das Gen des organisatorspezifischen Transkriptionsfaktors *gooseoid* deletiert war. Transplantierte Primitivknoten, die das *gooseoid* Gen exprimierten, konnten im Hühnchen neurales Gewebe induzieren. Primitivknoten, in denen *GOOSECOID* fehlte, hatten jedoch ihre neural induzierende Eigenschaft verloren (Zhu et al. 1999).

## **1.7 *gooseoid* knock-out Mutation der Maus**

Zwei unabhängige Arbeitsgruppen stellten mutante Mauslinien her, in denen das *gooseoid*-Gen deletiert war (Rivera-Perez et al., 1995; Yamada et al., 1995). Diese Mäuse zeigten nicht den erwartenden gestörten Gastrulationsphänotyp, sondern wiesen kraniofaziale Defekte, Rippen-, Hüft- und Schulter-Anomalien auf, die mit der *gooseoid*-Gen Expression während der Embryogenese nach E10.5 korrelieren. Die Tiere starben kurz nach der Geburt. Damit musste ein Kompensationsmechanismus für den Verlust des *gooseoid*-Gens angenommen

werden. Ein zu *gooseoid* verwandtes Gen mit einer während der Gastrulation überlappenden Expression könnte das Fehlen eines frühen gestörten Phänotyps in der *gooseoid knock-out* Mutante erklären. Das *gooseoid-like*-Gen in der Maus stellt nicht diesen kompensierenden Faktor in der *gooseoid knock-out* Mutante dar (Galili et al., 1997; Schweickert, 1999). Die Deletion des *gooseoid-like*-Gens in Mäusen führte zu keinerlei phänotypischen Defekten, weder während der Gastrulation noch während der späteren Embryogenese (Staint-Jore et al., 1998; Wakamiya et al., 1998). Doppelt mutante Mäuse, in denen die Gene *gooseoid* und *gooseoid-like* deletiert wurde, waren phänotypisch nicht von den der *gooseoid knock-out* Mutante zu unterscheiden (Wakamiya et al., 1998). Ein weiteres *gooseoid* verwandtes Gen, das *cgsx*-Gen wurde im Hühnchen identifiziert (Lemaire et al., 1997). Aufgrund von Sequenz- und Expressionsanalysen stellt das *cgsx*-Gen einen guten Kandidaten dar, für den gesuchten kompensierenden Faktor in der *gooseoid knock-out* Mutante zu kodieren. Bislang konnte allerdings kein zu *cgsx* homologes Gen in der Maus kloniert werden.

Eine genauere Analyse der *gooseoid knock-out* Mäuse zeigte eine abnormale Entwicklung des Chondrokraniums dieser Tiere. Die Schädelbasisknochen Ethmoid und Praesphenoid, waren zu einer einzelnen Struktur verschmolzen (Belo et al., 1998). Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da sich das Chondrokranium in enger Nachbarschaft mit dem prächordalen Mesoderm entwickelt (Kuratani et al., 1997).

## **1.8 Ziel der Arbeit: Analyse der Regionalisierung durch eine Missexpression des *gooseoid*-Gens in der Maus**

In der vorliegenden Arbeit sollte das *gooseoid*-Gen in der Maus während der Gastrulation im Primitivstreifenmesoderm missexprimiert werden. Hierzu wurden transgene Mäuse hergestellt, die das Gen *gooseoid* konditional unter der Kontrolle des *Brachyury*-Promotors exprimierten. Die transgenen Embryonen sollten zusätzlich zu der endogenen eine ektopische *gooseoid*-Gen

Expressiondomäne im gesamten Primitivstreifen aufweisen. Falls *GOOSECOID* auch im Säugetierorganismus über die Fähigkeit verfügt, Zellschicksale zu beeinflussen, könnte dies in den mesodermalen Zellen des Primitivstreifens zu einem veränderten Zellwanderungsverhalten führen.

### **1.8.1 Ein Promotorelement des *Brachyury*-Gens kontrolliert die Missexpression des *goosecoïd*-Gens in der Maus**

Zur Missexpression des *goosecoïd*-Gens im Primitivstreifenmesoderm während der Gastrulation im Mausembryo wurde ein Kontrollelement des *Brachyury*-Gens verwendet. Das Gen *Brachyury* gehört zur Familie der T-Box Gene und kodiert für einen Transkriptionsfaktor (Wilkinson et al., 1990; Kispert und Herrmann, 1993). Das *Brachyury*-Gen ist während der Gastrulation im Gegensatz zum *goosecoïd*-Gen im gesamten Primitivstreifen, Primitivknoten und in der Chorda exprimiert (Wilkinson et al., 1990; Herrmann, 1991). Somit ist *BRACHYURY* in allen mesodermalen Zellen des Embryos präsent und wird daher auch als pan-mesodermaler Marker bezeichnet.

Für die Expression ist ein Fragment in der 5' Region des Gens verantwortlich. Diese Sequenz schließt 500 Basenpaare vor bzw. 150 Basenpaare nach dem Transkriptionsstart ein. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment für die Expression eines LacZ-Reportergens im gesamten Primitivstreifenmesoderm verantwortlich ist. Es wird daher auch als Primitivstreifen-Enhancerelement bezeichnet (Clements et al., 1996). Für die Expression in der Chorda sind vermutlich zusätzliche Sequenzelemente in der Promotorregion verantwortlich, die nicht in diesen 650 Basenpaaren enthalten sind.

### **1.8.2 Experimentelles System zur Missexpression des *goosecoïd*-Gens in der Maus: Transgene Mäuse**

Experimentelle Manipulationen, wie sie in den Modellorganismen *Xenopus*, Hühnchen oder Zebrafisch möglich sind, können am Säugetierembryo nicht so

leicht durchgeführt werden. Um die Funktion eines Gens während der embryonalen Entwicklung zu untersuchen, war man daher lange Zeit auf spontane oder durch Mutagene bzw. ionisierende Strahlung induzierte Mutanten angewiesen. Nachdem es gelang, *in vitro* Kulturbedingungen für die Präimplantationsphase der Maus zu entwickeln, ließ sich die frühe Embryonalentwicklung, angefangen von der meiotischen Reifung von Eizellen über die Befruchtung bis hin zur Ausbildung einer Blastozyste vollkommen außerhalb des Körpers der Mutter nachvollziehen. Die *in vitro* kultivierten Embryonen können später wieder in Ammenmütter zurücktransferiert werden. Diese *in vitro* Kultur bildete die Basis für die Entwicklung der Techniken des Gentransfers (transgene Mäuse); (Hogan et al., 1986).

Transgene Mäuse sind in den letzten zehn Jahren zu einer Technik geworden, die in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung immer mehr an Bedeutung gewonnen hat (Palmiter und Brinster, 1986). Durch die Modifikation des Mausgenoms können gezielt Mutanten hergestellt werden, an denen sich biologische Prozesse studieren lassen. Aus der Etablierung von Tiermodellen ergeben sich neue Erkenntnisse der biologischen Grundlagenforschung. Darüber hinaus lassen sich auch menschliche Krankheiten, nicht zuletzt Krebs, sowie mögliche neue Therapieansätze an genmanipulierten Mäusen erforschen. In der frühen embryonalen Entwicklung unterscheiden sich Maus und Mensch kaum. Prinzipielle Mechanismen wie z.B. Gastrulation und Neurulation sollten daher weitgehend vergleichbar sein (Rugh, 1990).

Das Mausgenom kann durch das Einbringen von fremder bzw. zusätzlicher genetischer Information, wie z.B. der zufälligen Integration von DNA, experimentell verändert werden, wodurch sich transgene Mäuse herstellen lassen. Die von außen eingebrachte DNA wird stabil an zufälliger oder durch homologe Rekombination an gezielter Position in das Mausgenom integriert, so dass die veränderte Erbinformation an die nächsten Generationen weitergegeben wird.

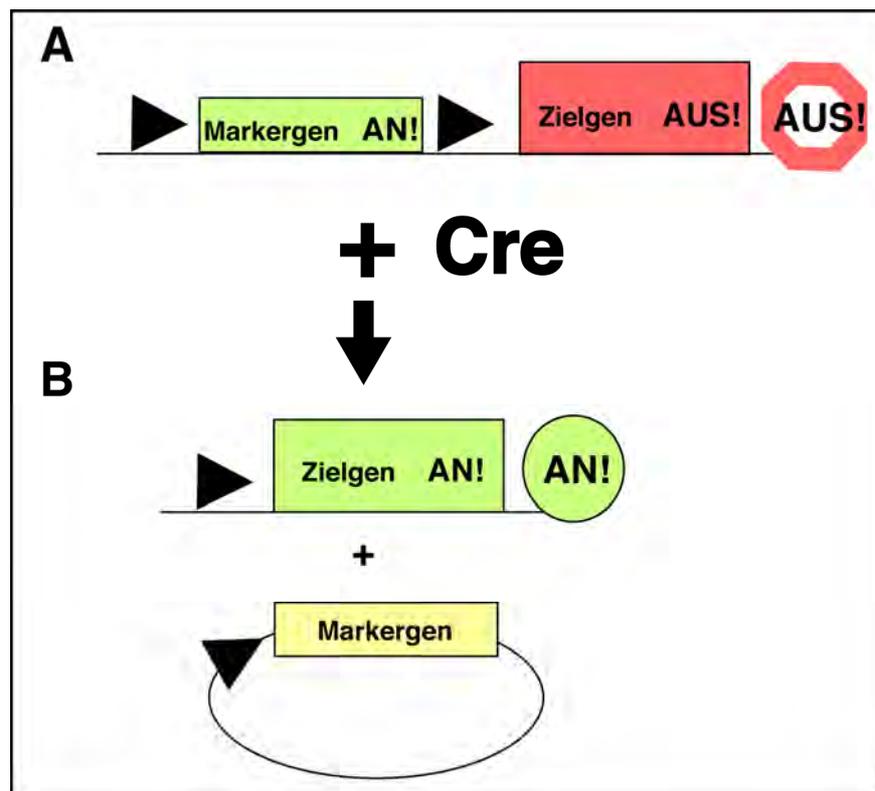
Zur Herstellung von transgenen Mäusen wurden verschiedene Techniken entwickelt. Neben den direkten Eingriffen wie DNA-Mikroinjektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle oder durch retrovirale Infektion von Präimplantations-Embryonen, kann das Mausgenom auch durch Mutagenese embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) verändert werden (Palmiter und Brinster, 1986; Soriano et al., 1986; Thomas und Capecchi, 1987). Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste stammen (Robertson, 1987). Sie lassen sich *in vitro* kultivieren und durch Elektroporation oder Transfektion von DNA genetisch verändern. Nach Injektion in einen Blastozysten-Embryo sind die transgenen ES-Zellen in der Lage, sich wieder in einen Embryo zu integrieren (Robertson, 1987). Die injizierten Blastozysten werden in scheinchwangere Ammen transplantiert und ausgetragen. Die sich daraus entwickelnden Mäuse bestehen demnach aus einer Mischung aus ES- und Wirtszellen, die Chimären genannt werden. Integrieren die ES-Zellen in die Keimzellen dieser chimären Tiere, so lassen sich durch Kreuzen Nachkommen erzeugen, die genetisch zu hundert Prozent von den ES-Zellen abstammen. Die embryonalen Stammzellen bieten den großen Vorteil, dass man in ihnen die genetischen Veränderungen *in vitro* analysieren kann. Nur diejenigen ES-Zellklone, die die gewünschten Eigenschaften besitzen, werden anschliessend zur Herstellung der transgenen Maus verwendet.

Um die Funktion eines Gens zu studieren bieten sich zwei Möglichkeiten an. Die Herstellung von Mausmutanten, in denen ein Gen gezielt ausgeschaltet wird, auch Funktionsverlust-Mutation (*loss-of-function*) oder *knock-out* Mutation genannt. Eine andere Variante, stellt die sogenannte Funktionszugewinn-Mutante (*gain-of-function*) dar. Hier werden durch Expression eines in seiner Sequenz veränderten Gens oder durch die zeitliche, räumliche oder mengenmäßige Missexpression eines Gens transgene Mäuse hergestellt (Bradley, 1991; Capecchi, 1989; Gossler et al., 1989; Koller und Smithies, 1992; Rossant und Nagy, 1995).

### 1.8.3 Missexpression des *gooseoid*-Gens in der Maus durch konditionale Mutagenese

Zur Missexpression des *gooseoid*-Gens im gesamten Primitivstreifenmesoderm der Maus wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ein konditionales Mutagenese-Experiment durchgeführt.

Die Missexpression oder die gezielte Ausschaltung eines Gens führt oft zu letalen Missbildungen während der embryonalen Entwicklung der transgenen Tiere. Dadurch ist es weder möglich die Funktion eines Gens im adulten Tier zu untersuchen, noch ist es möglich, diese transgene Mauslinie zu züchten. Dieser Nachteil lässt sich durch eine konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Systems umgehen (Sternberg und Hamilton, 1981; Hamilton und Abremski, 1984; Hoess und Abremski, 1984; Rajewsky et al., 1996).



**Abb. 5 Konditionale Aktivierung des Zielgens durch die Cre-Rekombinase.**

(A) Transgenes Zielgenkonstrukt vor der Cre-vermittelten Rekombination. Das von zwei spezifischen Cre-Erkennungssequenzen (loxP; Dreiecke) flankierte Markergen (grün) wird exprimiert (AN!). Das nachgeschaltete Zielgen (rot) wird dadurch an seiner Ausprägung gehindert (AUS!).

(B) Transgenes Zielgenkonstrukt nach der Cre-vermittelten Rekombination. Die Rekombinase schneidet das zwischen den beiden loxP-Elementen liegende Markergen als zirkuläres Molekül aus dem Zielgenkonstrukt. Ein intaktes loxP-Element bleibt auf jedem der Rekombinationsprodukte erhalten. Das Zielgen wird exprimiert (AN!).

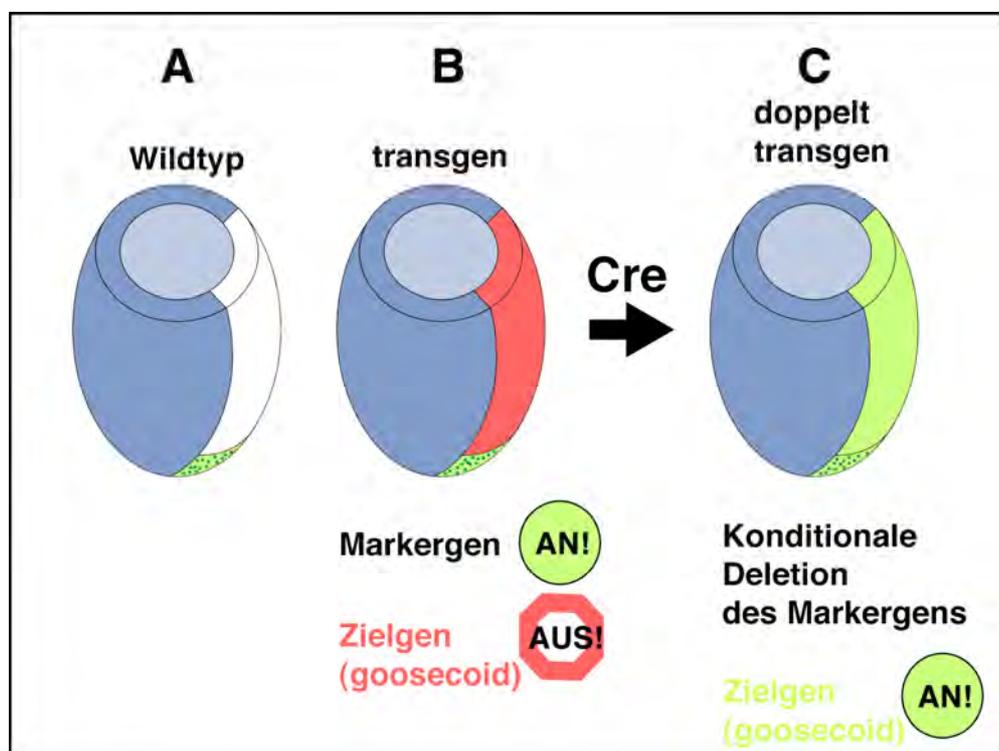
Das *CRE* (*causes recombination*)-Protein ist ein Enzym des Bakteriophagen P1. Diese Rekombinase schneidet spezifisch DNA-Sequenzen heraus, welche von zwei gleich orientierten *CRE*-Erkennungsstellen flankiert werden. Diese Erkennungsstellen werden als loxP- (*locus of crossover in P1*) Elemente bezeichnet (Sauer und Henderson, 1988). Neben dem Cre/loxP-System existiert noch eine zweite Variante der sequenzspezifischen Rekombination, das Flp/FRT-System aus der Hefe. Allerdings hat sich die *CRE*-Rekombinase als wesentlich effizienter im Säugetiersystem erwiesen (Buchholz et al., 1996; Rossant und McMahon, 1999).

Der erste Schritt ist die Herstellung einer transgenen Maus, in der das Zielgen in einer inaktiven Form im Genom integriert vorliegt. Das Zielgen wird durch eine loxP-flankierte Markergen-Sequenz an seiner Expression gehindert (Abb. 5A). Diese Mauslinie wird in einem zweiten Schritt mit einer anderen transgenen Linie, die die *CRE*-Rekombinase unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors gewebespezifisch exprimiert, gekreuzt. Damit wird in den Nachkommen die inaktivierende Sequenz durch das Enzym entfernt, und das Transgen kommt zu seiner Ausprägung (Abb. 5B). Mit dieser Methode kann man in definierten und gut charakterisierten transgenen Mauslinien die Funktion eines Gens zu verschiedenen Zeitpunkten während der embryonalen Entwicklung unter molekularen Aspekten zell- bzw. gewebespezifisch untersuchen (Torres und Kühn, 1997).

## 1.9 Arbeitshypothese - spezifische Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Vorgang der regionalen Spezifizierung des Primitivstreifens in der Maus auf molekularer und embryonaler Ebene zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurde eine transgene Maus hergestellt, die das organisatorspezifische Gen *goosecoid* konditional unter der Kontrolle des *Brachyury*-Promotors im gesamten Primitivstreifenmesoderm missexprimiert. Das Prinzip des Experiments ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Die Fehlsteuerung des Transkriptionsfaktors *GOOSECOID*, der zusätzlich zu seiner normalen Ausprägung am anterioren Ende konditional im gesamten Primitivstreifen aktiviert wurde, sollte sich in einer gravierenden Störung der normalen Genprogramme äußern, und damit zur Klärung der Frage dienen, wie die regionenspezifischen Genprogramme im Primitivstreifenmesoderm entstehen und funktionieren.



**Abb. 6 Konditionale Missexpression des *gooseoid*-Gens im gesamten Primitivstreifen.**

(A) Expression des endogenen *gooseoid*-Gens (gepunktet) im anterioren Primitivstreifen einer Maus-Gastrula (Wildtyp).

(B) Expression des Markergens (AN!) unter der Kontrolle des *Brachyury*-Gen-Promotors im gesamten Primitivstreifen eines transgenen Maus-Embryos. Das Zielgen kommt dadurch nicht zu seiner Ausprägung (AUS!).

(C) Konditionale Deletion des Markergens nach Verpaarung mit einer Cre produzierenden transgenen Mauslinie. Expression des Zielgens bzw. des transgenen *gooseoid*-Gens (AN!) unter der Kontrolle des *Brachyury*-Gen-Promotors im gesamten Primitivstreifen eines doppelt transgenen Maus-Embryos.

Der Modellorganismus Maus wurde gewählt, da

- sich in diesem System, im Gegensatz zu anderen Modellsystemen, gezielt gewebespezifisch Gene missexprimieren lassen;
- sich Linien aus genetisch identischen Tieren etablieren lassen;
- die Maus als das Säugetiermodell gilt, das Rückschlüsse auf die menschliche Entwicklung erlauben sollte.

Die Auswirkungen dieses experimentellen Eingriffs in das Mausgenom sollten in einer phänotypische Analyse, unter morphologischen und molekularen Aspekten, während der embryonalen Entwicklung untersucht werden.

Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Führt die Missexpression des *gooseoid*-Gens im gesamten Primitivstreifen zur Aktivierung oder Repression anderer Gene?
- Welche phänotypische Veränderungen resultieren aus diesem Eingriff in das normale genetische Programm?

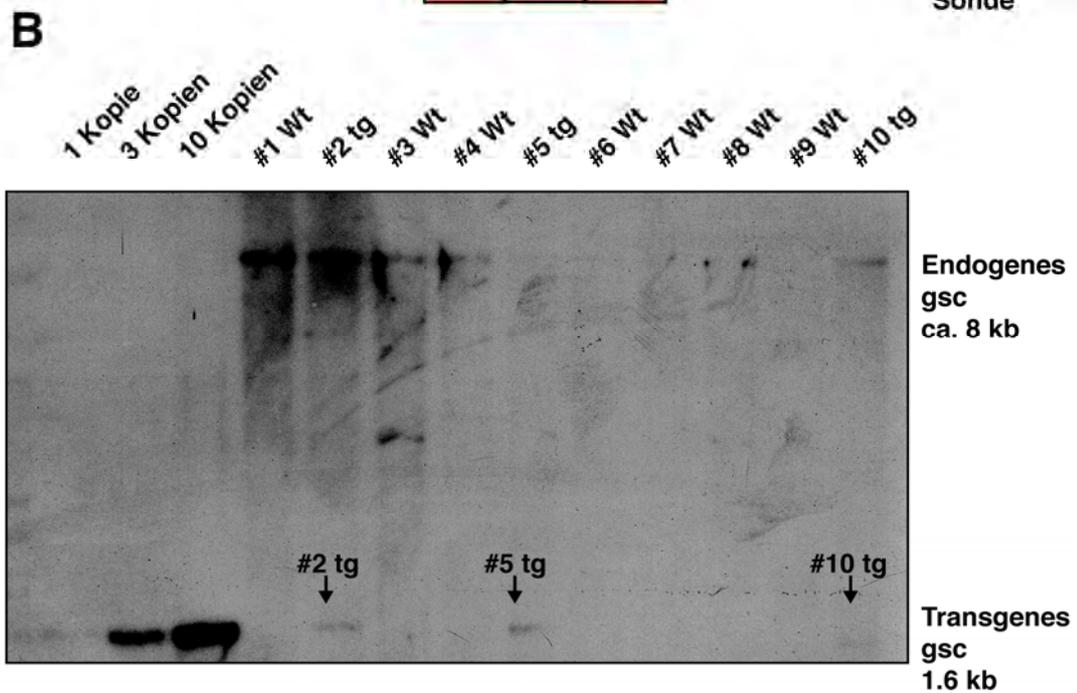
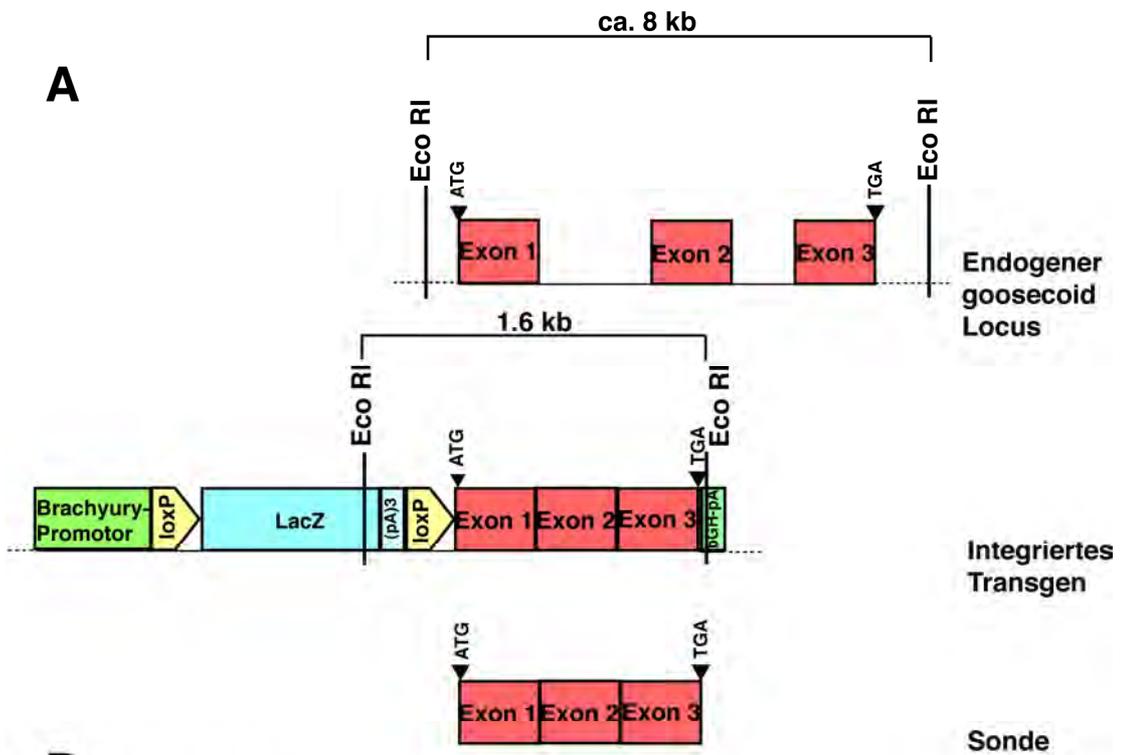
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung und Expression des Transgenkonstrukts

Zur Herstellung transgener Zellklone wurde das Transgenkonstrukt (pTgsc) in die embryonale Stammzelllinie (E14.1) transfiziert. Durch Ko-Transfektion wurde gleichzeitig ein Selektionsmarkerplasmid in die Zellen eingebracht. Dies erlaubte die Selektion mit einem Aminoglykosid-Antibiotikum (G418). Anschließend wurden die Zellen auf primären embryonalen Fibroblasten ausgesät und in Gegenwart von LIF (*leukemia inhibitory factor*) kultiviert. Es wurden 264 Klone isoliert, expandiert und genomische DNA isoliert. Durch Southern Blot Analyse konnten 5 Klone identifiziert werden, die neben dem endogenen *goosecoid*-Gen das transgene *goosecoid*-Fragment enthielten und somit das Transgenkonstrukt stabil in das Genom integriert hatten (nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass diese ES-Zellklone nicht keimbahngängig waren, d. h. die ES-Zellen hatten in den chimären Mäusen nicht zu den Keimzellen beitragen und somit wurde das Transgen nicht an Nachkommen dieser Tiere weitervererbt.

Ein zweiter Anlauf erfolgte mit einer anderen ES-Zelllinie (KPA, einem Subklon der E14.1 Linie), die zuvor in Kontrollexperimenten 100%ig keimbahngängig waren. Nach Ko-Transfektion, Selektion und Southern Blot Analyse von 100 Einzelklonen konnten insgesamt vier transgene Klone identifiziert werden (Abb. 10). Danach sind Zellklon #2, #5 und #10 transgen (vierter Klon nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Anzahl der integrierten Genkopien wurde parallel das transfizierte Transgenkonstrukt in Mengen, die einer, drei und zehn Kopien entsprechen, aufgetragen. Alle drei transgene Zellklone wiesen die Integration von nur einer Genkopie auf. Einzelintegration von Transgenkonstrukten sind wichtig, da multiple Transgenkopien nach *CRE*-vermittelte Rekombination zum Verlust ganzer Chromosomen führen kann. Dieses Phänomen, welches als RAD (*recombination*

*associated death*) bezeichnet wird, führt in den meisten Fällen zum Tod der transgenen Tiere (Dr. Gail Martin (San Fransisco), persönliche Mitteilung).



**Abb. 7 Charakterisierung von ES-Zellklonen, die das Transgenkonstrukt stabil exprimierten.**

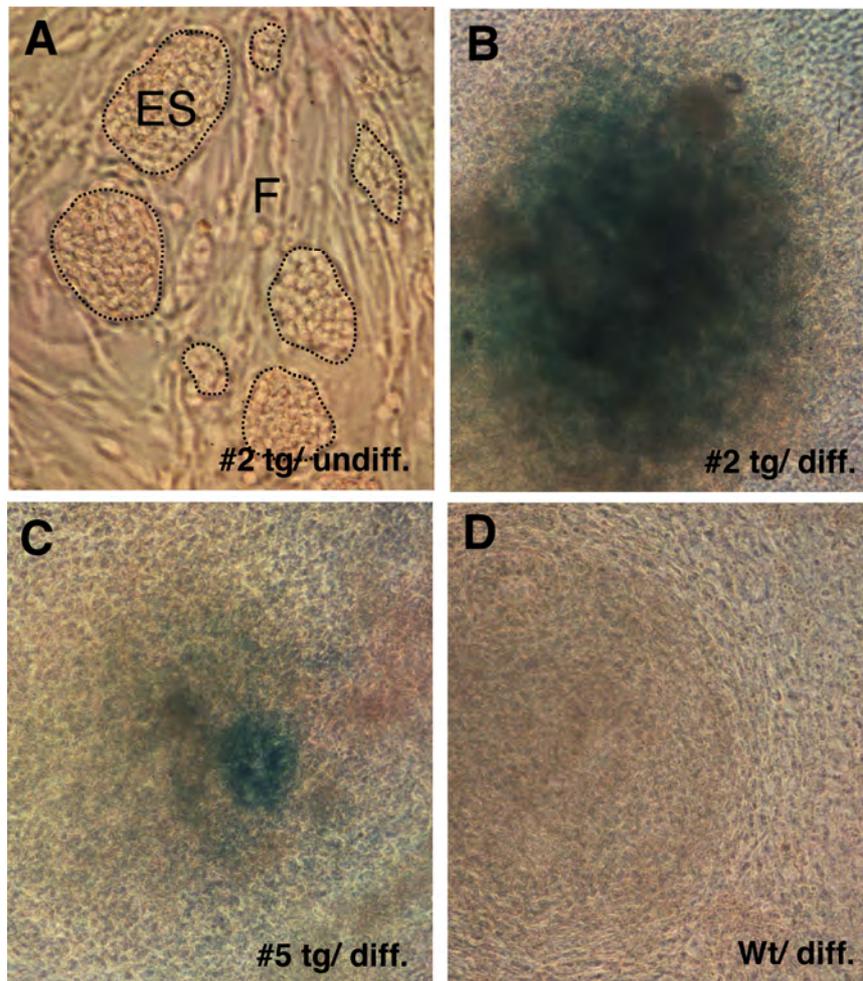
Southern Blot Analyse zur Bestimmung der Anzahl der integrierten Genkopien.

(A) Schematische Darstellung der DNA-Fragmente in der endogenen bzw. in der transgenen Situation. Nach Restriktionsverdau mit EcoRI ergab der endogene *gooseoid* Locus ein ca. 8 kb Fragment und das integrierte Transgen ein 1.6 kb Fragment.

(B) Genomische DNA (10 µg) von zehn unabhängigen Zellklonen wurde nach EcoRI Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Quantifizierung wurde parallel das transfizierte Transgenkonstrukt in Mengen verwendet, die einer, drei und zehn Genkopien entsprechen. Die Membran wurde mit radioaktiv markierter *gooseoid*-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Zellklone #2, #5 und #10 zeigten neben einem Signal für das endogene (ca. 8 kb) auch das für das transgene *gooseoid* (1.6 kb).

ATG= Startcodon; TGA= Stopcodon; tg= transgen; Wt= Wildtyp; kb= Kilobasen.

Zur weiteren Charakterisierung der positiven ES-Zellklone wurde überprüft, ob sich das Transgen in Zellkultur spezifisch aktivieren läßt. Dazu wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität des LacZ-Markergens bestimmt. In undifferenziertem Zustand exprimieren ES-Zellen das *Brachyury*-Gen nicht (Johansson und Wiles, 1995). Erwartungsgemäß zeigten die undifferenzierten transgenen ES-Klone ebenfalls keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Abb. 8A). Nach mesodermaler Differenzierung exprimieren ES-Zellen das endogene *Brachyury*-Gen (Johansson und Wiles, 1995). Um eine mesodermale Differenzierung zu erzielen, wurden jeweils ca. 100 Zellen der einzelnen transgenen Zellklone in hängenden Mediumtröpfchen (sogenannte *hanging drops*) an der Unterseite des Deckels einer Petrischale in Gegenwart von 1% Dimethylsulfoxid (DMSO) für 48 Stunden aggregiert. Die Aggregate wurden gesammelt, und danach auf Bakterienplatten für weitere 48 h in Gegenwart von 1% (DMSO) kultiviert. Die Aggregate wurden anschließend auf gelatinisierten Zellkulturschalen ausplattiert und für weitere drei Tage ohne DMSO kultiviert (Wobus, 1994). Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde mit dem Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) untersucht, das eine Blaufärbung ergab. In Abb. 8 ist ein solches Experiment dargestellt.



**Abb. 8 Charakterisierung der Transgen-Aktivität in ES-Zellklonen nach mesodermaler Differenzierung *in vitro*.**

Transgene ES-Zellklone wurden nach mesodermaler Differenzierung auf  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität untersucht. Der transgene *Brachyury*-Promotor ist in undifferenzierten ES-Zellen nicht aktiv, kann aber durch mesodermale Differenzierung (Aggregation und DMSO-Gabe) aktiviert werden.

(A) Der ES-Zellklon (#2) zeigte im undifferenzierten Zustand keine Färbung.

(B) Mesodermal differenzierte Zellen des ES-Zellklons (#2) zeigten deutliche blaue Färbung.

(C) Ein einzelner blaugefärbter Zellverband inmitten differenzierter Zellen des Zellklons #5.

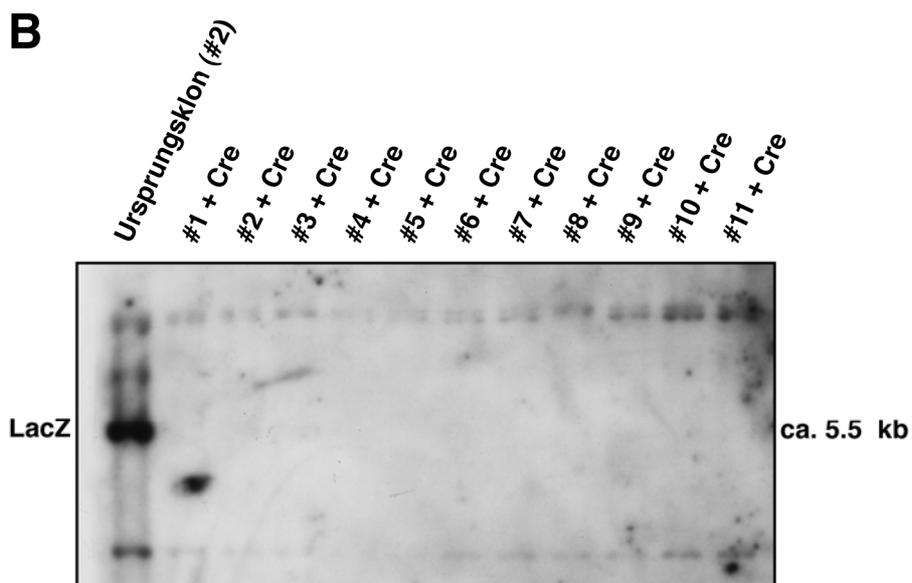
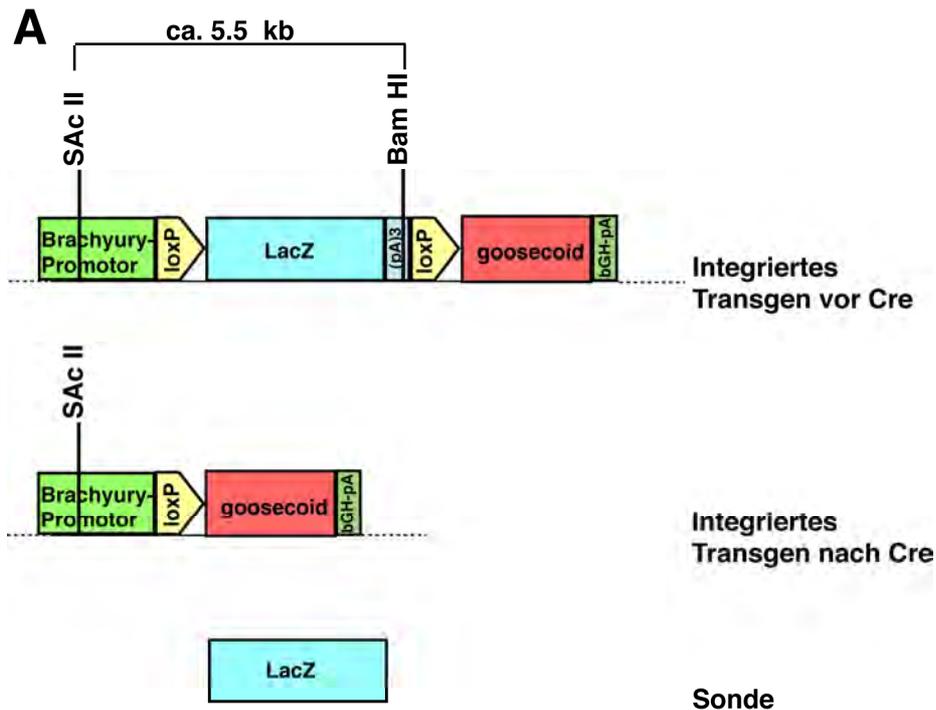
(D) Im differenzierten Wildtyp-ES-Zellklon ließ sich keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zeigen.

tg= transgen; Wt= Wildtyp; diff.= differenziert; undiff.= undifferenziert.

Einzelne Zellverbände innerhalb der ausplattierten Aggregate ließen sich blau anfärben. Dies deutete darauf hin, dass nur mesodermal differenzierte Zellen das Transgen exprimierten. Desweiteren ließen sich Intensitätsunterschiede der Färbung beobachten. Nur drei der vier transgenen ES-Zellklone zeigten starke Enzymaktivität. Diese Klone wurden zur weiteren *in vivo* Analyse verwendet.

## 2.2 Konditionale Aktivierung des Transgens *in vitro*

Die ES-Zellklone #2, #5 und #10 wurden mit einem Plasmid der *CRE*-Rekombinase unter der Kontrolle des Phosphoglycerinkinase-Gen-Promotors (PGk-*Cre*) transient durch Elektroporation transfiziert. Nach 48 Stunden wurden jeweils ca. 40 Klone zufällig ausgewählt und isoliert. Genomische DNA wurde durch Southern Blot Analyse der Klone auf die Anwesenheit der LacZ-Markergenkassette untersucht. In Abb. 9 ist eine solche Analyse exemplarisch an Zellklon #2 dargestellt. Nach *CRE*-vermittelter Rekombination zeigte keine der doppeltransgenen ES-Zellklone ein LacZ-Markergen-spezifisches Signal, d. h. die Rekombination war in jedem Fall erfolgreich. Durch das Entfernen der LacZ-Markergenkassette gelangte die *gooseoid*-Sequenz unter die Kontrolle des transgenen *Brachyury*-Promotors, wodurch die Missexpression des *gooseoid* Transgens in mesodermal differenzierten ES-Zellklonen möglich wurde.



**Abb.9 DNA-Analyse von transgenen ES-Zellklonen nach Entfernen der LacZ-Markergenkassette.**

Southern Blot Analyse, zur Untersuchung *CRE*-vermittelter Rekombination in 11 unabhängigen Zellklonen.

(A) Schematische Darstellung der detektierten DNA-Fragmente vor und nach der *CRE*-vermittelten Rekombination. Nach Restriktionsverdau mit SacII und BamHI ergab das integrierte Transgen vor der *CRE*-vermittelten Rekombination ein ca. 5.5 kb Fragment.

(B) Genomische DNA (10 µg) des Ursprungsklons (#2) und der doppelt transfizierten Klone wurde nach SacII und BamHI Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer LacZ-spezifischen Sonde hybridisiert. Der Ursprungsklon zeigte ein positives Signal (ca. 5.5 kb). Alle doppeltransfizierten Klone hatten die LacZ-Markergenkassette nach *CRE*-vermittelter Rekombination verloren.

kb= Kilobasen.

## 2.3            **Repression der *Brachyury*-Expression durch das Genprodukt des Transgens**

Im Verlauf dieser Arbeit wurde von zwei Arbeitsgruppen berichtet, dass beim Frosch *Xenopus laevis* das *GOOSECOID*-Protein mit dem *Brachyury*-Gen interagiert. Das *GOOSECOID*-Protein fungiert als Repressor der *Brachyury*-Gen-Transkription im Prächordalplattenmesoderm (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997). Falls ein ähnlicher Mechanismus auch in der Maus existiert, war die Missexpression des Transgens im gesamten Primitivstreifens u. U. nur sehr abgeschwächt zu erzielen. Der *Brachyury*-Promotor im Transgenkonstrukt könnte sowohl durch das transgene als auch durch das endogene *GOOSECOID* beeinflusst werden.

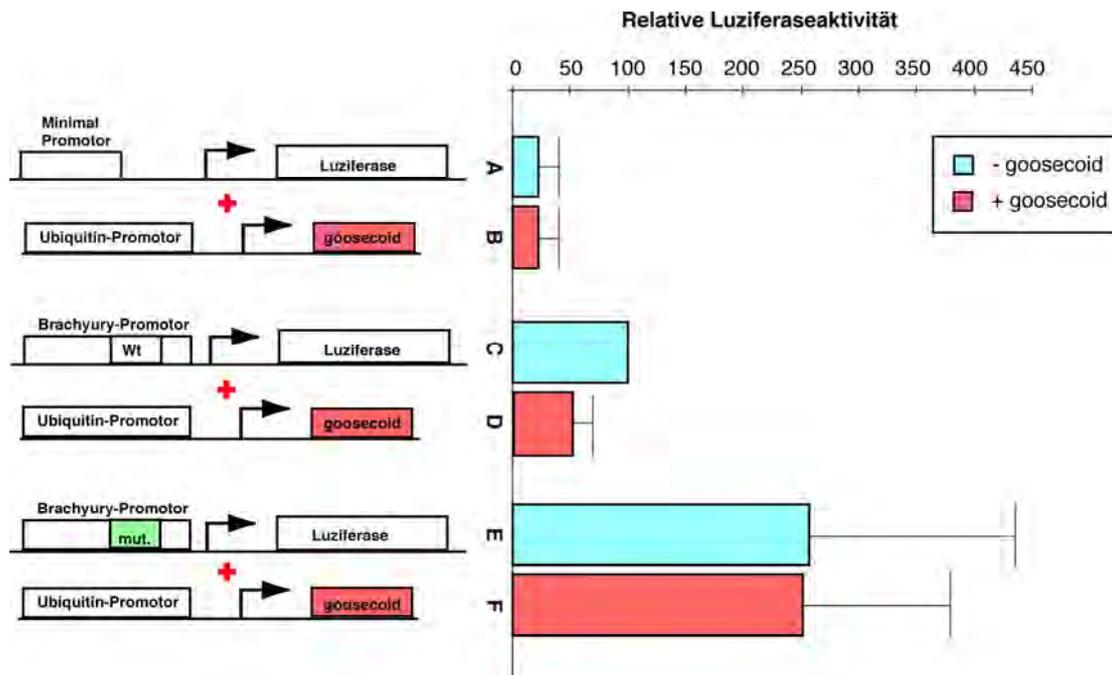
Ein Sequenzvergleich der *Brachyury*-Promotorregionen in Maus und Frosch ergab keinen hohen Grad an Konservierung. Insbesondere waren die zwei von Artinger et al. (1997) identifizierten putativen *GOOSECOID* Bindestellen, die zur Repression der *Brachyury*-Transkription im Frosch führten, in der Maus nicht konserviert. Auffällig war in der nicht translatierten 5` Region der mRNA ein konserviertes Element (TAAT), das u. U. eine mögliche Bindestelle für Homöoboxproteine einschliesst (Boucher et al., 2000).

Zur Aufklärung des Mechanismus in der Maus wurde ein ES-Zell-Experiment durchgeführt. ES-Zellen wurden stabil mit einem Luziferase-Reportergenkonstrukt, in dem das TAAT-Motiv des *Brachyury*-Promotors in eine ACTG-Sequenz mutiert war, bzw. mit dem Wildtyp-Promotor transfiziert. Als Kontrolle diente die parallele Transfektion mit einem Minimal-Promotorkonstrukt. Die transfizierten Zellen, die das Luziferase-Reportergenkonstrukt stabil enthielten, wurden als Massenkultur kultiviert und mit einem *gooseoid*-Expressionsplasmid transient transfiziert. In dem *gooseoid*-Expressionsplasmid kontrollierte der Promotor des *Ubiquitin*-Gens die Transkription der vollständigen kodierenden *gooseoid*-cDNA-Sequenz. Damit war eine ubiquitäre und hohe Expression des Transgens in den Zellen gewährleistet (Schorpp et al., 1996). Zur Aktivierung des *Brachyury*-Promotors im Luziferasegenkonstrukt wurden die Massenkulturen, wie oben beschrieben, zu

mesodermalen Zellen differenziert. Anschliessend wurden die Zellen geerntet und auf Luziferaseaktivität untersucht.

Der Minimal-Promotor bewirkte eine basale Aktivierung des Reportergens, die sich durch Anwesenheit des *GOOSECOID*-Proteins nicht beeinflussen ließ (Abb. 10A+B). Der Wildtyp-Promotor führte zu einer zwei- bis dreifachen Aktivierung des Reportergens im Vergleich zu Kontrollkulturen, die das Minimal-Promotorkonstrukt enthielten (Abb. 10C,A+B). Das durch Ko-Transfektion des *goosecoid*-Expressionsplasmids eingebrachte *GOOSECOID*-Protein reprimierte den Wildtyp-Promotor, was in einer um die Hälfte reduzierten Reportergenaktivität im Vergleich zu ES-Zellkulturen ohne *GOOSECOID* resultierte (Abb. 10C+D). Diese Repression wurde durch das mutierte Konstrukt aufgehoben (Abb. 10E+F). Auffallend war hier eine Erhöhung der Luziferaseaktivität um das 2.5-fache im Vergleich zu ES-Kulturen, die das Wildtyp-Promotorkonstrukt enthielten, was auf den Verlust der Repression durch das endogene *GOOSECOID* in den Zellen zurückzuführen sein könnte (Abb. 10E,F+C).

Dieses Experiment zeigte, dass die *GOOSECOID*-vermittelte Repression der *Brachyury*-Transkription durch das in Maus und Frosch konservierte TAAT Element im *Brachyury*-Promotor zurückzuführen war. Bei der Maus existiert ein ähnlicher Mechanismus wie beim Frosch, wobei das *GOOSECOID*-Protein die Transkription des *Brachyury*-Gens reprimiert. Dieser Befund ließ in dem geplanten konditionalen Missexpressionsexperiment (siehe Abb. 30) eine nur moderate Missexpression des *goosecoid*-Transgens im Primitivstreifenmesoderm der transgenen Mäuse erwarten.



**Abb. 10** Repression der *Brachyury*-Transkription durch *GOOSECOID* in ES-Zellen.

Transiente Transfektion eines *goosecoid*-Expressionsplasmids in ES-Zellklone, die ein Luciferase-Reporterergenkonstrukt mit Wildtyp-*Brachyury*-Promotor oder mutiertem *Brachyury*-Promotor stabil integriert hatten. Die Säulen repräsentieren die Luciferaseaktivität relativ zum Wildtyp-Konstrukt in Abwesenheit von *GOOSECOID* (A,C,E) (Durchschnittswerte aus vier Experimenten). Die Maximalwerte sind angezeigt, wobei die Werte des Wildtyp-Konstrukts ohne *GOOSECOID* (C) auf 100 gesetzt wurden. Das mutierte Konstrukt konnte durch *GOOSECOID* nicht mehr reprimiert werden (F). Die Reporteraktivität war im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (C) deutlich erhöht.

(A) ES-Zellklon mit stabiler Intergration des Minimal-Promotor-Reporterergenkonstrukts.

(B) ES-Zell-Massenkultur des ES-Zellklon aus (A) nach Ko-Transfektion mit *goosecoid*-Expressionsplasmid.

(C) ES-Zellklon mit stabiler Intergration des Wildtyp-*Brachyury*-Promotor-Reporterergenkonstrukts.

(D) ES-Zell-Massenkultur des ES-Zellklon aus (C) nach Ko-Transfektion mit *goosecoid*-Expressionsplasmid.

(E) ES-Zellklon mit stabiler Intergration des mutierten *Brachyury*-Promotor-Reporterergenkonstrukts.

(F) ES-Zell-Massenkultur des ES-Zellklon aus (D) nach Ko-Transfektion mit *goosecoid*-Expressionsplasmid.

## **2.4 Herstellung von transgenen Mäusen mit stabiler Integration des Transgens**

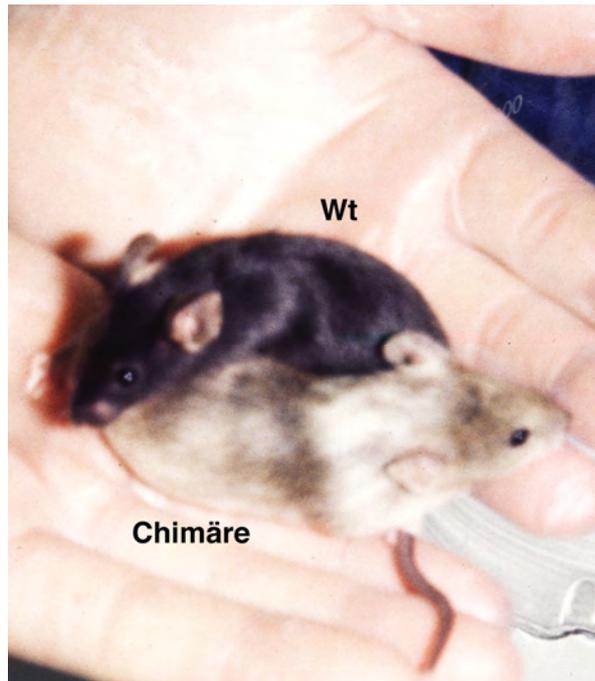
Zur Herstellung der transgenen Mäusen wurden zunächst die transgenen ES-Zellklone in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Ammen transferiert. Die sich daraus entwickelten chimären Mäuse bestanden aus einer Mischung aus Wirtszellen und transgenen ES-Zellen. Integrierten die transgenen ES-Zellen in die Keimzellen der chimären Tiere, so ließen sich durch Kreuzen Nachkommen erzeugen, die genetisch von den ES-Zellen abstammten.

### **2.4.1 Blastozysteninjektion**

Zur Blastozysteninjektion wurden aufgrund ihrer starken LacZ-Markergenaktivität nach mesodermaler Differenzierung (siehe Abb. 8) die ES-Zellklone #2, #5 und #10 ausgewählt. Blastozysten wurden isoliert, mit ES-Zellen des jeweiligen Klons injiziert und in pseudoschwangere Ammen transferiert.

Da Blastozysten (C57BL/6J; Inzuchtstamm mit schwarzer Fellfarbe) und KPA ES-Zellen (OLA/129; Inzuchtstamm mit beige/brauner Fellfarbe) nicht vom selben Mausstamm abstammen, entsteht bei der Integration der embryonalen Stammzellen ein chimäres Tier mit unterschiedlichen Fellfarben (Torres und Kühn, 1997). Der Grad des Chimärismus, d. h. wieviele ES-Zellen zur Entstehung des chimären Tieres beigetragen haben, läßt sich somit von der Fellfarbe der Chimäre ableiten.

Aus Blastozysteninjektion des ES-Zellklons #2 wurden vier männliche chimäre Mäuse geboren (Abb. 11), Injektionen der Klone #5 und #10 ergaben jeweils drei männliche chimäre Nachkommen.

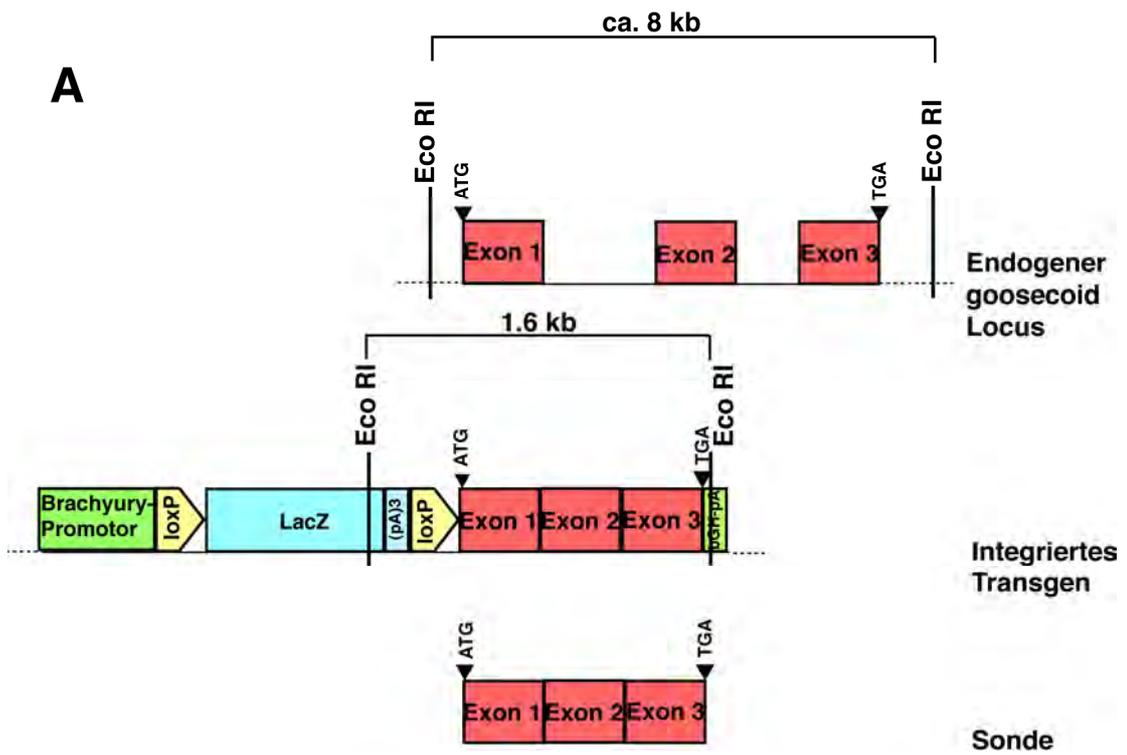


**Abb. 11 Chimäre Maus vor Transgen Aktivierung.**

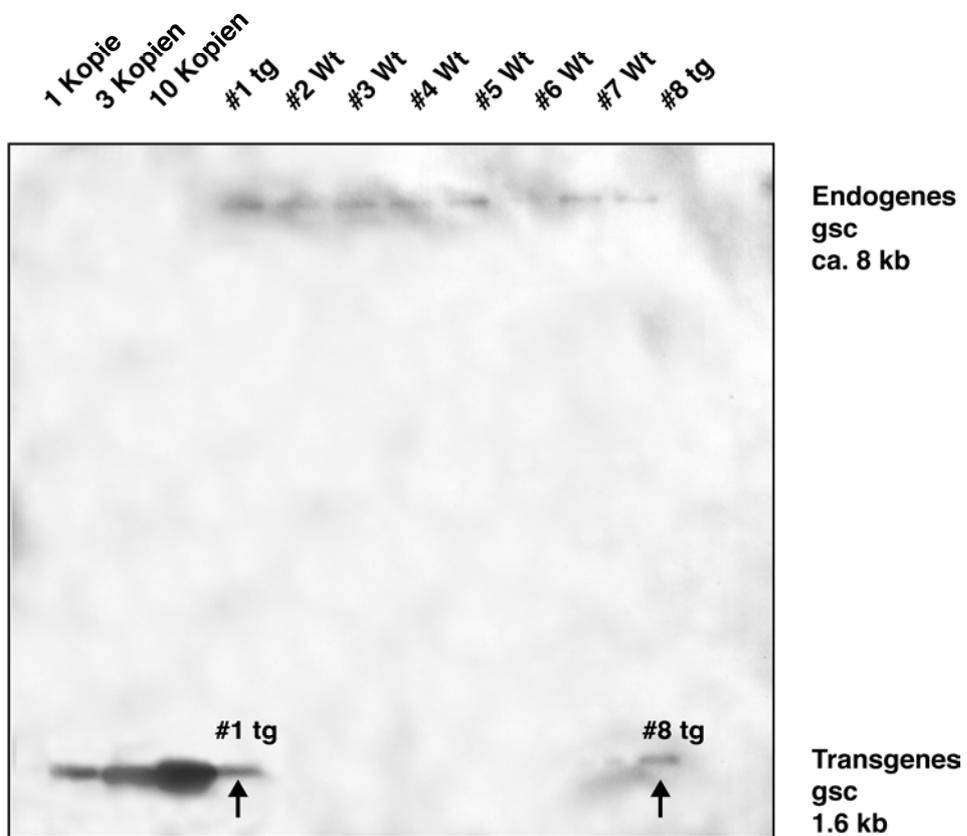
Chimäre Maus nach Blastozysteninjektion von ES-Zellklon #2. Im Vergleich daneben eine C57BL/6J Wildtyp-Maus.

#### **2.4.2 Integration der transgenen ES-Zellklone in die Keimbahn**

Die aus Blastozysteninjektionen entstandenen chimären Tiere wurden im Alter von acht Wochen mit gleichaltrigen C57BL/6J Weibchen verpaart. Falls ES-Zellen auch in die Keimzellen der chimären Mäuse integriert waren, sollten aus diesen Verpaarungen Nachkommen mit brauner Fellfarbe geboren werden. Aus Kreuzungen der insgesamt zehn männlichen Chimären (ES-Zellklon #2, #5 und #10) mit jeweils zwei Weibchen des Mausstamms C57BL/6J wurden 122 Nachkommen (63 weibliche und 59 männliche Tiere) geboren. Davon besaßen 73 Mäuse eine braune Fellfärbung (29 weibliche und 44 männliche Tiere). Ungefähr 60% der geborenen Mäuse zeigten demnach Keimbahntransfer. Da die chimären Mäuse nur jeweils ein Allel des Transgens besaßen, mußte davon ausgegangen werden, daß nur fünfzig Prozent ihrer Nachkommen mit brauner Fellfarbe auch das Transgen in sich trugen. DNA aus Schwanzbiopsien der 5 bis 10 Tage alten Tiere wurden durch Southern Blot Analyse mit einer *gooseoid*-spezifischen Sonde auf Anwesenheit des Transgens untersucht. In Abb. 12 ist solch ein Experiment dargestellt. Zwei Tiere enthielten demnach das Transgen.



**B**



**Abb. 12 Charakterisierung von transgenen Mäusen nach Keimbahntransfer.**

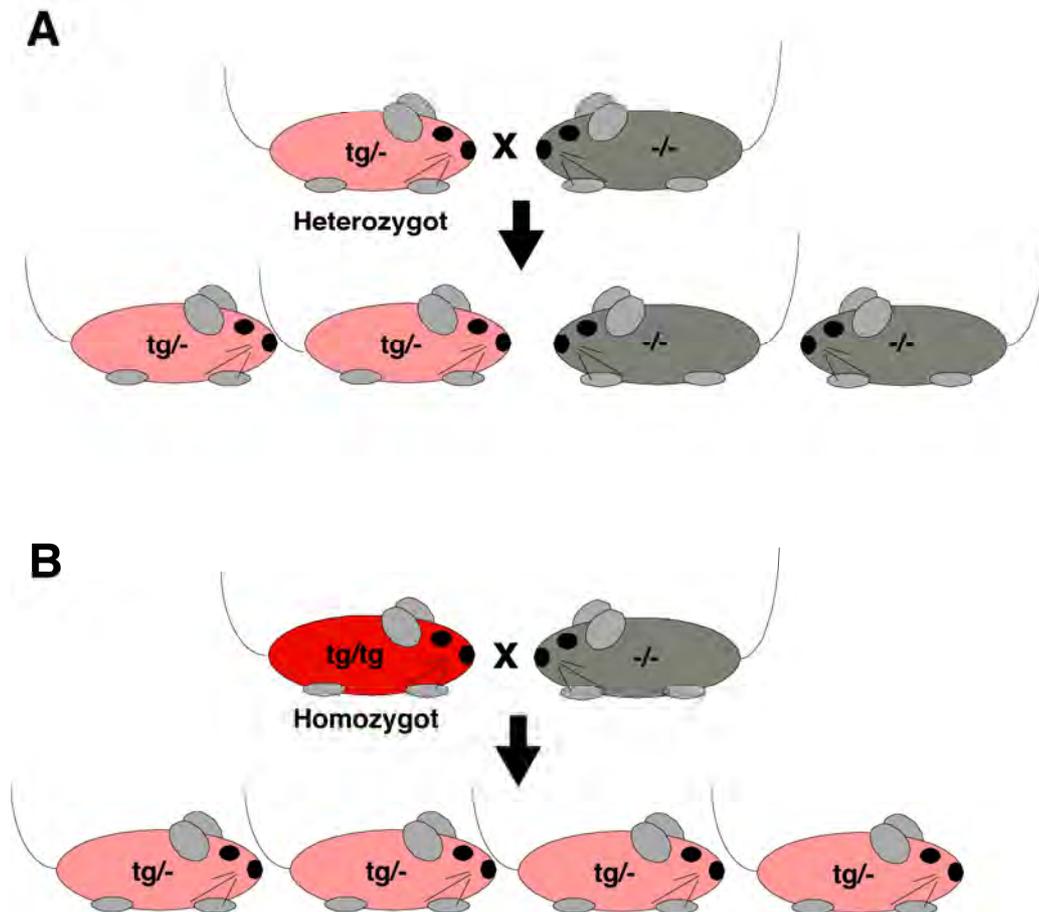
Southern Blot Analyse zur Detektion des Transgenkonstrukts in Nachkommen einer chimären Maus.

(A) Schematische Darstellung der DNA-Fragmente in der endogenen bzw. in der transgenen Situation. Nach Restriktionsverdau mit EcoRI ergab der endogene *gooseoid* Locus ein ca. 8 kb Fragment und das integrierte Transgen ein 1.6 kb Fragment.

(B) Genomische DNA (10 µg) aus Mäusen eines Wurfs mit Keimbahntransfer wurde nach EcoRI Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Quantifizierung wurde parallel das transfizierte Transgenkonstrukt in Mengen verwendet, die einer, drei und zehn Genkopien entsprechen. Die Membran wurde mit einer *gooseoid*-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Mäuse #1 und #8 zeigten neben einem Signal für die endogene (ca. 8 kb) auch eines für die transgene *gooseoid*-Sequenz (1.6 kb).

ATG= Startcodon; TGA= Stopcodon; tg= transgen; Wt= Wildtyp; kb= Kilobasen.

Alle als transgen charakterisierten Tiere einer ES-Zelllinie wurden zur Weiterzucht untereinander verpaart. Um die Nachkommen auf Homozygotie zu testen, wurden sie mit reinstämmigen C57BL/6 Mäusen verpaart. Alle Nachkommen homozygoter Tiere sollten ebenfalls eine Kopie des Transgens im Genom enthalten (siehe Abb. 13).



**Abb. 13 Kreuzungsschema zum Test auf Homozygotie.**

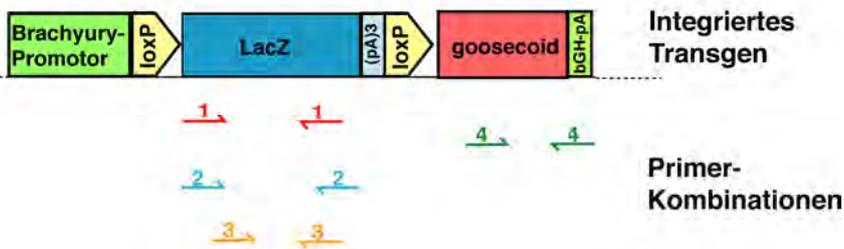
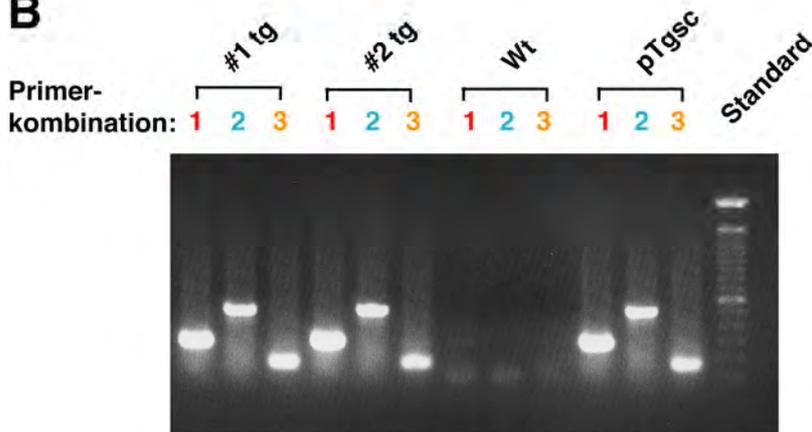
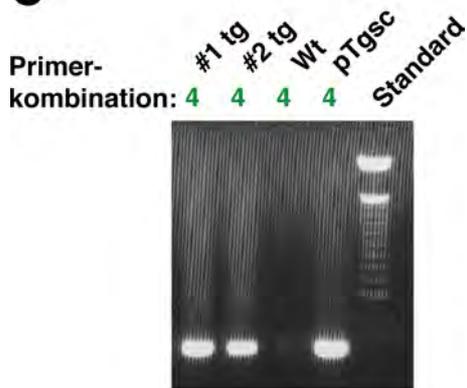
(A) Wurde eine heterozygot transgene Maus mit einer reinstämmigen Wildtyp-Maus verpaart, so erhielten 50% der Nachkommen eine Kopie des Transgens.

(B) Wurde eine homozygot transgene Maus mit einer reinstämmigen Wildtyp-Maus verpaart, so erhielten alle Nachkommen eine Kopie des Transgens.

tg/-= heterozygot transgen; -/-= Wildtyp; tg/tg= homozygot transgen.

### 2.4.3 Genotypisierung der transgenen Tiere

Zur routinemäßigen Genotypisierung der transgenen Tiere wurde eine im Vergleich zur Southern Blot Analyse schnellere Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) Analyse etabliert. Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde auf Anwesenheit des LacZ-Markergens und der transgenen *goosecoid*-Sequenz überprüft. Hierzu wurden drei verschiedene für die LacZ-Markergen-Sequenz spezifische und eine *goosecoid*-spezifische Primerkombination verwendet. Um sicherzustellen, daß nicht genomische *goosecoid*-DNA amplifiziert wurde, stammte in Primerkombination 4 ein Primer aus dem Exon 3 des *goosecoid*-Gens und der andere aus dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors. In Abb. 14 ist exemplarisch eine solche Untersuchung dargestellt. Nur wenn alle vier Amplifikationsprodukte nachweisbar waren, wurde die Maus als transgen charakterisiert.

**A****B****C****Abb. 14 Genotypisierung von transgenen Mäusen mit Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR).**

Genomische DNA transgener Tiere wurde mit Hilfe von PCR unter Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen amplifiziert.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Primerkombination.

(B) Nachweis des LacZ-Markergens: Bei Anwesenheit der transgenen LacZ-Markergenkassette ergab Primerkombination 1 ein 280 bp Produkt, Primerkombination 2 ein 510 bp Produkt und Primerkombination 3 ein 160 bp Produkt. Die Tiere #1 und #2 erwiesen sich im Gegensatz zu Maus #3 als transgen.

(C) Nachweis der transgenen *goosecoid*-Sequenz: Primerkombination 4 amplifizierte ein 277 bp Fragment. Die Sequenz des 5'Primers ist in der *goosecoid*-Sequenz (Exon 3) und die des 3'Primers im Polyadenylierungssignal lokalisiert. Maus #1 und #2 konnten als transgen bestätigt werden.

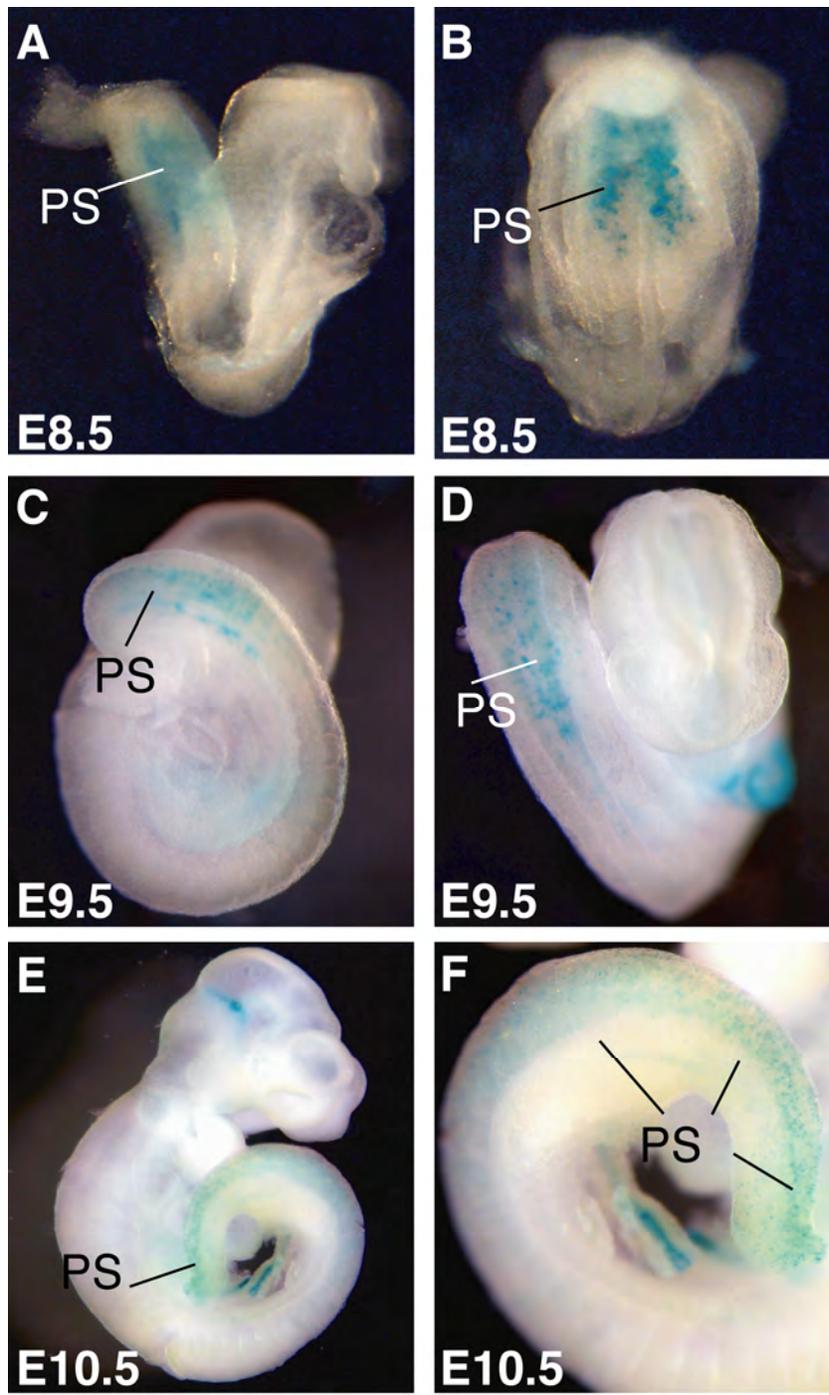
DNA (10 ng) des Transgenkonstrukts diente als Positiv-Kontrolle und 5 µg der 100 bp-Leiter als Größenstandard.

tg= transgen; Wt= Wildtyp; pTgsc= Transgenkonstrukt.

## 2.5 Analyse der Expression des Transgens in Embryonen

### 2.5.1 Analyse der LacZ-Markergenexpression in transgenen Embryonen

Die LacZ-Markergenkassette im Transgenkonstrukt erlaubte vor konditionaler Aktivierung des *goosecoid*-Transgens die Analyse der lokalen Transgenexpression im Embryo. Dazu wurden Embryonen der Embryonalentwicklung E7.5 bis E10.5 aus allen drei homozygoten transgenen Mauslinien isoliert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch das Substrat X-gal auf Blaufärbung in den Embryonen untersucht (Abb. 15). Sie zeigten das *Brachyury*-typische Expressionsmuster im posterioren Primitivstreifen, d. h. die Linie #2 rekapitulierte das endogene Muster der *Brachyury*-Genaktivität im Primitivstreifen zuverlässig. Bei den in Abb. 15C-F zusätzlich sichtbaren Färbungen in der Nabelschnur und an der Grenze von Mittel- und Hinterhirn handelt es sich um transgen-unabhängige Artefakte, die oft bei den  $\beta$ -Galaktosidase-Färbungen zu beobachten sind (Moore et al., 1998). Durch histologische Schnitte der gefärbten Embryonen (Abb. 16) ließ sich die LacZ-Markergenexpression ausschließlich dem naszierenden Mesoderm des posterioren Primitivstreifens zuordnen. In Embryonen am Tag 7.5 konnte keine Färbung nachgewiesen werden. In Embryonen der Linien #5 und #10 ließ sich keine Transgenaktivität nachweisen, sie wurden daher nicht weiter analysiert. Ähnliche Misserfolge wurden in der Literatur berichtet. Die Ursachen für fehlende Transgen-Ausprägung sind nicht bekannt (Torres und Kühn, 1997).



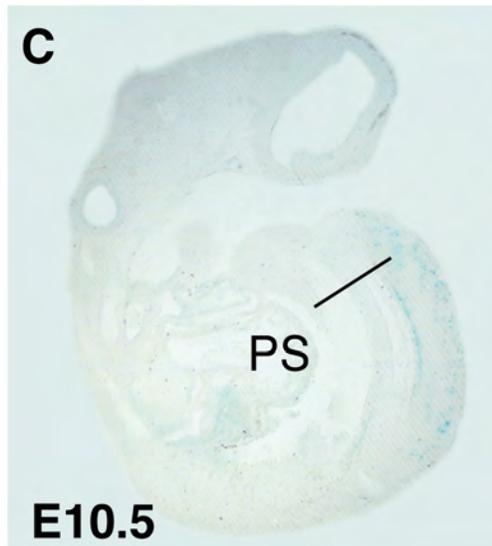
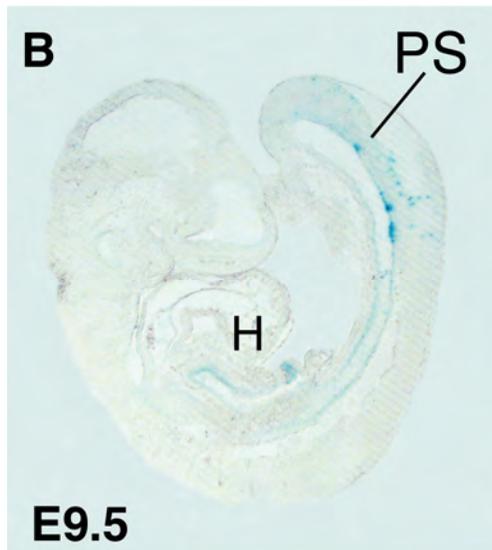
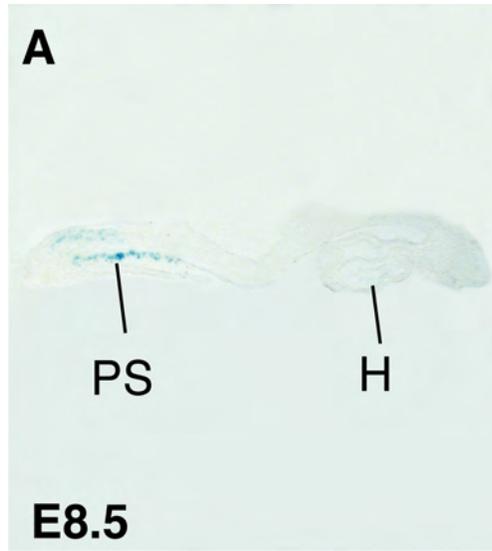
**Abb. 15 LacZ-Markergenaktivität in transgenen Embryonen.**

LacZ-Markergenexpression im Primitivstreifen transgener Embryonen der Linie #2.

(A+B) Der 8.5 Tage alte Embryo zeigte deutliche Blaufärbung im posterioren Primitivstreifen. (A) Laterale Ansicht. (B) Posteriore Ansicht.

(C+D) Im Embryo am Tag E9.5 waren blaufärbte mesodermale Zellen deutlich im naszierenden Mesoderm der Schwanzknospe zu erkennen. (C) Laterale Ansicht. (D) Ansicht von frontal.

(E+F)  $\beta$ -Galaktosidase positive Zellen waren in der Schwanzspitze des E10.5 Embryos lokalisiert. Transgen-unspezifische Färbung war ebenfalls in der Nabelschnur und in der Mittel-/Hinterhirngrenze zu beobachten. (E) Laterale Ansicht. (F) Detailaufnahme der Schwanzspitze. PS= Primitivstreifen.



**Abb. 16. Transgene Embryonen zeigten LacZ-Markergenaktivität ausschliesslich im Primitivstreifen.**

Histologische Sagittalschnitte der transgenen Embryonen nach Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch das Substrat X-gal.

(A) Im 8.5 Tage alten Embryo waren nur die mesodermalen Zellen des posterioren Primitivstreifens blaugefärbt.

(B) Der Embryo des Tages E9.5 wies starke Färbung in den Zellen der Schwanzknospe auf. Leichte transgen-unspezifische Färbung in der Nabelschnur ist in dieser Schnittebene ebenfalls zu erkennen.

(C) Am Tag E10.5 waren blaue Zellen lediglich im Primitivstreifen der Schwanzspitze des Embryos zu beobachten.

PS= Primitivstreifen; H= Herz.

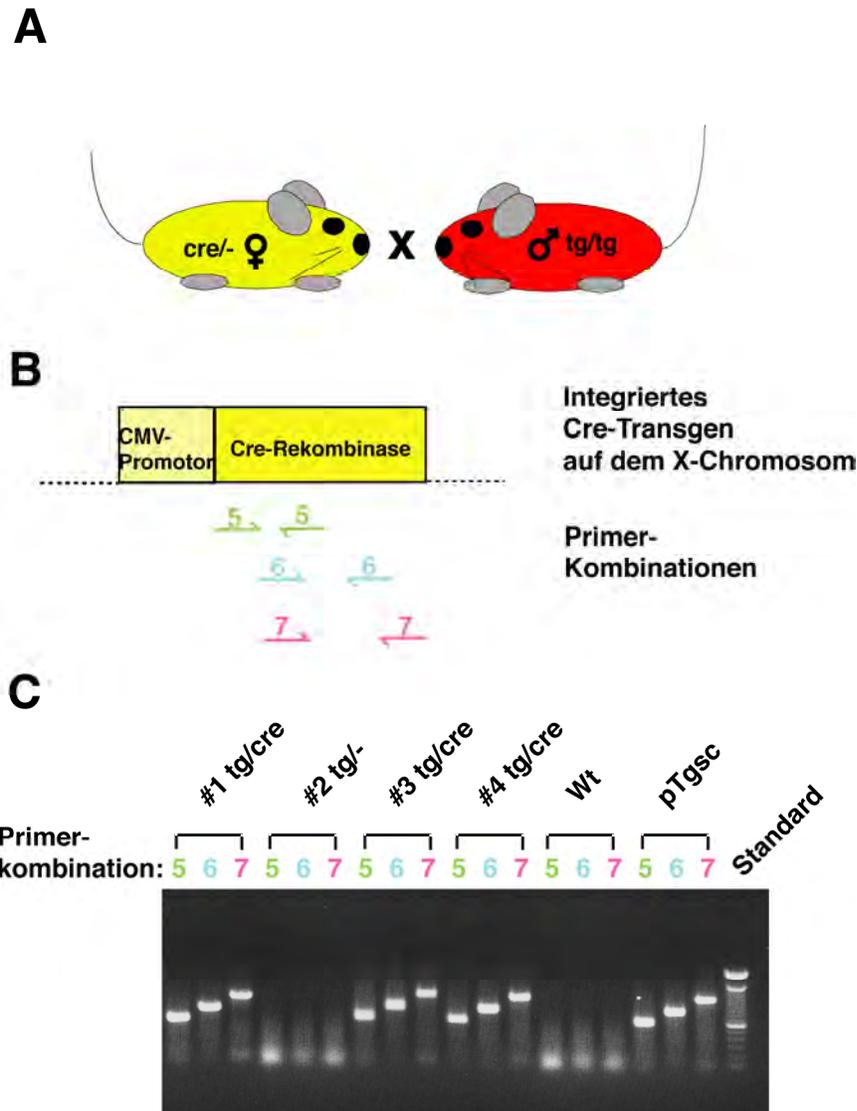
## 2.5.2 Analyse der Expression des *gooseoid*-Transgens in doppelt transgenen Embryonen

### 2.5.2.1 Aktivierung des *gooseoid*-Transgens *in vivo*

Zur Entfernung der mit loxP-Sequenzen flankierten LacZ-Markergenkassette, und damit zur Aktivierung des *gooseoid*-Transgens *in vivo*, wurden Tiere der Linie #2 mit einer weiteren transgenen Mauslinie verpaart. Diese zweite transgene Linie (*deleter*) exprimiert die *CRE*-Rekombinase unter dem Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV). Dies gewährleistet die ubiquitäre *Cre*-Expression schon im Blastozystenstadium (Schwenk et al., 1995).

Embryonen definierter Entwicklungsstadien (E6.5 bis 10.5) wurden aus Verpaarungen der beiden transgenen Linien isoliert. Da zunächst nur heterozygote Tiere der *deleter* Linie zur Verfügung standen, mußten die Embryonen aus der Verpaarung *cre*<sup>+/+</sup> mit *tg*<sup>+/+</sup> zunächst genotypisiert werden. Hierzu wurde genomische DNA aus den Embryonalhüllen isoliert und mit Polymerasen Kettenreaktion-Analyse auf Anwesenheit des *Cre*-Transgens analysiert. Mit drei verschiedenen *Cre*-spezifischen Oligonukleotiden wurden in doppeltransgenen Embryonen spezifische *Cre*-DNA-Sequenzen amplifiziert. In Abb. 17 ist ein solches Experiment dargestellt. Die Genotypisierung entfiel, nachdem im Verlauf der Zucht auch die *deleter* Mauslinie homozygot das Transgen trug. Da in diesen Tieren das *Cre*-Transgen allerdings X-

chromosomal integriert ist, wurden ausschliesslich weibliche Tiere für weitere doppeltransgene Verpaarungen verwendet.



**Abb. 17 Genotypisierung von doppelt transgenen Embryonen mit Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR).**

Genomische DNA doppelt transgener Tiere wurde mit Hilfe von PCR unter Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen amplifiziert.

(A) Die Embryonen stammten aus  $cre^{+/-}/tg^{+/-}$  Verpaarungen.

(B) Nachweis der transgenen Cre-Sequenz: Bei Vorhandensein des Gens für die Cre-Rekombinase ergab Primerkombination 5 ein 550 bp Fragment, Primerkombination 6 ein 650 bp Fragment und Primerkombination 7 ein 751 bp Fragment.

(C) In den Embryonen #1, #3 und #4 wurde ein spezifisches Produkt amplifiziert, wodurch sie als doppelt transgen charakterisierbar waren.

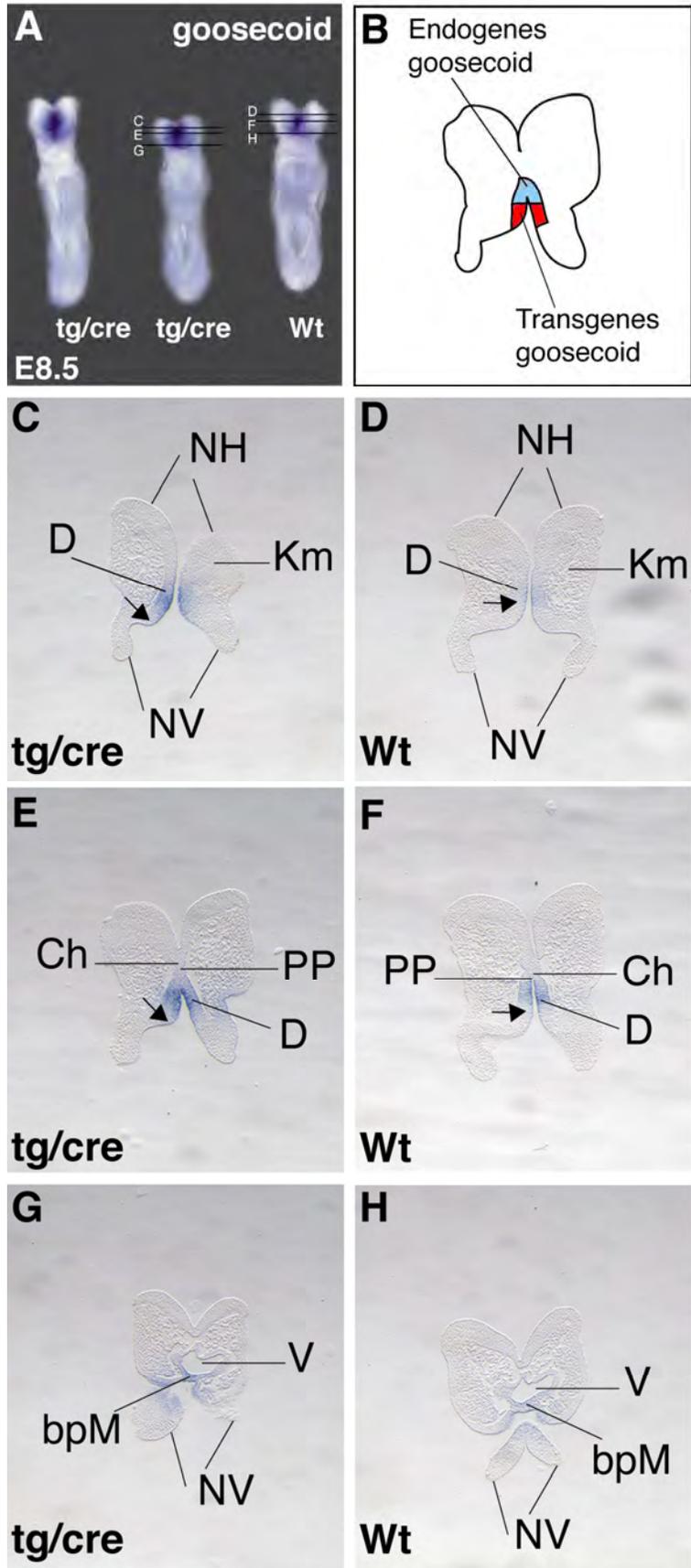
Das Transgenkonstrukt (10 ng) diente als Positiv-Kontrolle, genomische DNA einer Wildtyp-Maus als Negativ-Kontrolle und 5  $\mu$ g der 100 bp-Leiter als Größenstandard.

tg/cre= doppelt transgen; tg/-= transgen für pTgsc und nicht für Cre; Wt= Wildtyp.

### 2.5.2.2 Expression des *gooseoid*-Transgens in doppelt transgenen Embryonen

Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den transgenen Mäusen vor konditionaler Aktivierung des *gooseoid*-Transgens wies auf eine starke Expression des Transgens im gesamten Primitivstreifenmesoderm hin. Das transgene Expressionsmuster rekapitulierte die endogene *Brachyury*-Expressionsaktivität im naszierenden Mesoderm des Primitivstreifens. Zur Klärung der Frage, wie das transgene *gooseoid*-Gen nach seiner Aktivierung in doppelt transgenen Embryonen exprimiert wurde, diente eine *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat. Hierzu wurden Embryonen der Stadien E8.0 bis E8.75 isoliert, in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Transkription des endogenen und transgenen *gooseoid* mit einer *gooseoid*-spezifischen Sonde detektiert.

Im Gegensatz zum Markergenkonstrukt, fanden sich in den doppelt transgenen Embryonen keine *gooseoid*-Transkripte im posterioren Primitivstreifenmesoderm (Abb. 18A). Am Tag E8.5 wiesen die doppelt transgenen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen allerdings eine erhöhte *gooseoid*-Expression in der cranialen Region auf. Anhand von histologischen Schnitten ließ sich die endogene *gooseoid*-Genaktivität mit der des Transgens genauer vergleichen. Endogene *gooseoid* mRNA Transkripte sind in 8.5 Tage alten Embryonen im Neuroepithel des zukünftigen Diencephalon, im prächordalen Mesoderm und in der buccopharyngealen Membran des Vorderdarms lokalisiert (Filosa et al., 1997; Belo et al., 1997); (Abb. 18D,F,H). Neben einer erhöhten Signalstärke in diesen cranialen Bereichen könnte auch eine ektopische *gooseoid*-Genexpression im ventrolateralen Neuroepithel des zukünftigen Diencephalons vorliegen (siehe Abb. 18C,E,G). Durch weitere histologische Analysen sollte die beobachtete Ausdehnung der *gooseoid*-Genexpression betätigt werden können.



**Abb. 18 Überexpression von *gooseoid* in doppelt transgenen Embryonen am Tag E8.75.**

Nachweis der *gooseoid*-Expression *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat mit einer *gooseoid*-spezifischen Sonde.

(A) Ventrale Ansicht dreier 8.5 Tage alten Embryonen. *gooseoid* mRNA Transkripte sind im Neuroektoderm des zukünftigen Diencephalon und im anterioren Vorderdarm lokalisiert. Schnittebenen sind mit (C-H) markiert.

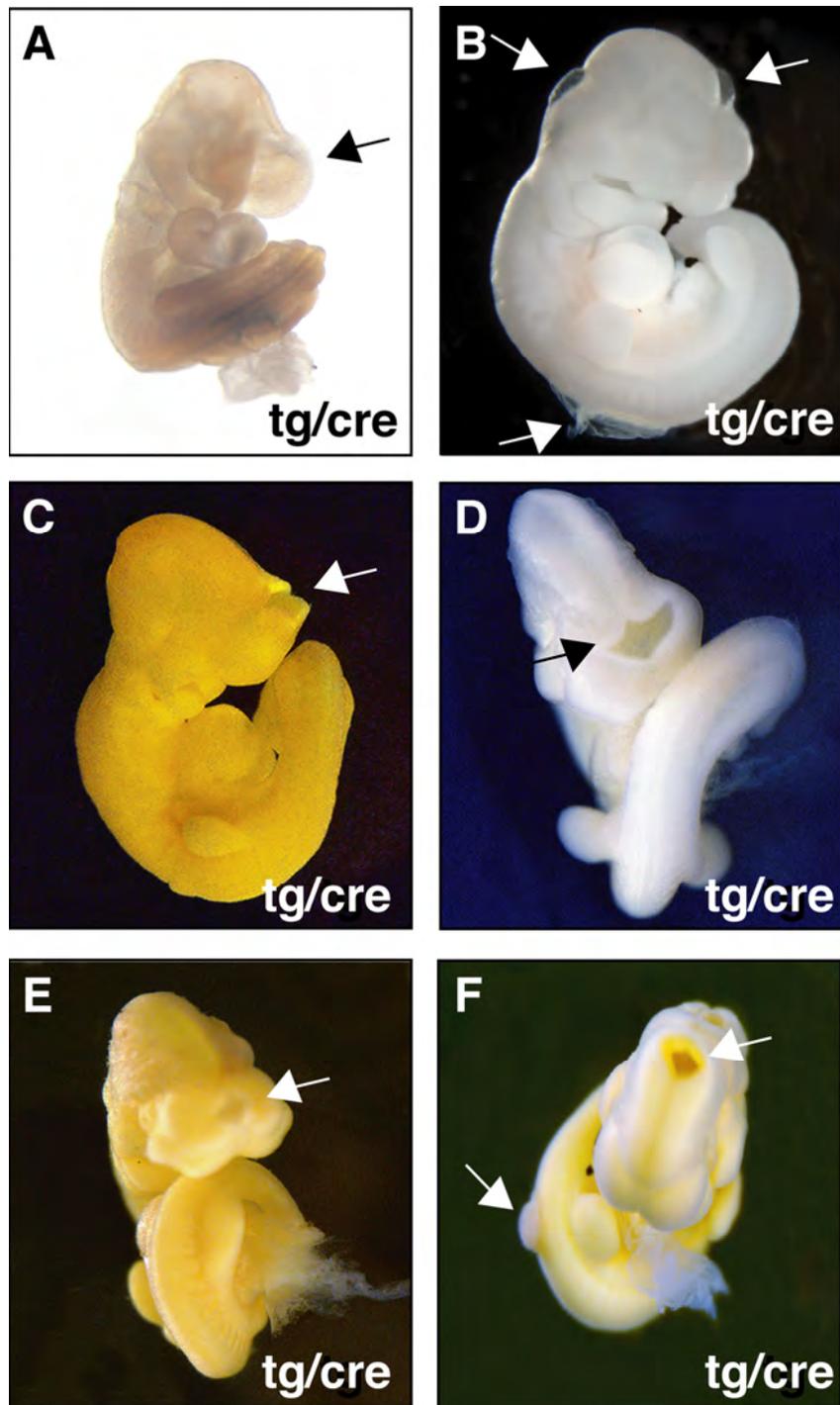
(B) Schematische Darstellung der Expressionsdomänen von endogenem und transgenem *gooseoid* aus (E).

(C,E,G) Schnitte der Kopfregion des doppelt transgenen Embryos, bzw. (D,F,H) des Kontrollembryo. (C,E) zeigen eine verbreiterte *gooseoid*-Expression im ventrolateralen Neuroepithel des zukünftigen Diencephalon im Vergleich zum Wildtyp-Embryo (D,F). Im Schnitt (G) auf der Höhe des anterioren Vorderdarms, läßt sich eine im Vergleich zur Kontrollsituation (H) erhöhte *gooseoid*-Expression in der buccopharyngealen Membran detektieren,.

bpm= buccopharyngeale Membran; Ch= Chorda; D= Neuroepithel des zukünftigen Diencephalon; Km= Kopfmesenchym; NfH= Neuralwülste des Hinterhirns; NfV= Neuralwülste des Vorderhirns; tg/cre= doppelt transgen; V= Vorderdarm; Wt= Wildtyp.

## **2.6 Analyse des Phänotyps bei Expression des *gooseoid*-Transgens**

Die isolierten doppelt transgene Embryonen der Embryonalentwicklung E6.5 bis E8.5 zeigten keine morphologischen oder anatomischen Auffälligkeiten (nicht gezeigt). Bei der Analyse von 9.5 und 10.5 Tage alten Embryonen konnte hingegen ein abweichender Phänotyp beobachtet werden. Die Embryonen zeigten Defekte des Neuralrohrschlusses (NTD= *neural tube closure defect*). In verschiedenen Regionen entlang der cranio-caudalen Achse schloss sich das Neuralrohr nicht vollständig. Die Missbildungen des cranialen Neuralrohrs reichten von kleineren Öffnungen im Bereich des zukünftigen Vorder-, Mittel- und Hinterhirns bis zum völligen Ausbleiben des Neuralrohrschlusses im Bereich des zukünftigen Vorderhirns. Der unvollständige Schluss des cranialen Neuralrohrs wird als Exencephalie bezeichnet. Einige der Embryonen wiesen auch Missbildungen des caudalen Neuralrohrs auf (Spina bifida). In Abb. 19 sind einige missgebildete Embryonen dargestellt; histologische Schnitte davon in Abb. 20.



**Abb. 19 Neuralrohrschlussdefekte (NTD) in doppelt transgenen Embryonen am Tag E10.5.**

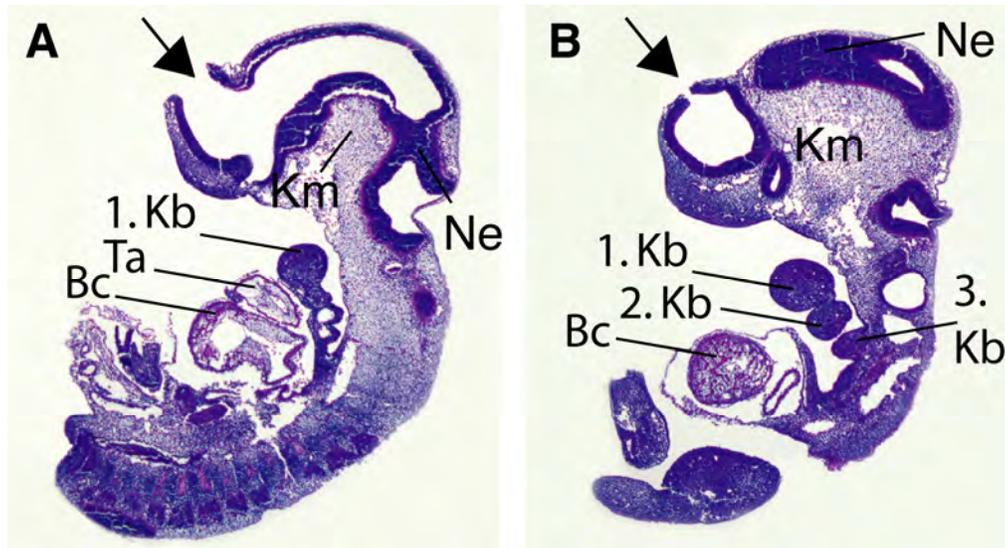
Missbildungen des Neuralrohrs sind durch Pfeile gekennzeichnet.

(A) Cranialer NTD mit geöffnetem Vorderhirn in frontaler Ansicht (Exencephalie). (B) Cranialer NTD an der Vorder-/Mittelhirngrenze und am Mittel-/Hinterhirnübergang (Exencephalie). Zusätzlicher Defekt im caudalen Neuralrohr (Spina bifida); (laterale Ansicht).

(C) Cranialer NTD: nicht vollständig geschlossenes Vorderhirn (Exencephalie); (Laterale Ansicht).

(D) Frontale Ansicht des in (C) gezeigten Embryos.

(E) Cranialer NTD der Mittel-/Hinterhirnregion (Exencephalie). Zusätzlicher Defekt des caudalen Neuralrohrs (Spina bifida); (Ansicht von oben).  
 Die Embryonen in A+B wurden in PFA-Lösung fixiert und erscheinen daher weiss; die Gelbfärbung der Embryonen in C,D,E,F resultierte aus der Bouin's-Fixierung.  
 tg/cre= doppelt transgen.



**Abb. 20 Histologische Analyse eines doppelt transgenen Embryo mit Neuralrohrschlussdefekt.**  
 Histologische Sagittalschnitte des Embryos aus Abb. 19C. Pfeile deuten auf Neuralrohrschlussdefekte im Bereich des Vorderhirns hin.  
 (A+B) Verschiedene Schnittebenen. (Hämalaun/Eosin-Färbung; 10 µm).  
 Km= Kopfmesenchym; Ne= Neuroepithelium; Kb= Kiemenbogen; Ta= Truncus arteriosus; Bc= Bulbus cordis.

### 2.6.1 Unvollständiges Auftreten des NTD-Phänotyps

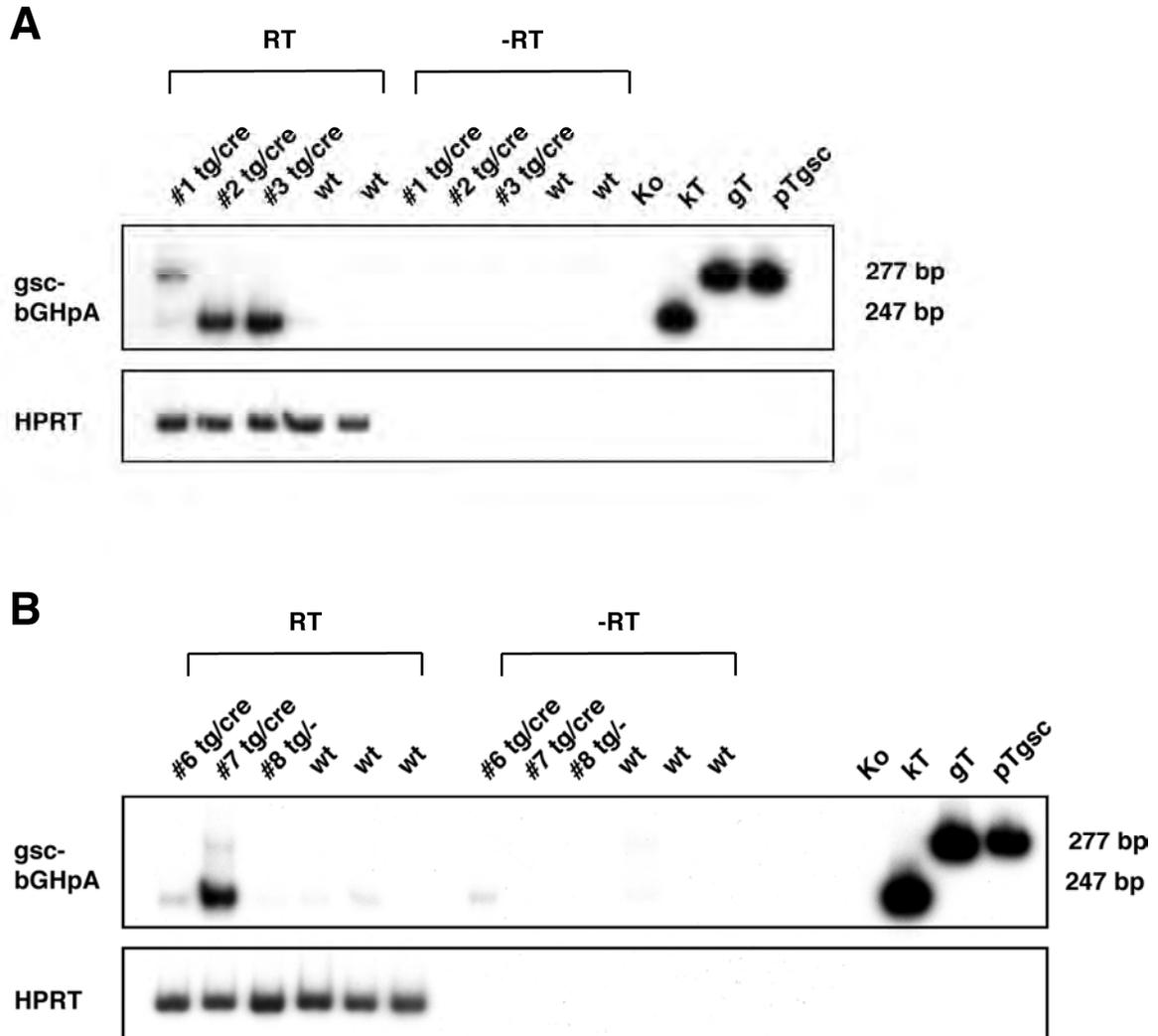
Nicht alle doppelt transgenen Embryonen am Tag E9.5 und E10.5 zeigten eine Missbildung des Neuralrohrs. Von 197 analysierten Embryonen wiesen 44 (22%) eine Anomalität des cranialen Neuralrohrs auf (Exencephalie). Zusätzlich konnte bei 10 dieser Embryonen Spina bifida beobachtet werden. Zu späteren Stadien konnten keine anatomischen oder morphologischen Auffälligkeiten beobachtet werden. Einige doppelt transgene Tiere wurden lebend geboren.

## 2.6.2 **Doppelt transgene Embryonen exprimierten zwei transgene *goosecoid*-Transkripte**

Um auszuschließen, dass die beobachtete geringe Penetranz des Phänotyps in den doppelt transgenen Embryonen, mit einer fehlenden oder unvollständigen Transkription des Transgens in Verbindung gebracht werden kann, wurden doppelt transgene Embryonen auf ihre transgene *goosecoid*-Expression hin untersucht.

Die Analyse der Expression des aktivierten *gossecoid*-Transgens auf molekularer Ebene zeigte zwei mRNA Transkripte in den doppelt transgenen Mäusen. Dazu wurde polyadenylierte RNA von doppelt transgenen Embryonen der Tage E8.5 und E10.5 isoliert. Durch reverse Transkription wurde cDNA hergestellt und diese in einer semiquantitativen PCR Reaktion mit spezifischen Oligonucleotiden amplifiziert. Ein Primer stammte aus der *goosecoid*-Sequenz, der andere aus dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors. Es konnte ein spezifisches Produkt der zu erwartenden Größe von 277 bp amplifiziert werden. Zusätzlich wurde ein zweites, um 30 bp kürzeres spezifisches Amplifikationsprodukt beobachtet. Das in Abb. 21A dargestellte Experiment zeigt, dass doppelt transgene 8.5 Tage alte Embryonen entweder das 277 bp- (Embryo #1) oder das kleine Transgen-Transkript (Embryonen #2 und #3) exprimierten. In Wildtyp-Embryonen konnte erwartungsgemäß kein PCR Produkt amplifiziert werden.

Am Tag E10.5 isolierte Embryonen, welche die phänotypischen Missbildungen des cranialen Neuroektoderms aufwiesen, zeigten bevorzugt die Transkription des kleinen Transgen-Transkripts (in Abb. 21B gezeigt). Wildtyp-Embryonen und solche, die lediglich das Transgenkonstrukt aber nicht das *CRE*-Enzym Transgen trugen, wiesen in keinem Falle eine Transgen-Transkription auf.



**Abb. 21 Expression von zwei transgenen *gooseoid* Transkripten in doppelt transgenen Embryonen.**

Zur Analyse der transgenen *gooseoid* Transkription wurde polyadenylierte RNA aus doppelt transgenen Embryonen (E8.5 und E10.5) isoliert, durch reverse Transkription cDNA hergestellt und diese in einer semiquantitativen PCR-Reaktion mit spezifischen Primer amplifiziert. Zur Amplifikation der transgenen *gooseoid*-Transkription stammte ein Primer aus der *gooseoid*-Sequenz, der andere aus dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors (*gsc-bGHpA*; Primerkombination 4 siehe 2.6.3).

(A) Zwei transgene *gooseoid* Transkripte wurden in doppelt transgenen Embryonen am Tag E8.5 exprimiert. Embryo #1 tg/cre zeigte ein Produkt mit der erwarteten Größe von 277 bp (großes Transkript) wie auch ein um 30 bp kleineres Transkript (247 bp; kleines Transkript), wohingegen die Embryonen #2 tg/cre und #3 tg/cre bevorzugt das kleine Transkript aufwiesen.

(B) In 10.5 Tage alten Embryonen, die einen Phänotyp zeigten, ließ sich im Embryo #6 tg/cre das kleine Transkript beobachten. Embryo #7 tg/cre wies dagegen beide transgene *gooseoid* Transkripte auf.

Die klonierten Transkripte sowie das Transgenkonstrukt dienten als Positiv-, cDNA des Wildtyps und Wasser als Negativkontrolle. Um genomische DNA als Kontaminationsquelle auszuschließen, wurde eine sogenannte  $-RT$  Reaktion (ohne das RT-Enzym) parallel durchgeführt. HPRT- (Hypoxanthinribosyltransferase-Gen) Expression diente als Ladekontrolle. kT= kleines Transkript; gT= großes Transkript; tg/cre= doppelt transgen.

Da das Vorhandensein des kleinen Transkripts unerwartet war, aber zugleich höchst spezifisch erschien, wurden beide RT-PCR Produkte kloniert und anschließend sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen des kleinen und des großen Transkripts mit der des Transgenkonstrukts ist in Abb. 22 dargestellt. Es zeigte sich eine vollständige Übereinstimmung der ersten 120 bp, die für das Exon 3 in der *gooseoid*-Sequenz kodieren. Die Ursache der Größenunterschiede beider Transkripte befand sich also nicht in der kodierenden *gooseoid* Sequenz.

Die Abfolge der letzten 114 Basenpaare, welche das 5`Ende des Polyadenylierungssignal repräsentieren, ist ebenfalls in allen drei Sequenzen identisch. Allerdings fehlten die ersten acht Basenpaare der Polyadenylierungskassette im kleinen Transkript. Dies hatte keinen Einfluss auf die Polyadenylierung des kleinen Transkripts. Die Tatsache, dass nur polyadenylierte RNA zur Herstellung der analysierten cDNA diente, bewies die Funktionalität der Polyadenylierungskassette im kleinen Transkript. Die zwischen dem Stopcodon der kodierenden *gooseoid*-Sequenz und der des Polyadenylierungssignals liegenden Basenpaarabfolge wich im kleinen Transkript stark von der des großen Transkripts bzw. der des Transgenkonstrukts ab. Dieses intermediäre Fragment, das von Restriktionsschnittstellen flankiert ist, repräsentiert in Teilen die Vektorsequenz des pBluescript II KS-Plasmids, das zur Klonierung des Transgenkonstrukts verwendet wurde.

PCR-Amplifikation des transgenen *gooseoid* aus genomischer DNA (siehe unter 2.6.3) zeigte in allen Fällen nur ein Produkt der Länge von 277 bp. Mesodermal differenzierte Zellen des ES-Zellklons #2 exprimierten nach Doppeltransfektion mit dem *Cre*-Expressionsplasmids ebenfalls zwei *gooseoid*-spezifische Transkripte der Länge 277 bp bzw. 247 bp (nicht gezeigt). Eine Untersuchung der genomischen DNA

dieser Zellen ergab jedoch nur die Amplifikation des großen Transkripts (nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die doppelt transgenen Embryonen zwei transgene *gooseoid*-Transkripte exprimierten, wobei eines die erwartete Größe hatte, das andere jedoch kleiner war. Der Befund, dass Embryonen die einen missgebildeten Phänotyp hatten, entweder das zu erwartende und zusätzlich auch das kleinere Transkript oder nur das kleinere Transkript aufwiesen, schliesst eine Korrelation zwischen dem Auftreten des Phänotyps und dem zweiten Transgen-Transkript aus. Das unvollständige Auftreten des Phänotyps ließ sich also nicht durch fehlende Transgenexpression erklären.

```

kT      ...AGAAGCGATC CTCCTCGGAG GAGTCAGAAA ACGCCGAGAA GTGGAACAAG
gT      ...AGAAGCGATC CTCCTCGGAG GAGTCAGAAA ACGCCGAGAA GTGGAACAAG
pTgsc  ...AGAAGCGATC CTCCTCGGAG GAGTCAGAAA ACGCCGAGAA GTGGAACAAG
  
```

```

kT      ACGTCCTCAA AAGCCTCGCC GGAGAAGAGG GAAGAGGAAG GTAAAAGCGA
gT      ACGTCCTCAA AAGCCTCGCC GGAGAAGAGG GAAGAGGAAG GTAAAAGCGA
pTgsc  ACGTCCTCAA AAGCCTCGCC GGAGAAGAGG GAAGAGGAAG GTAAAAGCGA
  
```

```

kT      TTTGGACTCG GACAGCTGA .....Cg GCCTCGGCCC TCGAG .....
gT      TTTGGACTCG GACAGCTGAG AATTC CTGCA GCCCGGCCGC TCGAGCATGC
pTgsc  TTTGGACTCG GACAGCTGAG AATTC CTGCA GCCCGGCCGC TCGAGCATGC
          EcoRI   PstI                               XhoI   SphI
  
```

```

kT      .TCTAGABGG CCCgtTTaaA cc..... ..... C3CTGA
gT      ATCTAGABGG CCCATTCTA TAGTGTCAAC TAAATGCTAG AGCTC3CTGA
pTgsc  ATCTAGABGG CCCATTCTA TAGTGTCAAC TAAATGCTAG AGCTC3CTGA
          XbaI   ApaI                               SacI
  
```

```

kT      TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCCTC
gT      TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCCTC
pTgsc  TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCCTC
  
```

```

kT      CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CAAGGGCGAA TTCGTTTA...
gT      CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CAAGGGCGAA TTCGTTTA...
pTgsc  CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CAAGGGCGAA TTCGTTTA...
  
```

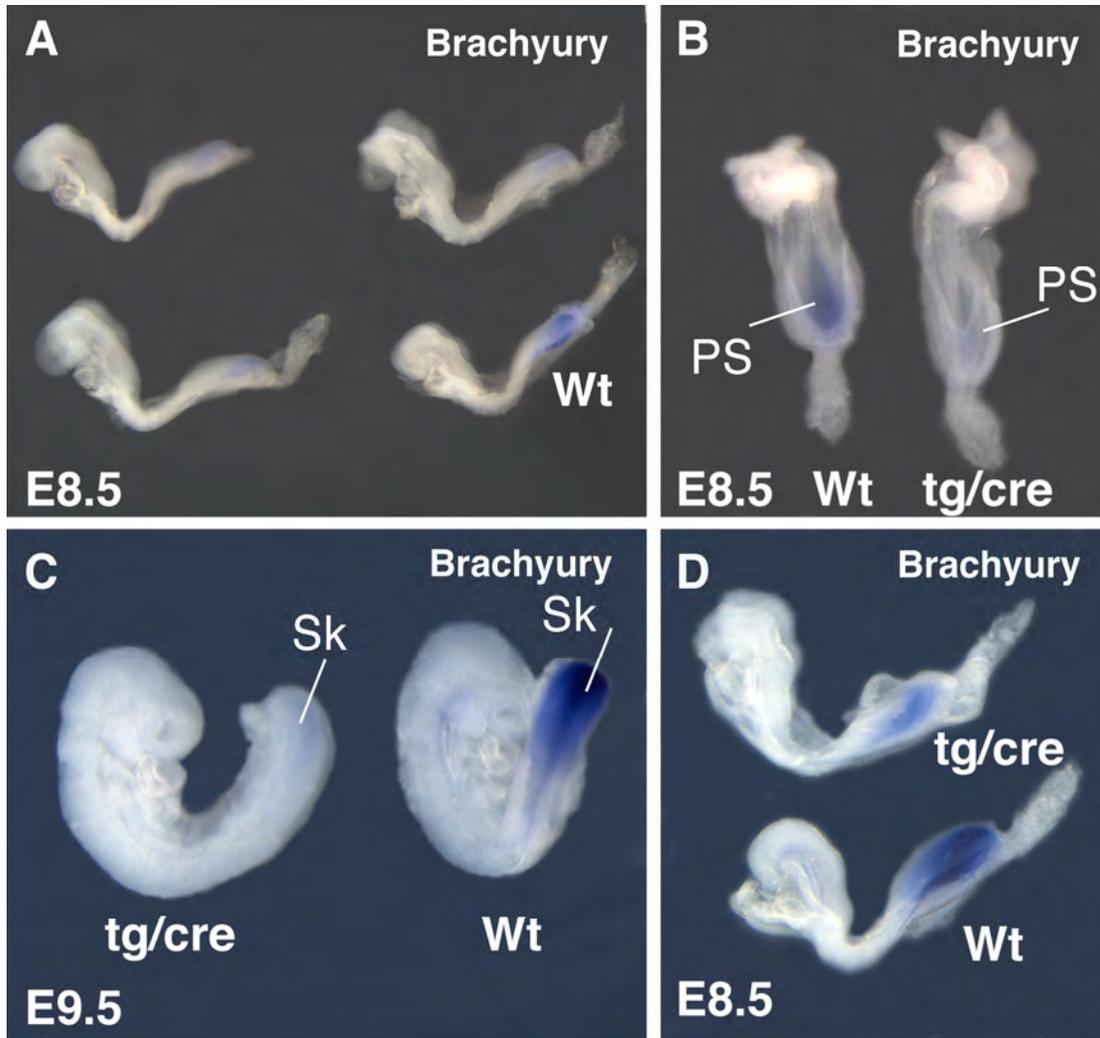
**Abb. 22 Vergleich der Sequenzen der beiden Transkripte und des Transgenkonstrukts.**

Die DNA-Sequenzen des kleinen (kT) und des großen Transkripts (gT) wurden mit der des injizierten Transgenkonstrukts verglichen. Rote Buchstaben beschreiben das 3`Ende der *goosecoid*-Sequenz, blaue das 5`Ende des Polyadenylierungssignal (bGH-pA) und schwarze die Vektorsequenz. Die Umrandungen deuten Schnittstellen für Restriktionsenzyme an. Unterschiede der Basenabfolge in der kT-Sequenz im Vergleich zu den beiden anderen Sequenzen sind mit Kleinbuchstaben markiert. Beide transgene *goosecoid*-Transkripte besaßen die komplette *goosecoid*-Sequenz und das Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors.  
Stop= Stopcodon.

## **2.7 Analyse von Wechselwirkungen mit anderen embryonalen Markergenen in doppelt transgenen Embryonen**

### **2.7.1 Repression der endogenen *Brachyury*-Transkripte in doppelt transgenen Embryonen**

Die Repression von *Brachyury* mRNA Transkription durch das *GOSSECOID* Protein in Maus ES-Zellen ließ vermuten, dass in doppelt transgenen Embryonen die endogene *Brachyury*-Expression verändert sein könnte. Deshalb wurden doppelt transgene Embryonen der Embryonalentwicklung E8.5 und E9.5 isoliert und mit einer *Brachyury*-spezifischen Sonde in einer *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat untersucht. Das *Brachyury*-Gen wird in der normalen Maus zu diesen Zeitpunkten im gesamten Mesoderm des posterioren Primitivstreifens exprimiert (Herrmann et al., 1990). Die *Brachyury*-Expression in den doppelt transgenen Embryonen war reduziert (Abb. 23). Am Tag E9.5 konnte der Verlust der *Brachyury*-Transkription am eindrucksvollsten beobachtet werden (Abb. 23C). Die zuvor in ES-Zellen beobachtete Repression des *Brachyury*-Promotor-Reporterkonstrukts durch *GOOSECOID* konnte also auch *in vivo* in *goosecoid* missexprimierenden Embryonen bestätigt werden.



**Abb. 23 Repression der endogenen *Brachyury*-Expression in doppelt transgenen Embryonen.**

Nachweis der *Brachyury*-Expression *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat mit einer *Brachyury*-spezifischen Sonde.

(A) Laterale Ansicht von Embryonen am Tag E8.5. Doppelt transgene Embryonen zeigten deutlich verminderte endogene *Brachyury*-Expression im gesamten Primitivstreifen.

(B) Ventrale Ansicht zweier Embryonen aus (A).

(C) Doppelt transgener Embryo und Wildtyp-Embryo am Tag E9.5 in lateraler Sicht. Der doppelt transgene Embryo zeigte eine deutliche Verminderung der endogenen *Brachyury*-Expression im naszierenden Mesoderm der Schwanzknospe.

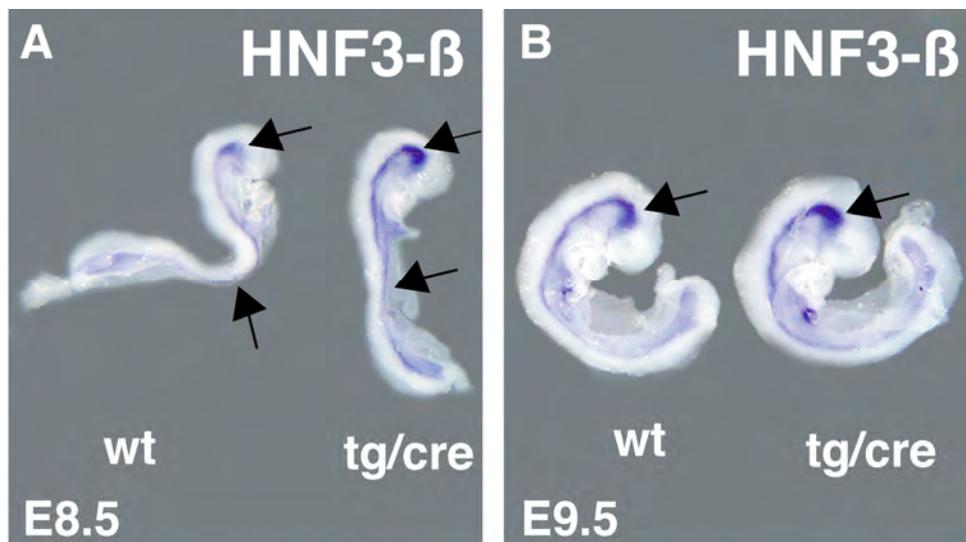
(D) Doppelt transgener Embryo und Wildtyp-Embryo am Tag E8.5 in lateraler Sicht. Der doppelt transgene Embryo wies eine deutliche Verminderung der endogenen *Brachyury*-Expression im naszierenden Mesoderm des Primitivstreifen auf.

PS= Primitivstreifen, Sk= Schwanzknospe.

## 2.7.2 Erhöhte Expression des *Hnf-3*-Gens in doppelt transgenen Embryonen

Filosa et al., 1997, wiesen in ihrer Arbeit eine genetische Interaktion von *gooseoid* und *Hnf-3* (*hepatic nuclear factor-3*) nach, die sich in Embryonen vom Genotyp *gooseoid*<sup>-1</sup>/*Hnf-3*<sup>+/-</sup>, u. a. in einem stark verkleinerten Vorderhirn äusserte. Grund hierfür war der Verlust der *Hnf-3*-Transkription in Zellen des Chordamesoderms und im ventralen Vorderhirn. *GOOSECOID* ist somit verantwortlich für die endogene *Hnf-3*-Expression in anterioren Kopfstrukturen während der Embryonalentwicklung.

Um diese Wechselwirkung in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen zu untersuchen, wurden doppelt transgene Embryonen der Entwicklungsstadien E8.5 und E9.5 isoliert und mit einer *Hnf-3*-spezifischen Sonde in einer *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat hybridisiert. In *gooseoid* missexprimierenden Embryonen zeigte sich eine generelle erhöhte *Hnf-3*-Expression im Bereich des ventralen Vorderhirns, in den Zellen der Chorda und des Primitivstreifens (Abb. 24A+B).



**Abb. 24 Erhöhte endogene Expression des Gens des Transkriptionsfaktors *HNF-3* in doppelt transgenen Embryonen.**

Nachweis der *Hnf-3*-Expression *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat mit einer *Hnf-3*-spezifischen Sonde.

Die doppelt transgenen Embryonen wiesen eine generell erhöhte *Hnf3*-Expression in der ventralen Grundplatte (Pfeil), in der Chorda (Pfeil) und im Primitivstreifen auf.

(A) Embryonen am Tag E8.5, laterale Ansicht.

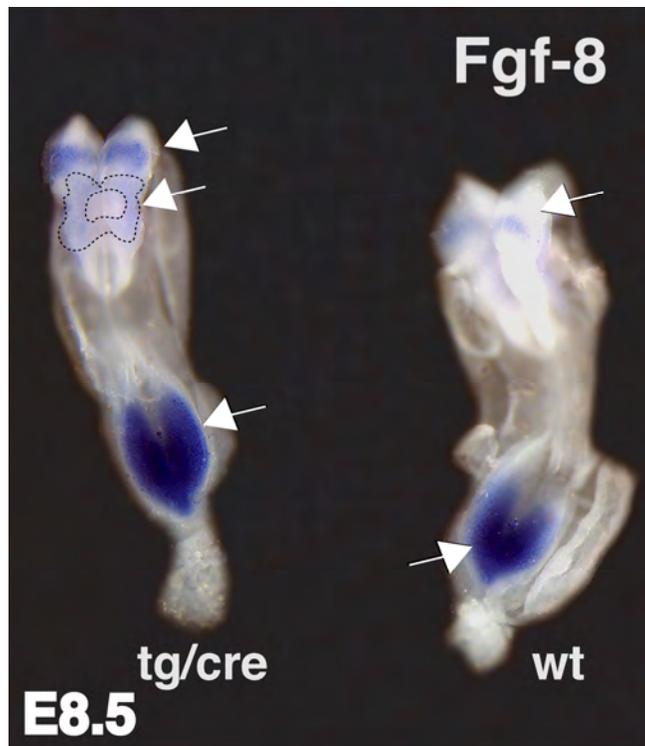
(B) Embryonen am Tag E9.5, laterale Ansicht.

tg/cre= doppelt transgen; Wt= Wildtyp.

**2.7.3 Die *Fgf-8*-Genexpression ist in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen erhöht**

Neben *HNF-3*, konnte auch für *FGF-8* (*fibroblast growth factor-8*) eine genetische Interaktion mit *GOOSECOID* gezeigt werden. Der Wachstumsfaktor *FGF-8* ist am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung der Maus in mesodermalen Zellen des Primitivstreifens, im zukünftigen Vorderhirn und in Zellen an der Mittel-/Hinterhirngrenze präsent (Crossley und Martin, 1995). Doppelt mutante Embryonen (Genotyp *gooseoid*<sup>-/-</sup>/*Hnf-3*<sup>+/-</sup>) wiesen am Tag E8.75 eine verminderte endogene *Fgf-8*-Genexpression in der Vorderhirn-Region auf, d. h. *GOOSECOID* spielt eine - direkte oder indirekte - Rolle bei der Regulierung der Transkription des *Fgf-8*-Gens (Filosa et al., 1997).

Um *gooseoid* missexprimierenden Embryonen auf eine veränderte *Fgf-8*-Expression zu untersuchen, wurde eine *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat mit einer spezifischen *Fgf-8*-Sonde durchgeführt. In den Embryonen am Tag E8.5 wurde eine generell verstärkte *Fgf-8*-Expression im ventralen Vorderhirn bzw. Diencephalon (nicht gezeigt), in der Mittel-/Hinterhirngrenze und in mesodermalen Primitivstreifenzellen nachgewiesen. Eine zusätzlich ektopische *Fgf-8*-Expression konnte im Bereich des Hinterhirns detektiert werden (siehe Abb. 25).



**Abb. 25 Die Expression des *Fgf-8*-Gens ist in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen erhöht.**

Nachweis der *Fgf-8*-Expression *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat mit einer *Fgf-8*-spezifischen Sonde. Der doppelt transgene Embryo zeigte eine erhöhte *Fgf-8*-Genexpression im naszierendem Mesoderm des Primitivstreifens und in der Mittel-/Hinterhirnregion (Pfeile). Die schwarze Umrandung deutet auf eine ektopische *Fgf-8*-Genexpression im Bereich des Hinterhirns.

tg/cre= doppelt transgen; Wt= Wildtyp.

## 2.8 Generalisierte Überexpression eines *gooseoid*-Transgens in chimären Embryonen

Zur Überprüfung der Spezifität des beobachteten NTD-Phänotyps wurde ein *gooseoid*-Überexpressionsexperiment in transient chimären Mausembryonen durchgeführt.

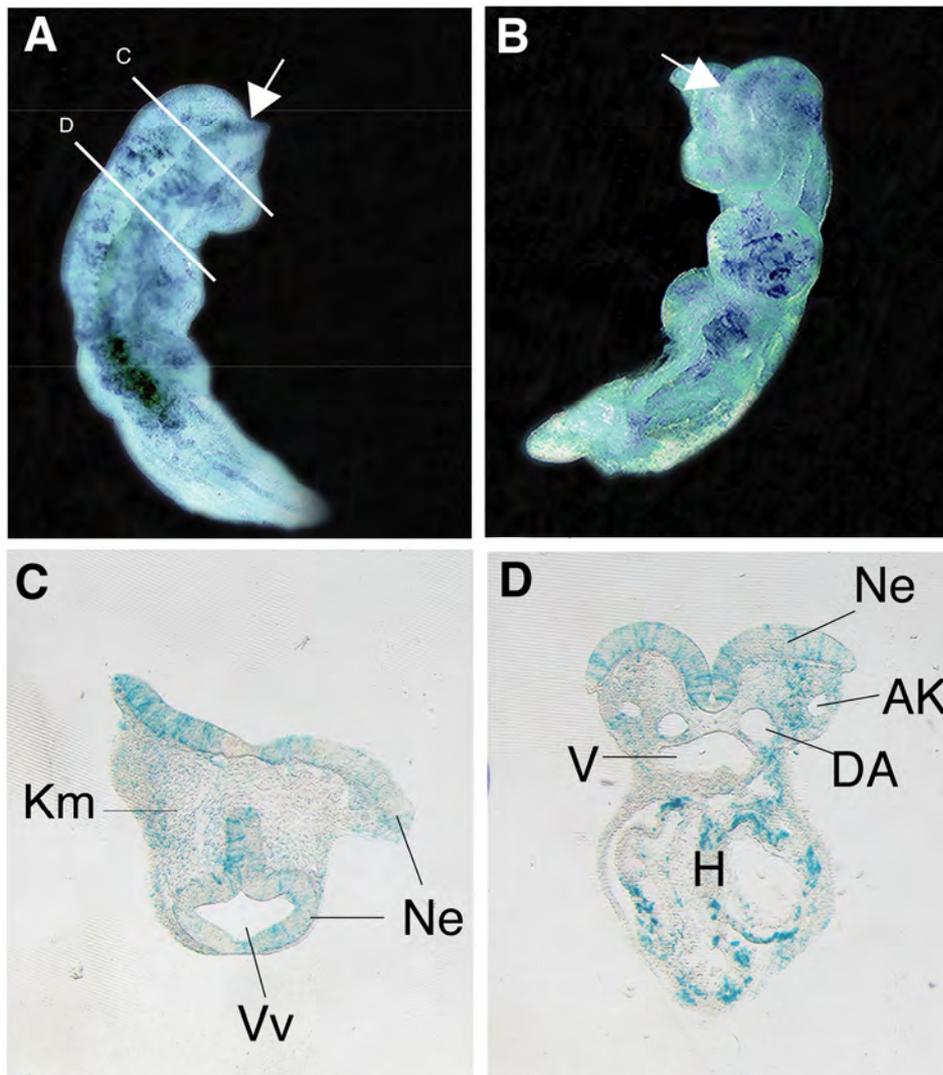
Dieses Experiment basierte auf der Pluripotenz von ES-Zellen. Nach Injektion in Blastozysten können sich diese Zellen in den Embryo integrieren. Dieser chimäre Embryo besteht somit aus einer Mischung aus eingebrachten ES-Zellen und Wirtszellen. Durch genetische Manipulation der ES-Zellen lassen sich während der Entwicklung neben zellautonomen Effekten auch Wechselwirkungen mit den

Wirtszellen analysieren. Zur Unterscheidung von Wirtszellen und transgenen ES-Zellen im Embryo dient eine Markierung der ES-Zellen, wie etwa die Transfektion eines Markergens.

Zur Überexpression von *gooseoid* in chimären Embryonen wurden transgene ES-Zellen mit einem *gooseoid*-Expressionskonstrukt transfiziert. Die zusätzliche Anwesenheit einer LacZ-Markergenkassette, erlaubte das Detektieren der transgenen Zellen nach einer Farbreaktion im Ganzpräparat. Dazu wurden in ES-Zellen stabil ein *gooseoid*-Expressionsplasmid und ein LacZ-Markergenkonstrukt ko-transfiziert. Die Sequenz des Ubiquitin-Promotors kontrollierte die Expression in beiden Konstrukten. Dies sollte die ubiquitäre Expression in den Chimären gewährleisten. ES-Zellklone konnte durch PCR-Analyse als transgen charakterisiert werden (nicht gezeigt), d. h. beide Expressionsplasmide waren stabil in das Genom integriert. Durch Injektion dieser ES-Zellklone in Blastozysten wurden chimäre Embryonen hergestellt.

Chimäre Embryonen wurden am Tag E9.5 und E10.5 isoliert und auf phänotypische Veränderungen analysiert. Von 27 untersuchten chimären Embryonen wiesen 22 (81%) einen Defekt des Neuralrohrschluss auf. Die Missbildungen variierten von kleineren Öffnungen im Bereich des zukünftigen Vorder-, Mittel- und Hinterhirns bis zum völligen Ausbleiben des Neuralrohrschluss im Bereich des zukünftigen Vorderhirns (Exencephalie) (nicht gezeigt). Zusätzlich wurde in einigen Chimären auch Spina bifida beobachtet (nicht gezeigt). Desweiteren konnten auch Embryonen isoliert werden (2 von 12 untersuchten chimären Embryonen), die entlang der cephalo-caudalen Achse ab dem Bereich des zukünftigen Mittelhirns ein offenes Neuralrohr aufwiesen. Dieser Neuralrohrschlussdefekt wird als Craniorachischisis beschrieben. In Abb. 26 ist ein solcher missgebildeter Embryo nach einer LacZ-Farbreaktion im Ganzpräparat dargestellt. Das craniale Neuralrohr im Bereich des Vorderhirns war geschlossen, doch ab der Vorder-/Mittelhirngrenze (Pfeile in Abb. 26A+B) klafften die Neuralwülste auseinander. In histologischen Schnitten konnten die blaugefärbten transgenen ES-Zellen sowohl im Neuroepithel der Neuralwülste als auch in anderen Geweben detektiert werden (Abb. 26C+D).

Transgene und Wildtyp-Zellen waren im chimären Embryo gleich verteilt und besaßen somit keine Präferenz ein bestimmtes Gewebe zu besiedeln. In keinem Falle zeigten chimäre Kontroll-Embryonen, d. h. stabil das LacZ-Markergen exprimierend, morphologische oder anatomische Auffälligkeiten (nicht gezeigt).



**Abb. 26 Neuralrohrverschlussdefekte nach genereller Überexpression von *gooseoid* in chimären Embryonen.**

Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit dem Substrat X-gal im Ganzpräparat eines chimären Embryo. Dieser Embryo am Tag E10.5 zeigte eine Missbildung des Neuralrohres.

(A+B) Die Schnittebenen von (C+D) sind markiert. Pfeile deuten Vorder-/Mittelhirngrenze an, caudal dieser Region blieb das Neuralrohr unverschlossen (Craniorachischisis). (A) Dorsale Ansicht. (B) Frontale Ansicht.

(C+D) Transversale Schnitte zeigen das unverschlossene Neuralrohr im Bereich des Mittel- bzw. Hinterhirn. Blaufärbung der Zellen deutet auf  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, d. h. dies sind die eingebrachten transgenen ES-Zellen, die das LacZ-Markergen zusammen mit dem *gooseoid*-Überexpressionskonstrukt exprimierten. Nicht gefärbte Zellen stellen Wildtyp-Zellen dar. Transgene und nicht transgene Zellen erschienen mehr oder weniger gleich verteilt im chimären Embryo.

AK= Anteriore Kardinalvene; DA= Dorsale Aorta; H= Herz; Km= Kopfmesenchym; Ne= Neuroektoderm; V= Vorderdarm; Vv= Vorderhirnventrikel.

Der Phänotyp in *gooseoid* überexprimierenden Chimären wies dieselben Missbildungen des Neuralrohres auf, wie sie auch in den doppelt transgenen Embryonen beobachtet wurden. Zusätzlich zeigten chimäre Embryonen Craniorachischisis und eine deutlich erhöhte Penetranz des NTD-Phänotyps.



### 3 Diskussion

Ausgangspunkt des Projekts war die Frage, wie der Primitivstreifen im Gastrula-Mausembryo regionalisiert wird, d. h. wie regionenspezifischen Genprogramme entstehen und funktionieren. Dazu wurde eine transgene Maus hergestellt, bei der der Transkriptionsfaktor *GOOSECOID* anormal verteilt gebildet wird. Zusätzlich zu seiner normalen Ausprägung am Vorderende wurde er konditional im gesamten Primitivstreifen unter Kontrolle des *Brachyury*-Promotors aktiviert. Erwartet wurden gravierende Störungen der normalen Genprogramme, die sich durch eine veränderte Expression von embryonalen Markergenen sowie phänotypisch durch Fehlentwicklungen der Embryonen äußern sollten.

Insbesondere wurden frühe phänotypische Defekte in diesen Embryonen erwartet als Resultat zellautonomer Veränderungen der Zellschicksale, eines veränderten Zellwanderungsverhaltens und veränderter Induktionsereignisse während der Gastrulation.

Überraschenderweise führte die *goosecoid*-Missexpression in diesen Embryonen zu morphologischen und anatomischen Auffälligkeiten, die nicht diesen Erwartungen entsprachen. Die veränderte molekulare Situation durch die Missexpression des *goosecoid*-Gens im Primitivstreifen während des frühen Gastrulationsprozesses führte erst in späteren Entwicklungsstadien (E9.5 und E10.5) zu einem phänotypischen Effekt (siehe Abb. 19). Betroffen war das craniale Neuralrohr, das sich nicht vollständig verschloss. In einigen Fällen konnte zusätzlich Spina bifida beobachtet werden. Diese unerwarteten und komplexen phänotypischen Effekte sind trotzdem sehr interessant. Da die Missexpression konditional erfolgte, können die in dieser Arbeit erzeugten transgenen Tiere für eine tiefgehende genetische Analyse des Neuralrohrverschlusses herangezogen werden. Darüberhinaus verspricht die weitergehende molekulare Analyse der Gastrulationsvorgänge Aufschlüsse über

Musterbildungs- und Zellwanderungsprozesse im Gastrula-Embryo, die in normalen Embryonen nicht direkt analysiert werden können.

Die molekulare Analyse führte zu ersten Hinweisen auf die veränderte Situation in den doppelt transgenen Embryonen nach Aktivierung von *gooseoid* im Primitivstreifenmesoderm. Diese experimentellen Untersuchungen wurden allerdings erschwert durch die limitierte Anzahl der doppelt transgenen Tiere. Beide Mauslinien, d. h. *gooseoid*-transgene und *Cre*-transgene Tiere trugen zunächst nur heterozygot das Transgen. Erst im Laufe der Arbeit waren durch entsprechende Zucht homozygote Tiere in ausreichender Anzahl vorhanden, so dass alle Embryonen aus Verpaarungen beider Linien beide Transgene aufwiesen.

### **3.1 Expressionsmuster des endogenen und transgenen *gooseoid*-Gens**

Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in transgenen Embryonen vor der Aktivierung von *gooseoid* durch die *CRE*-Rekombinase bestätigte das erwartete Expressionsmuster des Transgens im gesamten Primitivstreifenmesoderm (siehe Abb. 18). Allerdings ließ sich keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu Beginn der Primitivstreifenbildung in den Stadien E6.5-7.0 detektieren, obgleich das endogene *Brachyury*-Gen zu diesen Zeitpunkten exprimiert wird (Herrmann, 1992). In 7.5 Tage alten Embryonen konnte die Expression des Transgens zum ersten Mal detektiert werden. Das *Brachyury*-Promotorelement in dem Transgenkonstrukt ist demnach erst zu diesem Entwicklungsstadium in den Mäusen aktiv. Diese Beobachtung wurde von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (persönliche Mitteilung von Dr. Gail Martin, San Francisco).

Die starke  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität am Tag E8.5 im posterioren Primitivstreifen ließ die Annahme zu, dass das transgene *goosecoid* nach seiner Aktivierung ebenfalls dort zu lokalisieren sein sollte. Trotz zahlreicher Versuche ließ sich keine ektopische *goosecoid*-Expression im posterioren Primitivstreifenmesoderm der doppelt transgenen Embryonen am Tag E8.5 nachweisen. Auch die Analyse früherer und späterer Entwicklungsstadien führte zu keiner erfolgreichen Detektion von *goosecoid* mRNA Transkripten im posterioren Mesoderm. Unter Umständen liegen die transgenen mRNA Transkripte, aufgrund der Autorepression des Transgens, unterhalb der Detektionsgrenze einer *in situ* Hybridisierung im Ganzpräparat. Eine Wiederholung dieser Experimente mit einer radioaktiv markierter Sonde könnte den Nachweis der ektopischen *goosecoid*-Expression in der posterioren Region des Primitivstreifens erbringen.

Die Beobachtung der Reduktion der endogenen *Brachyury*-Expression im Primitivstreifenmesoderm in den doppelt transgenen Embryonen läßt allerdings den Schluss zu, dass auch eine moderate ektopische *goosecoid*-Expression zur nachhaltigen Repression von *Brachyury* führt (siehe Abb. 23). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die *goosecoid* missexprimierenden posterioren mesodermalen Zellen ein verändertes Zellwanderungsverhalten besitzen, und wie die endogenen *goosecoid* exprimierende Zellen nach anterior wanderten. Ein Verfolgen des transgenen *GOOSECOID*-Proteins in den missexprimierenden Embryonen wird erschwert, da trotz großer Anstrengungen bisher kein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Daher wurde anfangs versucht, das Transgenkonstrukt so zu modifizieren, dass es am aminoterminalen Ende von *goosecoid* mit einer sechsfachen Myc-tag-Sequenz fusioniert wurde. Das Myc-*goosecoid* Fusionsprodukt wurde nach der Klonierung auf seine Fähigkeit zur Ausbildung von Sekundärachsen in *Xenopus*-Embryonen überprüft. Da dieses Konstrukt dazu nicht in der Lage war, wurde dieser Ansatz aufgegeben. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde berichtet, dass eine solche Modifikation des *GOOSECOID*-Proteins sogar zu einem antimorphischen *GOOSECOID*-Protein führte, welches in Missexpressions-

experimenten im frühen Frosch-Embryo Gastrulationsbewegungen inhibierte und in Defekten der Körperachse resultierte (Ferreiro et al., 1998).

Die Unterscheidung zwischen endogenem und transgenem *gooseoid* auf der Ebene des Transkripts sollte im Prinzip dennoch möglich sein durch *in situ* Hybridisierung mit einer 3' nicht-translatierten Sequenz von *gooseoid* (endogenes Transkript) bzw. des Polyadenylierungssignals (bGH-pA) (transgenes Transkript). Nach Etablierung der Technik einer Doppel-*in situ* Hybridisierung könnte eine Unterscheidung möglich sein. Die geringe Expressionsmenge des transgenen *gooseoid* in den bislang durchgeführten *in situ* Hybridisierungs-Experimenten läßt vermuten, dass ein solches Experiment mit nicht radioaktiv markierten Sonden stets schwierig sein wird.

Ein experimenteller Ansatz, direkt das veränderte Zellwanderungsverhalten der *gooseoid* missexprimierten Zellen zu beobachten wäre eine Migrationsstudie. Hierzu könnten Primitivstreifenexplantate aus doppelt transgenen und Wildtyp Embryonen *in vitro* auf Fibronectin bzw. Laminin beschichteten Gewebekulturschalen kultiviert werden und auf Unterschiede ihres Zellwanderungsverhalten untersucht werden.

In 8.5 Tage alten doppelt transgenen Embryonen konnte eine verstärkte *gooseoid* Expression in der Kopfregion nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). In histologischen Schnitten konnte diese *gooseoid* Expression im Neuroepithel des zukünftigen Diencephalon und der buccopharyngealen Membran des Vorderdarms lokalisiert werden (Siehe Abb. 18). Dies entspricht den Expressionsorten des endogenen *gooseoid*-Gens (Belo et al., 1998). Zusätzlich zur verstärkten Expression im ventralen Neuroepithel des zukünftigen Zwischenhirns konnte in der bislang durchgeführten vorläufigen Analyse eine ventro-laterale ektopische *gooseoid* Expressionsdomäne gezeigt werden.

In der normalen Embryonalentwicklung wandern mesentodermale Zellen aus dem Primitivknoten in cranialer Richtung und bilden die Chordaanlage. Einige dieser Zellen, die *gooseoid* exprimieren, wandern noch weiter nach anterior und formieren sich zum mesodermalen Anteil der Prächordalplatte. Dies läßt die Annahme zu, dass die *gooseoid* missexprimierenden Zellen im posterioren Primitivstreifen ihr Zellwanderungsverhalten veränderten, und statt den Primitivstreifen in posteriorer bzw. lateraler Richtung zu verlassen, nach anterior wanderten. Daraus könnte die Bildung einer verbreiterten Prächordalplatte in den doppelt transgenen Embryonen resultieren, was einen zellautonomen Effekt der *gooseoid* missexprimierenden Zellen darstellte.

Die Verbreiterung der prächordalen Platte konnte in den bislang nur vorläufigen experimentellen Untersuchungen in den doppelt transgenen Embryonen nicht nachgewiesen werden. Eine genaue Analyse mit embryonalen Markergenen und histologische Studien dieser Region verschiedener Entwicklungsstadien E8.0-9.0 könnten eine tatsächliche Verbreiterung der Prächordalplatte bestätigen. Als molekulare embryonale Markergene für den rostralen Anteil der Prächordalplatte, die direkt dem zukünftigen Vorderhirn unterliegt, wären *sonic hedgehog* (kodiert für das Signalmolekül *SONIC HEDGEHOG*), *Hnf-3* und *gooseoid* selbst zu nennen. Der restliche Anteil des cranialen axialen Mesentoderms (=Prächordalplatte) unterliegt dem zukünftigen Mittelhirn. Die exprimierten Gene der Transkriptionsfaktoren *LIM1* und *OTX2* könnten hier als embryonale Markergene dienen.

Eine anderer experimenteller Ansatz, eine Verbreiterung der Prächordalplatte in den doppelt transgenen Embryonen nachzuweisen, wären rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Die Zellen, die den mesodermalen Anteil der Prächordalplatte bilden, unterscheiden sich morphologisch in ihrer Zellform und durch den Besitz eines zentralen Ciliums von ihren benachbarten entodermalen Zellen (Sulik et al., 1994).

Die generell verstärkte *gooseoid*-Expression im ventralen Neuroepithel des zukünftigen Diencephalons und insbesondere die beobachtete ektopische ventrolaterale *gooseoid*-Expression lässt auf einen nicht-zellautonomen Effekt schliessen. Die mesentodermalen Zellen der Prächordalplatte beeinflussen das darüberliegende neurale Gewebe. Dieses Gewebe stellt die ventrale Seite des Neuralrohrs dar. Der Bereich der Prächordalplatte unterlegt somit die ventrale Seite des anterioren Neuralrohrs, aus dem sich das zukünftige Vorder- und Mittelhirn entwickeln wird. Die Prächordalplatte löst hier Induktionseignisse aus, und ist für die korrekte Musterbildung der zukünftigen Gehirnstruktur verantwortlich. Die Prächordalplatte, eine Struktur, die sich vom Organisator bzw. Primitivknoten ableitet, übt ihre Funktion durch die Abgabe von Signalstoffen aus die in horizontaler und in vertikaler Richtung auf benachbarten Zellen wirken können. Dies konnte in Experimenten an *Xenopus* und Hühnchen-Embryonen gezeigt werden (Sharpe und Gurdon, 1990; Storey et al., 1992; Ruiz i Altaba et al., 1993; Storey et al., 1995; Lumsden und Krumlauf, 1996). Neuere Erkenntnisse aus Studien in frühen Maus-Embryonen schlagen ein zweites Signalzentrum vor, das anteriore viszerale Entoderm, das zusätzlich zu den vom Primitivknoten abgeleiteten Strukturen dem Neuralrohr eine anteriore Identität verleihen soll (Thomas et al., 1996; Bielinska et al., 1999; Shawlot et al., 1999; Tam et al., 1999; Kimura et al., 2000; Knoetgen et al., 2000; Kinder et al., 2001; Perea-Gomez et al., 2001).

In der Zebrafischmutante *cyclops*, die zum Verlust der ventralen anterioren Hirnstrukturen führte, ist die *gooseoid*-Expression in den mesentodermalen Zellen reduziert und im darüberliegenden Neuroektoderm aufgehoben (Thisse et al., 1994). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Expression von *gooseoid* in der Prächordalplatte durch ein vertikales Induktionseignis zur Expression von *gooseoid* im darüberliegenden Neuroektoderm führt (Thisse et al., 1994). Die vermutete Verbreiterung der Prächordalplatte, und damit eine breitere *gooseoid* Expressionsdomäne in den doppelt transgenen Embryonen könnte somit die

beobachtete generell verstärkte und ektopische *gooseoid*-Expression im darüberliegenden Neuroepithel erklären.

Im Hühnchen-Embryo konnte in Transplantationsexperimenten gezeigt werden, dass *gooseoid* exprimierende Zellen die ektopische Expression von *gooseoid* in benachbarten Wirtszellen induzierten (Izpisua-Belmonte et al., 1993). Die ektopische *gooseoid*-Expression in dorsolateralen Neuroepithel könnte eine Konsequenz der verstärkten *gooseoid*-Expression im benachbarten ventralen Neuroektoderm sein.

Eine mögliche Auto-Induktion der *gooseoid*-Expression im Neuroepithel sollte nicht-zellautonomer Art sein. Dazu könnte *GOOSECOID* zu einer direkten, oder durch seine Repressorfunktion zu einer indirekten Aktivierung von Signalmolekülen führen. Diese Signalfaktoren würden von den mesentodermalen Zellen der Prächordalplatte bzw. der ventralen Neuroepithelzellen sezerniert und interagierten mit Rezeptoren der benachbarten Zellen des Neuroektoderms. Dies führte zu einer intrazellulären Signaltransduktion in diesen Zellen, was die Aktivierung der endogenen *gooseoid*-Expression in diesen Zellen bewirkte.

Organisatorspezifische Signalmoleküle wie *CHORDIN*, *NOGGIN* und *FOLLISTAIN*, die *GOOSECOID* induzieren können (Klingensmith et al., 1999; Bachiller et al., 2000), sind im anterioren Mesentoderm bzw. im anterioren Neuroepithel nicht exprimiert. Doch ein anderes sezerniertes Signalmolekül, das *SONIC HEDGEHOG*-Protein könnte hier eine Rolle spielen. Eine Aktivierung von *SONIC HEDGEHOG* durch *GOOSECOID*, vermutlich über eine synergistische Interaktion mit *HNF-3*, konnte im Mausembryo gezeigt werden (Filosa et al., 1997). Eine Expressionsanalyse von *sonic hedgehog* in doppelt transgenen Embryonen könnte einen weiteren Beweis der Interaktion zwischen *GOOSECOID* und *sonic hedgehog* im mesentodermalen bzw. neuroektodermalen Zellen liefern.

Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der *gooseoid*-Expression in der Prächordalplatte bzw. im darüberliegenden Neuroektoderm mit einer Funktion bei der

Morphogenese des Neuroektoderms lieferte die Analyse der *gooseoid knock-out* Mutation in der Maus. Diese Tiere zeigten eine abnormale Entwicklung des Chondrokraniums. Die Knochen Ethmoid und Praesphenoid, die die Mittellinie der Schädelbasis bilden, waren zu einer einzelnen Struktur verschmolzen (Belo et al., 1998). Unterhalb dieser Region liegen während der embryonalen Entwicklung die mesodermalen Zellen der Prächordalplatte (Kuratani et al., 1997). Die Missexpression von *gooseoid* könnte ebenfalls zu einer Veränderung im Chondrokranium der doppelt transgenen Embryonen führen, was in einer anatomischen Analyse dieser Embryonen zu überprüfen wäre.

### **3.1.1 Doppelt transgene Embryonen exprimierten zwei transgene *gooseoid* Transkripte**

Der Nachweis von zwei transgenen *gooseoid* Transkripten in doppelt transgenen Embryonen war unerwartet (siehe Abb. 21). Eine Sequenzanalyse ergab, dass beide die vollständige *gooseoid* DNA-Sequenz enthielten (siehe Abb. 22). Lediglich in der Basenabfolge zwischen der *gooseoid*- Sequenz und dem Polyadenylierungssignal wich die Sequenz des kleinen Transkript von der Sequenz des Transgenkonstrukts ab. Diese intermediäre Sequenz stellt die Vektorsequenz des zur Klonierung des Transgenkonstrukts verwendeten Plasmids dar. Zusätzlich fehlten die ersten acht Basenpaare der Polyadenylierungskassette im kleinen Transkript. Diese Abweichungen beeinflussten die korrekte Polyadenylierung des kleinen Transkripts nicht, da auch dieses Transkript in polyadenylierter RNA nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse beider Transkripte lassen den Schluss zu, dass beide zur Translation funktioneller *GOOSECOID* Proteine führen.

Auf genomischer Ebene, in den doppelt transgenen Embryonen und in mesodermal differenzierten transgenen ES-Zellen, konnte die korrekte Länge der Transgensequenz nachgewiesen werden. Diese Befunde legen den Schluss nahe,

dass es sich bei der Existenz des zweiten transgenen *gooseoid* Transkripts in den doppelt transgenen Embryonen um das Produkt einer post-transkriptionellen Modifikation der mRNA handelt.

Wichtig für die Interpretation der doppelt transgenen Embryonen ist, dass es keine Korrelation zu einem der beiden Transkripte und dem Auftreten des NTD-Phänotyps gab.

## **3.2 Einfluss der Expression des *gooseoid*-Transgens auf andere embryonale Regulationsgene**

### **3.2.1 Repression der endogenen *Brachyury* Transkription**

Eine Interaktion von *Brachyury* und *GOOSECOID* in *Xenopus* wurde 1997 von zwei Arbeitsgruppen gezeigt (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997). Das *GOOSECOID* Protein agiert vermutlich als Repressor der *Brachyury* Transkription. Die publizierten Daten legten eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors *GOOSECOID* an zwei putative Homöobox-Bindestellen in der *Brachyury*-Promotorsequenz nahe. Beide Gene werden bei der Primitivstreifenbildung während der Gastrulation zunächst in den präsumptiven mesodermalen Zellen gemeinsam exprimiert. Im späteren Gastrula-Embryo trennen sich die Expressionsdomänen beider Gene. *Brachyury* Transkripte sind in der Randzone, d. h. im ventralen und lateralen Mesoderm lokalisiert, wohingegen *gooseoid* ausschliesslich im dorsalen Mesoderm, der zukünftigen Prächordalplatte, exprimiert wird. Im Frosch wird über diesen Mechanismus die Expression von *Brachyury* im prächordalen Mesoderm durch *GOOSECOID* reprimiert (Artinger et al., 1997; Latinkic et al., 1997).

In embryonalen Stammzellen der Maus konnte die im Frosch berichtete Repression der *Brachyury*-Transkription durch *GOOSECOID* bestätigt werden. Die vergleichende

Promotorsequenzanalyse zwischen Maus und Frosch ergab, dass die publizierten putativen *GOOSECOID* Bindestellen im *Brachyury*-Promotor der Maus nicht konserviert sind (Boucher et al., 2000). Durch eine experimentelle Promotoranalyse in ES-Zellen konnte allerdings ein zwischen Maus und *Xenopus* konserviertes Promotorelement mit der Repression der *Brachyury* Transkription durch *GOOSECOID* auch im Maussystem in Verbindung gebracht werden. Dieses Element stellt eine Konsensus-Bindestelle (5`-ATTA-3`) für Proteine mit einer DNA-Bindestelle des *paired*-Typs in ihrer Homöoboxdomäne, wie z.B. *GOOSECOID*, dar (Boucher et al., 2000). Das Luziferase-Reportergergen Experiment (Abb. 10) in mesodermal differenzierten ES-Zellen zeigte, dass *GOOSECOID* seine Repressorfunktion über dieses Element im *Brachyury*-Promotors ausübt. Eine Mutation des Elements führte zum Verlust der Repression der Luziferaseaktivität. Durch mesodermale Differenzierung der ES-Zellen wird neben der *Brachyury*- auch die *goosecoid*-Expression induziert. Die beobachtete zweieinhalbfache Aktivierung des mutierten *Brachyury*-Promotors im Reportergergenkonstrukt könnte daher mit dem Verlust der Repression durch das endogene *GOOSECOID* in den Zellen erklärt werden.

Die Analyse der endogenen *Brachyury*-Expression in doppelt transgenen Embryonen bestätigte *goosecoid* in seiner Rolle als Repressor von *Brachyury in vivo*. In 8.5 und 9.5 Tage alten Embryonen ließ sich eine Reduktion der endogenen *Brachyury*-Expression im gesamten Primitivstreifenmesoderm beobachten (siehe Abb. 23). Dieser partielle Verlust der *Brachyury*-Expression führte in den doppelt transgenen Embryonen allerdings zu keinem Gastrulationsphänotyp. Die endogene *Brachyury*-Expression in der Chorda blieb wie erwartet unverändert, da das Transgen durch das verwendete *Brachyury*-Promotorelement nur im Primitivstreifen zur Ausprägung kommen konnte.

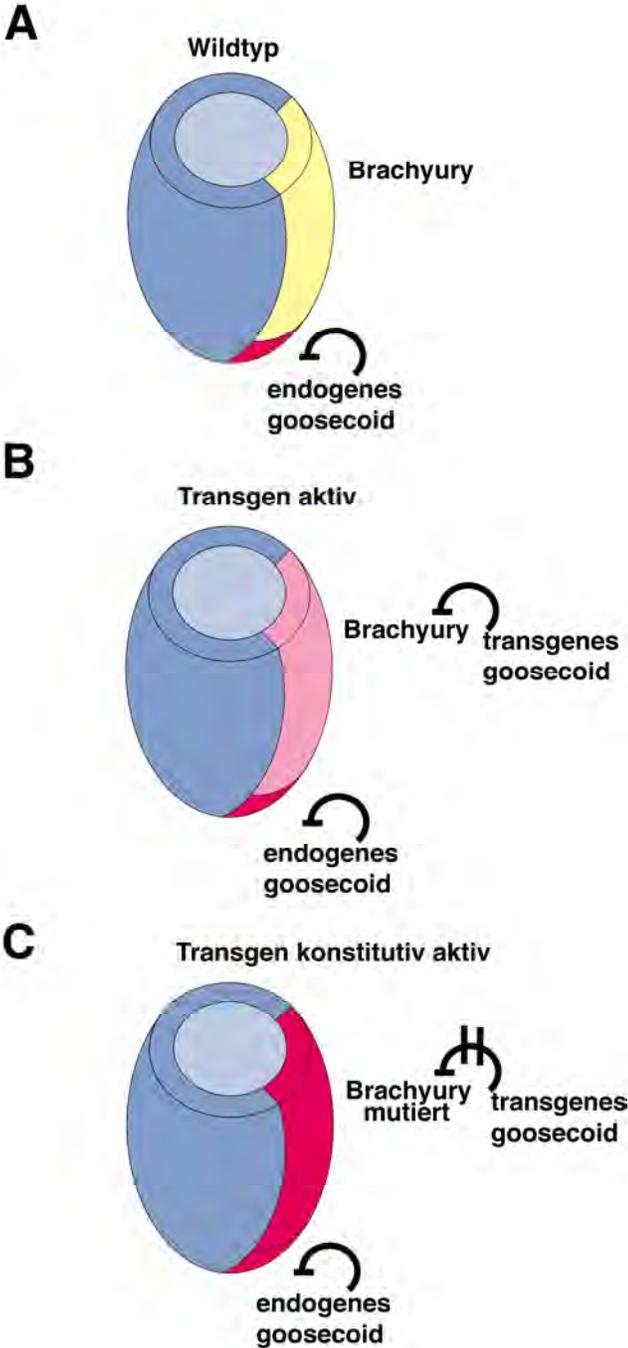
Die Deletion des *Brachyury*-Gens in der *Brachyury*-Mutation führt in der heterozygoten Situation durch Haplo-Insuffizienz zu einem verkürztem Schwanz der Tiere. Sind beide Genkopien ausgeschaltet, so resultiert dies in einen letalen

Phänotyp am Tag E10, verursacht durch das Ausbleiben der Allantoisbildung. Diese Embryonen weisen einen Verlust ihrer Chorda und sämtlicher posteriorer Rumpf- und Schwanzstrukturen auf. Die Chordaanlage wird zunächst angelegt, aber die Differenzierung zur Chorda bleibt aus (Herrmann und Kispert, 1994). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass das *Brachyury*-Gen Produkt für die korrekte Mesodermbildung während der Organogenese verantwortlich ist, jedoch für die frühe Mesodermentstehung keine essentielle Funktion besitzt. Die frühe Embryogenese verläuft auch ohne *Brachyury*-Expression normal und führt zu keiner Veränderung der Gastrulation (Herrmann, 1992). Dieser Befund könnte erklären, weshalb die verminderte *Brachyury* Expression im Primitivstreifenmesoderm der doppelt transgenen Embryonen zu keinem gestörten Gastrulationsphänotyp führte.

Die Beobachtung, dass homozygote *Brachyury* Mäuse in seltenen Fällen einen verzögerten Neuralrohrverschluss aufwiesen, eröffnete die Möglichkeit, dass die Ursache des spät veränderten Phänotyp der doppelt transgenen Tieren auf einer reduzierten *Brachyury* Transkription beruhte (Wilson et al., 1995). Da diese Effekte jedoch auf die *Brachyury* Funktion in der Chorda zurückzuführen sind (Beddington et al., 1992), und die Chordabildung in den doppelt transgenen Tieren unbeeinflusst war, scheint ein solcher Wirkmechanismus unbegründet zu sein.

Desweiteren wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen einem genetischen Polymorphismus des menschlichen *Brachyury* Locus (TIVS7-2) und Missbildungen des caudalen Neuralrohrs (Spina bifida) diskutiert. Eine statistische Untersuchung in europäischen Familien deutete darauf hin, dass ein Kind, dessen Eltern heterozygot das TIVS7-2 trugen, ein erhöhtes Risiko aufwiesen, Spina bifida zu entwickeln. Allerdings sind weitere Analysen mit einer größeren Anzahl von Familien mit NTD-Fällen nötig, um einen signifikanten Zusammenhang zwischen *Brachyury*-Gen und Spina bifida zu beweisen (Morrison et al., 1996; Shields et al., 2000). Die Sequenzanalyse des TIVS7-2-Allels deckte eine Punktmutation in der nicht kodierenden Basensequenz auf. Der molekulare Mechanismus dieser Mutation,

insbesondere die Frage, ob sich daraus ein Funktionsverlust des *Brachyury*-Gens ableiten lässt, der zu neuralen Missbildungen führen kann, ist bislang nicht geklärt.



**Abb. 27 Starke Missexpression des *goosecoïd* Transgens unter der Kontrolle des mutierten *Brachyury*-Promotors im Primitivstreifen.**

(A) Wildtyp-Embryo: Endogene *goosecoïd*-Expression im anterioren Primitivstreifen unterliegt einer Autorepression (dunkelrot). Endogene *Brachyury*-Expression im gesamten Primitivstreifen (gelb).

(B) Transgener Embryo: Moderate transgene *goosecoïd*-Expression im Primitivstreifen (hellrot). Transgenes *goosecoïd*-Gen reprimiert transgenen *Brachyury*- und endogenen *Brachyury*-Promotor. Endogene *goosecoïd*-Expression im anterioren Primitivstreifen unterliegt einer Autorepression (dunkelrot).

(C) Transgener Embryo: Starke Missexpression des transgenen *goosecoïd*-Gens im Primitivstreifen (dunkelrot). Mutierter transgener *Brachyury*-Promotor unterliegt nicht einer Autorepression durch das transgene *goosecoïd*-Gen. Endogene *goosecoïd*- und *Brachyury*-Expression werden weiterhin durch *goosecoïd* reprimiert.

Wichtig im Kontext mit der vorliegenden Arbeit war, dass in der Maus wie im Frosch die Repression des *Brachyury*-Gens durch das *GOOSECOID* Protein beobachtet wurde. In der doppelt transgenen Situation kommt es zu einer Autorepression, da das transgene *goosecoïd* seine transgene Expression über den transgenen *Brachyury*-Promotor reprimiert. Das Transgen sollte deshalb nur in einer moderaten Missexpression zu seiner Ausprägung kommen (Abb. 27B). Interessant wird daher die Herstellung einer zweiten transgenen Mauslinie sein, in der das Transgenkonstrukt eine Mutation der putativen *goosecoïd* Bindestelle im *Brachyury*-Promotorelement trägt. Dies sollte den Autorepressionsmechanismus unterbinden und zu einer starken ektopischen *goosecoïd*-Expression im gesamten Primitivstreifen führen (Abb. 27C).

### 3.2.2 Verstärkung der endogenen *Hnf-3*-Expression

Eine genetische Interaktion von *GOOSECOID* und einem anderen Transkriptionsfaktor, *HNF-3* (*Hepatic Nuclear Factor-3*), konnte in Experimenten mit doppelt mutanten Mäusen bewiesen werden (Filosa et al., 1998). Beide Gene sind während der embryonalen Entwicklung gemeinsam exprimiert. Mäuse in denen beide *goosecoïd* Allele und ein *Hnf-3* Allel (Genotyp: *goosecoïd*<sup>-/-</sup>/*Hnf-3*<sup>+/-</sup>) fehlten zeigten einen anderen Phänotyp als die Deletions-Mutationen der einzelnen Gene.

Die Analyse von 8.5 Tage alten doppel mutanten Embryonen wiesen Veränderungen in der Region des Vorderhirns auf. Diese Missbildung korrelierte mit dem Verlust der Expression von embryonalen Markergenen des cranialen Neuralrohres. *gooseoid* und *HNF-3* interagieren somit synergistisch und spielen dabei eine Rolle bei der korrekten Musterbildung des Neuralrohres während der normalen Entwicklung des Embryos (Filosa et al., 1998).

Daraufhin wurde das Expressionsmuster von *Hnf-3* in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen untersucht. Tatsächlich fanden sich erste Hinweise auf eine veränderte *Hnf-3*-Expression, die sich durch eine generelle Erhöhung der mRNA Transkripte in den endogenen Expressionsorten auszeichnete (siehe Abb. 24). Die Aktivierung der *Hnf-3*-Expression im Kopfbereich könnte auf eine zellautonome Wirkung der *gooseoid*-Überexpression im prächordalen Mesoderm zurückzuführen sein. Beide Gene werden während der normalen Entwicklung hier gemeinsam exprimiert (Filosa et al., 1998). Die erhöhte Anzahl an *gooseoid* exprimierenden Zellen in einer verbreiterten Prächordalplatte könnte durch eine indirekte Aktivierung der *Hnf-3*-Transkription in diesen Zellen die beobachtete Erhöhung der *Hnf-3*-Expression in der anterioren Region der Embryonen erklären. Eine Wiederholung dieser *in situ* Hybridisierungs-Experimente und eine anschließende genaue histologische Analyse der Prächordalplatte in doppelt transgenen Embryonen könnte diese Annahme bestätigen. Die zusätzlich beobachtete Verstärkung der *Hnf-3*-Expression in der Chorda könnte damit erklärt werden, dass Vorläuferzellen des Chordamesoderms durch die *gooseoid* Missexpression im Primitivstreifen bzw. Primitivknoten zu diesem Zeitpunkt einer erhöhten Menge *GOOSECOID* Proteinen ausgesetzt waren. Eine daraus resultierende Aktivierung der *Hnf-3*-Transkription in diesen Zellen könnte auch zu späteren Entwicklungsstadien in den Zellen der Chorda zu detektieren sein.

### 3.2.3 Verstärkung der endogenen *Fgf-8*-Expression

*GOOSECOID* und *HNF-3* regulieren in synergistischer Interaktion im prächordalen Mesoderm u. a. die Expression von Signalmolekülen wie *SONIC HEDGEHOG* und *FGF-8* (Filosa et al., 1998). Diese sezernierten Proteine sind für die korrekte Musterbildung im darüberliegenden ventralen Vorderhirn verantwortlich. Eine erste Analyse der *Fgf-8*-Expression in *goosecoid* missexprimierenden Embryonen am Tag E8.5 zeigte eine generelle Verstärkung der endogenen Expression im Primitivstreifen und im zukünftigen Vorder- und Mittelhirn (siehe Abb. 25). Zusätzlich konnte eine ektopische *Fgf-8*-Expression in der Region der Mittel-/Hinterhirngrenze detektiert werden. Die erhöhte *Fgf-8* Expression im Primitivstreifenmesoderm könnte durch die Missexpression von *goosecoid* in diesen Zellen verursacht sein. Die erhöhte und ektopische *Fgf-8*-Expression in den zukünftigen Hirnstrukturen deutet auf einen indirekten Einfluss der *goosecoid* Missexpression in den doppelt transgenen Embryonen hin. Der verbreiterte *Fgf-8*-Expressionsdomäne im Bereich der Mittel-/Hinterhirngrenze könnte eine morphologische Verbreiterung dieser Struktur zu Grunde liegen. Weitere histologischen und molekulare Analysen sind nötig, um eine möglicherweise veränderte Musterbildung und die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen im anterioren zentralen Nervensystem der *goosecoid* missexprimierenden Embryonen zu untersuchen.

### 3.2.4 Weitere embryonale Markergene für die Analyse der veränderten Musterbildung im anterioren ZNS

Zur experimentellen Untersuchung einer veränderten Musterbildung im anterioren ZNS der *goosecoid* missexprimierenden Embryonen bietet sich eine Expressionsanalyse von embryonalen Markergenen an. Für das Vorderhirn wäre hier insbesondere das Gen *Nkx2.1* zu nennen, das während der normalen Entwicklung im ventralen Diencephalon exprimiert wird. Interessanterweise wird seine Transkription

durch Signale des Prächordalplattenmesoderms reguliert (Shimamura et al., 1995; Kimura et al., 1996; Dale et al., 1997; Pera und Kessel, 1997; Shimamura und Rubenstein, 1997; Qui et al., 1998). Die Untersuchung der Expressionsmuster der Gene *Six3* und *Hesx1*, welche spezifisch im Vorderhirnbereich exprimiert werden, bietet sich hier ebenfalls an (Oliver et al., 1995; Martinez-Barbera et al., 2000). Aufschluss für eine veränderte Musterbildung im Bereich des Mittel- bzw. Hinterhirns könnte die Analyse weiterer Gene geben. Das Homöoboxgen *Engrailed-1* (*En-1*) und das Gen des Wachstumsfaktors *WNT1* werden spezifisch im Mittelhirn exprimiert (Davis und Joyner, 1988; Parr et al., 1993). Als Markergen für die Mittel-/Hinterhirngrenze bietet sich das Homöoboxgen *Engrailed-2* an (Joyner, 1996), wohingegen die Expression der *Hoxb*-Gene von *Hoxb-1* bis *Hoxb-4*, für die Regionen des Hinterhirns charakteristisch sind (Maconochie et al., 1997; Studer et al., 1998; Gaufo et al., 2000; Kwan et al., 2001).

Die bislang durchgeführten molekularen Analysen lieferten erste Hinweise auf Veränderungen des endogenen Expressionsmusters im Primitivstreifenmesoderm der *goosecoid* missexprimierenden Embryonen. Weitere ausführliche Untersuchungen sind jedoch nötig um die veränderte Musterbildung des Primitivstreifens, insbesondere eine Veränderung der Regionalisierung, zu bestätigen. Gene, die während der normalen Entwicklung bereits ein spezifisches regionalisiertes Expressionsmuster aufweisen, sind für eine Analyse von embryonalen Markergenen in den doppelt transgenen Embryonen besonders gut geeignet. Die posteriore Expression des Gens für des Wachstumsfaktors *BMP-4* oder die anteriore Lokalisation der Genprodukte der sezernierten Signalmoleküle *NOGGIN*, *CHORDIN* und *FOLLISTATIN* sowie die Transkriptionsfaktoren *LIM-1* und *OTX2* weisen diese Gene als geeignete Kandidaten für eine weitergehende Analyse aus (Bellusci et al., 1996; Klingensmith et al., 1999; Bachiller et al., 2000; De Groot et al., 2000; Barnes et al., 1994; Simeone und Acampora, 2001).

### **3.3. Phänotypische Veränderungen durch die *gooseoid* Missexpression**

Die Missexpression von *gooseoid* im gesamten Primitivstreifen während der Gastrulation führte in den Embryonen zu einer erst in späteren Entwicklungsstadien (E9.5 und 10.5) sichtbaren phänotypischen Veränderung. Die Embryonen wiesen eine Fehlbildung des Neuralrohrverschlusses (*neural tube closure defect*, NTD) auf (siehe Abb. 19). In der Region der zukünftigen Hirnstrukturen wie Vorder- und Mittelhirn dieser doppelt transgenen Embryonen schloss sich das Neuralrohr unvollständig (Exencephalie). In einigen Fällen wurden zusätzliche Neuralrohrverschlussdefekte im posterioren Bereich festgestellt (Spina bifida). Diese phänotypischen Auffälligkeiten konnten nicht in allen untersuchten doppelt transgenen Embryonen beobachtet werden. Die Häufigkeit, mit der der NTD-Phänotyp zu beobachten war, betrug 22%. Es standen daher relativ wenige phänotypisch veränderte Embryonen zur Analyse zur Verfügung. Da phänotypische Auswirkungen der *gooseoid* Missexpression in frühen Entwicklungsstadien erwartet wurden, begann die morphologische und anatomische Untersuchung der Embryonen zunächst in Gastrulations- und frühen Neurulastadien (E 7.5 und E8.5). Wie sich herausstellte konnten jedoch erst am Tag E9.5 und E10.5 Defekte des Neuralrohrverschlusses beobachtet werden. Dieser Befund, verbunden mit der geringen Anzahl der phänotypisch auffälligen Embryonen, erschwerte die Untersuchung. Daher sollte die bislang durchgeführte Analyse der doppelt transgenen Embryonen als vorläufig angesehen werden, der sich weitere Untersuchungen auf morphologischer, anatomischer, histologischer und molekularer Ebene anschließen müssen.

### 3.3.1 Entstehung und Verschluss des Neuralrohres

Zur Diskussion des NTD-Phänotyps soll hier zunächst kurz der Neuralrohrverschluss im Verlauf der Normalentwicklung dargestellt werden. Der Prozess der Neuralrohrentstehung in der Maus (E8.0-10.0) gliedert sich in zwei Phasen, die primäre und die sekundäre Neurulation (Schoenwolf, 1984; Schoenwolf und Smith, 1990).

Während der primären Neurulation entsteht das Neuralrohr aus der Neuralplatte. Die Neuralplatte wird durch das darunterliegenden Chorda- und Prächordalplattenmesoderm im Ektoderm induziert. Die Ektodermzellen formieren sich zu einem mehrreihigen Epithel, dem Neuraepithel. Dieser epitheliale Zellverband richtet sich zur Neuralrinne auf, wobei die Mittellinie der Neuralplatte mit dem darunterliegenden Chorda- und Prächordalplattenmesoderm verankert bleibt (*median hinge point*). Durch konvergente Extensionsbewegungen der Neuraepithelzellen entsteht eine in die Länge gezogene V-förmige Struktur, deren mediane Seite cranial mit dem prächordalen Mesoderm und caudal mit der Chorda in Verbindung steht. Im weiteren Verlauf schiebt sich das benachbarte Ektoderm, die zukünftigen „epidermalen“ Zellen auf beiden Seiten über die Neuralrinne und bilden die sogenannten Neuralwülste. Die laterale Randzone des Neuroepithels zu beiden Seiten der Neuralrinne kommt mit der epidermalen Epithelschicht in Kontakt. Diese Kontaktstellen werden als *`dorsal lateral hinge points`* (DLHP) bezeichnet. Die Neuralwülste bewegen sich aufeinander zu. Dies wird bewirkt durch eine Kontraktion der intrazellulären Aktin-Myosin-Filamenten, die sich zwischen den apikalen Desmosomen der DLHP-Neuroepithelzellen aufspannen. Die Neuralrinne nimmt dadurch eine U-förmige Gestalt an. Treffen die Neuralwülste in der dorsalen Mittellinie zusammen, so verschmelzen sie miteinander. Somit schliesst sich die Neuralrinne und das Neuralrohr wird gebildet. Dabei lösen sich die epidermalen Zellen beider Neuralwülste von ihren benachbarten Neuroepithelzellen ab, verschmelzen in der dorsalen Mittellinie miteinander und bilden als geschlossene

Epithelschicht die dorsale Epidermis des Embryos. Die neuroepithelialen Zellen fusionieren ebenfalls und bilden dabei die Deckplatte des Neuralrohrs (Smith und Schoenwolf, 1991; Alvarez und Schoenwolf, 1992, Gilbert, 2000).

Entlang der anterioren-posterioren Achse der Neuralrinne unterliegt der Ablauf der Verschmelzung der Neuralwülste regionalen Unterschieden. So verschmelzen im Gegensatz zum restlichen Anteil der Neuralrinne, im Bereich des prospektiven Mes- und Diencephalon zuerst die Neuralepithelzellen und danach die epidermalen Zellen miteinander (Smith und Schoenwolf, 1991).

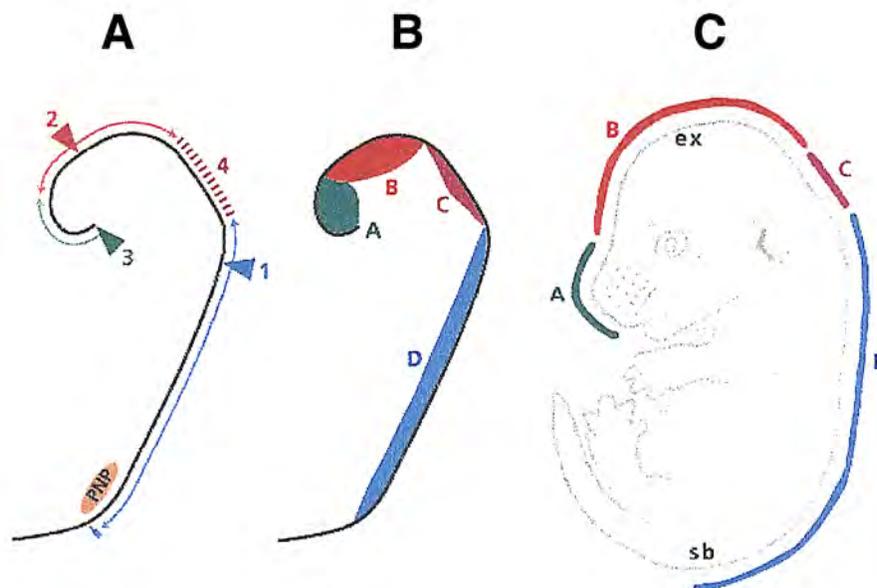
Im Epithel der Neuralwülste sind auch die Vorläufer der Neuralleistenzellen lokalisiert. Diese Zellen wandern nach Schluss des Neuralrohrs als Neuralleistenzellen aus dem Neuroepithel aus. Sie sind die Stammzellen für die Pigmentzellen des Körpers, die Spinalganglien, das vegetative Nervensystem, die Schwann-Zellen und Knorpelzellen des Kopfes (Drews, 1993; Gilbert, 2000).

Der Schluss des Neuralrohrs beginnt cranial und folgt wie die Somitenbildung der Wanderung des Primitivknotens nach caudal. Über der auswachsenden Kopfanlage ist die Neuralplatte jedoch so breit, dass der Neuralrohrverschluss relativ zum Rumpf verzögert ist. Daher schliesst sich das Neuralrohr zuerst im mittleren Bereich des Embryos, was etwa der späteren Grenze von Hirnstamm und Rückenmark entspricht. Der Schluss des Neuralrohrs schreitet von dort nach cranial fort. Die vordere Öffnung des Neuralrohrs wird als Neuroporus anterior und die hintere als Neuroporus posterior bezeichnet (Hinrichsen, 1993).

Die Phase der sekundären Neurulation setzt ein, wenn sich der Primitivknoten zur Schwanz- oder Endknospe umgewandelt hat, aus der die Chorda und die Somiten sowie die Neuralrinne direkt hervorgehen. Nach dem Schluss des Neuroporus posterior entsteht der Rest des Neuralrohrs direkt als fertiges Rohr aus dem Blastem

der Schwanzknospe. Am Tag E9.0 ist der Neuralrohrverschluss in der Kopfregion und am Tag E10.0 im Schwanzbereich abgeschlossen (Smith und Schoenwolf, 1991).

In der Maus existieren vier unabhängige Regionen entlang der cranio-caudalen Achse, in denen die Aufrichtung der Neuralrinne und der Schluss des Neuralrohrs jeweils *de novo* initiiert wird. In Abb. 28 sind diese Bereiche im Maus-Embryo schematisch dargestellt. Die Regionen der Aufrichtung der Neuralrinne werden als Zonen A-D bezeichnet. Die Stellen, an denen die Neuralwülste miteinander verschmelzen, werden als Initiationspunkte 1-4 bezeichnet. Die Verschmelzung der Neuralwülste schreitet von Initiationspunkt 1 und 2 in bi-direktionaler Richtung und von Punkt 1 ausgehend in caudaler Richtung fort. Dadurch entsteht während der primären Neurulation ein geschlossenes Neuralrohr bis zur posterioren Neuropore (Harris und Juriloff, 1999).



**Abb. 28 Regionen der Aufrichtung der Neuralrinne und Initiationspunkte des Neuralrohrverschlusses während der Neurulation in der Maus (modifiziert nach Harris und Juriloff, 1999).**

(A) *De novo* Initiationspunkte (1-4) des Neuralrohrverschlusses entlang der anterior-posterioren Körperachse während der Embryonalentwicklung E8.0-9.0. Pfeile deuten die Richtung der fortschreitenden Aufrichtung an.

(B) Vier unabhängige Regionen (A-B) der Aufrichtung der Neuralrinne Körperachse während der Entwicklungsstadien E8.0-9.0.(PNP= Posteriore Neuropore).

(C) Relative Position der Regionen A-B im 14 Tage alten Embryo. (ex= Exencephalie; sb= Spina bifida)

### 3.3.2 Fehlentwicklung des Neuralrohrverschlusses

Bei der beschriebenen Komplexität des Neuralrohrverschlusses verwundert es nicht, dass dieser Vorgang während der Embryogenese besonders stör anfällig ist. Alle Defekte führen zu schwerwiegenden embryonalen Missbildungen, die in den meisten Fällen letal sind (Schoenwolf und Smith, 1990).

Man unterscheidet Defekte des Neuralrohrverschlusses (*neural tube defect*; NTD) bezüglich der Position, an dem sich das Neuralrohr nicht vollständig schliesst. Der unvollständige Schluss der posterioren Neuropore wird als Spina bifida bezeichnet. Exencephalie bzw. Anencephalie beim Menschen beschreibt den unvollständigen Schluss des cranialen Neuralrohrs. Das vollständige Ausbleiben des Schluss des Neuralrohrs entlang der Körperachse wird Craniorachischisis genannt (Gilbert et al., 2000; Juriloff und Harris, 2000)

Fehlentwicklungen während der Neurulation sind eine relativ häufige Erscheinung beim Menschen. In 1000 Geburten kommt es zu einem Neuralrohrverschlussdefekt (Juriloff und Harris, 2000; Northrup und Volcik, 2000). Das Phänomen dieser Missbildungen unterliegt einem komplexen Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren. So sind verschiedene Gene identifiziert worden, die eine Rolle bei der Bildung des Neuralrohrs in Säugetieren eine Rolle spielen u.a. *Pax3*, *sonic hedgehog* und *openbrain (opb)* (Epstein et al., 1991; Echelard et al., 1993; Günther et al., 1994). Auch ein Einfluss der Ernährung der Mutter, wobei hier Cholesterin und Folsäure zu nennen wäre, konnten in Zusammenhang der Neuralrohrentstehung des Embryo gebracht werden. So wird vermutet, dass durch eine ausreichende Menge an aufgenommenem Folsäure während der

Schwangerschaft das Risiko von NTD des Kindes um 70% minimiert werden könnte (Werler et al., 1999).

### **3.3.3 Neuralrohrdefekte in verschiedenen Mausmutanten**

Die Analyse des NTD-Phänomens in verschiedenen Mausmutanten erlaubt Einblicke in die Mechanismen dieser Missbildung des Neuralrohrs. Zahlreiche spontan auftretende Mausmutanten und ungefähr 50 Einzel-Gen-Mutationen sind mittlerweile identifiziert worden, die zu einem NTD-Phänotypen in der Maus führen können. In fast allen Fällen wird von einer variablen Ausprägung und einer unvollständigen Penetranz des NTD-Phänotyps berichtet (Harris und Juriloff, 1999; Juriloff und Harris, 2000). Desweiteren liessen sich Exencephalie und Spina bifida einem fehlerhaften Prozess der Neuralrinnenbildung zuordnen, die wahrscheinlich nicht bei der eigentlichen Verschmelzung der Neuralwülste entstehen (Harris und Juriloff, 1999).

Überraschenderweise resultierte die gezielte Ausschaltung von Genen, die spezifisch im Neuralplattenepithel während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, wie z.B. *Otx1* und *Emx2* in keiner Veränderung der Neurulation (Shimamura et al., 1995; Cecchi et al., 1999). Dagegen führte die Ausschaltung von Genen, denen eine Funktion in der Onkogenese, Signaltransduktion oder in physiologische Funktionen im adulten Organismus zugeordnet wurde, zu einem NTD-Phänotypen (Juriloff und Harris, 2000).

Im den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Mausmutanten vorgestellt und diskutiert.

Die spontan aufgetretene Mutation *Spotch* (*Sp*) führt zu Exencephalie und Spina bifida in 50-100% der Tiere. (Auerbach et al., 1954; Kapron-Bras und Trasler, 1985; Moase und Trasler, 1987). In diesen Mutanten konnte zum ersten Mal ein kausaler

Zusammenhang zwischen NTD und dem Folat-Metabolismus nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt des Neuralrohrverschlusses ist die Pyrimidin-Biosynthese in diesen Mäusen gestört, was auf einen Mangel an Folatmolekülen zurückzuführen ist. Ein Ausgleich durch die zusätzliche Gabe an Thymidin oder Folsäure kann das Risiko der Missbildung des Neuralrohrs in diesen Tieren um ca. 40% minimieren (Fleming und Copp, 1998). Weder sind bislang die Ursachen des Folat-Mangels bekannt, noch konnte der molekulare Mechanismus, der in diesen Tieren zu NTD führt, aufgeklärt werden. Andere Beobachtungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen einem veränderten Zellwanderungsverhalten der Neuralleistenzellen und NTD. Die Wanderung der Neuralleistenzellen aus dem Neuroepithel der Neuralwülste im Rumpfbereich ist in der *Spotch* Mutante inhibiert (Serbedzija und McMahon, 1997). Dies könnte im Zusammenhang mit den beobachteten Veränderungen der Basalmembran des Neuroepithels stehen. So sind die Gene der Proteoglycan-Moleküle wie z.B. Versican im Neuroepithel sowie im axialen Mesoderm der *Spotch* Mutanten überexprimiert. Versican verhindert die Migration von Neuralleistenzellen (Trasler und Morriss-Kay, 1991; Henderson et al., 1997). Zusätzlich deuten Hinweise auf eine veränderte Zelladhäsion des cranialen Neuroepithels, auf ein verändertes Glykosylierungsmuster des Adhäsionsmolekül *NCAM* (*neural cell adhesion molecule*) und den Verlust der typischen dicht gepackte „epitheliale“ Morphologie der neuralen Zellen (Moase und Trasler, 1991; Neale und Trasler; 1994; Bennett et al; 1998).

Die *Spotch* Mutation konnte auf eine Deletion des *Pax3*-Gens zurückgeführt werden. *PAX3* ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zur selben Klasse der Homöoboxgene wie *gooseoid* (Epstein et al., 1991). Einige Zielgene von *Pax-3* sind bekannt. U. a. wird der Transkriptionsfaktor *MSX2* von *PAX-3* reguliert. So führt der Verlust der *Pax-3* Genexpression in der *Spotch* Mutante zur Überexpression des *Msx2* Gens. Der Transkriptionsfaktor *MSX2* wird während der normalen Entwicklung im dorsalen Neuralrohr exprimiert und Überexpression dieses Gens führte in transgenen Mäusen zu einem Exencephalie Phänotyp (Wang et al., 1996; Winograd et al., 1997).

Die Mausmutante *Spotch* ist ein Paradebeispiel für die Komplexität der Analyse der molekularen Mechanismen, die zu einer Missbildung des Neuralrohrs führen können. Es gibt weder Hinweise auf eine Verbindung zwischen der Funktion des *Pax-3*-Gens und der Pyrimidin-Biosynthese, noch lässt sich ein Zusammenhang zwischen einer Inhibition dieser Biosynthese und der Missbildungen des Neuralrohrs erklären.

Eine abnormale Entwicklung des Kopfmesenchyms im Bereich des Vorderhirns führte in der Deletionsmutante des *Cart1*- und des *twist*-Gens zum Verlust von mesenchymalen Zellen im Vorderhirnbereich. Dadurch wird wahrscheinlich die Neuralrinnenaufrichtung im Bereich des zukünftigen Mittelhirns verhindert, was zu Exencephalie (65-100% bzw. 100%) führt (Zhao et al., 1996; Chen und Behringer, 1995).

Die spontan aufgetretene Mausmutante *Curly tail (Ct)* zeigt ein verlangsamtes Zellwachstum des der Neuralplatte ventral benachbarten Gewebes im Bereich des Neuroporus posterior, was zu Exencephalie in 1-5% bzw. Spina bifida in 15-20% der Tiere führt (Embury et al, 1979). Ein Zusammenhang zwischen dem verlangsamten Zellwachstum und dem Retinsäure-Rezeptor  $\alpha$  (*RAR $\alpha$* ), konnte experimentell nachgewiesen werden. Die Expression des *RAR $\alpha$* -Gens ist in der *Ct* Mutante reduziert. Die Verabreichung von Retinsäure an schwangere Mäuse resultierte in einer Hochregulierung der *RAR $\alpha$* -Transkription und reduzierte den Spina bifida-Phänotyp um die Hälfte in diesen Embryonen (Embury et al, 1979).

In der knock-out Mutation des *Laminin 5*-Gens ist die Basalmembran des Neuroepithels verändert, was zum partiellen Verlust der Neuralrinnenaufrichtung führte. Sechzig Prozent dieser Embryonen zeigten Exencephalie im Bereich des Mittelhirns (Miner et al., 1998).

Die Deletion des Gens des Transkriptionsfaktors *TCFA2a (AP2)* führte in Embryonen zu abnormalem Zelltod im cranialen Neuroepithelium und resultierte in Exencephalie

und Spina bifida in allen Fällen. Die Expressionsdomäne des Gens des neuronalen Adhäsionsmolekül *NCAM* ist in diesen Embryonen verbreitert, und nicht wie in der normalen Entwicklung ausschliesslich im Epithel der Neuralwülste exprimiert (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Die Bedeutung der intrazellulärer Kommunikation während der Neuralrohrstehung ließ sich in transgenen Mäusen zeigen. Der Verlust oder die Überexpression des Gens eines Gap Junction Proteins, dem Connexin Cx43 im gesamten dorsalen Neuralrohr und in Neuralleistenzellen resultierte in Exencephalie (10-25%) (Ewart et al., 1997; Lo et al., 1997).

Die Nullmutation des Gens *p53*, das für einen Transkriptionsfaktor mit Tumorsupressor-Funktion kodiert und der ausserdem eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose) spielt, führte nur in homozygoten weiblichen Tieren zu Exencephalie (10-30%) (Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995). Weder die Rolle des Transkriptionsfaktors während der Embryonalentwicklung noch die Ursache dieses geschlechtsspezifischen NTD-Phänotyps sind bislang erforscht.

Transgene Mäuse, in denen das Gen für das organisatorspezifische Signalmolekül *NOGGIN* deletiert wurde, zeigten eine gestörte Neuralrohrentwicklung im zukünftigen Mittelhirnbereich, was zu Exencephalie in nahezu aller Fälle und in einigen Fällen auch zu Spina bifida führte. Die Rolle des *BMP-4* Antagonisten *NOGGIN* ist es, die dorsale Seite der Neuralwülste vor *BMP*-Signalen abzuschirmen. Der Verlust dieser antagonistischen Interaktion führte in diesen Tieren zu einer vorzeitigen Expression des *Msx1* Gens im dorsalen Neuralrohr am Tag E10.5. Die Expression des Gens des Transkriptionsfaktors *MSX1* wird durch *BMP4* Signale reguliert (McMahon et al., 1998; Smith et al., 1999).

In der spontan aufgetretenen *Loop tail (Lp)* Mutante, deren Zielgen noch nicht identifiziert ist, zeigten alle Embryonen in der homozygoten Situation

Craniorachischisis. Die Neuralrinnenbildung ist entlang der cranio-caudalen Achse ab dem Bereich des prospektiven Mittelhirns inhibiert, wohingegen der Bereich des zukünftigen Vorder- und Mittelhirns ein geschlossenes Neuralrohr aufweist. Am Tag 8.5 zeigen diese Embryonen eine Verbreiterung der ventralen Seite der Neuralplatte und der Chorda im Bereich des ersten Initiationspunkts bzw. caudal zu diesem Bereich entlang der Mittellinie (Wilson und Wyatt, 1992; Gerrelli und Copp, 1997; Greene et al., 1998). Zusätzlich konnte eine erhöhte Transkription der Gene der sezernierten Signalproteine *SONIC HEDGEHOG* und *NETRIN1* in der Grundplatte und eine *Brachyury*-Überexpression in der Chorda detektiert werden. Es wird vermutet, dass die Verbreiterung der Grundplatte und der Chorda das Zusammentreffen der Neuralwülste in der Mittellinie mechanisch inhibiert (Greene et al., 1998). Eine Überexpression des *sonic hedgehog*-Gens führte ebenfalls zu Exencephalie in (50%) dieser transgenen Mäusen (Echelard et al., 1993).

### **3.3.4 Neuralrohrdefekt in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen**

Der in den *gooseoid* missexprimierenden Embryonen beobachtete NTD Phänotyp, lässt auf eine fehlerhafte Neuralrinnenaufrichtung in der Zone A, B und D schließen (siehe hierzu Abb. 28). In der Literatur werden ausschließlich Mausmutanten beschrieben die entweder NTD-Missbildungen in der Zone B, D, B+D, C+D oder A+B zeigen (Harris und Juriloff, 1999; Fleming und Copp, 2000; Juriloff und Harris, 2000). Keine der publizierten NTD-Missbildungen schlossen die Kombination von Exencephalie und Spina bifida in der Region A,B und D ein. Der in den doppelt transgenen Embryonen beobachtete NTD-Phänotyp stellt also eine noch nicht bekannte Variation der NTD-Missbildung dar.

Der Mechanismus der Neuralrohrentstehung unterliegt regionalen Unterschieden entlang der cephalo-caudalen Achse, wie verschiedene Initiationsstellen und Unterschiede im Ablauf der Verschmelzung der Neuralwülste. Es wird diskutiert, dass

diese regionalen Unterschiede mit den beobachteten NTD-Missbildungen in den Mausmutanten in Verbindung gebracht werden können. Die in den *goosecoid* missexprimierenden Embryonen gefundene neue Kombination der NTD-Missbildung läßt die Annahme zu, dass der Schluss des Neuralrohres in den Zonen A,B und D einem bislang nicht vermuteten gemeinsamen Mechanismus unterliegt.

### **3.3.5 Häufigkeit des NTD-Phänotyps in *goosecoid* missexprimierenden Embryonen**

Die *goosecoid* missexprimierenden Embryonen zeigten einen NTD-Phänotyp mit unvollständigem Auftreten (ca. 20%). Es ließen sich keine Missbildungen in den bislang untersuchten Embryonen späterer Entwicklungsstadien beobachten. Ausserdem werden auch lebende Tiere geboren. Eine Erklärung hierfür könnte in der nur moderaten Aktivität des Transgens liegen. Die Menge an transgenem *GOOSECOID*- Protein könnte u. U. nicht ausreichend sein, um den NTD-Phänotyp in allen Fällen auszulösen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Analyse der chimären Embryonen, die eine hohe *goosecoid* Überexpression aufwiesen und dementsprechend ein deutlich häufigeres Auftreten des NTD-Phänotyps (81%) zeigten. Eine transgene Mauslinie, die eine Mutation der putativen *GOOSECOID* Bindestelle im *Brachyury*-Promotor des Transgens trägt, sollte demnach auch zu einer höheren Frequenz des NTD-Phänotyps führen.

Bei dem Mausstamm SELH/Bc, der eine Missbildung des cranialen Neuralrohres (Exencephalie) aufweist, wurde interessanterweise ein Kompensationsmechanismus beobachtet. Charakteristisch in allen SEHL/Bc Embryonen ist eine verzögerte Neuralrinnenaufrichtung im Mittelhirnbereich und das Nichtvorhandensein des zweiten Initiationspunkts. Nur 20% dieser Embryonen zeigen einen Verlust der Neuralrinnenbildung im Mittelhirnbereich, der in Exencephalie resultiert. In 80% der Fälle jedoch kann der Schluss des Neuralrohres in diesem Bereich durch eine

fortschreitende Neuralrinnenaufrichtung, die am dritten Initiationspunkt beginnt, kompensiert werden. Die meisten dieser Embryonen entwickeln sich zu normalen adulten Individuen. (Macdonald et al., 1989; Tom et al., 1991; Hall et al., 1997.) Ein gleichgearteter kompensatorischer Mechanismus könnte in den *gooseoid* missexprimierenden Tieren wirken und somit zum unvollständigen Auftreten des NTD-Phänotyps führen. Mit Hilfe rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der doppelt transgenen Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien könnte der Prozess des Neuralrohrverschlusses verfolgt und somit ein kompensatorisch wirkender Mechanismus untersucht werden.

Aber auch ein Einfluss des genetischen Hintergrunds der transgenen Mäuse auf die Häufigkeit der Neuralrohrdefekte muss in Betracht gezogen werden. Mausstämme, die in experimentellen Tierversuchen analysiert werden, stammen alle aus Inzuchtkreuzungen. Damit sind alle Tiere eines Stammes mehr oder weniger genetisch identisch. Diese Einschränkung im genetischen Pool zeigt sich zum Beispiel in der Mausstamm-abhängigen NTD Sensitivität gegenüber teratogenen Faktoren wie Retin- oder Valproinsäure, Hyperthermia und Hypoglykaemia (Finnell et al., 1988; Naruse et al., 1988; Finnell et al., 1986).

Die Analyse verschiedener Inzucht-Mausstämme führte zur Annahme, dass der zweite Initiationspunkt des Neuralrohrverschlusses in der Maus einem Polymorphismus unterliegt. Die Position dieses Punkts korreliert in den meisten Mausstämmen (z.B. C57Bl/6J) mit der zukünftigen Vorder-/Mittelhirngrenze des Embryos. In einigen Fällen, wie im DBA/2-Stamm, ist dieser zweiten Verschlusspunkt in caudaler Richtung und damit in die Nähe des Initiationspunkt 4 verschoben. Der Mausstamm NZW (New Zealand White) zeichnet sich durch eine Verschiebung des zweiten Punkts in rostraler Richtung aus. Ein Verlust der zweiten *de novo* Initiation des Neuralrohrverschlusses ist für den oben beschriebenen SEHL/Bc-Stamm charakteristisch (Juriloff et al., 1991). Experimentelle Untersuchungen wiesen eine Korrelation zwischen der Position des zweiten Initiationspunktes und dem Risiko der Mäuse, einen cranialen Neuralrohrdefekt zu entwickeln, auf. Je weiter rostral dieser

Verschlusspunkt positioniert ist, desto höher scheint das Risiko einer Missbildung des cranialen Neuralrohrs zu sein (Fleming und Copp, 2000). Das Einkreuzen der *Spotch*-Mutante in den genetischen Hintergrund des DBA/2-Stamm, d. h. eine Verschiebung des zweiten Verschlusspunkts nach caudal, resultierte in einer verringerten Frequenz des auftretenden cranialen NTD-Phänotyps in den Nachkommen. Wurden die *Spotch*-Mäuse jedoch mit dem NZW-Mausstamm gekreuzt, so glich das Risiko der Tiere, einen Neuralrohrverschlussdefekt (80%) zu entwickeln, dem der *Spotch*-Mutanten vor der Einkreuzung. Die caudale Position des zweiten Verschlusspunkts ist in der Mutante und im NZW Mausstamm identisch (Fleming und Copp, 2000).

Solche Polymorphismen könnten durch sogenannte *modifier*-Gene bewirkt werden, die eine phänotypische Ausprägung positiv oder negativ beeinflussen können. So wurde im Zusammenhang mit *modifier*-Genen in einer Reihe von Mausmutanten von einem variablen Auftreten des NTD-Phänotyps berichtet. Die Mausmutante *Open brain* (*Opb*), in der die betroffene Genfunktion nicht bekannt ist, zeigte Exencephalie (80-100%) und Spina bifida (2%). Die Häufigkeit der auftretenden Missbildungen des Neuralrohrs variiert, je nachdem in welchem Mausstamm diese Mutante eingekreuzt wird. Die Einkreuzung in einen Albino-Mausstamm (NMRI) resultierte in einer vollständigen Penetranz des Phänotyps, wohingegen das Einkreuzen in den Mausstamm C57Bl/6J zu einer verringerten Frequenz des NTD-Phänotyps führte (Günther et al., 1994). In den *p53*- und *Cart-1*- Mutanten sowie den Mausmutanten *Spotch*, *Axial defect* und *Curly tail* sind ähnliche Beobachtungen beschrieben worden (Armstrong et al., 1995; Zhao et al., 1996; Moase und Trasler, 1992; Essien et al., 1990; Letts et al., 1995). In der *Curly tail* (*Ct*) Mutation, konnte die Position des *Ct*-Gens, dessen Funktion noch unbekannt ist, einem bestimmten Chromosomenabschnitt (Chromosom 4) zugeordnet werden. Das Einkreuzen dieser Mausmutante in verschiedene Mausstämme führte zu einer Abnahme der Häufigkeit des NTD-Phänotyps. Tatsächlich konnte die Existenz eines Genlocus nachgewiesen werden, der die Wirkung des *Ct*-Locus modifiziert, dem sogenannten *mct1*-Locus

(*curly tail modifier*). Das Einkreuzen der *Ct*-Mutanten in einen weiteren Mausstamm, in der der *mct1*-locus vermutlich nicht existiert, führte erwartungsgemäss zu einem häufigerem Auftreten der Missbildungen des Neuralrohres in den Tieren (Letts et al., 1995).

Tatsächlich könnte die beobachtete geringe Häufigkeit des NTD-Phänotyps in den *gooseoid* missexprimierenden Embryonen im Zusammenhang ihres gemischten genetischen Hintergrunds, stehen. Die zwei transgenen Mauslinien (*gooseoid* und *Cre*) haben einen gemischten genetischen Hintergrund, der sich aus den Mausstämmen C57Bl/6J und 129/OLA zusammensetzt. Die Rückkreuzung in die reinen Inzucht-Mausstämme könnte einen Einfluss auf die Häufigkeit mit der der Phänotyps in den doppelt transgenen Embryonen auftritt, haben. Eine Einkreuzung anderer Mausstämmen könnte Hinweise auf potentiell vorhandene *modifier*-Gene geben. Da die Untersuchungen der *gooseoid* missexprimierenden Embryonen durch die geringe Frequenz des NTD-Phänotyps erschwert wurde, könnte die Einkreuzung in den NZW-Stamm die Anzahl phänotypisch veränderter Embryonen erhöhen und damit zukünftige Analysen erleichtern.

Das Einkreuzen von Mausmutanten in die transgene *gooseoid* Mauslinie könnte Hinweise auf genetische Interaktionen zwischen *GOOSECOID* und Genen während der Embryonalentwicklung der Maus liefern, wie dies in den doppelt mutanten Tieren des Genotyps *gooseoid*<sup>-/-</sup>/*Hnf-3*<sup>+/+</sup> gezeigt werden konnte (Filosa et al., 1998). Interessant wäre auch ein Einkreuzen in die *gooseoid* knock-out Mäuse. Der Verlust des endogenen *gooseoid*-Gens könnte u. U. zu einer Abschwächung des NTD-Phänotyps führen. Umgekehrt könnte die *gooseoid* Missexpression während der Gastrulation die phänotypischen Auswirkungen der Genverlustmutation aufheben. Desweiteren würde das Einkreuzen von Mausmutanten mit einem NTD-Phänotyp Rückschlüsse auf die Entstehung der Neuralrohrdefekte in den *gooseoid* missexprimierenden Embryonen erlauben. Falls in der *Loop tail* Mutante und in den *gooseoid* missexprimierenden Embryonen ein ähnlicher Mechanismus zu NTD führt, sollte ein Verpaaren der transgenen Mauslinie mit der Mausmutante zu einer

Verstärkung des NTD-Phänotyps führen. Unterschiedliche Mechanismen sollten in der doppel-heterozygoten Situation Abschwächung bewirken.

### **3.3.6 Spezifität des NTD-Phänotyps in *gooseoid* missexprimierenden Embryonen**

Die zufällige Integration des Transgens in das Genom der Maus birgt das Risiko, die Funktion eines endogenen Gens negativ oder positiv zu beeinflussen. Zum Verlust der Genfunktion kann es kommen, wenn die Integration des Transgens entweder in der kodierenden Sequenz oder in regulatorische Promotor-Regionen erfolgt. Andererseits könnten die regulatorischen Elemente des Transgens einen Einfluss auf die Transkription benachbarter endogener Gene ausüben, was zu einer Über- und/oder Missexpression dieser Gene führt. Solch ein Funktionsverlust bzw. -gewinn von Genen durch die Integration des Transgens könnte somit einen unspezifischen veränderten Phänotyp hervorrufen. In den transgenen Embryonen konnte jedoch vor der Aktivierung des *gooseoid* Transgens durch *CRE*-vermittelte Rekombination in keinem Fall eine Missbildung des Neuralrohrs beobachtet werden. Dieser Befund deutet daraufhin, dass der auftretende Neuralrohrdefekt in den doppelt transgenen Embryonen ein spezifischer Effekt der *gooseoid* Missexpression darstellt.

Gestützt wird diese These durch die Analyse der chimären Embryonen. Chimäre Embryonen, die *gooseoid* überexprimierende transgene ES-Zellen enthielten, wiesen einen den doppelt transgenen Embryonen vergleichbaren Phänotyp auf. Missbildungen des Neuralrohrs wie Exencephalie und Spina bifida konnten somit in beiden Experimenten, der gezielten Missexpression von *gooseoid* im Primitivstreifenmesoderm und der ungezielten Überexpression von *gooseoid* in chimären Embryonen beobachtet werden.

In einigen Fällen führte die *gooseoid* Überexpression in Chimären zu Craniorachischisis, einem vollständig offenen Neuralrohr von der Mittelhirnregion bis

zum caudalen Ende, einer Missbildung, die auch in der *Loop tail* Mutante beobachtet wurde (Wilson und Wyatt, 1992).

Die Integration der transgenen Zellen in den Embryo geschieht zufällig. Sie differenzieren sich zu Derivaten aller drei Keimblätter. So könnten in den Chimären mesodermale Zellpopulationen aus den transgenen ES-Zellen entstanden sein, die sich durch eine *goosecoid* Überexpression auszeichnen. Die Prächordalplatte würde sich aus endogenen *goosecoid* exprimierenden Zellen und *goosecoid* überexprimierenden Zellen zusammensetzen. Zusätzlich könnten mesodermale Zellen aufgrund ihrer ektopischen *goosecoid*-Expression ein verändertes Wanderungsverhalten zeigen und durch ihre Migration in anteriore Richtung zu einer verbreiterten Prächordalplatte führen. Diese Veränderungen in der Prächordalplatte würden eine Verbreiterung der Grundplatte in Bereich des zukünftigen Vorder- und Mittelhirns verursachen, was die Fusion der Neuralwülste in dieser Region mechanisch inhibieren könnte und somit Exencephalie verursachen. Eine verbreiterte caudale Neuralplatte ließe sich vermutlich mit der *goosecoid* Überexpression von transgenen ES-Zellen im posterioren Mittelliniemesoderms, dem Chordamesoderm, erklären. *goosecoid* ist endogen hier nicht exprimiert, doch könnte die ektopische *goosecoid*-Expression auch hier in der über der Chorda liegenden Neuralplatte zu Veränderungen führen, die schliesslich in Neuralrohrverschlussdefekten resultieren (Spina bifida und Craniorachischisis). Eine genaue Analyse von embryonalen Markergenen und histologische Studien des Mittelliniemesoderms sowie der darüberliegenden Neuralplattenregion sollten eine tatsächliche Verbreiterung dieser Strukturen bestätigen.

Zusammenfassend konnten die Experimente mit chimären Embryonen bestätigen, dass die in doppelt transgenen Embryonen auftretenden Neuralrohrdefekte spezifisch der *goosecoid* Missexpression zu zuschreiben sind. Ausserdem wurde dieser Phänotyp mit einer wesentlich höheren Frequenz beobachtet (ca. 81%), was vermutlich auf die stärkere Expression von *goosecoid* in den transgenen ES-Zellen

zurückzuführen ist. In diesem Licht erscheint die oben diskutierte Möglichkeit, eine weitere Mauslinie zu etablieren, die der negativen Rückkopplungsschleife nicht unterliegt, besonders attraktiv.

### **3.3.7 *gooseoid* Missexpression und Neuralrohrdefekte: ein Modell**

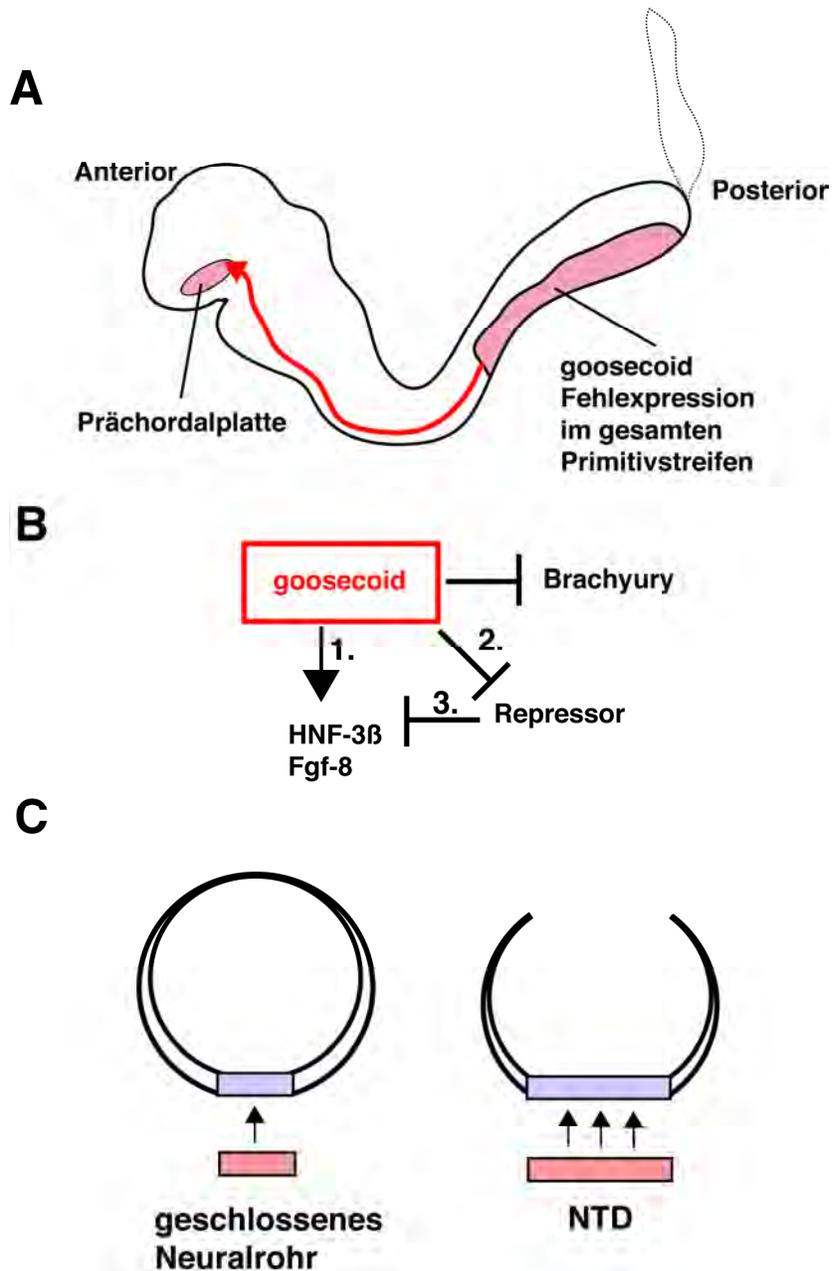
Abschliessend möchte ich ein Modell vorschlagen, das die Neuralrohrverschlussdefekte mit der normalen und transgenen *gooseoid* Funktion in Einklang zu bringen versucht.

Während der Gastrulation wandern die Zellen am anterioren Ende des Primitivstreifens über die Chordaanlage ins prächordale Mesoderm. Missexpression im posterioren Primitivstreifenmesoderm der doppelt transgenen Embryonen führt zu einer Veränderung des Zellwanderungsverhalten. Zellen, die normalerweise den Primitivstreifen posterior oder lateral verlassen, wandern jetzt, wie die endogen *gooseoid* exprimierenden Zellen, in anteriore Richtung, was zu einer Verbreiterung der Prächordalplatte führt (Abb. 29A+C). Die Zellen der Prächordalplatte induzieren im Wildtyp-Embryo im darüberliegenden ventralen Neuroektoderm des Zwischenhirns die Expression von *gooseoid*. In doppelt transgenen Embryonen resultiert eine verbreiterte Prächordalplatte in einer ventro-lateral expandierten *gooseoid* Expression im Diencephalon. Diese ektopische *GOOSECOID* Aktivität interferiert in einem weiteren Schritt mit dem Schluss des Neuralrohrs. Die Verbreiterung der prächordalen *gooseoid*-Expressionsdomäne könnte variabel ausgeprägt sein, so dass nicht in allen Fällen Exencephalie resultiert. Die in seltenen Fällen beobachtete Spina bifida wird u. U. von *gooseoid* missexprimierenden Zellen verursacht sein, die im posterioren Mesoderm verbleiben.

Zahlreiche in der Literatur der letzten Jahre berichteten experimentellen Befunde in *Xenopus*, Zebrafisch und Maus sowie die hier beschriebenen Veränderungen der Genexpression von *Brachyury*, *Hnf-3* und *Fgf-8* lassen sich mit diesem Modell in Einklang bringen. Ektopische Translation von *gooseoid* mRNA Transkripten im Mesoderm der ventralen Randzone von *Xenopus*-Gastrulae führte zu ektopischen Invaginationsbewegungen über die induzierte Urmundlippe (Niehrs et al., 1993). Die Tatsache, dass die phänotypischen Defekte am anterioren Ende des Embryos auftraten, während die Missexpression in posterioren Zellen stattfand, könnte ausser mit Zellwanderung vielleicht durch veränderte Signalwirkung über große Entfernungen erklärt werden. Diese theoretische Möglichkeit kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es keine Hinweise auf einen derartigen Wirkmechanismus von *GOOSECOID* während der normalen Embryogenese. Die Repression der *Brachyury*-Transkription im Primitivstreifenmesoderm bewies, dass das transgene *GOOSECOID*, wie das LacZ-Markergen, in eben diesen Zellen aktiviert wird, d. h. dass der *Brachyury*-Promotor zuverlässig funktioniert. Die genetische Analyse der Interaktion von *GOOSECOID*, *Hnf-3* und *Fgf-8* in Deletionsmutationen in Mäusen haben gezeigt, dass *gooseoid* synergistisch mit *HNF-3* für die Expression von *Fgf-8* im Neuroektoderm nötig ist (Filosa et al., 1997).

In der Funktionsgewinnsituation in doppelt transgenen Embryonen bestätigte sich dieser positive Effekt von *GOOSECOID* auf die *Fgf-8*-Transkription. Diese Wirkung ist sowohl im Mesoderm des Primitivstreifens, dem Ort der initialen Missexpression, als auch im anterioren Neuroektoderm zu beobachten, ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der vermuteten Zellwanderung. Auch die verstärkte Expression des *Hnf-3*-Gens legt davon Zeugnis ab, wobei die positive Verstärkung dieses Transkriptionsfaktors ebenfalls in der bereits erwähnten genetischen Analyse in der Maus gezeigt wurde. Induktion der *gooseoid*-Expression im ventralen Diencephalon durch die darunterliegende Prächordalplatte war im Zusammenhang mit der molekularen Analyse der *cyclops* Mutante im Zebrafisch vorgeschlagen worden (Thisse et al., 1994). Die in doppelt transgenen Embryonen beobachtete

Verbreiterung der *goosecoid*-Expressionsdomäne im Diencephalon steht im Einklang mit diesem Modell. Und schliesslich bietet die *Loop tail* Mutante einen Präzedenzfall für Neuralchlussdefekte, die durch eine verbreiterte Grundplatte ausgelöst werden.



**Abb. 29 Modell: *goosecoid* Misexpression führt zu NTD.**

(A) Schematische Darstellung eines doppelt transgenen Maus-Embryos am Tag E8.5. Transgene *goosecoid*-Expression, unter der Kontrolle des *Brachyury*-Promotors, im gesamten Primitivstreifen. Die *goosecoid* missexprimierenden mesodermalen Zellen wandern (roter Pfeil), wie die endogenen *goosecoid* exprimierenden Zellen, anterior aus dem Primitivstreifen und bilden den mesodermalen Anteil der Prächordalplatte. Dies führt zu einer Verbreiterung der Prächordalplatte.

(B) Die transgene *gooseoid*-Expression führt zu Repression der endogenen *Brachyury*-Transkription im gesamten Primitivstreifenmesoderm. Die Missexpression von *gooseoid* bewirkt eine Aktivierung der Genexpression von *Hnf-3* im Primitivstreifen und in der Prächordalplatte. Dies wird erreicht entweder durch direkte Bindung des *GOOSECOID*-Proteins an den *Hnf-3*-Promotor (1.) oder durch Repression eines die *Hnf-3*-Expression reprimierenden Faktors (2.+3.), und bewirkt damit die Erhöhung der *Hnf-3*-Transkription. *GOOSECOID* und *Hnf-3* interagieren synergistisch miteinander und aktivieren dabei die *Fgf-8*-Expression im Primitivstreifen und prächordalem Mesoderm.

(C) Eine verbreiterte Prächordalplatte in den *gooseoid* missexprimierenden Embryonen führt zu einer Verstärkung der induktiven Signale in die darüberliegende Grundplatte. Als eine Folge dieser erhöhten Signaleinwirkung resultiert eine Verbreiterung der Grundplatte. Das Zusammentreffen der Neuralwülste wird mechanisch verhindert. Das Neuralrohr schliesst sich nur unvollständig und es entstehen Neuralrohrverschlussdefekte.

Zusammenfassend legt die Analyse der doppelt transgenen Embryonen nahe, dass die primären Effekte des Experiments in einer Veränderung des Zellwanderungsverhaltens resultiert, in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Arbeitshypothese. Sekundär kommt es zu einer Verbreiterung der Prächordalplatte. Dies induziert eine verbreiterte Grundplatte, die den Neuralrohrverschluss behindert.

Die konditionale transgene Mauslinie, die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit entstand, bietet daher die Möglichkeit, nicht nur die Regionalisierung des Primitivstreifens und die Mechanismen von Zellwanderung im Säugetierembryo zu untersuchen, sondern bietet sich als Modell für Neuralrohrverschlussdefekte auch beim Menschen an.

## 4 Material

### 4.1 Bezugsquellen

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0.8)	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics Mannheim
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Biozym, Hameln
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Ampicillin	Roche, Mannheim
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad Laboratories, München
Ammoniumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Augsburg
Bakterienschalen (10 cm)	Greiner, Nürtingen
BM Purple Alkalische Phosphatase Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Boehringer Blockierungs-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-gal)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CHAPS (3-[(Cholamimidopropyl)-Dimethylammonio]- 1-Propan-Sulfonat)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
D-Luziferin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm

Digoxygenin-dNTP-Labeling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-Standard	New England Biolabs, Schwalbach/Ts.
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) (with high glucose )	Gibco, Eggenstein)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenguanintrtraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GbmH, Bensheim
Entellan neu (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Folin-Lösung	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Geneticin $\square$ -sulphat (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	BRL, Inc., Neu- Isenburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	BioRad Laboratories, München
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hybond-N <sup>+</sup> Membranen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immu-Mount, wäßriges Einbettmedium	Shandon, Frankfurt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Butanol)	Roth, Karlsruhe
Lambda DNA	Gibco, Eggenstein
Ligase Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaliumhexacyanoferrat (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Minimal Medium Alpha (MEM)	Gibco, Eggenstein
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Gibco, Eggenstein
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
N-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Gibco, Eggenstein
N, N'-Methylen-Bisacrylamid	BioRad Laboratories, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad Laboratories, München
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraplast Plus Histowax	Sherwood, Athy
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbegestelle	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbetröge	Bender und Hobein, Karlsruhe
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen, Düsseldorf
QuikHyb™-Hybridisierungslösung	Stratagene, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
RediPrime Random Primer Labeling	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
	Promega, Heidelberg
	USB, Cleveland
	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuklease A (RNase A)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonukleotidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RNASin	Promega, Heidelberg
Röntgenfilme (Hyperfilm™ MP)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sephadex G 50 Nick Columns	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Sterilfilter	Renner GmbH, Darmstadt
Superfrost Plus Objektträger	Labonord, Mönchengladbach
SP6-RNA-Polymerase	Promega, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg
T3-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T7-R NA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase und Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermosequenase Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Transkriptionspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl, Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	BioRad Laboratories, München
Torula RNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
t-RNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
Whatmann 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Wizard Plus SV Miniprep Kit	Promega, Mannheim
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen Becton Dickinson, New Jersey, USA
Ziegenserum	Sarstedt, Nürnberg Sigma, Deisenhofen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Merck, Darmstadt und Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

## Radiochemikalien

[ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP	(370 Mbq/ml)
[ $^{33}\text{P}$ ]-ddNTPs ([ $^{33}\text{P}$ ]-ddATP, [ $^{33}\text{P}$ ]-ddCTP, [ $^{33}\text{P}$ ]-ddGTP und [ $^{33}\text{P}$ ]-ddTTP)	(17 Mbq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

## 4.2 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

### ***E.coli* DH 5 $\lambda$**

Genotyp: F<sup>-</sup>, end A1, hsd R17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), sup E44, thi<sup>-</sup>, 1<sup>-</sup>, rec A1, gyr A96, rel A1. (aus dem Bakterienstock des Instituts für Toxikologie und Genetik, ITG)

### **TOP10 F'**

Genotyp: F'<sup>+</sup>mcrA $\lambda$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\lambda$  80, lacZ $\lambda$ M15 $\lambda$ lacX74deoR, recA1, araD139 $\lambda$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG. (Bestandteil des TOPO-TA Klonierungssystems, Invitrogen, Groningen, Niederlande)

### **E14.1**

Embryonale Stammzelllinie der Maus (Kühn et al., 1991); zur Verfügung gestellt von K. Rajewsky, Köln.

### **KPA**

Embryonale Stammzelllinie der Maus. Subklon der E14.1 ES-Zelllinie; zur Verfügung gestellt von K. Knobloch, Berlin.

## 4.3 Kulturmedien

Vorbemerkung: Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei Prozentangaben in Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern um Volumenprozent (v/v).

### **LB-Medium**

1% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0.1% (w/v) Glucose

### **Selektivagar**

1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0.1% (w/v) Glucose, 1.5% (w/v) Agar, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin

**SOB-Medium**

2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>)

**SOC-Medium**

2% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose

**ES-Zell-Kultumedium**

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) (*with high glucose*, Gibco, Eggenstein) mit 20% FCS (*fetal calf serum*, Biochrom KG, Berlin), 1x non-essential aminoacids (Gibco, Eggenstein), 0.1M 2-Mercaptoethanol (Gibco, Eggenstein) und 1000 U/ml LIF (ESGRO<sup>TM</sup>, *murine leukemia inhibitory factor*, Gibco, Eggenstein)

**Fibroblasten-Kulturmedium**

DMEM mit 10% FCS (PAA Laboratories, Linz, Austria) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein)

## 4.4 Puffer und Lösungen

**TBE-Puffer**

90mM Tris pH 8.3, 90mM Borsäure, 2.5mM EDTA pH 8.0

**TAE-Puffer**

40mM Tris-Acetat, 2mM EDTA, pH 8.5

**TE-Puffer**

10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0

**PBS**

137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.7mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

**PBS<sup>-</sup> (-Ca/-Mg)**

137mM NaCl, 2.7mM KCl, 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3

**10xSSC**

1.5M NaCl, 0.15M Na-Citrat pH 6.7

## 4.5 Plasmide

<b>pCDNA3.1</b> (5.4 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor; Invitrogen, Groningen, Niederlande
<b>pCRII-TOPO</b> (3.9 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor; Invitrogen, Groningen, Niederlande
<b>pBluescript II SK<sup>-</sup></b> (2.9 kb)	Prokaryontischer Kloniervektor; Stratagene, Heidelberg
<b>pRC/CMV</b> (5.4 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor; Invitrogen, Groningen, Niederlande
<b>pML129</b> (4.0 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor pGEM3, der folgende Elemente enthält: 650 bp Fragment des murinen <i>Brachyury</i> -Promotors; Sequenz des $\beta$ -Galaktosidase-(LacZ)-Markergen einschliesslich nachgeschalteten Polyadenylierungssignale (in allen drei Leserastern); die Markergenkassette ist von zwei Cre-Erkennungssequenzen (loxP) flankiert; zur Verfügung gestellt von G. Martin, San Francisco, USA.
<b>pML 125</b> (4.8 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor pGEM3, der das bakterielle Aminoglycosid-Phosphotransferasegen (Neo) unter der Kontrolle des Promotors des Phosphoglycerinkinase-Gens (PGK) enthält; zur Verfügung gestellt von G. Martin, San Francisco, USA.
<b>PT81luc</b> (6.6 kb)	Eukaryontischer Klonier- und Expressionsvektor der eine Luziferasereportersequenz enthält (Nordeen, 1988).
<b>PT81luc/T</b> (7.25 kb)	PT81luc-Vektor, der ein 650 bp Fragment des murinen <i>Brachyury</i> -Promotors enthält; zur Verfügung gestellt von M. Schäffer, ITG, Karlsruhe.
<b>PT81luc/T-mutiert</b> (7.25 kb)	PT81luc-Vektor, der ein mutiertes 650 bp Fragment des murinen <i>Brachyury</i> -Promotors enthält; zur Verfügung gestellt von M. Schäffer, ITG, Karlsruhe.
<b>pCDNA3.1-gsc</b> (6.6 kb)	pCDNA3.1-Vektor, der die vollständige kodierende <i>gooseoid</i> -cDNA-Sequenz (Maus) enthält (Blum et al., 1992).
<b>pUbi1.1+</b> (6.6 kb)	pCDNA3.1-Vektor, der statt des CMV-Promotors ein 1.2 kb Fragment des menschlichen Ubiquitin-Promotors enthält (Schorpp et al., 1996); zur Verfügung gestellt von M. Schäffer, ITG, Karlsruhe.
<b>pUbi/gsc</b> (7.8 kb)	pUbi1.1+-Vektor, der unter der Kontrolle des menschlichen Ubiquitin-Promotor die vollständige kodierende <i>gooseoid</i> -cDNA-Sequenz (Maus) enthält; zur Verfügung gestellt von M. Schäffer, ITG, Karlsruhe.
<b>pmT</b> (4.7 kb)	pBluescript II SK <sup>-</sup> -Vektor, der ein 1.8 kb EcoRI-Fragment der murinen <i>Brachyury</i> cDNA-Sequenz enthält (Hermann et al., 1990); zur Verfügung gestellt von B. Hermann, Freiburg.

<b>pHNF-3</b> (4.5 kb)	pGEM3-Vektor, der ein 1.6 kb HindIII-Fragment der murinen <i>HNF-3</i> cDNA-Sequenz enthält; zur Verfügung gestellt von A. Mansouri, Göttingen.
<b>pFgf-8</b> (4.3 kb)	pBluescript II SK <sup>-</sup> -Vektor, der ein 1.2 kb SmaI-Fragment der murinen <i>Fgf-8</i> cDNA-Sequenz enthält; zur Verfügung gestellt von A. Mansouri, Göttingen.

## 4.6 Mausstämme und Mauslinien

Adulte Mäuse des Mausstammes C57BL/6J und B6DBA/2 wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und werden seit 1995 in den Tierställen des Instituts für Toxikologie und Genetik gehalten.

Zwei adulte männliche, heterozygote *deleter* und zwei adulte weibliche, heterozygote *deleter* Mäuse wurden von K. Rajewsky, Universität Köln zur Verfügung gestellt. Diese befanden sich in einem Stammhintergrund von C57BL/6J.

Alle Mäuse wurden artgerecht in den Tierställen des Instituts für Toxikologie und Genetik in einem 12-stündigen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten freie Verfügung über Futter (Ssniff R/M H, extrudiert, Ssniff, Soest) und Wasser.

## 5 Methoden

### 5.1 Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

#### Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Reinigung einer Nukleinsäurelösung von Proteinen wurde in einem Mindestvolumen von 100  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1xTNE gesättigt, 1xTNE: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0) wurde gemischt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) nochmals gemischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch 3 min Zentrifugation bei 10000  $g$ . Proteine sammeln sich in der Interphase. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und zur Beseitigung von Phenolresten nochmals mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) auf die gleiche Weise extrahiert. Die gereinigte nukleinsäurehaltige Oberphase wurde dann zur weiteren Verwendung abgenommen.

#### Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Eine wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 3M Natriumacetat (pH 4.8) zu einer Endkonzentration von 0.3M versetzt, 2.5 Volumina absoluter Ethanol zugegeben und gemischt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei 4°C. Anschließend wurde das Präzipitat 15 min bei 10000  $g$  zentrifugiert, zur Entfernung von Salz mit kaltem 75% Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und an der Luft getrocknet.

#### Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt (Spektralphotometer: Spektrol UV/ViS, Carl Zeiss, Jena). Eine Extinktion bei 280 nm zeigt Verunreinigungen durch Proteine an. Das Verhältnis  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  sollte bei DNA etwa 1.8 und bei RNA etwa 2.0 sein. Eine Extinktion bei 260 nm entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

### 5.2 Präparation von DNA

#### Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Eine Bakterienkolonie mit dem entsprechenden Plasmid wurde in 3 ml LB-Selektionsmedium (LB-Medium, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Bakterienkultur wurden 1.5 ml für 5 min bei 2000  $g$  zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100  $\mu\text{l}$  GTE-Lösung (50mM Glucose, 25mM Tris, pH 8.0, 10mM EDTA pH 7.8) resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden 200  $\mu\text{l}$  alkalischer SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  3 M NaAc pH 4.8, vorsichtigem Mischen, wurde für 5 min bei 10000  $g$  zentrifugiert, um Zellfragmente und chromosomale DNA abzutrennen. Anschliessend wurde der Überstand Phenol/Chloroform-extrahiert. Die in der

wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer mit RNase (100  $\mu$ g/ml) aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurden hiervon 10  $\mu$ l für einen Restriktionsverdau verwendet.

Sollte die DNA-Präparation im kleinen Maßstab zur Sequenzierung eingesetzt werden, wurde alternativ das kommerzielle *WIZARD Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega, Mannheim) eingesetzt. Hierbei wurden von einer Übernacht-Bakterienkultur 1.5 ml für 5 min bei 2000 *g* zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250  $\mu$ l *WIZARD* Resuspensionslösung durch mehrmaliges Invertieren resuspendiert. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l *WIZARD* Lysislösung wurde nach 4-maligem Invertieren für 1-5 min bei RT inkubiert bis das Lysat klar erschien. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l alkalischer Proteaselösung und erneutem 4-maligem Invertieren wurde für maximal 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden 350  $\mu$ l *WIZARD* Neutralisierungslösung zugegeben und erneut 4 mal invertiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 *g* und RT wurde der Überstand auf eine *WIZARD* Zentrifugationssäule gegeben und für 1 min bei 14000 *g* zentrifugiert. Die auf der Säule zurückgehaltene DNA wurde durch Zugabe von zunächst 750  $\mu$ l, dann 250  $\mu$ l *WIZARD* Waschlösung durch Zentrifugation für je 1 min bei 14000 *g* gewaschen und anschliessend mit 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O durch erneute Zentrifugation eluiert. Nach Analyse der Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau wurde die so gewonnene DNA zur Sequenzierung verwendet.

### **Präparation großer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Ionenaustausch-Säulenchromatographie mit Qiagen-tip-500-Säulen (Qiagen, Hilden). 250 ml einer über Nacht in LB-Selektionsmedium (LB-Medium, 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) inkubierten Bakterienkultur mit dem entsprechenden Plasmid wurden 10 min bei 2000 *g* und 4°C zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 10 ml Puffer 1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 8.0, 100  $\mu$ g/ml RNase A) wurden 10 ml Puffer 2 (2mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml 2.6M KAc pH 4.8 zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und anschliessend 30 min bei 10000 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT (750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix bindet. Nach Durchfluss dieses Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1M NaCl, 50mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (1.25M NaCl, 50 mM MOPS pH 8.2, 15 % Ethanol) eluiert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min bei 10000 *g* und 4°C pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol und Trocknen wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer gelöst und die Konzentration bestimmt. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### **Präparation genomischer DNA aus embryonalem oder adultem Gewebe zur Genotypisierung**

Embryonalhüllengewebe bzw. Schwanzspitzen-Biopsien (0.1-0.6 cm) der Mäuse wurden in je 200  $\mu$ l Lysis-Puffer (100mM Tris pH 8.5, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl, Proteinase K 100  $\mu$ g/ml) gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde gut gemischt (Vortex) und 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend durch Isopropanolfällung mit folgender Zentrifugation gewonnen und in 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O unter Schütteln bei 55°C gelöst. Zur Genotypisierung mit PCR wurden 17.5  $\mu$ l der gelösten DNA eingesetzt.

### **Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen**

Zur Lyse der ES-Zellen wurden diese in 500  $\mu$ l Lysispuffer (100mM Tris pH 8.5, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl, Proteinase K 100  $\mu$ g/ml) für 2 h bei 37°C inkubiert. Zu dem Lysat wurde das gleiche Volumen an Isopropanol gegeben und gemischt. Die präzipitierte DNA liess sich um die Spitze einer Pipette wickeln und durch Eintauchen in 80% Ethanol waschen. Das Präzipitat wurde in 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und unter Schütteln bei 55°C gelöst.

## **5.3 Klonierungstechniken**

### **Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Eine Enzymeinheit U ist definiert als die Menge Enzym, die 1  $\mu$ g DNA des Phagen Lambda ( $\lambda$ ) in einer Stunde vollständig verdaut. Für analytische und präparative Zwecke wurde die zu verdauende DNA mit 2-3 Einheiten Restriktionsenzym pro  $\mu$ g DNA bei den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen (in der Regel 37°C) für 1 h bis über Nacht inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zehnfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Bei Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben; andernfalls wurde zuerst der Verdau mit dem Enzym und Puffer niedriger Ionenstärke durchgeführt, und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation erfolgte dann der Verdau mit dem zweiten Enzym und entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke. Bei Plasmid-DNA aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l RNaseA zugesetzt. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschliessend über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### **Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt und mit 3 U T4-DNA-Ligase und 2  $\mu$ l 10x Ligasepuffer (50mM Tris pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM Spermidin, 1mM ATP) in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l über Nacht bei 15°C inkubiert. Zehn  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden in kompetente Bakterien transformiert.

### **Präparation kompetenter Bakterien**

Eine Kolonie von *E.coli* DH5 $\alpha$  wurde in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Einhundert ml SOB-Medium wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur angeimpft und solange bei 37°C geschüttelt, bis die optische Dichte bei 560 nm etwa 0.3-0.35 betrug. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Bakterienkultur

für 10 min bei 2000 *g* und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde auf Eis vorsichtig in 20 ml eiskaltem STB (100mM KCl, 45mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 3mM H<sub>2</sub>CoCl<sub>3</sub>, 10mM K-Mes pH 6.3, 15% Glycerin) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 *g* und 4°C wurden die Bakterien vorsichtig in 4 ml eiskaltem STB resuspendiert. Die Bakterien waren nun für die Aufnahme von DNA kompetent, und wurden entweder direkt transformiert oder in 100 µl Aliquots bei - 80°C aufbewahrt.

### **Transformation kompetenter Bakterien**

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, 10 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA zugemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42°C und 2 min Inkubation auf Eis wurden 3 ml SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien für 3 min bei 1000 *g* sedimentiert und das Bakterienpellet in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Selektivagarplatten (LB/Ampicillin-Platten) ausplattiert und zum Wachstum der ampicillinresistenten Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den resultierenden Kolonien konnte ein Klon gepickt, weiterkultiviert, für Plasmidpräparation verwendet oder eingeforen werden.

### **Klonierung von PCR-Produkten mit dem TOPO-Klonierungssystem (Invitrogen, Groningen, NL)**

Das TOPO-Klonierungssystem bietet aufgrund einer schnellen, einstufigen Klonierungsstrategie die Möglichkeit der direkten Insertion von Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Es beruht auf einer von der DNA-Matrize unabhängigen Aktivität der thermostabilen Taq-Polymerase während PCR-Reaktionen. Diese heftet an alle 3'Enden von doppelsträngiger DNA ein zusätzliches Desoxyadenosin (A). Da der Vektor pCRTMII-TOPO einzelne 3'Desoxythymidin (T)-Überhänge besitzt ist es möglich, PCR-Produkte direkt mit diesem zu ligieren. Im TOPO-Klonierungssystem waren neben dem Vektor zusätzlich kompetente Bakterien (Top10F'), SOC-Medium und β-Mercaptoethanol für die Transformation enthalten. Diese Klonierungsmethode wurde für die Klonierung der beiden RT-PCR Produkte des *gooseoid* Transgens in den doppelt transgenen Embryonen angewandt. Jeweils 0.5-2 µl (10 ng/µl) PCR-Produkt wurden für die Ligation eingesetzt. Die Konzentration an PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese, durch Vergleich mit definierten Markermengen ermittelt. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt: 0.5-2 µl frisches PCR-Produkt wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 4 µl aufgefüllt. Nach Zugabe und vorsichtigem Mischen von 1 µl Vektor pCRII-TOPO erfolgte die Ligation innerhalb von 5 min bei RT, so dass unmittelbar im Anschluss direkt mit der Transformation nach Vorschrift des TOPO-Klonierungssystems begonnen werden konnte.

### **Herstellung von Selektivagarplatten**

In einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar in einem Liter ddH<sub>2</sub>O gelöst, und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agarplatten (10 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt.

## **5.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele**

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarosegele. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0.8 bis 1.5% Agarosegele verwendet. Je nach Größe der Gelkammern (50 oder 300 ml) wurde TBE-Puffer bzw. TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose versetzt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis sich die Agarose vollständig löste. Nach Abkühlen der Agarose und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.4 µg/ml) wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Aushärten mit TBE- bzw. TAE-Laufpuffer überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer (10mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerin, 0.1% (w/v) SDS, 0.02% (w/v) Bromphenolblau) versetzten Proben wurden in die von einem Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter DNA-Fragmentlängenstandard (spezifisch restriktionsfragmentierte λDNA) ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50-120 V. Danach konnten die Nukleinsäurefragmente durch Fluoreszenz unter einem UV-Transilluminator bei 256 nm (IL-350M, Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

## **5.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Systems *Easy Pure DNA Purification Kit* (Biozym Diagnostik, Oldendorf). Die Bande des zu isolierenden DNA-Fragments wurde unter UV-Durchlicht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und ihr Volumen bestimmt, wobei eine Masse von 100 mg einem Volumen von 100 µl gleichgesetzt wurde. Anschließend wurden dem Gelstück das 1/2 Volumen MELT-Lösung und 4.5x Volumen des Ausgangsvolumen an SALT-Lösung zugegeben und für mindestens 5 min bei 55°C unter Schütteln inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Fünf µl + 1 µl/µg der erwarteten Ausbeute an DNA wurden an BIND-Lösung zugegeben und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur unter häufigem Mischen inkubiert. Die (gebundene) DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, mit 1 ml WASH-Lösung gewaschen, nochmals durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und bei RT getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 10-20 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und nach erneuter Zentrifugation für 1 min als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

## 5.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte

### Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Didesoxymethode

Die zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA (pCR II-TOPO-Vektor) wurde nach der Isolierung mittels *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega, Mannheim) in 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und deren Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Für jeden zu sequenzierenden Klon wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, um die Sequenz von beiden Seiten der Insertion im TOPO-Vektor, d. h. mit Hilfe des T7- bzw. Sp6-Primers (5'-AATACGACTCATTATAG-3' bzw. 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'), lesen zu können. Für jede dieser beiden Reaktionen wurden jeweils vier Polymerasen Kettenreaktionen angesetzt, von denen jede 2.5  $\mu\text{l}$  Terminationsmix, der aus 2  $\mu\text{l}$  dGTP Nukleotid-Mastermix (7.5  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0.5  $\mu\text{l}$  des entsprechenden [ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]-ddNTP ([ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]-ddATP, [ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]-ddCTP, [ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]-ddGTP oder [ $\alpha$ -P<sup>33</sup>]-ddTTP) besteht, enthielt. Jeder dieser Polymerasen Kettenreaktionsansätze enthielt somit 0.25  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Primers (2 pmol), 0.5  $\mu\text{l}$  10x Reaktionspuffer (260mM Tris-HCl pH 9.5, 65mM MgCl<sub>2</sub>), 3.75  $\mu\text{l}$  DNA (1-3  $\mu\text{g}$ ), 0.5  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (4 U/ $\mu\text{l}$ ) und 2.5  $\mu\text{l}$  Terminationsmix. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-225, Biozym, Hameln) unter folgenden Bedingungen: 30 sec 95°C, 30 sec 55°C, 1 min 72°C für 45 Zyklen. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 4  $\mu\text{l}$  Stop-Lösung (95% Formamid, 20mM EDTA, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylencyanol FF) abgestoppt und bei -20°C bis zur Auftrennung der Reaktionsprodukte aufbewahrt.

### Auftrennung der Sequenzierungsreaktion durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden die im Verlauf der Sequenzierungsreaktion entstandenen DNA-Fragmentgemische in denaturierenden 6% Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Um die DNA-Fragmente in denaturiertem Zustand zu halten, wurden Sequenzgele mit einer hohen Harnstoffkonzentration (7M) hergestellt. Unter Verwendung einer Sequenzierapparatur (SequiGen GT *Sequencing Cell*, BioRad, München) wurde die Elektrophorese bei einer hohen Leistung (100 W) durchgeführt, um die erforderliche Temperatur von 45-50°C aufrechtzuerhalten. Die Elektrophoresedauer richtete sich nach dem Ausmaß der gewünschten Sequenzinformation und betrug zwischen 1.5 und 4.5 Stunden. 150 ml einer Gellösung (6% (w/v) Acrylamid, 0.16% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 8M Harnstoff in TBE-Puffer) wurden mit 900  $\mu\text{l}$  10% (w/v) APS und 90  $\mu\text{l}$  TEMED versetzt und nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei Glasplatten, die durch zwei konisch zulaufende 0.2 bis 0.4 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennt wurden, gegossen. Nach Einsetzen eines Taschenformers erfolgte die Polymerisation des Gels in horizontaler Lage über Nacht. Das polymerisierte Gel wurde in eine Vertikalgelapparatur gespannt und oberes und unteres Pufferreservoir mit TBE-Puffer gefüllt. Nach einem 30 minütigen Vorlauf des Gels wurden 3  $\mu\text{l}$  der zuvor 20 min bei 80°C denaturierten Proben in die Taschen überführt. Nach Beendigung der Elektrophorese und Abkühlen des Gels auf

Raumtemperatur wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt. Das Gel wurde auf 3MM-Papier aufgezogen, für 2 h bei 80°C im Vakuum getrocknet und einem Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) über Nacht bei RT exponiert.

## 5.7 Präparation von polyadenylierter RNA

Zur Isolierung polyadenylierter RNA aus embryonalem Gewebe wurde das kommerzielle *Dynabeads mRNA Direct™ Kit* (DynaL, Norwegen) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Basenpaarbindung zwischen der Poly(A)-Region der mRNA und einer an superparamagnetischer monodispersen Polymerpartikel (*Dynabeads*) kovalent gebundene Oligo(dT)-Sequenz. Durch anschließende Elution wird die an die Oligo(dT)-Sequenz gebundene polyadenylierte RNA isoliert und kann zur weiteren Analyse wie z. B. einer nach reverser Transkription durchgeführten Polymerasen Kettenreaktion (RT<sup>+</sup>-PCR) verwendet werden.

Zum spezifischen Nachweis der Transkription des transgenen *goosecoid*-Gens in doppelt transgenen Embryonen durch eine RT<sup>+</sup>-PCR-Analyse wurden doppelt transgene und Wildtyp-Embryonen (E8.5) dissektiert, d. h. die Embryonen wurden in der Mitte durchtrennt und der posteriore Anteil wurde zur mRNA Isolierung verwendet. Die Schwanzspitze von doppelt transgenen Embryonen mit NTD-Phänotyp und Wildtyp-Embryonen (E10.5) wurde abgetrennt und zur mRNA Isolierung verwendet. Weder in der posterioren Region noch in der Schwanzspitze wird das endogene *goosecoid*-Gen während der Embryogenese E8.5-E10.5 exprimiert, d. h. lediglich die Expression des transgenen *goosecoid*-Gens kann detektiert werden. Das embryonale Gewebe wurde in 300  $\mu$ l Lysis/Bindepuffer (100mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM LiCl, 10mM EDTA pH 8.0, 1% (w/v) LiDS, 5mM DTT) aufgenommen, homogenisiert und für 30 sec bei 10000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde mit den Oligo(dT)-Partikel in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 10 min bei RT inkubiert, hierbei binden die Poly(A)-Region an die Oligo(dT)-Partikel. Anschliessend wurde das Reaktionsgefäß für 5 min in den *Magnetic Particle Concentrator* (Dyna<sup>l</sup>MPC, Dynal, Norwegen), einem Reaktionsgefäß-Ständer mit integriertem starken Magneten, gestellt. Die magnetischen Polymerpartikel wurden durch den Magneten im Ständer an eine Seite des Reaktionsgefäß gezogen und sammelten sich dort. Der Überstand konnte vorsichtig abgenommen werden und die Partikel wurden 2x mit 600  $\mu$ l Waschlösung A (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA, 0.1% (w/v) LiDS) und 2x mit 300  $\mu$ l Waschlösung B (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA) gewaschen. Die mRNA wurde mit 10  $\mu$ l 10mM Tris-HCl pH 7.5 eluiert und für 2 min bei 65°C inkubiert. Anschliessend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## 5.8 Das Transgenkonstrukt (pTgsc)

Zur Herstellung einer transgenen Maus, die *gooseoid*-Gen unter der Kontrolle des *Brachyury*-Promotors im gesamten Primitivstreifen missexprimiert, wurde das in Abb. 7 schematisch dargestellte konditionale Missexpressionsexperiment entworfen.

Das Transgenkonstrukt (pTgsc) enthielt folgende Elemente:

- Ein 650 Basenpaar-Fragment des murinen *Brachyury*-Promotors. Dieses Element (das sogenannte Primitivstreifen-Enhancerelement) ist für die korrekte zeitliche wie auch räumliche Expression eines Markergens im gesamten Primitivstreifen während der Gastrulation ausreichend (Clements et al., 1996).
- Ein  $\beta$ -Galaktosidase-(LacZ)-Markergen, das die Überprüfung der korrekten Expression des Transgens im Embryo erlaubte. Um sicherzustellen, dass es nicht zu einer Aktivierung der transgenen *gooseoid*-Gensequenz vor der Cre-vermittelten Rekombination kommen kann, waren dem LacZ-Markergen Polyadenylierungssignale (in allen drei Leserastern) nachgeschaltet. Die Markergenkassette war von zwei Cre-Erkennungssequenzen (loxP) flankiert. Diese dienten dem späteren Entfernen der Kassette durch die Cre-Rekombinase.
- Die vollständige kodierende *gooseoid*-Gensequenz (770bp), verknüpft dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors (bGH-pA).



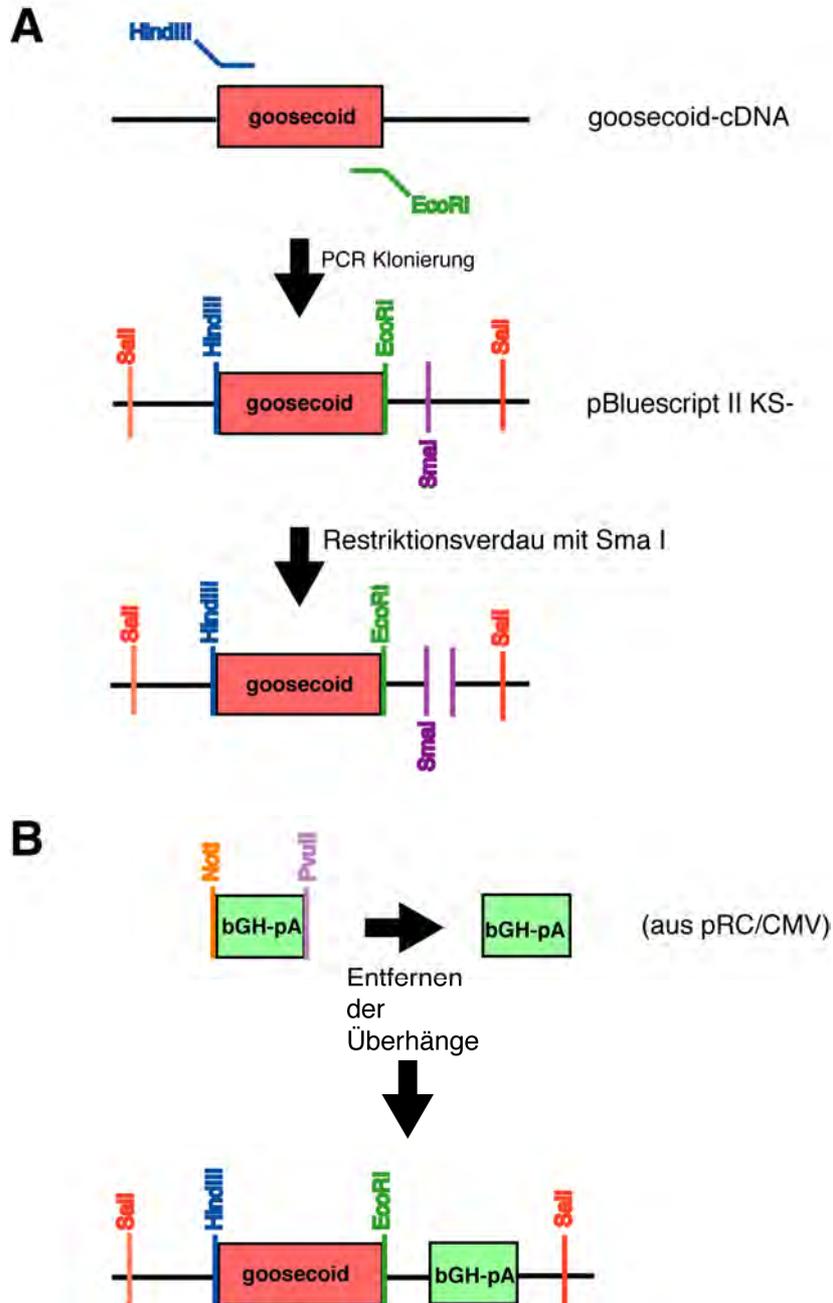
**Abb. 31** Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts (pTgsc).

Ein Promotorelement des *Brachyury*-Gens (grün) kontrolliert die Expression des Transgenkonstrukts. Eine nachgeschaltete Markergenkassette (LacZ-Markergen; blau), wird flankiert von zwei Cre-spezifischen Erkennungselementen (loxP, gelb). Die dreifachen Polyadenylierungssignale (pA)<sub>3</sub>; hellblau) des Markergens verhindern die Expression des sich anschließenden Zielgens (*gooseoid*; rot) vor Cre-vermittelter Rekombination. Die kodierende *gooseoid*-Gensequenz ist mit einem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors (bGH-pA; hellgrün) verknüpft.

### Klonierung des Transgenkonstrukts (pTgsc)

Als erster Schritt wurde die kodierende Sequenz des *gooseoid*-Gens mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingeführt (HindIII am 5' Ende, EcoRI am 3' Ende; siehe Abb.32). Die PCR-Produkte wurden in den pBluescript-Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass – vermutlich durch den sehr hohen Anteil von GC-Basenpaaren, der z.B. in Exon 1 über 70% liegt – sehr viele Fehler auftraten, die durch Kompression bei der Gelelektrophorese nicht immer einfach zu detektieren waren. Erst beim 13. sequenzierten Klon wurden keine Sequenzfehler festgestellt. Dieser Klon wurde, wie in Abb. 32 gezeigt, mit dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors (bGH-pA), welches aus dem pRc/CMV Expressionsvektor isoliert wurde, verknüpft. Zur weiteren

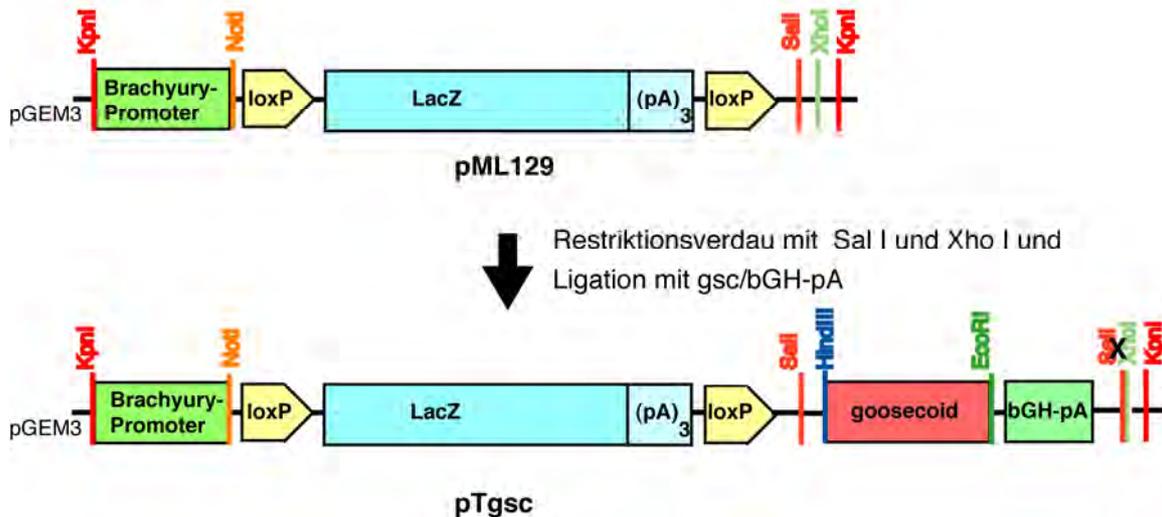
Klonierung des Transgenkonstrukts wurde die verknüpfte Sequenz in das Plasmid pML129 subkloniert (Abb. 33).



**Abb. 32** Schematische Darstellung der Verknüpfung der *goosecoid*-Sequenz mit dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors.

(A) Klonierung der mit PCR amplifizierten kodierenden Sequenz des *goosecoid*-Gens und eingeführten Restriktionsschnittstellen in den pBluescript-Vektor. Durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym SmaI, wurde das Plasmid für die nachfolgende Ligation des Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors vorbereitet.

(B) Durch Restriktionsverdau wurde das Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumsfaktors aus dem pRC/CMV-Vektor herausgeschnitten, die Überhänge der Restriktionsschnittstellen entfernt und hinter die *goosecoid*-Sequenz im pBluescript-Vektor kloniert.



**Abb. 33** Schematische Darstellung der Klonierung des Transgenkonstrukts pTgsc. Das Plasmid pML129 wurde mit den Restriktionsenzymen Sal I und Xho I geschnitten und das Sal I-Fragment (goosecoid/bGHpA) durch Ligation eingefügt.

## 5.9 Zellkultur

### Embryonale Stammzellkultur

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind aus der inneren Zellmasse (ICM) früher Embryonalstadien gewonnene Zellen, die eine pluripotente Zellpopulation darstellen. Somit sind sie in der Lage sich in sämtliche Zelltypen eines Organismus zu differenzieren. Durch das Einbringen von zusätzlicher DNA-Information, lassen sich transgene ES-Zellen herstellen. Nach Blastozysteninjektion integrieren sich diese transgenen Zellen wieder in einen Embryo. Durch Transfer der injizierten Blastozysten in Ammenmäuse lassen sich chimäre Tiere herstellen. Diese Chimären bestehen aus einer Mischung aus Wirtszellen und eingebrachten transgenen ES-Zellen. Durch Verpaarung chimärer Mäuse mit reinstämmigen Tieren lässt sich eine transgene Mauslinie etablieren. Neben dieser Verwendung eignen sich ES-Zellen auch für *in vitro* Differenzierungsstudien.

### Kultivierung von ES-Zellen

ES-Zellen müssen mit größter Sorgfalt in Kultur gehalten werden damit sie ihren embryonalen Charakter bewahren. Eine ungewollte Differenzierung der pluripotenten Zellen in spezifische Zelltypen muss vermieden werden. Andifferenzierte Zellen sind nicht mehr fähig sich in einen Embryo zu integrieren, geschweige denn an der Bildung der Keimzellen teilzunehmen. Es hat sich bewährt die Kulturen nur mit gekauften Medien und Supplementen zu versorgen, sowie ausschliesslich mit Plastikpipetten zu arbeiten, um eine Kontamination durch organische Lösungsmittel (Phenol etc.) oder Spülmittelresten vorzubeugen. Die ES-Zellen wurden auf einem Rasen von primären embryonalen Fibroblasten und auf gelatinisierten Gewebekulturschalen kultiviert. Die Fibroblasten (sogenannte *feeder*-Zellen) sezernieren Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium. Dies diente der Versorgung der ES-Zellen und verhinderte eine Differenzierung.

Die Fibroblasten wurden aus E13.5 Mausembryonen isoliert und vor Ko-Kultur mit 2000-3000 Rad aus einer  $^{60}\text{CO}$ -Quelle bestrahlt. Dies stellte eine subletale Dosis dar, die Zellen waren zwar stoffwechselaktiv jedoch nicht mehr teilungsfähig und konnten daher die ES-Zellen in der Ko-Kultur nicht überwachsen.

Das ES-Zell-Kulturmedium setzte sich aus DMEM (*with high glucose*; Gibco, Eggenstein) mit 20% FCS (*fetal calf serum*, Biochrom KG, Berlin), 1x non-essential aminoacids (Gibco, Eggenstein), 0.1M 2-Mercaptoethanol (Gibco, Eggenstein) und 1000 U/ml LIF (ESGRO<sup>TM</sup>, *murine leukemia inhibitory factor*, Gibco, Eggenstein) zusammen. Die ES-Zellen erhielten jeden Tag frisches Medium.

Die Morphologie der ES-Zellen wurde jeden Tag überprüft. Unter optimalen Bedingungen wachsen ES-Zellen als tropfenförmige Kolonien mit regelmässigem Rand. In der Kolonie selbst sind nur schwer Einzelzellen zu identifizieren, da ES-Zellen in engem Zell-Zell-Kontakt wachsen. Wenn die Kolonien eine bestimmte Größe erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert.

Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Gewebekulturschalen kultiviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten soweit möglich an einer Sterilbank (Glatt AG, Schweiz).

### **Passagieren von ES-Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS <sup>-/-</sup> gewaschen und für 5 min mit 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA (Gibco, Eggenstein) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Resuspendieren vereinzelt, anschließend in ES-Zell-Kulturmedium aufgenommen und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen, 1:5 verdünnt und auf Gewebekulturschalen mit bereits ausplattierten inaktivierten primären Fibroblastenzellen verteilt.

### **Einfrieren von ES-Zellen**

Nach Trypsinierung wurden Zellen durch Resuspendieren vereinzelt, in Kulturmedium aufgenommen und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in kaltem Einfriermedium (80% FCS und 20% DMSO) aufgenommen und in 1ml Aliquots auf -80°C eingefroren. Zur längeren Aufbewahrung wurden die eingefrorenen ES-Zellen nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

### **Auftauen von ES-Zellen**

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut, anschliessend in ES-Zell-Kulturmedium aufgenommen und für 3 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf Gewebekulturschalen mit bereits ausplattierten inaktivierten primären Fibroblastenzellen verteilt.

### **Präparation von primären embryonalen Maus-Fibroblastenzellen**

Da bei der Kultivierung der transfizierten ES-Zellen zur Selektion Neomycin bzw. G418 als Selektionsmarker verwendet wurde, müssen die Fibroblasten ebenfalls eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum besitzen. Zur Präparation dieser Zellen wurden ausschliesslich Embryonen (E13.5) verwendet, die aus Verpaarungen von Wildtyp (Mausstamm C57/DBA2xC57B6) und einer transgenen Mauslinie die das Neomycinresistenzgen trugen, stammten. Bei der verwendeten

transgenen Mauslinie handelte es sich um Tiere des Genotyps  $cd44^{-/-}$  (eine Neomyzinkassette führte in diesen Mäusen zum Funktionsverlust des  $cd44$ -Gens (Schmits et al., 1997). Schwangere Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, das Abdomen mit 70% Ethanol desinfiziert und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus duplex mit den Implantationen wurde entnommen und in eiskaltes PBS  $^{-/-}$  überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular unter sterilen Bedingungen. Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Implantationen durchtrennt. Nach Entfernen des Uterusgewebes und der embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) wurden der Kopf und die inneren Organe der Embryonen abgetrennt. Das restliche Rumpfgewebe wurde mit der Schere zerkleinert und in 0.25% Trypsin / 1mM EDTA (Gibco, Eggenstein) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 5 ml Pipette vereinzelt und anschliessend wurden die Zellen durch ein Zellsieb (40  $\mu$ m, Becton Dickinson, New Jersey, USA) in ein vorbereitetes 50 ml Röhrchen mit frischem Fibroblasten-Kulturmedium (DMEM, Gibco, Eggenstein mit 10% FCS (PAA Laboratories, Linz, Austria und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein) überführt. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 2 ml Fibroblasten- Kulturmedium pro 1 ml Trypsin eingesetzt. Die Zellen wurden durch 3minütiges Zentrifugieren bei 300 g pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und pro Embryo auf eine 15 cm Gewebekulturschalen bei 37°C kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach drei Tagen waren die Fibroblastenzellen konfluent gewachsen und wurden passagiert (siehe Passagieren von ES-Zellen). Nach 5 Passagen wurden die Kulturen seneszent und konnten nicht mehr zur Ko-Kultur mit ES-Zellen verwendet werden.

#### **Inaktivieren von Fibroblastenzellen durch Bestrahlung**

Zur Inaktivierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS  $^{-/-}$  gewaschen, mit 3 ml 0.25% Trypsin / 1mM EDTA (pro 15 cm Gewebekulturschale) für 5 min bei 37°C inkubiert und in Kulturmedium aufgenommen. Anschliessend wurden die Zellen bei 2-3000 RAD aus einer  $^{60}\text{CO}$ -Quelle bestrahlt. Die inaktivierten Fibroblasten wurden in Einfriermedium (80% FCS und 20% DMSO) zu jeweils 1 ml Aliquots eingefroren bei -80°C eingefroren.

#### **Auftauen von ES- und Fibroblastenzellen**

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut, anschliessend in Fibroblasten-Kulturmedium aufgenommen und für 3 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Fibroblasten-Kulturmedium aufgenommen und auf eine Gewebekulturschale verteilt.

#### **Gelatinisieren von Gewebekulturschalen**

Die Gewebekulturschalen wurden für 10 min mit einer 0.02% Gelatinelösung (Sigma, Deisenhofen) überschichtet, anschliessend wurde die Lösung wieder abgenommen.

#### **Stabile Transfektion von ES-Zellen mit Elektroporation**

Durch Elektroporation kann Plasmid-DNA effizient in Zellen eingebracht werden. An eine mit einer Zellsuspension gefüllte Elektrodenküvette wird kurz eine elektrische Spannung angelegt. Dadurch werden die Oberflächenladungen der

Zellen kurzfristig umgekehrt, die Zellporen öffnen sich und in Puffer gelöste DNA gelangt in die Zellen. Nach einem Kälteschock ziehen sich die Poren wieder zusammen.

Um zu gewährleisten, dass sich die ES-Zellen während des Experiments in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden sie am Vortag der Elektroporation passagiert. Am Tag der Elektroporation wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und für 5 min mit 0.05% Trypsin / 0.02% EDTA bei 37°C inkubiert. Anschliessend durch Resuspendieren vereinzelt, in Kulturmedium aufgenommen und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen, auf eine mit Gelatine beschichteten Gewebekulturschale gegeben und für 30 min 37°C inkubiert. Dieser Zeitraum genügte, um die Fibroblastenzellen sich an der Oberfläche der Gewebekulturschale anheften zu lassen. Somit konnten die ES-Zellen durch einfaches Spülen von den Fibroblastenzellen getrennt werden (sogenannte *preplate*-Technik). Die ES-Zell-Suspension wurde abgenommen, zweimal mit eiskaltem Elektroporationspuffer (PBS<sup>-</sup> / 10mM HEPES pH 7.05) gewaschen und die Anzahl der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Elektroporation wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in 800  $\mu$ l eiskaltem Elektroporationspuffer aufgenommen, mit 35-40  $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Zur Herstellung transgener ES-Zellklone mit stabiler Integration des Transgenkonstrukts (pTgsc) wurden 30  $\mu$ g des isolierten Fragments aus dem Transgenkonstruktplasmid nach KPN1-Restriktionsverdau (5.5 kb) und 5  $\mu$ g des nach SacII-Restriktionverdaus linearisierten Neomycinresistenz-Gen-Plasmids (pML125; 5 kb) zusammen elektroporiert. Zur Ko-Elektroporation wurden demnach beide DNA-Fragmente im molaren Verhältnis 6:1 eingesetzt. Ungefähr 60-80% der neomycinresistenten Klone werden beide DNA-Fragmente stabil in das Genom aufnehmen (Torres und Kühn, 1997).

Zur Herstellung transgener ES-Zellklone mit stabiler Integration eines Luziferase-Reportergenkonstrukts, wurden 30  $\mu$ g des nach BamHI-Restriktionsverdau linearisierten Luziferase-Reportergenkonstrukt (ca. 7 kb) zusammen mit 4  $\mu$ g des nach SacII-Restriktionsverdaus linearisierten Neomycinresistenz-Gen-Plasmid (5 kb) gleichzeitig elektroporiert.

Zur Herstellung chimärer Embryonen, die das *gooseoid*-Überexpressionsplasmid stabil enthielten wurden ES-Zellen mit 20  $\mu$ g des nach XbaI-Restriktionsverdau linearisierten *gooseoid*-Überexpressionsplasmids (5 kb), 12  $\mu$ g des nach XhoI-Restriktionsverdau linearisierten LacZ-Markergenkonstrukt (8.5 kb) und 7  $\mu$ g des nach SacII-Restriktionsverdaus linearisierten Neomycinresistenz-Gen-Plasmid (5 kb) gleichzeitig elektroporiert.

Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: BioRad Gene Pulser, 400 V und 250  $\mu$ F. Die elektroporierten Zellen wurden anschliessend 10 min auf Eis inkubiert und auf Gewebekulturschalen mit Fibroblasten ausgesät.

### **Selektion der neomycinresistenten ES-Zellklone**

Vierundzwanzig Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Neomycinselektion begonnen. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Selektionsmedium (400  $\mu$ g G418 pro ml ES-Zellen-Kulturmedium) zugegeben. Das Selektionsmedium wurde jeden Tag durch frisches ersetzt. Nach

vier Tagen begannen die ES-Klone, die das Neomycinresistenzgen nicht stabil in das Genom integriert hatten, abzusterben.

### **Isolierung und Expandieren einzelner transgener ES-Zellklone**

Am 10. Tag der Selektion wurden einzelne neomycinresistente ES-Zellklone isoliert. Die Zellklone wurden in 90  $\mu$ l 0.25% Trypsin / 1mM EDTA vereinzelt. Je 60  $\mu$ l der Zellsuspension wurde auf eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte (sogenannte Masterplatte) mit Fibroblasten gegeben. Die restlichen 30  $\mu$ l wurden in die Vertiefung Gelatine geschichteter 24-Loch-Platten (sogenannte Duplikat-Platten) pipettiert.

Die Master-Platte diente dem Expandieren der einzelnen ES-Zellklone. Das Selektionsmedium wurde alle 24 h gewechselt und nach ca. fünf Tagen waren die ES-Zellklone konfluent gewachsen. Die ES-Zellklone wurden mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und Medium (40  $\mu$ l Kulturmedium und 80  $\mu$ l Einfriermedium pro ES-Zellklon) zugegeben. Die Masterplatte wurde anschliessend auf -80°C aufbewahrt. Die Duplikat-Platten dienten ebenfalls zum Expandieren der ES-Zellklone. Die daraus präparierte genomische DNA wurde anschliessend in einer Southern Blot Analyse eingesetzt. Diese Analyse erlaubte das Nachweisen der Integration des Transgenkonstrukts in das Genom der ES-Zellklone, sowie die Bestimmung der Anzahl der integrierten Zielgenkopien.

### **Transiente Transfektion von ES-Zellen mit der Super-Fect-Methode™**

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sich das hochmolekulare Super-Fect™-Reagenz (Qiagen, Hilden) an die DNA anlagert und mit ihr einen sehr kompakten Struktur bildet. Dieser Reagenz-DNA-Komplex besitzt eine positive Ladung mit dem er sich an negativ geladene Rezeptoren wie z. B. sialysierte Glykoproteine auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen anlagert. Durch Endocytose wird dieser Komplex in das Zellinnere eingeschleust und anschliesslich in den Zellkern transportiert.

Am Vortag der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  ES-Zellen / 2 ml Kulturmedium pro Vertiefung einer mit Gelatine beschichteten 6-Loch-Platte ausgesät. Zur Transfektion am nächsten Tag wurden 4  $\mu$ g DNA in 100ul serumfreien Zellkulturmedium gemischt. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l Super-Fect™-Reagenz entstand der Reagenz-DNA-Komplex innerhalb von 10 min. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, der Reagenz-DNA-Komplex mit 600  $\mu$ l gemischt und auf die Zellen verteilt. Nach einer 37°C Inkubation für 2 h wurde der Überstand durch einmaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt und frisches Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden durch Aggregation in Fibroblastenmedium mit 1% DMSO für drei Tage mesodermal differenziert, geerntet und ein Luziferase-Aktivitätsnachweis durchgeführt.

### **Mesodermale *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen**

Zur mesodermalen Differenzierung wurden ES-Zellklone trypsiniert, durch *preplate*-Technik von den Fibroblasten separiert und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Jeweils ca. 100 Zellen der einzelnen ES-Zellklone in hängenden 20 $\mu$ l Fibroblastenmediumtröpfchen (sogenannte *hanging drops*) an der Unterseite des Deckels einer Petrischale in Gegenwart von 1%

DMSO für 48 h aggregiert. Die Aggregate wurden gesammelt und danach auf Bakterenschalen für weitere für 48 h in Fibroblastenmedium mit 1% DMSO kultiviert. Anschliessend wurden die Aggregate auf gelatinisierten Zellkulturschalen ausplattiert und für drei Tage ohne Zusatz von DMSO in Fibroblastenmedium kultiviert (modifiziert nach Wobus, 1994).

## 5.10 Herstellung transgener Mäuse

### Isolation von Blastozysten

Mäuse des Mausstammes C57BL/6J wurden verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf Anwesenheit eines Vaginalpropfs (*plug*) untersucht. Vaginalpropfen sind koagulierte Proteine der Samenflüssigkeit, die nach der Kopulation noch ca. 12 h sichtbar sind. *Plug*-positive Tiere wurden aussortiert und am Tag 3.5 dpc (*days post coitum*) durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde das Fell im Bereich des Bauchraums mit 70% Ethanol sterilisiert und mit einer Schere ein ca. 1 cm langer Schnitt in die Oberhaut gesetzt. Das Fell wurde rostro-kaudal abgezogen und so die Unterhaut freigelegt. Die Unterhaut wurde mit einer spitzen Schere beginnend in der Bauchmitte eröffnet. Die Gedärme wurden zur Seite geschoben und der Uterus mit Pinzette und Schere lokalisiert. Der Uterus wurde mit kleinen Schnitten vom Mesometrium getrennt und entnommen. Der Cervix Uteri, der Uterushals ist besonders muskulös und wirkt wie ein Ventil. Deshalb musste er durchtrennt werden. Die beiden Uterushälften wurden dann in ein Schälchen mit M2-Medium (Sigma, Deisenhofen) überführt. Unter dem Binokular wurde eine Injektionsnadel in den Uterus eingeführt und mit einer Einmalspritze ca. 2 ml M2-Medium durchgespült. Die Blastozysten (6-10 pro Maus) konnten herausgespült und mit einer Transferkapillare gesammelt werden. Sie wurden bis zur Injektion im Brutschrank aufbewahrt.

### Injektion von Blastozysten

Zuerst wurden die ES-Zellen vorbereitet. Hierzu wurden diese trypsiniert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Durch die *preplate*-Technik wurden ES-Zellen von den Fibroblastenzellen separiert, kurz abzentrifugiert, resuspendiert und auf Eis bis zur Injektion aufbewahrt.

Unter einem Leica Axiovertmikroskop wurden 8-15 ES-Zellen mit einer feiner Glaskapillare in das Blastozoele einer Blastozyste injiziert. Der Vorgang wurde bei allen anderen Blastozysten wiederholt, anschliessend die injizierten Blastozysten in M16-Medium (Sigma, Deisenhofen) transferiert und bis zum Transfer in die Ammen im Brutschrank inkubiert.

### Produktion von scheinchwangeren Ammen

Die injizierten Blastozysten wurden in eine 2.5 dpc (*days post coitum*) Ammenmutter transferiert. Die Amme wurde zuvor von einem vasktomierten Männchen begattet. Bei der Vasektomie wurden die Samenleiter unter Narkose kauterisiert. Dies führte dazu, dass die Männchen zwar noch kopulierten, aber in der Samenflüssigkeit keine Spermien vorhanden sind. Bei den begatteten Weibchen führte die Kopulation zu einem hormonellen Zyklus wie bei einer Schwangerschaft; sie waren scheinchwanger. Diese Scheinschwangerschaft war

wichtig, da dadurch die Blastozysten im Eileiter wandern und sich in den Uterus einnisten konnten.

### **Transfer von Blastozysten in Ammen**

Blastozysten (3.5 dpc) wurden in den Uterus von 2.5 dpc scheinchwangeren Ammen transferiert. Eine Amme wurde gewogen und 0.014-0.018 ml/g Körpergewicht des Narkotikums Avertin, (Stocklösung: 1 g 2,2,2 Tribromethanol (Sigma, Deisenhofen) in 1 ml 2-Methyl-2-butanol (Sigma, Deisenhofen)) i. p. gespritzt. Avertin wirkt sehr schnell, die Maus sollte nach 1-2 min tief anästhesiert sein. Kontrolle erfolgte durch kurzes Kneifen in den Schwanz. Der Rücken des Tieres wurde entlang der Wirbelsäule im Bauchbereich mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschliessend wurde mit einer Schere einen 1-1.5 cm langen Schnitt in die Oberhaut gesetzt. Ein weiterer Schnitt wurde mit einer Irisschere durch die Unterhaut gesetzt und der Uterus am Ovar herausgezogen. Die Blastozysten (6-8) wurden perlschnurrartig in eine Transferkapillare aufgenommen. Mit einer Injektionsnadel wurde in das dem Eileiter zugewandte Ende des Uterus eingestochen, die Transferkapillare in den Stichkanal eingeführt und die Blastozysten in den Uterus eingeblasen. Der Uterus wurde in die Körperhöhle zurückgedrückt und der Vorgang auf der anderen Seite wiederholt. Danach wurde die Oberhaut mit zwei Autoclips verschlossen. Nach etwa 18 Tagen wurden die chimären Mäuse geboren und der Chimärismus konnte nach wenigen Tagen am Verhältnis von brauner (OLA/129) zu schwarzer (C57BL6) Fellfärbung abgeschätzt werden.

### **Integration der transgenen ES-Zellklone in die Keimbahn**

Die aus Blastozysteninjektionen entstandenen chimären Tiere wurden im Alter von acht Wochen mit gleichaltrigen C57BL/6 Weibchen verpaart. Falls die ES-Zellen in die Keimzellen der chimären Mäuse integriert hatten, sollten aus diesen Verpaarungen Nachkommen mit brauner Fellfarbe geboren werden. Da die chimären Mäuse nur jeweils ein Allel des Transgens besaßen, mußte davon ausgegangen werden, daß nur fünfzig Prozent ihrer Nachkommen mit brauner Fellfarbe auch das Transgen in sich trugen. Durch Southern Blot Analyse mit einer *goosecoid*-spezifischen Sonde konnte genomisch DNA aus Schwanzbiopsien der 5 bis 10 Tage alten Tiere auf Anwesenheit des Transgens untersucht werden. Alle als transgen charakterisierten Tiere einer ES-Zelllinie wurden zur Weiterzucht untereinander verpaart. Um die Nachkommen auf Homozygotie zu testen, wurden sie mit reinstämmigen C57BL/6 Mäusen verpaart. Alle Nachkommen homozygoter Tiere erhielten eine Kopie des Transgen, somit konnte eine stabile transgene Mauslinie etabliert werden.

## **5.11 Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien**

Um Embryonen eines definierten Embryonalstadiums zu erhalten, wurden weibliche Mäuse der entsprechenden Mauslinie mit männlichen Tieren der entsprechenden Mauslinie am späten Nachmittag verpaart. Bei Vorhandensein eines vaginalen Pfropfs (*vaginal plug*) am folgenden Morgen wurde der Mittag als Stadium der Embryonalentwicklung 0.5 dpc (0.5 days post coitum) bzw. E0.5 (E=

*embryonic day*) angenommen, da die cervixstimulierte Ovulation der weiblichen Mäuse, die in einem 12 Stundentag-Rhythmus gehalten wurden, in der Mitte der Dunkelphase stattfindet.

## 5.12 Isolierung und Fixieren von Embryonen

Schwangere Mäuse wurden zur Isolation der Embryonen durch zervikale Dislokation getötet und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus wurde entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular (Wild M 10, Leica, Bensheim). Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Implantationen durchtrennt. Mit zwei Uhrmacherpinzetten (#5) wurde das Uterusgewebe vorsichtig entfernt. Die Embryonen wurden von sämtlichen embryonalen Hüllen ( Dottersack und Amnion) befreit, sowie die Plazenten an der Nabelschnur entfernt. Die Embryonen wurden zweimal 5 min in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd in PBS<sup>-</sup> fixiert. Anschließend wurden die Embryonen 3x 5 min in PBS<sup>-</sup> gewaschen und schrittweise (25, 50, 75, 100, 100% Methanol in PBS<sup>-</sup>) in Methanol überführt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Embryonen die für Ganzpräparat-Hybridisierungen vorgesehen waren, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 100% Methanol aufbewahrt. Probenmaterial, das für histologische Schnitte vorgesehen war, wurde um eine vollständige Dehydrierung zu vermeiden, bei -20°C in 75% Methanol in PBS<sup>-</sup> aufbewahrt.

Embryonen mit NTD-Phänotyp wurden in Bouin`s-Lösung (0.9% Pikrinsäure, 9% Formaldehyd, 5% Essigsäure; Sigma, Deisenhofen) über Nacht bei RT fixiert. Die Analyse erfolgte unter dem Binokular Leica Wild M 10 mit Hilfe einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

## 5.13 Analytische Methoden

### 5.13.1 Southern Blot Analyse

#### Markierung von doppelsträngiger DNA mit Radionukleotiden

DNA-Fragmente wurden nach der Random-Primer-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Hierbei hybridisieren die durch Erhitzen entstandenen Einzelstränge mit kurzen DNA-Stücken zufälliger Sequenz, welche dann als Primer für die nachfolgende Polymerisation, durch Exonuklease-freie Klenow-Polymerase, dienen. Durch Zugabe radioaktiv markierter Nukleosid-Triphosphate wird, bei deren Einbau, der entstehende Doppelstrang radioaktiv markiert. Verwendet wurde das *rediprime DNA labelling system* der Firma Amersham, Braunschweig. 25 ng DNA wurden in 45 µl TE aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert, danach sofort auf Eis abgekühlt und kurz herunterzentrifugiert. Die 45 µl wurden in ein *redi-prime*-Eppendorfgefäß gegeben, das die für die Reaktion notwendigen Nukleotide, die Polymerase, Primer und Puffer in lyophylierter Form enthält und zusätzlich wurden 5 µl [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) zugegeben. Das Mischen des Reaktionsansatzes erfolgte durch Hoch- und Runterpipettieren und die

daraufliegende Inkubation für 45 min bei 37°C, bis diese durch Zugabe von 5 µl EDTA (0.2M) gestoppt wurde.

Der Ansatz wurde zum Entfernen der nicht inkorporierten Nukleotide über eine Sephadex-G50-Säule laufen gelassen. Die Tropfsäule wurde zuerst mit 3 ml TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) äquilibriert, die radioaktive Probe auf das Säulenbett aufgetragen, mit 400 µl TE in die Säule einlaufen gelassen und mit wiederum 400 µl eluiert. Mit einem Aliquot von 2 µl konnte die Aktivität (Cerenkov Counts) der Sonde in einem Scintillations Counter überprüft werden. Die sich im Eluat befindende markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis heruntergekühlt und konnte dann zur Hybridisierung von Southern Blot Membranen eingesetzt werden.

### **Southern Blot und Hybridisierung**

Nach Restriktionsverdau der aus ES-Zellklonen präparierten genomische DNA (10 µg), wurde die DNA durch Agarose (0.8%)-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden depuriniert und denaturiert. Dazu wurde das Gel zunächst in 0.25N HCl bei RT für 15 min geschwenkt, die Lösung durch 400 ml 1N NaOH ersetzt und für 30 min bei RT geschwenkt. Anschliessend wurde durch Zugabe von 400 ml Blot-Neutral-Lösung (1M Trisbase, 1.5N HCl) der pH der Lösung auf 8-8.5 eingestellt und nochmals für 30 min bei RT geschwenkt. Die Lösung wurde entfernt und das Gel bei RT für 30 min in 10x SSC unter Schütteln äquilibriert. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, Braunschweig) wurde durch Kapillarkräfte erzielt. Dabei wurde die Membran auf das Gel und darauf eine Schicht Zellulosepapier gelegt. Durch Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit aus dem Gel in die Zellulose gesaugt und dabei die DNA aus dem Gel auf die Membran transferiert. Nach 12 h wurde die Membran getrocknet und die DNA an die Membran durch UV-Strahlung (312 nm, Stratalinker, Stratagene, Amsterdam, NL) gebunden. Zur anschliessenden Hybridisierung der an die Membran gebundenen DNA-Fragmente wurde eine zuvor radioaktiv markierte spezifische DNA-Sonde eingesetzt. Die Membran wurde zunächst in einer kommerziellen Hybridisierungslösung (QuickHyb<sup>TM</sup>, Stratagene, Amsterdam, NL), wobei 33 µl pro cm<sup>2</sup> Membranfläche eingesetzt wurde, 20 min bei 68°C inkubiert. Danach wurde die durch Aufkochen denaturierte DNA-Sonde mit 100 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml, Stratagene, Amsterdam, NL) vermischt und der Hybridisierungslösung zugegeben. Nach einstündiger Hybridisierung bei 68°C wurde die Membran 2x für 15 min bei RT in Waschlösung I (2x SSC, 0.1% SDS) und danach für 30 min bei 60°C in Waschlösung II (0.1x SSC, 0.1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde in Plastik eingeschweisst und ein Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) für 12h - einige Tage bei -20°C exponiert.

### **5.13.2 Polymerasen Kettenreaktion**

#### **Genotypisierung der transgenen Mäuse bzw. der doppelt transgenen Embryonen mit Polymerasen Kettenreaktion (PCR)**

Zur Genotypisierung mit Polymerasen Kettenreaktion wurden 2.5 µl 2mM dNTP's, 2.5 µl 10x PCR-Puffer (500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl), 0.2 µl thermostabiler DNA-Polymerase (Taq), Template (10 ng Plasmid DNA bzw. 100-

200 ng genomische DNA) und jeweils 10 pmol der entsprechenden Amplifikationsoligonukleotide (Primer) in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l gemischt. Ein Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-225, Biozym, Hameln) diente der Amplifikation der Produkte. Die Reaktionsbedingungen der Zyklen richteten sich jeweils nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, sowie der Schmelztemperatur ( $T_m = \text{melting temperature}$ ) der Primer und wurden empirisch ermittelt. In der Regel wurde zunächst das Template für 1 min bei 95°C denaturiert. Anschliessend erfolgten 34 der nachfolgend beschriebenen Zyklen: 30 sec Denaturierung bei 95°C; 1 min Hybridisierung der Primer an das Template bei einer Temperatur, die 3-5°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Amplifikationsprimer (siehe unten) lag; DNA-Synthese bei 72°C für 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA. Als Annäherung zur Berechnung der Schmelztemperatur von Amplifikationsprimern gilt folgende Gleichung:  $T_m = 20 \times (4 \times G/C + 2 \times A/T) \times n - 1$ . Hierbei stehen G/C für die Anzahl der hybridisierenden G/C-Basenpaare, A/T für die Anzahl der hybridisierenden A/T-Basenpaare und n für die Gesamtzahl der hybridisierenden Basenpaare.

### **DNA-Sequenz, Produktlänge und Hybridisierungsbedingungen der zur Genotypisierung mit PCR verwendeten Primer**

Die Sequenzen der Primer sind folgend in 5`-3` Orientierung angegeben.

Primerkombination 1:

5`Oligo TCAATCCGCCGTTTGTTC  
3`Oligo CCGCCACATATCCTGATCTTC  
280bp, 55°C

Primerkombination 2:

5`Oligo GCAGTGCACGGCAGATACACTT  
3`Oligo CCCCATATGGAAACCGTCG  
510bp, 55°C

Primerkombination 3:

5`Oligo GGGACGCGCGAATTGAATTA  
3`Oligo CCCCATATGGAAACCGTCG  
160 bp, 55°C

Primerkombination 4:

5`Oligo GTTCTGTACTGGTGTCTCG  
3`Oligo GGCACCTTCCAGGGTCAAGG  
277 bp, 63.5°C

Primerkombination 5:

5`Oligo CGCATAACCAAGTGAAACAGCAT  
3`Oligo GAAAGTCGAGTAGGCGTGTACG  
550 bp, 55°C

Primerkombination 6:

5`Oligo TAATCGCCATCTTCCAGCAG  
3`Oligo GCTGGCTGGTGGCAGATGGCG  
650 bp, 55°C

Primerkombination 7:

5`Oligo CAATTTACTGACCGTACAC  
3`Oligo GCTGGCTGGTGGCAGATGGCG  
751 bp, 55°C

Primerkombination zum Nachweis der pcUbi/gsc- Sequenz:

5`Oligo        CCACTAGTCCAGTGTGGTGG  
3`Oligo        GACGCAGGGCTGCGGGGGTC  
385 bp, 65°C

Nach der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

## **Semiquantitative PCR**

### **Synthese von cDNA durch reverse Transkription**

Das Enzym Reverse Transkriptase (RT<sup>+</sup>) ermöglichte die Synthese von cDNA (complementary DNA) aus RNA. Die hergestellte cDNA wurde anschliessend mit spezifischen Primer in einer Polymerasen Kettenreaktion amplifiziert. Zur Synthese der cDNA wurde ein Primer verwendet, der aus 15 Desoxythymidinen (dT)<sub>15</sub> bestand. Da polyadenylierte RNA eine Poly (A) Region besitzt, bindet hier dieser Primer bevorzugt. Zur Synthesereaktion wurden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß gegeben: 2 µl der isolierten polyadenylierten RNA und 1 µl (500 ng) p(dT)<sub>15</sub>-Primer (Roche, Mannheim). Nach Mischen und Erhitzen für 10 min bei 70°C wurde das Reaktionsgemisch für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 4 µl 5x Reaktionspuffer (Gibco, Eggenstein), 2 µl 0.1M DTT, 1 µl 10mM dNTP Mix (10nM je dATP, dGTP, dTTP und dCTP) wurde für 10 min bei RT inkubiert, für 2 min auf 42°C erhitzt und durch Zugabe von 1 µl (60 U) Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco, Eggenstein) die RT<sup>+</sup>-Reaktion gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch eine 15 minütigen 70°C Erhitzung inaktiviert und damit die Reaktion abgestoppt. Als Kontrollansatz diente eine Minus-RT<sup>+</sup>-Reaktion, d. h. dem Reaktionsgemisch wurde keine RNA zupipettiert und es konnte dementsprechend keine cDNA synthetisiert werden. In der anschliessend durchgeführten PCR-Analyse sollte in der Minus-RT<sup>+</sup>-Reaktion kein Amplifikationsprodukt entstehen. Falls doch ein Produkt amplifiziert wurde, so deutete dies auf eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA hin.

### **Amplifikation der synthetisierten cDNA mit semiquantitativer Polymerasen Kettenreaktion (PCR)**

Um PCR-Amplifikationsproduktmengen von verschiedenen RT<sup>+</sup>-Reaktionen vergleichen zu können, mussten zwei Faktoren gewährleistet sein. 1. Die eingesetzten RT<sup>+</sup>-Reaktionen beinhalteten vergleichbare Mengen an cDNA. Der Nachweis dafür erfolgte mit der Amplifikation von Transkripten des HPRT-Gens, die in Säugetierzellen in konstant hohen Mengen entstehen (Keller et al., 1993). 2. Die Polymerasen Kettenreaktion musste im linearen Bereich der Produktamplifikation beendet werden. Um dies sicherzustellen, wurde der Polymerasen Kettenreaktion 0.2 µl [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-ddCTP (3000 Ci/nmol, 10 mCi/ml) zugegeben, welches eine sensitive Detektion des Amplifikationsprodukts durch Radiographie und somit eine Reduktion der Zyklenzahl ermöglichte. Der effektivste und lineare Bereich der Polymerasen Kettenreaktion wurde empirisch ermittelt und lag für das Hypoxanthinribosyltransferase-Gen (HPRT) bei 25 Zyklen und für *gooseoid* bei 29 Zyklen. Die Primerkombination zum Nachweis der

HPRT-Transkripte (5`Oligo GCTGGTGAAAAGGACCTCT und 3`Oligo CACAGGACTAGAACACCTGC) ergab bei 50-55°C ein spezifisches Produkt der Länge von 249 bp. Die Primerkombination 4 zum Nachweis der transgenen *gooseoid*-Transkripte ergab bei 63.5°C ein spezifisches Produkt der Länge von 277 bp (großes Transkript) bzw. 247 bp (kleines Transkript).

Nach der PCR-Amplifikation wurden aus jedem Reaktionsansatz 2 µl entnommen, mit je 1 µl DNA-Probenpuffer (10mM EDTA pH 8.0, 10% (w/v) Glycerin, 0.1% (w/v) SDS, 0.02% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und auf ein 6%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel (30 Gewichtsprozent einer Acrylamid-Stammlösung und 0.8 Gewichtsprozent N,N'- Methylenebisacrylamid in TBE-Puffer; zum Start der Polymerisationsreaktion wurden 1% (w/v) APS und 0.1% TEMED zugegeben) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für ca. 2 h. Das Gel wurde auf 3MM-Papier aufgezogen, für 2 h bei 80°C im Vakuum getrocknet und einem Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) für 0.5-12 h bei -20°C exponiert.

### 5.13.3 Das Anfertigen von histologischen Schnitten

#### Behandlung von Objektträgern

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10% HCl / 70% Ethanol, ddH<sub>2</sub>O und 96% Ethanol gereinigt und 10 min bei 150°C getrocknet. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte durch Eintauchen für 10 sec in eine 2% TESP/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100% Aceton und einmal Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurden die Objektträger über Nacht bei 42°C getrocknet.

#### Einbetten von Embryonen und Anfertigen von histologischen Schnitten mit einem Rotationsmikrotom

Die fixierten Embryonen wurden mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in einem Gewebeprozessor (Shandon Hypercenter XP, Frankfurt) in folgenden Schritten mit Gewebewachs perfundiert:

Ethanol (100%)	3 x 30 min
Xylol	2 x 30 min
Histowax (Leica, Nussloch) bei 60°C	2 x 40 min

Anschließend wurden die Embryonen mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten (Leica EG1160, Leica, Bensheim) in Wachs eingebettet. Hierzu wurden diese aus den Einbettkassetten herausgenommen und in auf 59°C vorgewärmte Einbettformen gelegt. Die Einbettformen wurden mit flüssigem Wachs aufgefüllt und eine Haltekassette aufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsblöcke aus den Einbettformen genommen. Das Loslösen des Wachsblockes aus der Einbettform wurde, nachdem das Wachs auf Raumtemperatur abgekühlt war, durch Abschrecken auf Eis unterstützt.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Reichert und Jung, Nußloch) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden Schnitte von 7 µm

angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42°C geglättet und auf beschichteten Objektträger transferiert.

### **Entparaffinierung, Färbung und Entwässerung der Schnitte**

Die Behandlung der Schnitte wurde automatisch durchgeführt (Varistain XY, Shandon, Frankfurt), dabei waren die einzelnen Schritte folgendermaßen programmiert:

Entparaffinierung:	Xylol	2x5 min
	100% Ethanol	1 min
	95% Ethanol	2x 5 min
	70% Ethanol	1 min
Färbung:	Leitungswasser	2 min
	Hämatoxylin	1 min
	(Gill II, Surgipath, Richmond, IL, USA)	
	Leitungswasser	5 min
	Eosin	1 min
	(Accustain™, Sigma, Deisenhofen)	
Entwässerung:	70% Ethanol	2x 1 min
	95% Ethanol	2x 1 min
	100% Ethanol	2x 1 min
	Xylol	2x 1 min

Die Analyse erfolgte unter dem Binokular Leica Wild M 10 mit Hilfe einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

### **Einbetten von Embryonen und Anfertigen von histologischen Schnitten mit einem Vibratom-Mikrotom**

Die fixierten Embryonen wurden mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in 2 ml einer Gelatine-Albumin-Mischung (2.2 g Gelatine, 135 g Rinder-Albumin und 90 g Sacharose in 450 ml PBS) unter Zugabe von 140  $\mu$ l Glutaraldehyd (25%) eingebettet. Zum Erhärten der Gelatine-Albumin-Mischung wurde für 10 min bei RT inkubiert. Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Gelatine-Albumin-Blöcke in die Halterung eines Vibratoms (Vibratom-Mikrotom VT1000S, Leica-Heerburg AG, Schweiz) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden Schnitte von 30  $\mu$ m angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei RT geglättet und auf Objektträger transferiert. Die Analyse erfolgte unter dem Binokular Leica Wild M 10 mit Hilfe einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

#### **5.13.4 *In situ* Hybridisierung im Ganzpräparat**

##### **Präparation von Digoxigenin-markierter *antisense* RNA (Sonde)**

Für die Hybridisierung wurde Digoxigenin-markierte RNA *in vitro* transkribiert. *Antisense* RNA kann mit sense mRNA Doppelstränge ausbilden, wobei RNA-RNA-Hybride stabiler sind als DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybride. Die Genprobe (cDNA oder genomische DNA) wurde in einen geeigneten Vektor kloniert, der die Transkription von RNA mit Hilfe von Phagen RNA-Polymerasen erlaubte. Ein weit verbreiteter und universell einsetzbarer Vektor ist pBluescript. Die aus 22 Restriktionsschnittstellen bestehende *'multiple cloning site'* wird auf beiden Seiten

von Promotoren für RNA-Polymerasen der Phagen T3 und T7 flankiert. Vor der *in vitro* Transkription muss das Genkonstrukt linearisiert werden, um einen 'read through' in Vektorsequenzen zu vermeiden. Dazu wurde das Plasmid mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, durch Agaroseelektrophorese auf vollständigen Verdau kontrolliert, und anschliessend durch Phenol-Chloroformextraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Für die Markierungsreaktion wurde das linearisierte Plasmid in einer Konzentration von 1 µg/µl in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### ***In vitro* Transkription**

Auf Eis wurde die folgende Reaktion pipettiert: 1 µg linearisiertes Plasmid, 4 µl 5x Reaktionspuffer (200mM Tris pH 8.0, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 50mM NaCl, 20mM Spermidin, 250 µg/ml BSA), 2 µl 10x Digoxigenin dNTP-Mix (10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP, pH 7.5), 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl (20 U / µl) RNA-Polymerase, 10 µl ddH<sub>2</sub>O. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 2 µl 0.2M EDTA abgestoppt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2.5 µl 4M LiCl, 75 µl Ethanol und 30 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min mit 10000 g bei 4°C wurde die RNA mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen und in 60 µl Formamid/dd-H<sub>2</sub>O (1/1) gelöst. Qualität und Menge der RNA wurden gelelektrophoretisch durch Vergleich vor und nach Präzipitation bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

### **Vorbehandlung der Embryonen**

Vorbemerkungen:

Sämtliche nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, mit Ausnahme des Proteinase K-Verdau, der bei Raumtemperatur erfolgte. Als Reaktionsgefäße dienten 5 ml Glasröhrchen (Biozym Diagnostics, Oldendorf), in die zu Beginn des Experiments die entsprechenden Embryonen überführt wurden. Da Luftkontakt der Embryonen zu unspezifischer Hintergrundfärbung führt, erfolgte das Wechseln von Lösungen stets so, dass die Embryonen in einem minimalen Restvolumen der zu entfernenden Lösung verblieben, bevor eine neue Lösung hinzugegeben wurde.

Die in 100% Methanol aufbewahrten Embryonen wurden zunächst über eine absteigende Methanolreihe stufenweise rehydriert. Dies erfolgte durch eine Inkubation für je 5 min in 75%, 50% und 25% Methanol in PBSw (0.1% Tween-20 in PBS<sup>-</sup>). Anschließend wurde 3 mal für je 5 min in PBSw gewaschen. Um eine bessere Zugänglichkeit der Probe ins Gewebe zu ermöglichen erfolgte ein partieller Verdau mit Proteinase K. Die Proteinase K Konzentration betrug 4.5 µg/ml PBSw; die Inkubationszeiten hingen von der Größe der Embryonen ab und wurden empirisch ermittelt. Der Verdau wurde durch Zugabe frischer Glycinlösung (2 mg/ml PBSw) und dreimaligem Waschen mit PBSw für je 5 min gestoppt. Anschließend wurden die Gewebe durch Inkubation in 4% Paraformaldehyd / 0.2% Glutaraldehyd in PBSw nachfixiert. Nach viermaligem Waschen in PBSw für je 5 min, erfolgten Inkubationen für je 5 min zunächst in 50% Hybridisierungslösung in PBSw (50 ml 100% Hybridisierungslösung: 0.5 g Boehringer Block, 25 ml Formamid, 12.5 ml 20x SSC pH 7.0, 6 ml ddH<sub>2</sub>O, 5 ml 10 mg/ml Torula RNA, 100 µl 50 mg/ml Heparin, 250 µl 20% Tween-20, 500 µl 10%

CHAPS, 500  $\mu$ l 0.5M EDTA) gefolgt von 100% Hybridisierungslösung. Anschliessend erfolgte eine Prähybridisierung in 900  $\mu$ l Hybridisierungslösung für drei Stunden bei 65°C.

### **Hybridisierung und Waschen**

Zu den 900  $\mu$ l Volumina-Ansätzen wurden 200 ng digoxigeninmarkierter RNA (Sonde) in 100  $\mu$ l Hybridisierungslösung gegeben, die zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C. Das Waschen zur Entfernung freier, nicht hybridisierter Sonde erfolgte zunächst in 800  $\mu$ l Hybridisierungslösung für 5 min bei 70°C. Nach dreimaliger Zugabe von je 400  $\mu$ l 2x SSC pH 4.5 erfolgte eine zweimalige Inkubation von je 30 min bei 70°C in 2x SSC pH 7.0. Daraufhin wurde zweimal in Maleinsäurepuffer (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7.5) für je 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal in Maleinsäurepuffer für je 30 min bei 70°C. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 10 min bei Raumtemperatur und einmaligem Waschen in PBSw für 5 min erfolgte eine Inkubation in 1 ml Antikörperpuffer (10% Ziegen Serum, 1% Boehringer Block, in PBSw) für mindestens zwei Stunden bei 4°C.

### **Visualisierung und Auswertung**

Schließlich erfolgte die Inkubation in 1.5 ml Antikörperpuffer mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Anti-Digoxigenin Antikörper (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 über Nacht bei 4°C. Nach einmaligem Spülen in 0.1% BSA in PBSw folgten fünf Waschschrte in 0.1% BSA in PBSw für je 45 min bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen für je 30 min in PBSw erfolgte eine zweimalige Inkubation für je 10 min in AP1-Puffer (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>). Die Farbreaktion erfolgte nach Überführen der Präparate in BM-Purple (präzipitierendes alkalische Phosphatase Substrat, Roche Diagnostics, Mannheim) im Dunkeln. Nach Eintritt einer zufriedenstellenden Farbreaktion wurde diese durch mehrmaliges Waschen in PBS gestoppt. Die Präparate wurden anschließend stufenweise in Methanol überführt und so bei -20°C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte nach stufenweiser Rehydrierung in PBS unter dem Binokular Leica Wild M 10 mit Hilfe einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

## **5.13.5 Bestimmung der Luziferase-Aktivität**

### **Herstellung von Gesamtzelllysaten**

Zum Nachweis der Luziferase-Aktivität wurden transfizierte mesodermal differenzierte Zellen geerntet. Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS<sup>-</sup>, wurden die Zellen in Lysis-Puffer (0.1M Tris-Acetat, pH 7.5; 2mM EDTA, 1% Triton X100) für 20 min auf Eis aufgeschlossen, die Zellfragmente wurden für 10 min bei 2000 g pelletiert und der proteinhaltige Überstand zur Analyse verwendet.

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Der Gesamzellextrakt (10  $\mu$ l) wurde mit 490  $\mu$ l Lösung I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1 N NaOH) gemischt und anschliessend 1 ml Lösung IV (frisch hergestellt aus: Lösung II (500  $\mu$ l 2% NaK-Tartrat ); 50  $\mu$ l Lösung I; Lösung III (50  $\mu$ l CuSO<sub>4</sub>))

zugegeben. Nach Inkubation für 10 min bei RT wurden 100  $\mu$ l frisch hergestellter 50% Folin-Lösung zugegeben, gut gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgte die Extinktion bei 600 nm bestimmt und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve verschiedener BSA-Konzentrationen ermittelt.

### **Luziferaseaktivitäts-Nachweis**

Die Klonierung des Luziferase-Gen aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) ermöglichte die Etablierung eines sensitiven, nicht radioaktiven genetischen Reportersystems in eukaryontischen Zellen (de Wet et al., 1987). Die Biolumineszenz wird durch das Enzym Luziferase katalysiert, das dazu D-Luziferin als Substrat, ATP,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$  benötigt. Zum Nachweis der Luziferaseaktivität in Zelllysaten wurden diese zusammen mit D-Luziferin, ATP,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$  gemischt. Entstehende Lichtblitze wurden durch ein Luminometer (Luminomat 9600, Fa. Berthold, Bad Wildbad) detektiert.

Pro Ansatz wurden durch die Injektionseinrichtung des Luminometers 100  $\mu$ l Zelllysate, 350  $\mu$ l Puffer (25 mM Glycylgly, 15 mM  $MgSO_4$ , 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP) und 100  $\mu$ l Luziferin-Lösung (40  $\mu$ M D-Luziferin im Puffer (ohne DTT und ATP gelöst) miteinander vermischt. Nach einer Reaktionszeit von 10 sec konnte das Ergebnis abgelesen werden.

### **Statistische Auswertung der Luziferaseaktivitäts-Analysen**

Jeder Ansatz wurde mit Duplikaten durchgeführt, in je drei voneinander unabhängigen Experimenten. Aus den erhaltenen Daten wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt.

### **5.13.6 Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit dem Substrat X-gal im Ganzpräparat und in ES-Zellen**

Die isolierten Embryonen bzw. die ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschliessend in frisch hergestellte Fixierungslösung (PBS<sup>-/-</sup> mit 1% Formaldehyd, 0.2% Glutaraldehyd, 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM EGTA, 0.02% NP-40) überführt. Fixierungszeiten bei RT:

- 30-60 min ab E12.5 und später
- 60-90 min bei E13.5 und früher
- 30 min ES-Zellen.

Die Embryonen bzw. ES-Zellen wurden anschliessend 3x mit PBS<sup>-/-</sup>/0.02% NP-40 gewaschen und in die frisch hergestellte Färbelösung (5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 2 mM  $Mg_2Cl_2$ , 0.01% NaDeoxycholat, 0.02% NP-40, 1 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid; X-gal) überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die gefärbten Embryonen/ES-Zellen wurden 3x mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und für 30 min in 4% Paraformaldehyd in PBS<sup>-/-</sup> nachfixiert. Anschliessend wurden die ES-Zellen photographiert. Die Embryonen wurden durch Eintauchen in 80% Glycerol / PBS<sup>-/-</sup> transparent gemacht, photographiert und anschliessend bei 4°C aufbewahrt.



## 6 Literatur

- Afzelius**, B. A. (1995). Situs inversus and ciliary abnormalities. What is the connection? *Int J Dev Biol* 39, 839-44.
- Albano**, R. M., Arkell, R., Beddington, R. S., and Smith, J. C. (1994). Expression of inhibin subunits and follistatin during postimplantation mouse development: decidual expression of activin and expression of follistatin in primitive streak, somites and hindbrain. *Development* 120, 803-13.
- Alberts**, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. VHC, Weinheim.
- Alvarez**, I. S., and Schoenwolf, G. C. (1992). Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. *J Exp Zool* 261, 340-8.
- Armstrong**, J. F., Kaufman, M. H., Harrison, D. J., and Clarke, A. R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 5, 931-6.
- Artinger**, M., Blitz, I., Inoue, K., Tran, U., and Cho, K. W. (1997). Interaction of gooseoid and brachyury in *Xenopus* mesoderm patterning. *Mech Dev* 65, 187-96.
- Bachiller**, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J. A., Anderson, R. M., May, S. R., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., Rossant, J., and De Robertis, E. M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403, 658-61.
- Barnes**, J. D., Crosby, J. L., Jones, C. M., Wright, C. V., and Hogan, B. L. (1994). Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of *Xenopus* Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev Biol* 161, 168-78.
- Beddington**, R. S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120, 613-20.
- Beddington**, R. S., Puschel, A. W., and Rashbass, P. (1992). Use of chimeras to study gene function in mesodermal tissues during gastrulation and early organogenesis. *Ciba Found Symp* 165, 61-74.
- Beddington**, R. S., Rashbass, P., and Wilson, V. (1992). Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl*, 157-65.
- Beddington**, R. S., and Robertson, E. J. (1998). Anterior patterning in mouse. *Trends Genet* 14, 277-84.
- Beddington**, R. S., and Smith, J. C. (1993). Control of vertebrate gastrulation: inducing signals and responding genes. *Curr Opin Genet Dev* 3, 655-61.
- Bellusci**, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., and Hogan, B. L. (1996). Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* 122, 1693-702.
- Belo**, J. A., Bachiller, D., Agius, E., Kemp, C., Borges, A. C., Marques, S., Piccolo, S., and De Robertis, E. M. (2000). Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis* 26, 265-70.
- Belo**, J. A., Bouwmeester, T., Leyns, L., Kertesz, N., Gallo, M., Follettie, M., and De Robertis, E. M. (1997). Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech Dev* 68, 45-57.
- Belo**, J. A., Leyns, L., Yamada, G., and De Robertis, E. M. (1998). The prechordal midline of the chondrocranium is defective in Gooseoid-1 mouse mutants. *Mech Dev* 72, 15-25.
- Bennett**, G. D., An, J., Craig, J. C., Gefrides, L. A., Calvin, J. A., and Finnell, R. H. (1998). Neurulation abnormalities secondary to altered gene expression in neural tube defect susceptible Splotch embryos. *Teratology* 57, 17-29.
- Bielinska**, M., Narita, N., and Wilson, D. B. (1999). Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *Int J Dev Biol* 43, 183-205.
- Blitz**, I. L., and Cho, K. W. (1995). Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene orthodenticle. *Development* 121, 993-1004.
- Blum**, M., De Robertis, E. M., Kojis, T., Heinzmann, C., Klisak, I., Geissert, D., and Sparkes, R. S. (1994). Molecular cloning of the human homeobox gene gooseoid (GSC) and mapping of the gene to human chromosome 14q32.1. *Genomics* 21, 388-93.

- Blum**, M., Gaunt, S. J., Cho, K. W., Steinbeisser, H., Blumberg, B., Bittner, D., and De Robertis, E. M. (1992). Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid. *Cell* *69*, 1097-106.
- Blumberg**, B., Wright, C. V., De Robertis, E. M., and Cho, K. W. (1991). Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science* *253*, 194-6.
- Boucaut**, J. C., and Darribere, T. (1983). Fibronectin in early amphibian embryos. Migrating mesodermal cells contact fibronectin established prior to gastrulation. *Cell Tissue Res* *234*, 135-45.
- Boucher**, D. M., Schaffer, M., Deissler, K., Moore, C. A., Gold, J. D., Burdsal, C. A., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., and Blum, M. (2000). goosecoid expression represses Brachyury in embryonic stem cells and affects craniofacial development in chimeric mice. *Int J Dev Biol* *44*, 279-88.
- Bradley**, A. (1991). Developmental potential of murine pluripotential stem cells. *Basic Life Sci* *57*, 83-97.
- Buchholz**, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F., and Stewart, A. F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* *24*, 4256-62.
- Burdsal**, C. A., Lotz, M. M., Miller, J., and McClay, D. R. (1994). Quantitative switch in integrin expression accompanies differentiation of F9 cells treated with retinoic acid. *Dev Dyn* *201*, 344-53.
- Camus**, A., Davidson, B. P., Billiards, S., Khoo, P., Rivera-Perez, J. A., Wakamiya, M., Behringer, R. R., and Tam, P. P. (2000). The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development* *127*, 1799-813.
- Capecchi**, M. R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* *5*, 70-6.
- Cecchi**, C., Mallamaci, A., and Boncinelli, E. (1999). Mouse forebrain development. The role of *Emx2* homeobox gene. *C R Acad Sci III* *322*, 837-42.
- Chen**, J., Knowles, H. J., Hebert, J. L., and Hackett, B. P. (1998). Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* *102*, 1077-82.
- Chen**, Z. F., and Behringer, R. R. (1995). *twist* is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* *9*, 686-99.
- Cho**, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M. (1991) Molecular Nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell*,*67*,1111-1120.
- Clements**, D., Taylor, H. C., Herrmann, B. G., and Stott, D. (1996). Distinct regulatory control of the Brachyury gene in axial and non- axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation. *Mech Dev* *56*, 139-49.
- Crossley**, P. H., and Martin, G. R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* *121*, 439-51.
- Dale**, L. and Slack, J. M. W. (1987). Regional specificity within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. *Development* *100*, 279-295.
- Dale**, L., Howes, G., Price, B. M. J. and Smith, J. C. (1992). Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* *115*: 573-585.
- Damjanov**, I., Damjanov, A., and Damsky, C. H. (1986). Developmentally regulated expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in peri-implantation mouse embryos and extraembryonic membranes. *Dev Biol* *116*, 194-202.
- Davenne**, M., Maconochie, M. K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F. M. (1999). *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* *22*, 677-91.
- Davis**, C. A., and Joyner, A. L. (1988). Expression patterns of the homeo box-containing genes *En-1* and *En-2* and the proto-oncogene *int-1* diverge during mouse development. *Genes Dev* *2*, 1736-44.
- De Groot**, E., Feijen, A., Eib, D., Zwijsen, A., Sugino, H., Martens, G., and Van Den Eijnden-Van Raaij, A. J. (2000). Expression patterns of follistatin and two follistatin-related proteins during mouse development. *Int J Dev Biol* *44*, 327-30.
- Deißler**, K. (1996). Neurale Induktion in Teratokarzinomzellen (P19) der Maus: Antagonistische Wirkung von follistatin und Bone Morphogenetic Protein-4. Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe.

**De Robertis**, E. M., Kim, S., Leyns, L., Piccolo, S., Bachiller, D., Agius, E., Belo, J. A., Yamamoto, A., Hainski-Brousseau, A., Brizuela, B., Wessely, O., Lu, B., and Bouwmeester, T. (1997). Patterning by genes expressed in Spemann's organizer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *62*, 169-75.

**De Robertis**, E. M., Wessely, O., Oelgeschlager, M., Brizuela, B., Pera, E., Larrain, J., Abreu, J., and Bachiller, D. (2001). Molecular mechanisms of cell-cell signaling by the Spemann-Mangold organizer. *Int J Dev Biol* *45*, 189-97.

**De Robertis**, E. M., Blum, M., Niehrs, C., and Steinbeisser, H. (1992). Goosecoid and the organizer. *Dev Suppl*, 167-71.

**De Robertis**, E. M., and Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* *380*, 37-40.

**DeSesso**, J. M., Scialli, A. R., and Holson, J. F. (1999). Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. *Am J Med Genet* *87*, 143-62.

**Dosch**, R., Gawantka, V., Delius, H., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* *124*, 2325-34.

**Drews**, U. (1993). *Taschenatlas der Embryologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Dunn**, N. R., Winnier, G. E., Hargett, L. K., Schrick, J. J., Fogo, A. B., and Hogan, B. L. (1997). Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev Biol* *188*, 235-47.

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

**Embury**, S., Seller, M. J., Adinolfi, M., and Polani, P. E. (1979). Neural tube defects in curly-tail mice. I. Incidence, expression and similarity to the human condition. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* *206*, 85-94.

**Epstein**, D. J., Vekemans, M., and Gros, P. (1991). Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* *67*, 767-74.

**Essien**, F. B., Haviland, M. B., and Naidoff, A. E. (1990). Expression of a new mutation (Axd) causing axial defects in mice correlates with maternal phenotype and age. *Teratology* *42*, 183-94.

**Ewart**, J. L., Cohen, M. F., Meyer, R. A., Huang, G. Y., Wessels, A., Gourdie, R. G., Chin, A. J., Park, S. M., Lazatin, B. O., Villabon, S., and Lo, C. W. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* *124*, 1281-92.

**Fainsod**, A., Deissler, K., Yelin, R., Marom, K., Epstein, M., Pillemer, G., Steinbeisser, H., and Blum, M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev* *63*, 39-50.

**Feinberg**, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* *132*, 6-13.

**Ferreiro**, B., Artinger, M., Cho, K., and Niehrs, C. (1998). Antimorphic goosecooids. *Development* *125*, 1347-59.

**Filosa**, S., Rivera-Perez, J. A., Gomez, A. P., Gansmuller, A., Sasaki, H., Behringer, R. R., and Ang, S. L. (1997). Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis. *Development* *124*, 2843-54.

**Finnell**, R. H., Bennett, G. D., Karras, S. B., and Mohl, V. K. (1988). Common hierarchies of susceptibility to the induction of neural tube defects in mouse embryos by valproic acid and its 4-propyl-4-pentenoic acid metabolite. *Teratology* *38*, 313-20.

**Finnell**, R. H., Moon, S. P., Abbott, L. C., Golden, J. A., and Chernoff, G. F. (1986). Strain differences in heat-induced neural tube defects in mice. *Teratology* *33*, 247-52.

**Fleming**, A., and Copp, A. J. (1998). Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* *280*, 2107-9.

**Fleming**, A., and Copp, A. J. (2000). A genetic risk factor for mouse neural tube defects: defining the embryonic basis. *Hum Mol Genet* *9*, 575-81.

**Franke**, W. W., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., and Winter, S. (1983). Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 7113-7.

- Galili**, N., Baldwin, H. S., Lund, J., Reeves, R., Gong, W., Wang, Z., Roe, B. A., Emanuel, B. S., Nayak, S., Mickanin, C., Budarf, M. I., and Buck, C. A. (1997). A region of mouse chromosome 16 is syntenic to the DiGeorge, velocardiofacial syndrome minimal critical region. *Genome Res* 7, 399.
- Gaufo**, G. O., Flodby, P., and Capecchi, M. R. (2000). Hoxb1 controls effectors of sonic hedgehog and Mash1 signaling pathways. *Development* 127, 5343-54.
- Gaunt**, S. J., Blum, M., and De Robertis, E. M. (1993). Expression of the mouse gooseoid gene during mid-embryogenesis may mark mesenchymal cell lineages in the developing head, limbs and body wall. *Development* 117, 769-78.
- Gawantka**, V., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1995). Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene Xvent-1. *Embo J* 14, 6268-79.
- Gerrelli**, D., and Copp, A. J. (1997). Failure of neural tube closure in the loop-tail (Lp) mutant mouse: analysis of the embryonic mechanism. *Brain Res Dev Brain Res* 102, 217-24.
- Gilbert**, S. F., (2000). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Glinka**, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-9.
- Gossler**, A., Joyner, A. L., Rossant, J., and Skarnes, W. C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 244, 463-5.
- Graff**, J. M., Thies, R. S., Song, J. J., Celeste, A. J., and Melton, D. A. (1994). Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo. *Cell* 79, 169-79.
- Greene**, N. D., Gerrelli, D., Van Straaten, H. W., and Copp, A. J. (1998). Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. *Mech Dev* 73, 59-72.
- Günther**, T., Struwe, M., Aguzzi, A., and Schughart, K. (1994). Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development* 120, 3119-30.
- Johansson**, B. M., and Wiles, M. V. (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15, 141-51.
- Hall**, J. L., Harris, M. J., and Juriloff, D. M. (1997). Effect of multifactorial genetic liability to exencephaly on the teratogenic effect of valproic acid in mice. *Teratology* 55, 306-13.
- Hamilton**, D. L., and Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178, 481-6.
- Harris**, M. J., and Juriloff, D. M. (1997). Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. *Teratology* 56, 177-87.
- Harris**, M. J., and Juriloff, D. M. (1999). Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. *Teratology* 60, 292-305.
- Hinrichsen**, K. V. (1990). *Human-Embryologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hemmati-Brivanlou**, A., and Melton, D. A. (1992). A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359, 609-14.
- Herrmann**, B. G. (1992). Action of the Brachyury gene in mouse embryogenesis. *Ciba Found Symp* 165, 78-86.
- Herrmann**, B. G. (1991). Expression pattern of the Brachyury gene in whole-mount TWis/TWis mutant embryos. *Development* 113, 913-7.
- Hogan**, B. L., Blessing, M., Winnier, G. E., Suzuki, N., and Jones, C. M. (1994). Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev Suppl*, 53-60.
- Hogan**, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Holley**, S. A., Jackson, P. D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M., Hoffmann, F. M., and Ferguson, E. L. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature* 376, 249-53.

- Izpisua-Belmonte**, J. C., De Robertis, E. M., Storey, K. G., and Stern, C. D. (1993). The homeobox gene goosecoid and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm. *Cell* **74**, 645-59.
- Jackson**, B. W., Grund, C., Winter, S., Franke, W. W., and Illmensee, K. (1981). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* **20**, 203-16.
- Jones**, C. M., Lyons, K. M., Lapan, P. M., Wright, C. V., and Hogan, B. L. (1992). DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* **115**, 639-47.
- Joyner**, A. L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet* **12**, 15-20.
- Jurand**, A. (1962). The development of notochord in chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **10**, 602-621.
- Jurand**, A. (1974). Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 1-33.
- Juriloff**, D. M., and Harris, M. J. (2000). Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* **9**, 993-1000.
- Kapron-Bras**, C. M., and Trasler, D. G. (1985). Reduction in the frequency of neural tube defects in splotch mice by retinoic acid. *Teratology* **32**, 87-92.
- Kaufmann**, M. H. (1992). *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press Limited, London.
- Kimura**, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2000). Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol* **225**, 304-21.
- Kispert**, A., and Herrmann, B. G. (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo J* **12**, 3211-20.
- Klingensmith**, J., Ang, S. L., Bachiller, D., and Rossant, J. (1999). Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. *Dev Biol* **216**, 535-49.
- Klinowska**, T. C., Ireland, G. W., and Kimber, S. J. (1994). A new in vitro model of murine mesoderm migration: the role of fibronectin and laminin. *Differentiation* **57**, 7-19.
- Knoetgen**, H., Teichmann, U., Wittler, L., Viebahn, C., and Kessel, M. (2000). Anterior neural induction by nodes from rabbits and mice. *Dev Biol* **225**, 370-80.
- Koller, B. H., and Smithies, O. (1992). Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* **10**, 705-30.
- Kuratani**, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Developmental patterning and evolution of the mammalian viscerocranium: genetic insights into comparative morphology. *Dev Dyn* **209**, 139-55.
- Kwan**, C. T., Tsang, S. L., Krumlauf, R., and Sham, M. H. (2001). Regulatory analysis of the mouse Hoxb3 gene: multiple elements work in concert to direct temporal and spatial patterns of expression. *Dev Biol* **232**, 176-90.
- Latinkic**, B. V., Umbhauer, M., Neal, K. A., Lerchner, W., Smith, J. C., and Cunliffe, V. (1997). The *Xenopus* Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes Dev* **11**, 3265-76.
- Lawson**, K. A. (1999). Fate mapping the mouse embryo. *Int J Dev Biol* **43**, 773-5.
- Lawson**, K. A., Meneses, J. J., and Pedersen, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**, 891-911.
- Lawson**, K. A., and Pedersen, R. A. (1992). Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. *Ciba Found Symp* **165**, 3-21.
- Lees-Miller**, J. P., Yan, A., and Helfman, D. M. (1990). Structure and complete nucleotide sequence of the gene encoding rat fibroblast tropomyosin 4. *J Mol Biol* **213**, 399-405.
- Lemaire**, L., Roeser, T., Izpisua-Belmonte, J. C., and Kessel, M. (1997). Segregating expression domains of two goosecoid genes during the transition from gastrulation to neurulation in chick embryos. *Development* **124**, 1443-52.
- Letts**, V. A., Schork, N. J., Copp, A. J., Bernfield, M., and Frankel, W. N. (1995). A curly-tail modifier locus, mct1, on mouse chromosome 17. *Genomics* **29**, 719-24.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S., and De Robertis, E. M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**, 747-56.
- Lumsden**, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15.

- Macdonald**, K. B., Juriloff, D. M., and Harris, M. J. (1989). Developmental study of neural tube closure in a mouse stock with a high incidence of exencephaly. *Teratology* *39*, 195-213.
- Maconochie**, M. K., Nonchev, S., Manzanares, M., Marshall, H., and Krumlauf, R. (2001). Differences in Krox20-dependent regulation of *Hoxa2* and *Hoxb2* during hindbrain development. *Dev Biol* *233*, 468-81.
- Martinez-Barbera**, J. P., Rodriguez, T. A., and Beddington, R. S. (2000). The homeobox gene *Hesx1* is required in the anterior neural ectoderm for normal forebrain formation. *Dev Biol* *223*, 422-30.
- Matzuk**, M. M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D. R., and Bradley, A. (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* *374*, 360-3.
- McMahon**, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., and McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* *12*, 1438-52.
- Miner**, J. H., Cunningham, J., and Sanes, J. R. (1998). Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol* *143*, 1713-23.
- Moase**, C. E., and Trasler, D. G. (1987). Retinoic acid-induced selective mortality of splotch-delayed mouse neural tube defect mutants. *Teratology* *36*, 335-43.
- Moase**, C. E., and Trasler, D. G. (1989). Spinal ganglia reduction in the splotch-delayed mouse neural tube defect mutant. *Teratology* *40*, 67-75.
- Moore**, A. W., Schedl, A., McInnes, L., Doyle, M., Hecksher-Sorensen, J., and Hastie, N. D. (1998). YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev* *79*, 169-84.
- Morrison**, K., Papapetrou, C., Attwood, J., Hol, F., Lynch, S. A., Sampath, A., Hamel, B., Burn, J., Sowden, J., Stott, D., Mariman, E., and Edwards, Y. H. (1996). Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet* *5*, 669-74.
- Nakatsuji**, N. (1979). Effects of injected inhibitors of microfilament and microtubule function on the gastrulation movement in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* *68*, 140-50.
- Naruse**, I., Collins, M. D., and Scott, W. J., Jr. (1988). Strain differences in the teratogenicity induced by sodium valproate in cultured mouse embryos. *Teratology* *38*, 87-96.
- Neale**, S. A., and Trasler, D. G. (1994). Early sialylation on N-CAM in splotch neural tube defect mouse embryos. *Teratology* *50*, 118-24.
- Niehrs**, C. (2001). The Spemann organizer and embryonic head induction. *Embo J* *20*, 631-7.
- Niehrs**, C., and De Robertis, E. M. (1991). Ectopic expression of a homeobox gene changes cell fate in *Xenopus* embryos in a position-specific manner. *Embo J* *10*, 3621-9.
- Niehrs**, C., and De Robertis, E. M. (1992). Vertebrate axis formation. *Curr Opin Genet Dev* *2*, 550-5.
- Niehrs**, C., Dosch, R., and Onichtchouk, D. (2000). Embryonic patterning of *Xenopus* mesoderm by *Bmp-4*. *Ernst Schering Res Found Workshop* *29*, 165-90.
- Niehrs**, C., Keller, R., Cho, K. W., and De Robertis, E. M. (1993). The homeobox gene *gooseoid* controls cell migration in *Xenopus* embryos. *Cell* *72*, 491-503.
- Niehrs**, C., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1994). Mesodermal patterning by a gradient of the vertebrate homeobox gene *gooseoid*. *Science* *263*, 817-20.
- Nonaka**, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* *95*, 829-37.
- Nonchev**, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Maruthinar, K., Kuroiwa, A., Brenner, S., Charnay, P., and Krumlauf, R. (1996). The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9339-45.
- Nordeen**, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* *6*, 454-8.
- Northrup**, H., and Volcik, K. A. (2000). Spina bifida and other neural tube defects. *Curr Probl Pediatr* *30*, 313-32.

**Oliver**, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* *121*, 4045-55.

**Palmiter**, R. D., and Brinster, R. L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* *20*, 465-99.

**Parr**, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G., and McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* *119*, 247-61.

**Pera**, E. M., and Kessel, M. (1997). Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development* *124*, 4153-62.

**Perea-Gomez**, A., Rhinn, M., and Ang, S. L. (2001). Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* *45*, 311-20.

**Piccolo**, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* *397*, 707-10.

**Piccolo**, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoroventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* *86*, 589-98.

**Poelmann**, R. E. (1981). The Formation of the Embryonic Mesoderm in the early Post-implantation Mouse Embryo. *Anat Embryol* *162*, 29-40.

**Rajewsky**, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* *98*, 600-3.

**Rivera-Perez**, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., and Behringer, R. R. (1995). Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* *121*, 3005-12.

**Robertson**, E. J. (1987). In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*. IRL press, Oxford.

**Rossant**, J., and McMahon, A. (1999). "Cre"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev* *13*, 142-5.

**Rossant**, J., and Nagy, A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* *1*, 592-4.

**Rugh**, R. (1990). *The mouse. Its reproduction and development*. Oxford University Press, London.

**Saint-Jore**, B., Puech, A., Heyer, J., Lin, Q., Raine, C., Kucherlapati, R., and Skoultschi, A. I. (1998). Goosecoid-like (Gsc), a candidate gene for velocardiofacial syndrome, is not essential for normal mouse development. *Hum Mol Genet* *7*, 1841-9.

**Sah**, V. P., Attardi, L. D., Mulligan, G. J., Williams, B. O., Bronson, R. T., and Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* *10*, 175-80.

**Sasai**, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K., and De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* *79*, 779-90.

Sasaki, H., and Hogan, B. L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* *118*, 47-59.

**Sausedo**, R. A., and Schoenwolf, G. C. (1994). Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos. *Anat Rec* *239*, 103-12.

**Schmidt**, C., Wilson, V., Stott, D., and Beddington, R. S. (1997). T promoter activity in the absence of functional T protein during axis formation and elongation in the mouse. *Dev Biol* *189*, 161-73.

**Schmidt**, J., Francois, V., Bier, E., and Kimelman, D. (1995). *Drosophila* short gastrulation induces an ectopic axis in *Xenopus*: evidence for conserved mechanisms of dorsal-ventral patterning. *Development* *121*, 4319-28.

**Schmits**, R., Filmus, J., Gerwin, N., Senaldi, G., Kiefer, F., Kundig, T., Wakeham, A., Shahinian, A., Catzavelos, C., Rak, J., Furlonger, C., Zakarian, A., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Paige, C. J., Gutierrez-Ramos, J. C., and Mak, T. W. (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* *90*, 2217-33.

**Schoenwolf**, G. C. (1984). Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat* *169*, 361-76.

**Schoenwolf**, G. C. (2000). Molecular genetic control of axis patterning during early embryogenesis of vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* *919*, 246-60.

- Schoenwolf**, G. C., and Alvarez, I. S. (1992). Role of cell rearrangement in axial morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 27, 129-73.
- Schoenwolf**, G. C., and Smith, J. L. (2000). Mechanisms of neurulation. *Methods Mol Biol* 136, 125-34.
- Schoenwolf**, G. C., and Smith, J. L. (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* 109, 243-70.
- Schorle**, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R., and Mitchell, P. J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381, 235-8.
- Schorpp**, M., Jager, R., Schellander, K., Schenkel, J., Wagner, E. F., Weiher, H., and Angel, P. (1996). The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res* 24, 1787-8.
- Schweickert**, A. (1999). Spezifizierung der Körperachsen: Die Rolle von Homeobox- und Transkriptionsfaktoren der gooseoid und Pitx-Genfamilien während der frühen Embryogenese der Wirbeltiere. Dissertation an der Universität Karlsruhe.
- Schwenk**, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080-1.
- Serbedzija**, G. N., and McMahon, A. P. (1997). Analysis of neural crest cell migration in Splotch mice using a neural crest-specific LacZ reporter. *Dev Biol* 185, 139-47.
- Sharpe**, C. R., and Gurdon, J. B. (1990). The induction of anterior and posterior neural genes in *Xenopus laevis*. *Development* 109, 765-74.
- Shawlot**, W., Wakamiya, M., Kwan, K. M., Kania, A., Jessell, T. M., and Behringer, R. R. (1999). Lim1 is required in both primitive streak-derived tissues and visceral endoderm for head formation in the mouse. *Development* 126, 4925-32.
- Shields**, D. C., Ramsbottom, D., Donoghue, C., Pinjon, E., Kirke, P. N., Molloy, A. M., Edwards, Y. H., Mills, J. L., Mynett-Johnson, L., Weir, D. G., Scott, J. M., and Whitehead, A. S. (2000). Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *Am J Med Genet* 92, 206-11.
- Shimamura**, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J. L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-33.
- Simeone**, A., and Acampora, D. (2001). The role of Otx2 in organizing the anterior patterning in mouse. *Int J Dev Biol* 45, 337-45.
- Slack**, J. M. W. (1991). From Egg to Embryo. Cambridge University Press.
- Smith**, J. L., Gesteland, K. M., and Schoenwolf, G. C. (1994). Prospective fate map of the mouse primitive streak at 7.5 days of gestation. *Dev Dyn* 201, 279-89.
- Smith**, W. C., and Harland, R. M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-40.
- Soriano**, P., Cone, R. D., Mulligan, R. C., and Jaenisch, R. (1986). Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science* 234, 1409-13.
- Spemann**, H. und Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech.* 100, 599-638.
- Stachel**, S. E., Grunwald, D. J., and Myers, P. Z. (1993). Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* 117, 1261-74.
- Sternberg**, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M., and Hoess, R. (1981). Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45, 297-309.
- Storey**, K. G., Crossley, J. M., De Robertis, E. M., Norris, W. E., and Stern, C. D. (1992). Neural induction and regionalisation in the chick embryo. *Development* 114, 729-41.
- Storey**, K. G., Selleck, M. A., and Stern, C. D. (1995). Neural induction and regionalisation by different subpopulations of cells in Hensen's node. *Development* 121, 417-28.
- Stott**, D., Kispert, A., and Herrmann, B. G. (1993). Rescue of the tail defect of Brachyury mice. *Genes Dev* 7, 197-203.

**Studer**, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F. M., Chambon, P., and Krumlauf, R. (1998). Genetic interactions between *Hoxa1* and *Hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* *125*, 1025-36.

**Sulik**, K., Dehart, D. B., Iangaki, T., Carson, J. L., Vrablic, T., Gesteland, K., and Schoenwolf, G. C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* *201*, 260-78.

**Sulik**, K. K., and Sadler, T. W. (1993). Postulated mechanisms underlying the development of neural tube defects. Insights from in vitro and in vivo studies. *Ann N Y Acad Sci* *678*, 8-21.

**Suzuki**, A., Thies, R. S., Yamaji, N., Song, J. J., Wozney, J. M., Murakami, K., and Ueno, N. (1994). A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10255-9.

**Tam**, P. P. (1983). Regionalisation of the mouse ectoderm: allocation of prospective ectodermal tissues during gastrulation. *Development* *107*, 55-67.

**Tam**, P. P., and Beddington, R. S. (1992). Establishment and organization of germ layers in the gastrulating mouse embryo. *Ciba Found Symp* *165*, 27-41.

**Tam**, P. P., and Beddington, R. S. (1987). The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* *99*, 109-26.

**Thisse**, C., Thisse, B., Halpern, M. E., and Postlethwait, J. H. (1994). Goosecoid expression in neurectoderm and mesendoderm is disrupted in zebrafish cyclops gastrulas. *Dev Biol* *164*, 420-9.

**Thomas**, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* *51*, 503-12.

**Thomas**, P., and Beddington, R. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol* *6*, 1487-96.

**Tom**, C., Juriloff, D. M., and Harris, M. J. (1991). Studies of the effect of retinoic acid on anterior neural tube closure in mice genetically liable to exencephaly. *Teratology* *43*, 27-40.

**Torres**, M. R. and Kuehn, R. (1997). *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*. Oxford University Press.

**Trasler**, D. G., and Morriss-Kay, G. (1991). Immunohistochemical localization of chondroitin and heparan sulfate proteoglycans in pre-spina bifida splotch mouse embryos. *Teratology* *44*, 571-9.

**Wakamiya**, M., Lindsay, E. A., Rivera-Perez, J. A., Baldini, A., and Behringer, R. R. (1998). Functional analysis of *Gscl* in the pathogenesis of the DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Hum Mol Genet* *7*, 1835-40.

**Wang**, S., Krinks, M., and Moos, M., Jr. (1997). *Frzb-1*, an antagonist of *Wnt-1* and *Wnt-8*, does not block signaling by *Wnts -3A, -5A, or -11*. *Biochem Biophys Res Commun* *236*, 502-4.

**Wang**, W., Chen, X., Xu, H., and Lufkin, T. (1996). *Msx3*: a novel murine homologue of the *Drosophila* *msh* homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system. *Mech Dev* *58*, 203-15.

**Werler**, M. M., Louik, C., and Mitchell, A. A. (1999). Achieving a public health recommendation for preventing neural tube defects with folic acid. *Am J Public Health* *89*, 1637-40.

**Wilkinson**, D. G., Bhatt, S., and Herrmann, B. G. (1990). Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* *343*, 657-9.

**Wilson**, D. B., and Wyatt, D. P. (1992). Abnormal elevation of the neural folds in the loop-tail mutant mouse. *Acta Anat* *143*, 89-95.

**Wilson**, P. A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by *Bmp-4*. *Nature* *376*, 331-3.

**Wilson**, V., and Beddington, R. (1997). Expression of *T* protein in the primitive streak is necessary and sufficient for posterior mesoderm movement and somite differentiation. *Dev Biol* *192*, 45-58.

**Wilson**, V., and Beddington, R. S. (1996). Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech Dev* *55*, 79-89.

**Wilson**, V., Manson, L., Skarnes, W. C., and Beddington, R. S. (1995). The *T* gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* *121*, 877-86.

**Winograd**, J., Reilly, M. P., Roe, R., Lutz, J., Laughner, E., Xu, X., Hu, L., Asakura, T., vander Kolk, C., Strandberg, J. D., and Semenza, G. L. (1997). Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in *MSX2* transgenic mice. *Hum Mol Genet* *6*, 369-79.

- Wobus**, A. M., Kleppisch, T., Maltsev, V., and Hescheler, J. (1994). Cardiomyocyte-like cells differentiated in vitro from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca<sup>2+</sup> channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* *30A*, 425-34.
- Yamada**, G., Mansouri, A., Torres, M., Stuart, E. T., Blum, M., Schultz, M., De Robertis, E. M., and Gruss, P. (1995). Targeted mutation of the murine goosecoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* *121*, 2917-22.
- Yanagisawa**, K. O., Fujimoto, H., and Urushihara, H. (1981). Effects of the brachyury (T) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo. *Dev Biol* *87*, 242-8.
- Zhang**, B., Berger, J., Hu, E., Szalkowski, D., White-Carrington, S., Spiegelman, B. M., and Moller, D. E. (1996). Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* *10*, 1457-66.
- Zhao**, Q., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (1996). Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nat Genet* *13*, 275-83.
- Zhu**, C. C., Yamada, G., Nakamura, S., Terashi, T., Schweickert, A., and Blum, M. (1998). Malformation of trachea and pelvic region in goosecoid mutant mice. *Dev Dyn* *211*, 374-81.
- Zhu**, L., Belo, J. A., De Robertis, E. M., and Stern, C. D. (1999). Goosecoid regulates the neural inducing strength of the mouse node. *Dev Biol* *216*, 276-81.
- Zimmerman**, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* *86*, 599-606.