

**Isolierung, evolutive Einordnung und  
funktionelle Charakterisierung von  
Knopfkopf,  
einem buttonhead-Ortholog in der Maus.**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

vorgelegt von: Dieter Treichel  
aus: Ascheberg (Westfahlen)

Würzburg, 2002

Meinen Eltern,  
die in all den Jahren immer für mich da waren

und

meinen Kindern,  
für die ich leider viel zu selten da war.

Eingereicht am .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig, noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

München, den 17.10.2002

.....

(Dieter Treichel)

Dieter Treichel  
Augsburger Str. 12  
85221 Dachau

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 16. Mai 1965  
Geburtsort: Aschebert (Westf.)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische Ausbildung**

Grundschule: August 1971 – Juli 1975  
an der Grundschule der Gemeinde Ascheberg  
  
Realschule: September 1975 – Juli 1981  
an der Öffentlichen Realschule Ascheberg (Westf.)  
Erlangung der Mittleren Reife  
  
Gymnasium: August 1981 – Mai 1984  
an dem Wilhelm-Hifforf-Gymnasium Münster  
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### **Wehrdienst**

Bundeswehr: Oktober 1984 – Dezember 1985  
bei dem 1. / Flugabwehr-Raketen-Bataillon 21  
Verleihung der Ehrenmedaille der Bundeswehr

### **Studium**

Biologiestudium: Oktober 1985 – Juli 1993  
Verleihung des akad. Grades des Diplom-Biologen Univ.  
  
Diplomarbeit: Charakterisierung von Stadien-spezifischen Proteinen während der  
Spermatogenese der Ratte mittels der Zellfraktionierung und  
zweidimensionalen Gelelektrophorese  
  
Doktorarbeit: August 1992 –  
  
Auslandsstudium: August 1988 – Juni 1989  
an der State University of New York at Albany  
  
Stipendien: Oktober 1986 – Juli 1993  
von der Friedrich-Ebert-Stiftung  
  
August 1988 – Juni 1989  
vom Deutschen Akademischen Austausch Dienst

### **Beruflicher Werdegang**

Investment Manager: Februar 2001 –  
bei der FORUM Venture Capital AG, München

Mit dem Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die ich meinen Weg nicht hätte gehen können. Namentlich erwähnen möchte ich besonders:

- Prof. Klaus Scheller und Frau Priv.Doz. Heide Schenkel, bei denen ich zum ersten Mal eine Pipette in der Hand hatte;
- Prof. Martin Heisenberg, der für mich immer ein großes Vorbild war;
- Prof. Hans Joachim Gross, der mir die Biochemie beibrachte und mit dem ich über die Vor- und Nachteile der Anarchie diskutieren konnte;
- Prof. Ricardo Benavente, der mir die Gelegenheit zur Diplomarbeit gab und diese Doktorarbeit auf der Seite der biologischen Fakultät in Würzburg betreute;
- Prof. Paulette McCormick, von der ich alles über EC-Zellen und vieles über Amerika lernte;
- Dr. Hinrich Böger und Dr. Alvaro Mailhos, die mich als Bench-Genossen während der Doktorarbeit ertragen haben;
- Dr. Kamal Chowdhury, ohne den ich den Kampf gegen die Zink-Finger-Proteine sicherlich verloren hätte;
- Prof. George Chalepakis, Dr. Guy Goudreau, Prof. Michael Kessel, Dr. Anastassia Stoykova, Dr. Jan Wijnholds, Prof. Gen Yamada und Prof. Yoshifumi Yokota, die mir über alle Klippen und Hürden der vorliegenden Arbeit hinweg halfen;
- Dr. Ahmed Mansouri, der das Projekt zukünftig weiter führen wird;
- Dr. Götz Frommer, von dem ich zum ersten Mal über *buttonhead* erfuhr und Dr. Frieder Schöck, der die in dieser Arbeit vorgestellten Drosophila-Arbeiten machte;
- Prof. Herbert Jäckle, der in vielen langen Diskussionen viel zu der vorliegenden Arbeit beigetragen hat;

und vor allem

- Prof. Peter Gruss, der mir die Durchführung der Arbeit ermöglichte und auch in nicht immer einfachen Zeiten mit viel Geduld half, wenn ich ihn brauchte.

## Zusammenfassung

Ausgehend von Daten aus der Fruchtfliege wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nach Orthologen des *Drosophila*-*buttonhead*-Gen gesucht. Hierzu wurden verschiedene Kriterien erarbeitet, die der Klonierung von möglichen Kandidaten und der Identifizierung des wahrscheinlichsten Orthologs dienen. Insgesamt wurden drei Gene der Sp1-Genfamilie kloniert und charakterisiert, von denen zwei, Sp5 und Sp6, als Paraloge zu *buttonhead* (*btd*) eingestuft wurden. Das dritte Gen, Knopfkopf (*Knk*) wurde auf Grund von Sequenz-Ähnlichkeiten und des Expressionsprofils als wahrscheinliches Ortholog zu *btd* eingestuft.

Die Arbeiten haben dazu geführt, dass ein umfangreicher Stammbaum der Sp1-Genfamilie erstellt werden konnte, der zahlreiche Unterfamilien enthält. Die neu identifizierten Gene Sp5 und Sp6 bilden hierbei eine eigene Gruppe. Zumindest Sp5 weist ein komplexes und sehr spezifisches Expressionmuster auf, das zusammen mit den vorläufigen Daten von Sp6 darauf hindeutet, dass diese Gene eine wichtige Rolle bei der Embryogenese spielen. Es wurden keine funktionellen Daten zur Funktion der beiden Gene erhoben.

Eine weitere Untergruppe der Sp1-Genfamilie umfasst die beiden *Drosophila*-Gene *D-Sp1* und *btd* sowie das Maus-Gen *Knk*. *Knk* weist ähnlich wie Sp5 ein komplexes und sehr spezifisches Expressionsprofil auf. Das Gen ist während der Gastrulation und der Organogenese aktiv. Während der Gastrulation konnte mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass es im Neuroektoderm exprimiert wird sowie in der Schwanzknospe (sekundäre Gastrulation). Während der Organogenese ist es im ZNS (Telencephalon, Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze und Rückenmark) und den Extremitätenanlagen aktiv.

Als funktionelle Untersuchung wurde für das *Knk*-Gen eine vollständige Inaktivierung mittels homologer Rekombination ("Knock Out") durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Anlagen der betreffenden Strukturen gebildet werden. Eine molekulargenetische Analyse zeigte weiterhin, dass die frühen Musterbildungsprozesse und Regionalisierungen durchlaufen wurden, obwohl die morphologisch-strukturellen Eigenschaften, insbesondere beim Vorderhirn, stark verändert waren.

Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass die fehlende *Knk*-Aktivität ein weiteres Wachstum und die Umsetzung der frühen Musterbildung verhindert. Worauf dieser Effekt beruht, ist nicht bekannt; ein möglicher Ansatzpunkt wären jedoch Vergleiche mit anderen Mitgliedern der Sp1-Familien, die z.B. die Methylierung der DNA oder die Acetylierung von Histonen beeinflussen.

Abschließend wurden mögliche Zusammenhänge mit Erkrankungen des Menschen erarbeitet. Die gewonnenen Daten deuten auf eine Rolle von *Knk* bei der Krebsentstehung und dem Roberts Syndrom hin. Zusätzlich wurden in der Diskussion zahlreiche weiterführende Experimente dargestellt, die die bisherigen Ergebnisse ergänzen und fortführen könnten..

## Summary

The goal of this doctoral thesis was to identify and characterize orthologous genes of the *Drosophila melanogaster buttonhead* gene (*btd*) in the mouse.

Based on the *Drosophila btd*-data several criteria were defined in order to facilitate the cloning of possible candidate mouse genes and the identification of the most likely *btd* orthologue. Altogether three mouse genes, which show all relevant features of the *Sp1* gene family, were cloned and characterized. Two of these genes, *Sp5* and *Sp6*, were classified as paralogous genes of *btd*. The third gene, *Knopfkopf* (*Knk*), was based on its sequence similarity and expression profile classified as a most likely orthologous gene of *btd* in the mouse or vertebrates in general.

Within this doctoral thesis a detailed evolutionary tree of the *Sp1* gene family was reconstructed, containing several subfamilies.

The newly identified genes *Sp5* and *Sp6* are forming one distinct subfamily within this tree. At least *Sp5* is expressed in a complex and specific manner during embryogenesis of the mouse. Together with preliminary data on *Sp6* it can be concluded that these genes play an important role during embryogenesis. For *Sp5* and *Sp6* no functional data were ascertained.

A further subfamily within this tree contains the genes *D-Sp1* and *btd* from *Drosophila* and *Knk* from the mouse. Similar to *Sp5*, *Knk* shows a very specific expression profile during the embryogenesis of the mouse. The first phase of activity starts during gastrulation where it is expressed in the neuroectoderm and later on in the tail bud (secondary gastrulation). The second phase of activity starts during organogenesis with a specific expression in the central nervous system (telencephalon, midbrain-hindbrain-boundary and spinal cord) and in the anlagen of the limbs.

In order to study the function of *Knk* a complete inactivation of the gene via homologous recombination (knock out) was performed. In homozygous *Knk*-knock out embryos the anlagen of all structures that do express *Knk* under normal conditions are formed normally. A detailed analysis of molecular markers showed that the early processes of patterning and regionalization are normal, even though the morphological features of the anlagen were severely affected, especially in the telencephalon.

Based on these results it was concluded that *Knk* does not influence the early molecular patterning events but the interpretation of these patterning signals by the cells in the affected tissue, thereby preventing further outgrowth and differentiation.

The molecular cause of the findings and the function of the KNK-protein itself is not known. A possible starting point for further experiments would be the effect of other proteins of the *Sp1* family on the methylation of the DNA or the acetylation of histones, thereby influencing the state of the chromatin.

Finally a possible link between the *Knk*-gene and human diseases and syndromes was established. The available data point to a possible role of *Knk* during the development of cancer and the so called Roberts syndrome.