

**Nothing in Biology Makes Sense
Except in the Light of Evolution.**

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

in: *The American Biology Teacher*, 1973 (35:125-129)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
Einleitung	6
Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie.	6
Vergleichen ist lernen	8
<i>gap</i> -Gene schließen die Lücke	10
Köpfe aus dem Baukasten?	12
<i>buttonhead</i> : Nicht verstanden oder nicht gefunden?	15
Geschwistergene erzählen von den Eltern.	16
<i>Sp1/Sp4</i> und <i>btd</i> – ein ungleiches Paar	19
Von der Fliege lernen, heißt nicht nur fliegen lernen.	22
Die Regulation des Regulators	24
Zusammenfassung und Aufgabenstellung	27
Methoden	28
Präparation, Analyse und Manipulation von Nucleinsäuren	29
Analytische Plasmidpräparation	29
Präparative Plasmidpräparation / Standard	30
Präparative Plasmidpräparation / hochreine Präparation von (low copy)-Plasmid-DNA.	30
Präparation von λ -DNA.	35
Degenerative PCR zur Isolierung eines <i>buttonhead</i> -Orthologs.	37
Southern-Blot-Analyse	38
Präparation von genomischer Maus-DNA für die Genotypisierung	39
Genotypisierung per Southern-Blot.	39
Genotypisierung per PCR	40
Plasmid-Verdau mit Restriktions-Endonukleasen	41
Partieller Restriktionsverdau	41
Dephosphorylierung von DNA-Enden	41
Erzeugung von glatten DNA-Enden	42
Agarose-Gelelektrophorese	42
Präparative Agarose-Gelelektrophorese	42
Ligation	43
Präparation von kompetenten <i>E. coli</i>	43
Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien	43
Herstellung von Glycerol-Stämmen	43
Herstellung von transgenen Mäusen	44
X-Gal-Färbung von transgenen Mäusen	44
Skelett-Präparation	44
<i>in situ</i> -Hybridisierung auf Paraffin-Schnitten	44

<i>whole mount in situ</i> -Hybridisierung (<i>in situ</i> -Hybridisierung von Ganzpräparaten) von Mausembryonen / WMISH.	45
Drosophila-Experimente	64
Ergebnisse	65
Amplifizierung von Sp1-typischen Zink-Finger- Sequenzen aus genomischer Maus-DNA.	65
Klonierung von <i>Knopfkopf</i> -, <i>Sp5</i> - und <i>Sp6</i> -cDNA.	67
Nutzung von <i>very low copy</i> -Vektoren (plcBS) für die Klonierung	68
Klonierung und Expressionsanalyse von Sp6	71
Klonierung und Expressionsanalyse von Sp5	76
Klonierung von <i>Knopfkopf</i> und “ <i>Artefact</i> ”	85
Expression von <i>Knopfkopf</i>	94
Gezielte Inaktivierung des <i>Knopfkopf</i> -Gens mittels homologer Rekombination.	99
Analyse des Phänotyps der <i>Knk</i> -Mutanten	108
Partielle Rettung von <i>Drosophila-buttonhead</i> -Mutanten durch das <i>Knopfkopf</i> -Maus-Gen	120
Chromosomale Lokalisation des <i>Knopfkopf</i> -Gens bei der Maus und dem Menschen	121
Vergleich der <i>Knopfkopf</i> -Protein-Sequenz mit anderen Spezies.	121
Sequenz- und phylogenetischer Vergleich der Sp1/KNK/BTEB/XKLF-Proteinfamilie.	124
Diskussion	127
Viel gemeinsam und doch verschieden: Untergruppen in der Familie der <i>Sp1</i> -Transkriptionsfaktoren	127
Sp5 und Sp6: paralog und redundant?	128
Wenn Geschwistergene und Verwandte zu einander finden: <i>btd</i> , <i>D-Sp1</i> und <i>Knk</i> bilden eine neue Genfamilie	130
Von der Sequenz zur Expression: Die Regulation als Homologiekriterium	132
<i>Knk</i> spielt eine wesentliche Rolle in der Embryogenese der Maus	136
Knopfköpfe im Tierreich	143
Maus-Mutanten und das Roberts Syndrom: Welche Rolle spielt <i>Knk</i> in der Humangenetik?	146
Knopfkopf spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Krebs.	151
Modell der Funktion des KNK-Proteins	152
plcBS	155
Zusammenfassung	156
Referenzen	157

Abkürzungen

Abkürzungen im Text, die nicht aufgeführt sind, entsprechen denen des *Deutschen Wörterbuches* (Duden-Verlag). Ebenfalls nicht aufgenommen wurden Abkürzungen, die als allgemein bekannt vorausgesetzt wurde (ATP etc.).

Abb	=	Abbildung
AK	=	Antikörper
AP	=	Alkalische Phosphatase
bp	=	Basenpaare
BSA	=	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CHAPS	=	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
CIA	=	Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)
d	=	Tage
DEPC	=	Diethyl-pyrocbonat
DIG	=	Digoxigenin
E8.5	=	embryonaler Tag 8.5 (bzw. jede andere angegebene Anzahl an Tagen)
EBI	=	European Bioinformatics Institute, Hinxton
Eppis	=	Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Polypropylen
EtOH	=	Ethanol
FAI	=	Formaldehyd
FAm	=	Formamid
FCS	=	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
g	=	einfache Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
h	=	Stunden
H ₂ O ^M	=	Mit einer <i>Milli-RX 75 / Milli-Q synthesis A-10</i> -Anlage von <i>Millipore</i> aufbereitetes Wasser
i.d.R.	=	in der Regel
ISH	=	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	=	Kilobasen
Konz.	=	Konzentration
Lsg	=	Lösung
MCS	=	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MeOH	=	Methanol
min	=	Minuten
NaAc	=	Natriumacetat
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
nt	=	Nukleotide
o/n	=	über Nacht (<i>over night</i>)
PBS	=	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS/FAI	=	PBS mit 4% Formaldehyd
PBST	=	PBS mit 0,1% Tween20
PCI	=	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (24:24:1)
PCR	=	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	=	Polyethylen

PNS	= peripheres Nervensystem
PP	= Polypropylen
RIPA	= radio immuno precipitation assay
RT	= Raumtemperatur
sec	= Sekunden
s.o.	= siehe oben
s.u.	= siehe unten
Tab	= Tabelle
UPM	= Umdrehungen pro Minute
UPS	= Umdrehungen pro Sekunde
Vol.	= Volumen
WMISH	= whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung (<i>in situ</i> Hybridisierung von Ganzpräparaten) von Mausembryonen
ZNS	= Zentrales Nervensystem

Einleitung

genetische Kaskaden
bzw. Netzwerke als
konservierte
Steuerprogramme

Einer der wesentlichen Erfolge biologischer Forschung ist die Entdeckung von biochemischen und genetischen Kaskaden bzw. Netzwerken als gemeinsame Steuerprogramme in der Entwicklung so unterschiedlicher Organismen wie der Taufliege *Drosophila melanogaster* und dem Menschen. Sie sind der Schlüssel zum Verständnis der Evolution alles Lebendigen - damit unserer eigenen Existenz - sowie der biochemischen Prozesse, auf denen alles Leben basiert.

Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie

die Nutzung von
Modellorganismen

Die Entdeckung dieser konservierten Steuerprogramme hatte zwei wesentliche Konsequenzen für die molekulare ("moderne") Entwicklungsbiologie. Erstens ermöglicht sie es, zum Studium von (molekular)biologischen Fragestellungen sogenannte Modellorganismen einzusetzen. Bei entsprechend sorgfältiger Auswahl des Organismus' bieten diese eine bestmögliche technische Handhabbarkeit, ohne dass die aus den Versuchen und Beobachtungen gezogenen Ergebnisse an Allgemeingültigkeit bzw. Übertragbarkeit verlieren.

Besonders deutlich wird die Notwendigkeit der Nutzung von Modellsystemen im Bereich der Medizin. Sowohl die oft unüberschaubare Komplexität, als auch offenkundige moralisch-ethische Gründe erschweren die wissenschaftliche Arbeit mit dem Menschen oder machen sie unmöglich. Eine Möglichkeit zur Umgehung der genannten Probleme sind *in vitro*-Experimente, deren Nutzbarkeit und Aussagekraft jedoch begrenzt sind. Die Reduktion des Versuchsaufbaus auf exakt kontrollierbare Bedingungen außerhalb der Komplexität des menschlichen Organismus' beinhaltet neben unbestreitbaren Vorteilen gleichzeitig erhebliche Nachteile. Es ist in der Praxis oft nicht möglich, die nötigen Vereinfachungen des Experiments vorzunehmen, ohne artifizielle Bedingungen zu schaffen, die wiederum ungenaue oder sogar falsche Versuchsergebnisse zur Folge haben.

Lebende Organismen dagegen bieten bei entsprechender Auswahl eine physikochemische Versuchsumgebung, die entweder *per definitionem* der natürlichen Umgebung von interagierenden Molekülen entsprechen (wenn die Moleküle aus eben diesem Organismus entstammen), oder aber sie sind diesen sehr ähnlich. Dies erhöht die Aussagekraft eines entsprechenden Experimentes deutlich gegenüber reinen *in vitro*-Experimenten.

Noch deutlicher wird die Notwendigkeit von Tierversuchen bei Fragestellungen, die das Zusammenwirken und die wechselseitige Regulation von Prozessen zwischen Zellen und Geweben betreffen. So ist es zwar möglich und sinnvoll, die

basalen elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen z.B. mit der *patch clamp*-Technik *in vitro* zu studieren (Neher E. und Sakmann B.; 1976). Will man aber untersuchen wie das Gehirn funktioniert, bleibt keine andere Möglichkeit als den Organismus in seiner Gesamtheit bis hin zu seinem Verhalten zu studieren.

Die vom Wissenschaftler zu treffende Auswahl des geeignetsten Modellorganismus' wird von vier Hauptkriterien bestimmt:

1. Der Organismus soll möglichst einfach in der technischen Handhabung sein.
2. Es sollte bereits möglichst viel über den Organismus bekannt sein, um eine optimale Planung des Experiments und die anschließende Interpretation der Beobachtungen zu gewährleisten.
3. Das gewählte Modellsystem muß der Komplexität der wissenschaftlichen Fragestellung entsprechen.
4. Der Organismus muß bei medizinischen Fragestellungen auf den Menschen übertragbare Eigenschaften besitzen.

Kriterien zur Auswahl

Hierauf basierend haben sich im Bereich der Entwicklungsbiologie und der biomedizinischen Forschung einige Modellsysteme etabliert, jedes mit spezifischen Vor- und Nachteilen. Generell ergibt sich eine reziproke Beziehung zwischen der technisch-methodischen Handhabbarkeit und der Komplexität. Beispiele für den erfolgreichen Einsatz solcher Systeme sind u.a.:

1. an Hefen (zumeist *Saccharomyces cerevisiae*) wurden enorme Fortschritte bei der Aufklärung von generellen Regulationsmechanismen der Genexpression gemacht (Kornberg RD. und Lorch Y.; 1999);
2. am Nematoden *Caenorhabditis elegans* gelangen die entscheidenden Entdeckungen auf dem Gebiet der Apoptose (Liu QA. et al.; 1999);
3. an *Drosophila melanogaster* wurden die erwähnten genetischen Kaskaden bzw. Netzwerke als gemeinsame Steuerprogramme in der Embryologie zu wesentlichen Teilen ausgearbeitet (Rivera-Pomar R. und Jäckle H.; 1996);
4. an *Danio rerio* (Zebrafisch) und *Oryzia latipes* (Medaka) wurden Mutantenanalysen und der Effekt von ektopischen Genexpressionen untersucht ("Zebrafish Issue" Development 123, 1996. Ishikawa Y. ; 2000);
5. an Embryonen von *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) bzw. *Triturus taeniatus* und *T. cristatus* wurde vor allem die Gastrulation und Neurulation untersucht (Spemann H. und Mangold H.; 1924);
6. am Hühnerembryo (*Gallus gallus*) wurden induktive Prozesse mit Hilfe von Transplantationsexperimenten während der Organogenese bearbeitet (Martinez S. et al.; 1991);
7. an der Maus (*Mus musculus*) wurde die Funktion einzelner Gene im Kontext eines Organismus' insbesondere mit Hilfe der *Knock Out*-Technik (gezielte Inaktivierung eines Genes durch homologe Rekombination) ausgearbeitet (Donehower LA. et al.; 1992).

etablierte Modellorganismen

Nutzung von
Modellsystemen bei der
Erforschung der
Augenentwicklung

Ein Beispiel für die Nutzung der Modellorganismen ist die Erforschung der Augenentwicklung. Hier konnten mit Hilfe der Mutantanalyse in *Drosophila* zahlreiche beteiligte Gene identifiziert werden, wie z.B. *eyeless* (Quiring R. et al.; 1994) und *sine oculis* (Cheyette BN. et al.; 1994). Die Homologie-screens in der Maus haben zur Identifizierung der homologen Gene *Pax6* (Walther C. und Gruss P.; 1991) und *Six3* (Oliver G. et al.; 1995) geführt, und die Funktion des *Pax6*-Gens wird auf der Basis der Geninaktivierung durch homologe Rekombination (*Knock Out*) sowie der natürlichen *small eye*-Mutante intensiv untersucht (St-Onge L. et al.; 1997. Quiring R. et al.; 1994. Schedl A. et al.; 1996). Die Rolle des *Six3*- bzw. *Six6*-Homologs *XOptx2* in der Augenentwicklung wurde durch die Überexpression des Gens in *Xenopus* studiert (Zuber ME. et al.; 1999). Zusätzlich wurde die Möglichkeit genutzt, die Wirkung von Genen aus der Maus in anderen Arten zu testen: die induktive Wirkung von *Pax6* wurde in *Drosophila* (Halder G.; 1995), die von *Six3* in Medaka untersucht (Oliver G. et al.; 1996).

vom Zuschauer zum
Akteur

Nach wie vor hat die Wissenschaft nur eine schemenhafte Vorstellung davon, wie sich aus einer einzelnen Zelle ein komplexer Organismus entwickelt, der im Falle des Menschen aus 100 Billionen (10^{14}) Zellen mit einer phantastischen Präzision aufgebaut wird. Aber das obige Beispiel zeigt, dass der Mensch mit Hilfe des Einsatzes dieser vielfältigen Methoden so viel Wissen über die ontologischen und phylogenetischen Prozesse erlangen kann, dass er erstmals die Rolle des fassungslos staunenden Zuschauers verlassen und mit dem neu gewonnenen Verständnis an der Faszination der Entstehung des Lebens teilnehmen kann.

Vergleichen ist lernen

der Vergleich
ermöglicht ein tieferes
Verständnis

Die zweite Konsequenz aus der Entdeckung der konservierten Steuerprogramme ist hinsichtlich unseres Erkenntnisgewinns von noch entscheidenderer Bedeutung: der Vergleich der Ergebnisse, basierend auf Unterschieden zwischen den untersuchten Organismen auf der einen Seite und Gemeinsamkeiten auf der anderen Seite, erleichtert das Verstehen der tieferliegenden Mechanismen, bzw. macht es erst möglich, diese überhaupt zu erkennen.

Trotz der evidenten Unterschiede in der Embryogenese und Körpergrundgestalt von Maus und Taufliege zeigt das Beispiel der Augenentwicklung, wie weitreichend der Grad der Konservierung reicht. Inzwischen wurden zu fast allen Genen, die in *Drosophila* eine Rolle in der Embryonalentwicklung spielen, homologe Maus-Gene kloniert. Dies trifft sowohl für die Transkriptionsfaktoren zu - siehe z.B. *eyeless* und *Pax6* oder die Steuerung der antero-posterioren Achsenentwicklung durch die *Hom*- bzw. *Hox*-Cluster (Bachiller D. et al.; 1994) - als auch die Signalmoleküle - hier wären z.B. die orthologen Gene *hedgehog* und *sonic hedgehog* (Echelard Y. et al.; 1993. Krauss S. et al.; 1993), sowie *armadillo* und *β -catenin* zu nennen (Barth AI. et al.; 1997). Hinzu kommt, dass auch der Großteil der Strukturproteine und Enzyme von orthologen Genen kodiert wird (Aktin, Myosin, Histone, ribosomale Proteine, Hexokinase etc.).

Angesichts dieser Übereinstimmungen zwischen der Tauffliege und Maus stellt sich die Frage, wie die gleichzeitig deutlichen Unterschiede in der Körpergrundgestalt entstehen? Obwohl das jetzige Wissen eine abschließende Beantwortung nicht erlaubt - tatsächlich gewann die Frage erst in den letzten Jahren an Bedeutung, so dass sich inzwischen einige Wissenschaftler eingehender mit dieser Problematik befassen - beruhen die Erklärungsversuche hauptsächlich auf einer "abgemilderten" Form des "Biogenetischen Grundgesetzes" von Ernst Haeckel (*Ontogenie rekapituliert Phylogenie*; näheres hierzu wird als bekannt vorausgesetzt und soll an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden).

Nach diesem Schema ergibt sich für die Beziehung von *Drosophila* und der Maus eine Dreiteilung in der Embryonalentwicklung: während einer mittleren Phase (im Schema als "2" markiert) durchlaufen die Embryonen einen Entwicklungsabschnitt, der die gemeinsame evolutive Wurzel widerspiegelt. Ungeachtet dessen, dass die Grundgestalt des gemeinsamen Vorläuferorganismus' Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Debatten und umstritten ist, kann aus molekulargenetischer Sicht davon ausgegangen werden, dass dieser Vorläuferorganismus bereits alle homologen Gene besaß und - ungeachtet seiner Morphologie - in entsprechendem Kontext exprimierte. Um bei den oben genannten Beispielen zu bleiben, wären es z.B. die Vorläufer der Orthologen-Paare *eyeless/Pax6*, *hedgehog/sonic hedgehog*, *armadillo/β-catenin* etc..

An diese Phase paralleler Entwicklung schließt sich eine divergente Phase an ("3" im Schema). Hier werden Gene exprimiert, die kein Homolog im jeweils anderen Organismus haben. Sie können zum einen mit der unterschiedlichen Morphogenese des Embryos in Verbindung stehen, vor allem aber die unterschiedliche biochemische Ausstattung der Organismen widerspiegeln. Beispiele hierfür wären die im Pankreas gebildeten Proteine Glukagon und Pankreatisches Polypeptid, die nicht in Insekten vorkommen (Insulin dagegen spielt auch in Insekten eine Rolle, was übereinstimmt mit der dualen Rolle dieses Hormons bzw. dessen paraloge Gene wie dem "insulin-like growth factor" als Energiestoffwechselregulator und Wachstumshormon (Edgar BA.; 1999. Verdu J. et al.; 1999)). Allerdings handelt es sich bei diesem Wechsel von gemeinsamen Genen zwischen Maus und *Drosophila* zu solchen Genen, die nur in einem von beiden gefunden werden, um keine strikte zeitliche Abfolge. Viele Gene, die spezifisch für eine Art sind, werden dort konstitutiv exprimiert oder zumindest schon zu einem Stadium, in dem auch die Gene der parallelen Phase aktiv sind. Hier sei z.B. auf das Haemoglobin in der Maus oder die Proteine LSP-1 und LSP-2 der Haemolymphe in *Drosophila* hingewiesen (Deutsch J. et al.; 1989).

Besonders im Fall der Maus und von *Drosophila* sind nicht nur die späteren Entwicklungsschritte stark abgeleitet, sondern auch die kurze initiale Phase (hier als "1" markiert). Bei den Säugern beruht der Wandel auf der weitgehenden Aufgabe der Stoff- und Energiespeicherung in der Oozyte/Zygote auf Grund der intrauterinen Embryogenese, so dass das Ei stark reduziert wurde (Apomorphie). Bei *Drosophila* dagegen ist die erste Phase der Entwicklung durch die Ausbildung eines Syncytiums geprägt (Apomorphie). Außerdem ist die

parallele Phase

divergente Phase

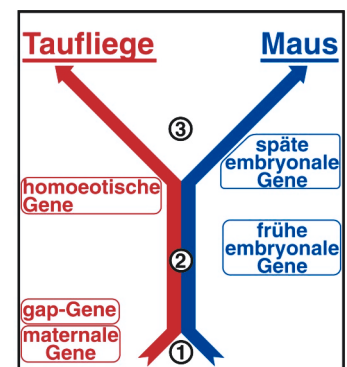


Abb.1: Beziehung der Entwicklung von Tauffliege und Maus. Im Vergleich können die Embryonalentwicklungen in eine konvergente (1), eine parallele (2) und eine divergente (3) Phase unterteilt werden.

konvergente Phase

Drosophila-Oozyte groß und, durch den Bildungsprozess bestimmt, von Beginn an stark strukturiert (Bicoid-Gradienten etc.) (Plesiomorphie). Dadurch spielen in der Tauffliege die maternalen Gene eine entscheidende Rolle in der Embryogenese (Rivera-Pomar R. und Jäckle H.; 1996). Insgesamt betrachtet, beginnt dieses kurze Entwicklungsstadium bei sehr unterschiedlichen Startpunkten und endet schließlich mit der Expression der Gene, die die parallele Phase definieren - es handelt sich also um eine konvergente Phase.

gap-Gene schließen die Lücke

Genetische und biochemische Kaskaden beinhalten eine zeitliche Abfolge mit zwingenden biochemischen Kausalitäten. Daher ist es aus praktischer Sicht sinnvoll, das Studium "am Anfang" zu beginnen, so wie man auch ein Buch aus Gründen der besseren Verständnis üblicherweise beginnt, am Anfang zu lesen und nicht in der Mitte oder am Ende. Da die Ontogenie ganz zu Beginn ebenso unterschiedlich ist, wie am Ende der Embryonalentwicklung, bedeutet dies, den Startpunkt der parallelen Phase zu finden, da zu diesem Zeitpunkt die Komplexität am niedrigsten ist und die experimentelle Manipulation eines Bausteins dieser Kaskade die offensichtlichsten Folgen haben sollte.

gap-Gene bilden den Startpunkt der parallelen Entwicklungsphase

Betrachtet man das bereits bekannte genetische Netzwerk in der Tauffliege, so zeigt sich entsprechend der relativ klaren hierarchischen Struktur, dass der gesuchte Anfangspunkt auf der Ebene der sogenannten *gap*-Gene liegt. In Drosophila sind insgesamt 14 dieser Gene beschrieben. Bei sechs von ihnen sind die vermutlichen Orthologe auch in der Maus kloniert, bei weiteren sechs sind in der Maus Gene bekannt, die zumindest prinzipiell als Orthologe in Frage kommen, bei denen aber die Zuordnung noch recht vage ist. Bei den verbleibenden zwei Genen gibt es bislang keine gut begründete Orthologiebeziehung zu bekannten Mausgenen.

Gen	Proteinklasse	Maus-Orthologe
<i>caudal, cad</i>	Homoeodomänen-Protein	<i>Cdx1, Cdx2, Cdx4</i>
<i>crocodile, croc</i>	helix-loop-helix-Protein	<i>Fkh1</i>
<i>empty spiracles, ems</i>	Homoeodomänen-Protein	<i>Emx1, Emx2</i>
<i>hunchback, hb</i>	C ₂ H ₂ -Zink-Finger-Protein	<i>Ikaros</i>
<i>huckebein, hkb</i>	C ₂ H ₂ -Zink-Finger-Protein	<i>EGR-Gene</i>
<i>orthodenticle, otd</i>	Homoeodomänen-Protein	<i>Otx1, Otx2</i>

Tab.2: Drosophila-gap-Gene und deren Maus-Orthologe. Bei sechs von 14 Drosophila-Genen gelten die Orthologe in der Maus als (vermutlich) bekannt. Durch Genduplikationen in der Maus-Evolutionslinie sind zumeist mehrere Gene als ortholog zu betrachten. (Beck F. et al.; 1995. Subramanian V. et al.; 1995. Sasaki H. und Hogan BL.; 1993. Bishop KM. et al.; 2000. Boncinelli E. et al.; 1993. Georgopoulos K. et al.; 1992. Molnar A. und Georgopoulos K.; 1994. Brönner G. et al.; 1994. Finkelstein R. und Boncinelli E.; 1994. Acampora D. et al.; 1998. Sharman AC. und Brand M.; 1998)

Bei der Zuordnung von orthologen Genen in der Maus ergibt sich oft das Problem, dass nicht nur ein Gen die Voraussetzungen erfüllt, die die Wissenschaft als Kriterien heranziehen würde, sondern mehrere. Die Ursache hierfür ist, dass in der Stammlinie der Maus zahlreiche Gene ein- oder mehrfach dupliziert wurden. Dadurch steht einem Gen in der Tauffliege oft eine ganze Gruppe von Mausgenen gegenüber.

Genduplikationen erschweren die Homologisierung von Genen

Gen	Proteinklasse	Maus-Orthologe
<i>buttonhead, btd</i>	C ₂ H ₂ -Zink-Finger-Protein	<i>Sp1, Sp4</i>
<i>cap 'n' collar, cnc</i>	bZIP-Proteine	<i>Nrf1, Nrf2</i>
<i>knot = collier, kn</i>	helix-loop-helix-Protein	<i>Ebf/Olf-1, Ebf2, Ebf3</i>
<i>Krüppel, Kr</i>	C ₂ H ₂ -Zink-Finger-Protein	<i>EKLF</i>
<i>sloppy paired, Slp</i>	fork head-Protein	<i>BF-1</i>
<i>tailless, tll</i>	Steroidhormonrezeptor	<i>Tlx</i>

Tab.3: Drosophila-gap-Gene mit unklarer Zuordnung von Maus-Genen.

Bei sechs der 14 Drosophila-gap-Gene existieren zwar homologe Gene in der Maus, aber ihre Zuordnung als Orthologe oder Paraloge ist unklar bzw. es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Paraloge. (Wimmer EA. et al.; 1993. Schöck F. et al.; 1999. Evans MJ. und Scarpulla RC.; 1990. Chan JY. et al.; 1998. Garel S. et al.; 1997. Shields JM. und Yang VW.; 1997. Tao W. und Lai E.; 1992. Toresson H. et al.; 1998. Monaghan AP. et al.; 1995. Monaghan AP. et al.; 1997)

Auch die verbleibenden zwei gap-Gene ohne identifizierte Orthologe in der Maus können bestimmten Proteinklassen zugeordnet werden, besitzen also auch dort homologe Gene. Allerdings zeigen die übrigen Merkmale (Sequenzähnlichkeiten, Expressionsprofile etc.) keine Übereinstimmungen, die eine orthologe Beziehung wahrscheinlich machen würden.

Gen	Proteinklasse	Maus-Orthologe
<i>giant, gt</i>	bZIP-Proteine	–
<i>knirps, kni</i>	Steroidhormonrezeptor	–

Tab.4: Drosophila-gap-Gene ohne identifizierte Maus-Orthologe.

Obwohl beide Gene in bekannte Proteinklassen fallen, gibt es noch keine Kandidaten, die als mögliche Orthologe in Frage kommen. (Capovilla M. et al.; 1992. Gerwin N. et al.; 1994)

Wie wichtig und instruktiv der Vergleich von Ergebnissen aus zwei verschiedenen Modellorganismen ist, zeigt sich auch bei der obigen Problematik der Zuordnung unterschiedlicher Homologieebenen. Dadurch, dass die Homoeobox-Gene strukturell bedingt eine relativ einfache Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen anhand von Sequenzmerkmalen erlauben, konnten sehr früh die Beziehungen von Genen in der Maus und Drosophila ermittelt werden. Somit war die Basis gelegt für funktionelle und biochemische Vergleiche in beiden Spezies. Deren Ergebnisse wiederum ermöglichten eine Verfeinerung unserer Vorstellung der evolutiven Prozesse, was wiederum neue und gezieltere Fragestellungen bei den vergleichenden Analysen zuließ. Auf diese Art und Weise ist es gelungen, die Gruppe der Homoeobox-Gene besser zu verstehen als jede andere Klasse von Transkriptionsfaktoren. Die Folge ist, dass von allen obigen Verwandtschaftsbeziehungen diejenigen von *cad* zu *Cdx1/Cdx2/*

Homoeobox-Gene: von der Sequenz zum Funktionsvergleich

Cdx4, *emx* zu *Emx1/Emx2* und *otd* zu *Otx1/Otx2* als mit Abstand am besten gesichert betrachtet werden können (siehe z.B. Finkelstein R. und Boncinelli E.; 1994. Sharman AC. und Brand M.; 1998).

Köpfe aus dem Baukasten?

Ein wesentliches Merkmal der Insekten ist ihr segmentaler Aufbau. Dieser spiegelt sich auch in der Genexpression während der Embryogenese wider. Besonders deutlich zeigt sich die segmentale Genregulation im thorakalen und abdominalen Teil der Larve mit der Genkaskade “maternale Gene – *gap*-Gene – *pairrule*-Gene – *segmentpolarity*-Gene – homoeotische Gene”. Beispiele hierfür sind die Expression der *pairrule*-Gene *fushi tarazu* (*ftz*) und *even skipped* (*eve*) (Hafen E. et al.; 1984. Macdonald PM. et al.; 1986. Liang Z. und Biggin MD.; 1998), das *segment polarity*-Gen *engrailed* (*en*) (Weir MP. und Kornberg T.; 1985), sowie die homoeotischen Gene *Antennapedia* (*Antp*) (Schneuwly S. et al.; 1987) und *Ultrabithorax* (*Ubx*) (Casanova J. et al.; 1985).

Genkaskaden in der Kopfentwicklung

Ähnliche Korrelationen zwischen Genexpression und Segmentierung finden sich auch im Kopfbereich. So können einzelne *gap*-Gene (oft auch als *gap-like* bezeichnet - siehe unten) bestimmten Kopfsegmenten zugeordnet werden.

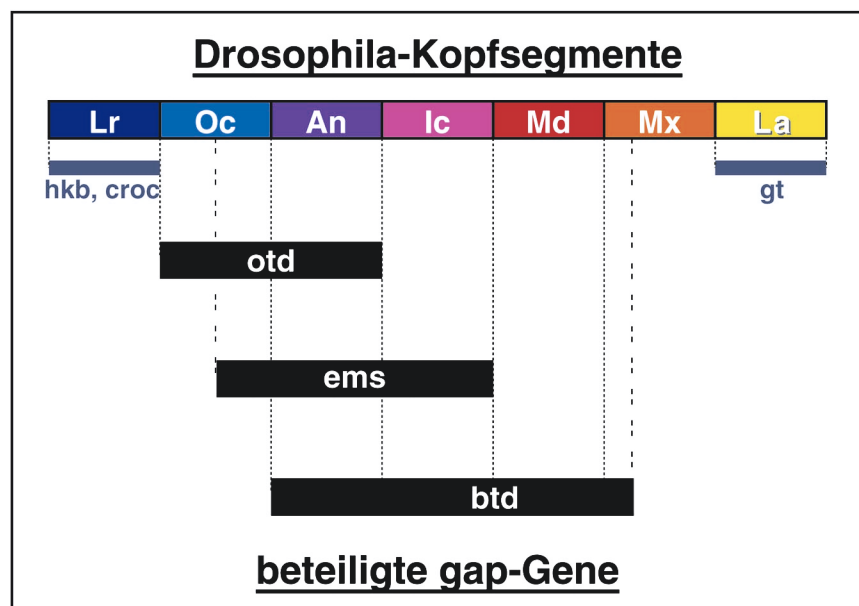


Abb.2: Segmentale Expression von *gap*-Genen in der *Drosophila*-Larve. Der Kopf der *Drosophila*-Larve ist wie der restliche Körper segmental aufgebaut. Den insgesamt sieben Segmenten entsprechen die Expressionsmuster der beteiligten *gap*-Gene; lediglich im Falle von *buttonhead* ist die posteriore Aktivitätsgrenze nicht übereinstimmend mit einem Segment. Seine mRNA kann auch in dem vordersten Viertel des Maxillaren Segmentes nachgewiesen werden. (Abkürzungen: An = Antennales Segment, Ic = Interkalares Segment, La = Labiales Segment, Lr = Labrales Segment, Md = Mandibulares Segment, Mx = Maxillares Segment, Oc = Oculares Segment; für die Gensymbole: siehe Tab.1-3) (Schmidt-Ott U. et al.; 1994. Wimmer EA. et al.; 1993. Wimmer EA. et al.; 1996)

Diesen offensichtlichen Ähnlichkeiten zwischen dem Kopf und Rumpf stehen deutliche Unterschiede gegenüber: Im Gnathozephalon (Labiales, Mandibulares und Maxillares Segment) wird die Abfolge von maternalen – *gap* – *pair rule* – *segment polarity* – homoeotischen Genen wie im Rumpf beibehalten. Im Prosenzephalon (Intercalares, Antennales, Oculares und Labrales Segment sowie dem Acron) dagegen fehlt die Ebene der *pair rule*-Gene. Hier werden die *segment polarity*-Gene entweder direkt oder mittels weiterer, bislang nicht zugeordneter Gene von den *gap*-Genen gesteuert. Der genaue Mechanismus und weitere möglicherweise beteiligte Gene sind jedoch unbekannt.

Gnatho- und Prosenzephalon enthalten unterschiedliche Steuerprogramme

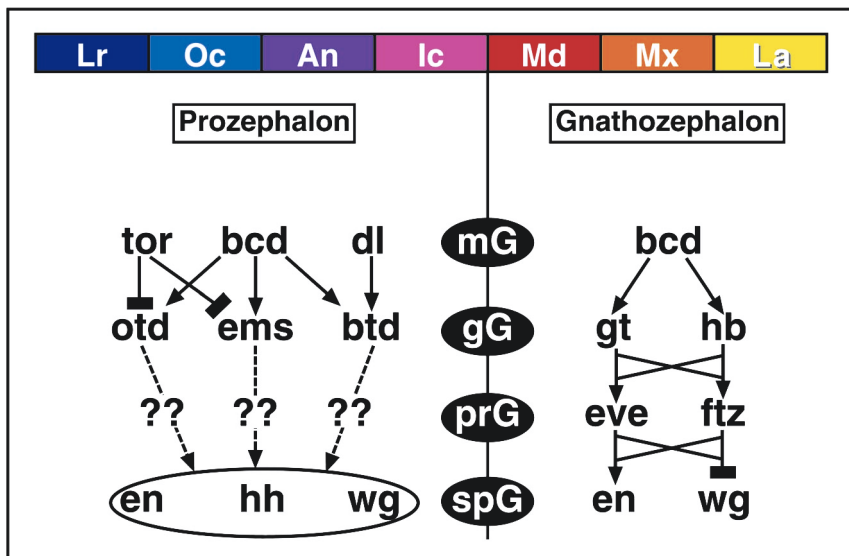


Abb.3: Molekulargenetische Unterschiede zwischen Pro- und Gnathozephalon bei *Drosophila melanogaster*. Während die molekulargenetischen Steuerungsprozesse im Gnathozephalon denjenigen aus der Rumpfregeion entsprechen, fehlt im Prozephalon die Ebene der *pair rule*-Gene. (Abkürzungen: mG = maternale Gene, gG = *gap*-Gene, *pari rule*-Gene, spG = *segment polarity*-Gene; An, Ic, La, Lr, Md, Mx, Oc = siehe Abb.2; für die Gensymbole: siehe Tab.1-3 und Text) (Schema nach: Jürgens G. und Hartenstein V.; 1993)

Wie in der Abb. 2 zu erkennen ist, entsprechen die Expressionsdomänen der beteiligten *gap*-Gene *btd*, *croc*, *ems*, *gt*, *hkb* und *otd* weitgehend den Segmentgrenzen. Einzige Ausnahmen sind die anteriore Grenze von *ems* (ca. bei 50% des Ocularen Segmentes) und die posteriore Grenze von *btd*. Letztere wurde anfangs gleichgesetzt mit dem Übergang vom Maxillaren zum Mandibularen Segment, da in der *buttonhead*-Mutante die Mandibularen, Intercalaren und Antennalen Segmente vollständig fehlen. Allerdings bringt der am weitesten anteriore Anteil des Maxillaren Segmentes keine charakteristischen Cuticulastrukturen hervor, weshalb die ausschließlich hieran orientierten Analysen diesen Aspekt nicht eindeutig beantworteten (Cohen SM. und Jürgens G.; 1990). Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass der anteriore Anteil des Maxillaren Segmentes in der Mutante ebenfalls betroffen ist. Hieraus wird geschlossen, dass auch die Expression des Gens in diesen Teil des mMaxillaren Segmentes hineinreicht (Wimmer et al.; 1996). Es kann jedoch nicht

buttonhead in der Fruchtfliege

ausgeschlossen werden, dass der maxillare Phänotyp nur indirekt verursacht wird, z.B. durch die nicht vorhandene mandibulare-maxillare Segmentgrenze.

Sieht man davon ab, dass die posteriore Expressiongrenze von *buttonhead* vermutlich nicht exakt mit der mandibularen-maxillaren Segmentgrenze übereinstimmt, kann man den einzelnen Kopfsegmenten nur für sie charakteristische Expressionsmuster der *gap*-Gene zuordnen:

- Labiales Segment: *giant*
- Maxillares Segment: – (*buttonhead*)
- Mandibulares Segment: *buttonhead*
- Intercalares Segment: *buttonhead* und *empty spiracles*
- Antennales Segment: *buttonhead*, *empty spiracles* und *orthodenticle*
- Oculares Segment: *orthodenticle* (und *empty spiracles*)
- Labrales Segment: *huckebein* und *crocodile*

gap-Gene des Kopfes weisen kombinatorische Merkmale auf

Diese Beobachtung hat zu einem Modell der Kopfentwicklung in *Drosophila* geführt, bei dem die oben genannten *gap*-Gene nicht nur wie die “klassischen” *gap*-Gene in der Rumpfregeion wirken (z.B. *Krüppel* (Knipple DC. et al.; 1985. Preiss A. et al.; 1985) oder *knirps* (Nauber U. et al.; 1988)). Vielmehr wurde angenommen, dass die *gap*-Gene der Kopfregion eine kombinierte Wirkung der *gap*-Gene des Rumpfes und der dazu gehörenden homoeotischen Gene des *Hom*-Cluster besitzen (Lewis EB.; 1978. Cohen CM. und Jürgens G.; 1990).

Unterstützt wurde diese Hypothese durch zwei Beobachtungen in der Maus. Dort wurden die *Hox*-Gene als orthologe Gene des *Hom*-Clusters identifiziert und eine entsprechende homoeotische Wirkung bei der Segmentierung und Identitätsgebung nachgewiesen, was als *Hox-Code* bezeichnet wurde (Kessel M. und Gruss P.; 1991). Zusätzlich zeigten die Expressionsanalysen der Maus-Gene *Otx1/Otx2* und *Emx1/Emx2* eine ähnlich verschachtelte Expression wie deren *Drosophila*-Orthologe *otd* und *ems* (Holland P. et al.; 1992. Finkelstein R. und Boncinelli E.; 1994).

“einfache” Genkombinationen reichen nicht aus für die Segment-Identität

Würde das kombinatorische Modell bei *Drosophila* (und bei Vertebraten) zutreffen, könnte durch die Veränderung der Expression eines der betreffenden Gene eine homoeotische Transformation der Kopfsegmente verursacht werden. Die unterschiedlichen Kopfsegmente würden sich demnach wie beliebig austauschbare Elemente eines Baukastens verhalten. So sollte eine Expression von *buttonhead* im Ocularen Segment dazu führen, dass dieses in ein Antennales Segment transformiert wird. Entsprechende Experimente zeigten jedoch, dass ein solcher kombinatorischer Code nicht existiert - die ectopische Expression von *btd* hat keinen Einfluss auf die Kopfentwicklung (Wimmer EA. et al.; 1997). Ähnliches gilt für die ectopische Expression von *orthodenticle* (Gallitano-Mendel A. und Finkelstein R.; 1998). Allerdings zeigte auch die Überprüfung des instruktiven Potentials einzelner *Hox*-Gene gewisse Einschränkungen für die Gültigkeit des *Hox*-Codes (Greer JM. et al.; 2000).

buttonhead:

Nicht verstanden oder nicht gefunden?

Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass *buttonhead* zur Familie der *Sp1*-Transkriptionsfaktoren zählt (Wimmer EA. et al.; 1993). Besonders ein Orthologieverhältnis zwischen *btd* und *Sp1* sowie *Sp4* wurde in der Literatur mehrfach als möglich oder wahrscheinlich angenommen (siehe z.B. die “*The Interactive Fly*”-home page unter der URL: <http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimain/1aahome.htm>. Supp DM. et al.; 1996). Neben der angesprochenen Sequenzähnlichkeit gibt es folgende Argumente für diese Einordnung der Homologieverhältnisse:

- *Sp1* kann *btd* teilweise in seiner biologischen Funktion ersetzen: *btd*-Mutanten fehlt der anteriore Teil des Maxillaren Segmentes sowie das Mandibulare, Intercalare und Antennale Segment in Gänze. Wird in solchen Mutanten *Sp1* als Transgen in diesen Segmenten exprimiert, kommt es zu einer Rettung des Maxillaren und Mandibularen Segmentes (Wimmer EA. et al.; 1993. Schöck F. et al.; 1999).
- *in vitro*-Experimente zeigen, dass *Sp1*- und *BTD*-Proteine die gleichen TBP-associated factors (TAFs) binden und eine übereinstimmende Wirkung auf die Expression von Reporter-Genen *in vitro* besitzen (Schöck F. et al.; 1999).
- Die Expressionsmuster von *Sp4* (und *Sp5*) zeigen mehr oder weniger große Übereinstimmungen mit den Erwartungen, die sich aus dem Expressionsmuster von *btd* in *Drosophila* ergeben. Dazu gehört a) eine gewebespezifische Expression (*Sp1* dagegen ist *cum grano salis* ubiquitär exprimiert), b) ein dynamisches Muster in der Embryogenese, c) eine Expression im ZNS, insbesondere im Gehirn eine mehr posteriore Aktivität als *Otx* und *Emx*, d) Transkripte in den Extremitäten, e) keine oder nur eine begrenzte Expression in anderen Regionen des Körpers (Wimmer EA. et al.; 1993, Wimmer EA. et al.; 1996. Harrison SM. et al.; 2000. Treichel et al.; 2001).

Sp1 ersetzt *btd* partiell in der Kopfentwicklung

biochemische Ähnlichkeiten

Sp4 (und *Sp5*) haben ähnliche Expressionsmuster wie *btd*

Diese Übereinstimmungen stellen signifikante Argumente für die Annahme eines solchen Orthologieverhältnisses dar. Dennoch konnte bislang nur wenig aus den Vergleichen der Daten aus der Maus (oder anderen Vertebraten) mit denen aus der Taufliege gelernt werden. Dies gilt besonders, wenn man die Situation mit derjenigen bei den orthologen Genen *otd* und *Otx1/Otx2* sowie *ems* und *Emx1/Emx2* vergleicht. Es stellt sich die Frage, ob in diesem speziellen Fall die eingangs dargelegte Erweiterung des Wissens und des Verständnisses durch den Prozess des Vergleichens nicht funktioniert?

Hierfür kann es prinzipiell zwei Gründe geben. Erstens ist es möglich, dass die Wissenschaft bislang nicht das Grundverständnis bereitstellt, um die Beziehung dieser Gene zu erkennen. Zweitens können die Grundvoraussetzungen für den Vergleich nicht gegeben sein. Konkret würde dies bedeuten, dass Gene und die mit ihnen verbundenen Steuerprozesse verglichen werden, die prinzipiell nicht vergleichbar sind, da es sich nicht um Orthologe handelt bzw. um Gene, die in einem konservierten biochemischen Kontext auftreten. Im Folgenden soll dargelegt werden, dass es sich im Fall von *buttonhead* mit großer Wahrscheinlichkeit um die zweite Möglichkeit handelt.

Geschwistergene erzählen von den Eltern

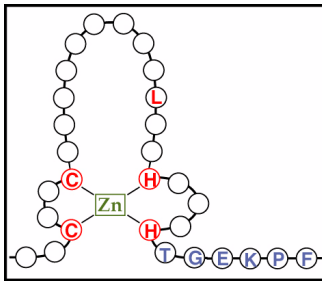


Abb.4: "Standard-Zn-Finger"
Leere Kreise stellen variable Aminosäurereste dar, die stark konservierten Aminosäuren sind rot dargestellt, der HC-link in blau.

Das charakteristische Merkmal für die Zuordnung von allen genannten Genen (*buttonhead*, *Sp1*, *Sp4*, *Sp5* etc.) ist die DNA-bindende Domäne des translatierten Proteins. Es handelt sich dabei um drei sogenannte C₂H₂-Zink-Finger. Diese kommen in mehreren Tausend, d.h. in ca. 1 % aller Mammalia-Gene vor (siehe u.a. Berg JM. und Shi Y.; 1996. Mackay JP. und Crossley M.; 1998). Anders als z.B. bei der Homoeodomäne ist die Sequenzähnlichkeit in vielen Fällen jedoch sehr gering, da ein einzelner dieser Zink-Finger aus ca. 26-28 Aminosäuren aufgebaut ist, von denen aber nur fünf praktisch ausnahmslos konserviert sind. Bei diesen konservierten Aminosäureresten handelt es sich um die namensgebenden Cysteine und Histidine, die über ihre Seitenketten das Zn²⁺-Ion komplexieren, sowie um ein Leucin an Position 10 zwischen dem zweiten Cystein und dem ersten Histidin, das über hydrophobe Wechselwirkungen mit weiteren, weniger konservierten Aminosäureresten zur Gesamtstruktur beiträgt. Zusätzlich ist in vielen Zink-Finger-Proteinen die Verbindung zwischen zwei Zink-Fingern stark konserviert. Diese konservierte Struktur, der sogenannte H/C-link, ist allerdings deutlich weniger stark erhalten als die fünf anderen Aminosäurereste bzw. fehlt als homologes Merkmal z.T. vollständig.

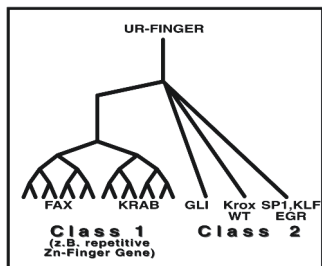


Abb.5: Zn-Finger-Evolution.
Hypothetische Evolution der Zink-Finger-Gene (nach Pieler T. und Bellefroid E.; 1994 - leicht abgeändert).

Durch die starke Variabilität der Zink-Finger-Domänen ist es möglich, diese trotz der großen Zahl verschiedener Proteine in klar abgegrenzte Gruppen aufzuteilen. Dabei zeigt sich, dass es eine kleine Zahl von Genen gibt, die sehr hoch konservierte phylogenetische Einheiten bilden und fast unverändert in Mammaliern, Amphibien, Nematoden, Insekten oder Hefen gefunden werden können. Der Großteil der Gene wird als "repetitive Zink-Finger-Gene" zusammengefasst und bildet ein fast kontinuierliches Spektrum an Sequenzähnlichkeiten ohne deutlich hervortretende Gruppencharakteristika. Von manchen Autoren werden die phylogenetisch alten Gruppen auch als "Klasse 2"-Gene zusammengefasst, die erst spät innerhalb der Vertebraten, insbesondere der Tetrapoden entstandenen Vertreter dagegen als "Klasse 1"-Gene (el-Baradi T. und Pieler T.; 1991. Pieler T. und Bellefroid E.; 1994). Betrachtet man den konkreten Fall der BTB und Sp1 bzw. Sp4-Proteine, so ist eine klare Gruppierung der dazugehörigen Gene in eine homologe Abstammungslinie möglich.

btd box	finger 1	finger 2	finger 3	
QPOAGRRTREACTCTFCDESEGRASGDPGKKKHQHI	CHIQCGKVVYGTSLRLKRWITGERPFMCNWSYCKRFTPSDELQRKRTTIGKXKFAFLCPKPKFMRSDHLSKIKT			Sp1 (m)
-H-E-K-L-L-V-----R-REG-gGTRJ-----C-P-C-----R-H-S-----VC-M-C-----R-R-H-----VC-S-----A-H-H				Sp3 (h)
EV-P-K-L-L-V-S-N-REG--GSSE-----V-E-E-----E-H-----VC-S-HFC-----R-R-H-----VC-C-----H-V-H				Sp4 (m)
AFL-ATAR-CRR-R-N-DAAG-APEAE-----N-C-VP-C-----K-H-H-----VC-LIC-S-----L-L-N-R-C-G-----A-H-V-H				Sp5 (m)
ET-P-EKR-M-----R-L-G-K-S-EG-----V-C-PDC--TPR--L-L-K-V-LR-----VC-PPC-----R-A-N-D-R-EGAGQ-----T-H-V				Sp2 (h)
T-E-Q--S-V-R--S-P-N-E--R-A-G-H--C-P-C-R-L--A--K-T-H-----L-C-L-C--S-----R-H--H-R-P-F-C-I-C-E-K-S-----R-S-E				BTB (D)
HREPE-ODSG-PSPLLIH-IVARK-KHEDP-K-EPG-C-----S-K-H-V-----T-P-PC-K-S-----T-H-E-----D-C-----T-HARRR				BTEB1 (m)
LE-EPCFAGSGEPFQDGRGRRSRAHSPDPRK-K-C-YA-C-----S-----K-H-T-----AGS-QEEN-K-A-----A-H-V-H-----S-C-ICE-----T-HARRR				BTEB3 (m)
S-SGT-LESLAFAQDPSAARVTPQI-REIVFRK-----GSHP-EG-T-F-S-----K-H-V-T-----K-S-S-KQCR-R-A-----S-HR-----C-CHDR-----T-HARRR				TIEG1 (m)
AAGKELLPLAARVFTFSQNCVPI-PSRQVVV-CFPF-K-T-F-S-----K-H-T-----K-K-SG-DCC-K-A-----S-HR-----VC-VEOR-----T-HARRR				TIEG2 (h)
MNNOFACISPFPIESTFROBRSE-H-EN-RSL-R-CDPE-CN-----T-S-----K-HR-T-----K-YKCT-EGCTWK-G-----T-HR-KN--V-P-KACDOR-S-----ALHRRR				AP-2rep (m)
HNPPLT-LPVSNGIQWRYNRRSNP-LE-RR-I-Y-CDY-CT-----T-S-----K-H-T-----K-YKCT-EGCCHN-A-----T-HR-KN--A-P-COVRRS-S-----ALHM-RR				BTEB2 (h)
SRYVQLRPHS-LPEH-LPKS-R-NFRKSTAT-CGYA-CG-T-T-S-----K-H-T-----K-YKCT-DCC-WK-A-----T-HR-KN--HRP-CCHLDRS-S-----ALHM-RR				GKLF (m)
AARLLTFPASLELLEA-PEH-LN-WFRKSTAT-CGYA-CG-T-T-S-----K-H-T-----K-YKCT-DCC-WK-A-----T-HR-KN--HRP-CCHLDRS-S-----ALHM-RR				LKLF (h)
ELG-TAIIAGDAGLSPGTAPFKRS-RTLAKRQAA-T-CHE-EG-S-T-S-----K-H-T-----K-YAS-DCCN-A-----T-HR-KN--HRP-CCHLDRS-S-----ALHM-RR				EKLF (m)

Abb.6: Vergleich der Zink-Finger- und buttonhead-Domänen verschiedener Mitglieder der Sp1 und BTEB/KLF-Proteine. Die btd-Domäne und die Zn-Finger sind mit unterschiedlichen Grüntönen markiert. Weitere konservierte Domänen in der BTEB/KLF-Gruppe sind durch Rahmen hervorgehoben. Die Sequenz des BTB-Proteins ist hellrot unterlegt. Identische Aminosäuren sind durch "-" dargestellt, Auslassungen durch "." (Abkürzungen: m = Maus, h = Mensch, D = Drosophila)

Wie in der Abbildung 6 zu erkennen ist, besitzt das *BTD*-Protein Merkmale, die eine klare Eingruppierung in die *Sp1*-Familie zwingend begründen (alle Sequenzen aus *GenBank / NCBI*). Dazu gehört in erster Linie die sogenannte *buttonhead*-box, die als synapomorphes Merkmal nur in dieser Genfamilie auftritt. Ebenfalls zu erwähnen sind an dieser Stelle die sechs Aminosäurereste vor dem ersten *Zn*-Finger.

Weitere, indirekte Argumente ergeben sich aus dem Vergleich mit der ansonsten sehr nah verwandten *BTEB/XKLF*-Genfamilie. So besitzen z.B. die Vertreter dieser Gruppe an Position sieben in der Schleife des ersten Fingers ein Serin, wohingegen das *BTD*-Protein an dieser Stelle ein Alanin besitzt. Allerdings ist dies gleichzeitig ein Unterschied zur *Sp1*-Gruppe, die an dieser Position ein Threonin aufweist. Ähnliche Merkmale, die *buttonhead* von allen übrigen Mitgliedern dieser Genfamilie abheben sind z.B. das Fehlen von zwei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen des zweiten Fingers (*BTD* hat zwei Aminosäurereste, alle anderen vier), der Verlust des zweiten HC-links, das Lysin an Position drei der Schleife des dritten Fingers und die Dreiergruppe Glutaminsäure, Arginin und Leucin am Anfang der Schleife des ersten Fingers.

Gleichzeitig gibt es auch Merkmale, die eine Zuordnung von *btd* in die *BTEB/XKLF*-Gruppe rechtfertigen würden. Diese wären z.B. die Serine an Position fünf der Schleifen des zweiten und des dritten Fingers, die ansonsten auch bei *BTEB1* bzw. bei *AP-2rep*, *BTEB2*, *GKLF*, *LKLF* und *EKLF* vorkommen.

Auch wenn die Gesamtheit der Gemeinsamkeiten und Unterschiede keinen Zweifel an der Korrektheit der Zuordnung des *buttonhead*-Gens in die *Sp1*-Familie begründen, stellt sich die Frage, warum einige Merkmale in einem Widerspruch hinsichtlich der Homologieverhältnisse zueinander stehen? Prinzipiell kann man drei Möglichkeiten unterscheiden, die jeweils unterschiedliche Konsequenzen für die Vorhersage der Merkmale eines orthologen Gens in der Maus haben:

1. Die Merkmale, die *buttonhead* mit der *Sp1*-Gruppe verbinden, spiegeln den plesiomorphen, vor der Speziation vorliegenden Zustand wider. Die *Sp1*-Gene sind also evolutiv älter als die der *BTEB/KLF*-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den beiden Genfamilien sind also durch Synapomorphien auf der Ebene der *BTEB/KLF*-Familie begründet. Die Konsequenz hieraus ist, dass ein Ortholog von *buttonhead* die gleichen *Sp1*-typischen Merkmale aufweisen sollte wie *buttonhead* selbst.
2. Die Merkmale, die *buttonhead* mit der *BTEB/KLF*-Gruppe verbinden, spiegeln den plesiomorphen Zustand wider. Bei analoger Argumentation wie in 1. sollte ein Ortholog von *buttonhead* ebenfalls die *BTEB/KLF*-typischen Merkmale aufweisen.
3. *buttonhead* selbst spiegelt den plesiomorphen Zustand wider, und die beiden anderen Gruppen sind erst später entstanden. Diese Möglichkeit würde die größtmögliche Ähnlichkeit eines *btd*-Orthologs als Konsequenz haben (falls diese nicht sekundär in der Vertebratenlinie verloren gingen).

btd gehört in die *Sp1*-Genfamilie

Autapomorphien von *BTD*

Homologisierungsmöglichkeiten von *BTD* zur *Sp1*- und *BTEB/KLF*-Gruppe

Gegen die zweite und dritte Möglichkeit spricht, dass - sollte sie zutreffen - zahlreiche typische Merkmale der ursprünglichen Gene im Laufe der Evolution verloren gingen. Dies wäre nur dann wahrscheinlich, wenn bereits in der Entwicklungslinie zu den einzelnen Vorläufergenen der *Sp1*-Gruppe bzw. *BTEB*/*XKLF*-Gruppe diese Verluste aufgetreten sind. Ansonsten hätten diese Änderungen mehrfach und unabhängig von einander erfolgen müssen.

D-Sp1 ist der Schlüssel zur Verwandtschaftsaufklärung

Ein besonders wichtiges Argument gegen diese Möglichkeit sowie die zweite und dritte Alternative bietet die Tauffliege selbst. Diese besitzt neben *btd* ein zweites, zumindest teilweise redundantes Gen: *D-Sp1*. Trotz seines Namens zeigt es hinsichtlich seines genetischen Kontextes erheblich mehr Übereinstimmungen mit *btd* als mit dem Vertebraten-Gen *Sp1* (Wimmer EA. et al.; 1996).

Entsprechend unserer heutigen Kenntnisse über die Mechanismen zur Entstehung von Genen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei *btd* und *D-Sp1* um Paraloge handelt - sie also auf eine Genduplikation zurückgehen. Vergleicht man die Sequenz von *D-Sp1* mit der von anderen Mitgliedern der *Sp1*- und *BTEB*/*KLF*-Gruppe, so zeigt sich, dass die *btd*-spezifischen Unterschiede hier nicht auftreten (siehe Abb. 7). Im Sinne der sparsamsten Erklärung heißt dies, dass *btd* die spezifischen Charakteristika in einer divergenten Entwicklung erst später erlangte. Die einzige alternative Erklärung wäre, dass *D-Sp1* durch eine konvergente Evolution die Merkmale der *Sp1*-Gruppe nachträglich erworben hat. Obwohl dies nicht ausgeschlossen werden kann, wird die Wahrscheinlichkeit hierfür als praktisch Null angenommen.

	finger 1	finger 2	finger 3	
KQHI	CHIQCGKVGKTSHLRAHLRWHTGERPFMCNWSY	CGKRFTRSDLELQPKRHTGKFKFAC	CECPKRFMRSDHLSKHKTH	Sp1 (m)
--V	C--E-C-----H--H-----IC--MFC-----HR--H-----EC--CS-----HV--H			Sp4 (m)
---	C--P-CERL---A---KTH--H-----ICL.TC-----HG--H-NYRPY-C-ICS-K-S-----HK--H			<i>btd</i> (D)
NI-S	C--P-C-----K-H--H-----VCN-LFC-----HL--H-----R-C-VCN-----G--A-HV--H			<i>D-Sp1</i> (D)
-R-K	CPYS-C-----S---K-HY-VH-----PCT-PDCL-K-S-----T-HY--H-----Q-R-C-LCE-----T-HARRH			<i>BTEB1</i> (m)
AT-T	CSYA-CG-T-T-S---K-H--H---K-YHC--DGC--WK-A-----T-HY-KH--HRP-QHLC-DRA-S-----ALHM-RR			LKLF (M)

Abb.7: Vergleich der Zink-Finger des buttonhead- und D-SP1-Proteins mit verschiedenen Mitglieder der Sp1- und BTEB/KLF-Proteine. Die Zn-Finger sind in Grün hervorgehoben. Identische Aminosäurereste sind durch ein “-” ersetzt. Auslassungen sind durch ein “.” dargestellt. Die Sequenz des *BTD*- und *D-Sp1*-Proteins sind hellrot unterlegt. (Abkürzungen: m = Maus, h = Mensch, D = Drosophila)

Vorhersage der *BTD*-Merkmale

Hinsichtlich der zu erwartenden Merkmale eines *btd*-Orthologs in der Maus ergeben sich hieraus zwei Möglichkeiten:

1. Das Maus-Ortholog ähnelt in seiner Sequenz allen übrigen “typischen” Mitgliedern der *Sp1*-Proteine (*Sp1*, *Sp4*, *D-Sp1*). Alle Merkmale, die das *BTD*-Protein kennzeichnen, kommen in der Maus nicht vor, da sie erst in der Evolutionslinie nach der Speziation, die die Vorläufer der Insekten und Vertebraten trennte, entstanden sind.
2. Das Maus-Ortholog weist in seiner Sequenz einige oder alle typischen Merkmale des *BTD*-Proteins auf, falls die Speziation erst zu einem Zeitpunkt erfolgte, als das “Ur-*BTD*”-Protein bereits einige oder alle Charakteristika des heutigen Proteins aus der Tauffliege entwickelt hat.

***Sp1/Sp4* und *btd* – ein ungleiches Paar**

Nachdem gezeigt wurde, dass *buttonhead* in die Homologiegruppe der *Sp1*-Gene eingeordnet werden muss, stellt sich die Frage, ob eines (oder mehrere) der bekannten Gene dieser Familie als Orthologe in Frage kommen? Man kann postulieren, dass ein solches Ortholog ähnlich wie im Fall von *otd* und *Otx1/Otx2* sowie *ems* und *Emx1/Emx2* eine spezifische Rolle in der Kopf- bzw. Gehirnentwicklung spielen sollte. Demnach würden die ubiquitär exprimierten *Sp1* und *Sp3* nicht weiter in Frage kommen. Die Expressionsdaten zu *Sp2* sind zu unvollständig, um von einer ubiquitären Genaktivität auszugehen, aber vorliegende Literaturdaten weisen auf eine zumindest breite Expression hin (Kingsley C. und Winoto A.; 1992).

Gene der *Sp1*-Familie mit einer spezifischen Expression, insbesondere im ZNS, sind *Sp4* und das erst kürzlich identifizierte *Sp5* (Supp DM. et al.; 1996. Harrison SM et al.; 2000. Treichel et al.; 2001). Da die Übertragbarkeit der Expressionsdomänen von der Tauffliege auf die Maus nur bedingt möglich ist, kann die Genaktivität in der Embryonalentwicklung nur unter Vorbehalt als Kriterium genutzt werden.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die Einordnung der Homologieverhältnisse ist der Vergleich der Sequenzen außerhalb der bereits beschriebenen Zink-Finger-Domäne. Die Erfahrungen, die unter anderem mit den Homoeobox-Genen bzw. -Proteinen gemacht wurden, zeigen, dass hier entscheidende Informationen gewonnen werden können. Beispiele für solche konservierte Bereiche bei den Homoeobox-Genen sind die Paired-Domäne in den PAX-Proteinen (Noll M; 1993), die SIX-Domäne in den SIX-Proteinen (Zhou X. et al.; 2000) und die IRO-Domäne in den IROQUOIS-Proteinen (Bürglin TR.; 1997).

Vergleicht man die verschiedenen Proteine der *Sp1*- sowie der BTEB/XKLF-Familie, zeigt sich, dass auch hier solche konservierten Domänen existieren, die Auskunft über die Verwandtschaftsverhältnisse geben (siehe Abb. 8). So kann *Sp5* anhand der N-terminalen Region eindeutig in die Gruppe der BTEB/KLF-Proteine eingeordnet werden. Diese sehr unterschiedliche Homologisierung der Zink-Finger-Domäne und der übrigen, Prolin-reichen Domäne, geht mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein "domain swapping" zurück (Treichel et al.; 2001). Damit scheidet *Sp5* als orthologes Gen für *buttonhead* aus.

Obwohl als letzter Kandidat das *Sp4*-Protein auf den ersten Blick eine deutliche Ähnlichkeit zum BTD-Protein aufweist (Glutamin-reiche und Serin/Threonin-reiche Domänen), kann man auch in diesem Fall zeigen, dass eine Orthologiebeziehung sehr unwahrscheinlich ist. Für eine solche Homologie sprechen die Glutamin- und Serin/Threonin-reichen Domänen, die auch in den Proteinen *Sp1*, *Sp2* und *Sp3* vorkommen. Die Tatsache, dass das BTD-Protein auch C-terminal eine große Serin/Threonin-reiche Domäne enthält, während alle übrigen genannten Proteine keine oder nur eine kurze solche Region aufweisen, ist kein prinzipielles Argument gegen ein Orthologieverhältnis. Dies folgert aus

Die Expression als Kriterium für die Homologiebeziehung

Protein-Domänen außerhalb der Zn-Finger enthalten wichtige Informationen

der Beobachtung, dass die C-terminale und N-terminale Domäne des BTD-Proteins weitgehend übereinstimmende Funktionen haben (Schöck F. et al.; 1999). Dies deutet darauf hin, dass die große N-terminale Serin/Threonin-reiche Domäne keine prinzipiell neuen Eigenschaften besitzt. Analog zur Argumentation bei den Abweichungen innerhalb der Zink-Finger-Domäne kann man postulieren, dass innerhalb der *buttonhead*-spezifischen Evolutionslinie eine spätere Verlängerung einer ursprünglich kürzeren Serin/Threonin-reichen Domäne (wie z.B. in Sp4) stattgefunden hat.

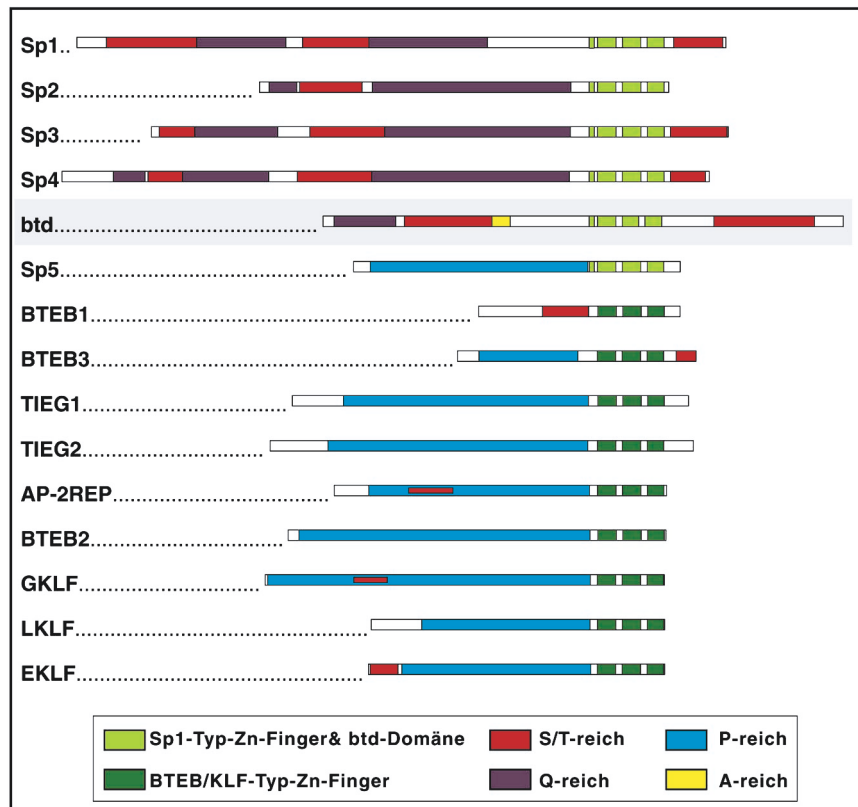


Abb.8: Vergleich des BTD-Gesamtproteins mit den übrigen Vertretern der Sp1- und BTEB/KLF-Familie. Die schematischen Proteindarstellungen sind entsprechend ihrer relativen Längen zueinander proportional dargestellt. Die Ausrichtung erfolgte anhand der Zink-Finger-Domänen. Das BTD-Protein ist grau unterlegt. Besonders zu beachten sind die verlängerte N-terminale S/T-reiche Domäne, die zusätzliche A-reiche Domäne und die vertauschten Q- und S/T-reichen Domänen des BTD-Proteins, sowie die chimäre Struktur des Sp5-Proteins. (Abkürzungen: S = Serin, T = Threonin, Q = Glutamin, P = Prolin, A = Alanin)

Abweichende
Sequenzmerkmale des
BTD-Proteins

Sp1:
S/T-reich vor Q-reich
BTD:
Q-reich vor S/T-reich

Gegen eine Orthologiebeziehung von *Sp4* und *buttonhead* sprechen drei Strukturmerkmale des BTD-Proteins im Vergleich mit allen übrigen Mitgliedern der Sp1-Familie:

1. Obwohl in der ursprünglichen Beschreibung von *buttonhead* (Wimmer EA. et al.; 1993) und nachfolgenden Publikationen (z.B. Schöck F. et al.; 1999) davon ausgegangen wird, dass die Glutamin-reiche Domäne des BTD-Proteins zu der des Sp1- (und Sp4-)Proteins homolog ist, gibt es schwerwiegende Argumente gegen diese Einschätzung. Erstens tritt diese Domäne bei den Vertretern der Sp1-Familie immer in gleicher,

charakteristischer Weise zusammen mit der Glutamin-reichen Domäne auf: N-terminal liegt die S/T-reiche Region und erst anschließend folgt die Glutamin-reiche Domäne. Obwohl dieses Muster im Falle von Sp2 und dem ersten Teil von Sp4 etwas aufgebrochen ist, indem eine kurze Region mit einer Anreicherung an Glutaminresten vor der Serin/Threonin-reichen Region liegt, ist es dennoch klar erkennbar. Außerdem treten die beiden Domänen zumeist tandemartig wiederholt zwei Mal pro Protein auf. Einzige Ausnahme ist das Sp2-Protein, das vermutlich den ersten Teil nachträglich wieder verloren hat (diese nachträgliche Veränderung entspricht den beobachteten Unterschieden von Sp2 innerhalb der Zink-Finger-Domäne). Beim BTD-Protein dagegen ist diese Reihenfolge klar vertauscht. Nimmt man die dargelegte Abstammung des Proteins von einem gemeinsamen Vorläuferprotein von BTD und Sp1 etc. an, erscheint ein Verlust sowohl des ersten Teils (die S/T-reiche Domäne vor der Q-reichen Domäne) als auch eines mittleren Teils (die zweite Q-reiche Domäne hinter der ursprünglich zweiten S/T-reichen Domäne) als sehr unwahrscheinlich.

- Die Aminosäuresequenzen der Glutamin-reichen Regionen des BTD- und der Sp1-homologen Proteine sind hinsichtlich ihrer Verteilung völlig unterschiedlich. Bei den Sp1-Proteinen sind die Glutamin-Reste gleichmäßig über eine größere Region verteilt, so dass nur in wenigen Fällen mehr als 2 Glutamin-Reste unmittelbar hintereinander vorkommen. Insgesamt beträgt der Glutamin-Anteil in einer solchen Domäne etwa 20-25%. Die entsprechende Region des BTD-Proteins dagegen enthält sie in Form von Wiederholungen direkt aufeinander folgender Glutamine (bis zu 22 Reste als Homopolymer). Der Gesamtanteil beträgt 64%.

Ein weiteres Argument dafür, dass eine in dieser Art und Weise aufgebaute Domäne nicht homolog zur Glutamin-reichen Region der Sp1-Proteinfamilie ist, folgt auch daraus, dass diese Glutamin-Homopolymere nicht nur im BTD-Protein gefunden werden können. Eine große Anzahl von Proteinen in der Taufliege enthält solche Bereiche = *opa*-Elemente (Wharton KA. et al.; 1985). In wenigen Fällen werden solche Glutamin-Wiederholungen auch in Vertebratengenen gefunden, aber zumeist sind diese eindeutig nicht homolog zum *opa*-Element.

Beispiele für Homologe in der Taufliege und der Maus, bei denen die Fliegenproteine ein solches *opa*-Element besitzen, während es in dem Mausprotein fehlt, wären u.a. DACHSHUND, ELF, ODD-PAIRED / ZIC, ABDOMINAL-A / HOX...8, ABDOMINAL-B / HOX...9, NOTCH, PROSPERO, DISHEVELLED, DORSAL / REL, MSH / MSX, TAF110, ARAUCAN / IRX, EYES ABSENT / EYA etc.. Aufgrund dieser Argumentation kann man davon ausgehen, dass das BTD-Protein die in den Sp1-Proteinen essentielle Glutamin-reiche Region (Courey AJ. und Tjian R.; 1988) nicht besitzt bzw. die verschiedenen Domänen in den Proteinen unterschiedliche Funktionen besitzen.

Sp1-typische Sequenz

(2. Q-riche Domäne aus Sp4):

NQFQVIQVQNPSGSVQYQVIP
 QLQTVEGQQIQINPTRSSSLQD
 LQGQIQILISAGNNQAILTAANRT
 ASGNILAQNLANQTVPVQIRPGV
 SIPLQLQTLPGTQAQV

BTD-Sequenz:

AQQHQAQQQQAQHQQHA
 QQQQHHLHMQAQHHLHLSH
 QQAQQQHMQHLLTQQQQQQ
 QQQQQQQQQQQQQQQQQ
 PQQQQH

A-reiche BTD-Domäne:
TAAAGALAGSPTSSSPSSAASA
AAAAAAAAAADLGAAA
VAsAAY

Das Vertebraten-
Ortholog zu *btd* ist noch
nicht identifiziert
worden

- Das BTD-Protein besitzt im Gegensatz zu den Sp1-homologen Proteinen eine Alanin-reiche Domäne. Diese Domänen kommen insbesondere in Transkriptionsfaktoren und anderen DNA/RNA-bindenden Proteinen vor, wie z.B. KRÜPPEL, DACHSHUND, HOXA13, HOXD13, POU3F3, SOX3, ZIC2, BRAIN-1, RIBOSOMAL PROTEIN L14, PHOX2B, GSH-2, NKX2.3 etc.. Obwohl diese Domäne nicht sehr groß ist und auch eine "zufällige" Aminosäuresequenz repräsentieren könnte, ist dies auf Grund der biologischen Daten sehr unwahrscheinlich. Es ist bekannt, dass solche Alanin-Homopolymere wichtige Funktionen in der biochemischen Funktion des entsprechenden Proteins besitzen, so dass das Fehlen dieser Domäne in den Sp1-homologen Protein als signifikant betrachtet werden kann (Akarsu AN. et al.; 1996. Goodman FR. et al.; 1997. Licht JD. et al.; 1990). Dieser Argumentation entsprechend sollte ein BTD-Ortholog ebenfalls eine Polyalanindomäne besitzen.

Trotz der zu Beginn dieses Kapitel aufgeführten Argumente für ein Orthologieverhältnis zwischen *Sp4* und *buttonhead* kann eine solche Homologisierung auf Grund der gezeigten Unterschiede zwischen den beiden Genen bzw. den postulierten Proteinen nicht aufrecht erhalten werden. **Damit kann (im Rahmen einer wissenschaftlich begründbaren Vorhersagbarkeit) ausgeschlossen werden, dass das Vertebraten-Ortholog zum buttonhead-Gen der Taufliede *Drosophila melanogaster* bereits gefunden wurde.**

Von der Fliege lernen, heißt nicht nur fliegen lernen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass nicht nur die Flugkünste von *Drosophila* von großem wissenschaftlichen Wert sind. Auch die Bearbeitung der Frage nach der Entwicklung unseres Gehirns profitiert in unschätzbarem Maße vom Studium der Tauflieg. Es wurde gezeigt, dass die meisten Gene, die bei *Drosophila* die Kopf- und ZNS-Entwicklung steuern, auch bei Säugern wie der Maus und dem Menschen eine entscheidende Rolle spielen. Dies gilt insbesondere für die orthologen Gene *otd* und *Otx1/Otx2* sowie *ems* und *Emx1/Emx2*.

Es konnte gezeigt werden, dass die *buttonhead*-Orthologe der Maus und des Menschen bislang nicht identifiziert worden sind. Entsprechend der bisherigen Erfahrungen kann davon ausgegangen werden, dass diese Gene ähnlich zu *Otx1/2* und *Emx1/2* ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Säugetierkopfes und -gehirns spielen werden. Daher sind die Klonierung und Charakterisierung der Mammaliogene von großer wissenschaftlicher Bedeutung.

Da die bisherigen Versuche mit den üblichen Homologie-*screens* hierzu in zahlreichen Laboren dieser Welt zu keinerlei Resultaten geführt haben, (Labore von Peter Gruss, Herbert Jäckle - Max-Planck-Institut für Biophysikalische

Chemie, John Rubenstein - University of California at San Francisco, Alexandra Joyner - Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine; persönliche Mitteilungen) stellt sich die Frage nach den Ursachen und möglichen Strategien. Beide Aspekte lassen sich mit Hilfe der vorherigen Analysen beantworten:

Die Ursache für das Versagen der üblichen Homologie-*screens* ergibt sich unmittelbar aus der diskutierten Verwandtschaftsbeziehung mit der *Sp1*-Familie und den übrigen Sequenzmerkmalen des *btd*-Gens: Wird die Zink-Finger-Box des *btd*-Gens wegen der besonders hohen evolutiven Sequenzkonservierung als Sonde in einem *screen* verwendet, kann dies nur erfolgreich sein, wenn man entweder bei niedriger Stringenz eine sehr große Zahl homologer Gene kloniert und aus deren Gesamtheit versucht das Ortholog zu identifizieren, oder bei hoher Stringenz nach einem Gen sucht, das die selben spezifischen Unterschiede zu den übrigen homologen Genen aufweist, wie *buttonhead* selbst.

Gegen einen Erfolg bei der Suche mit niedriger Stringenz sprechen zwei Gründe:

1. Viele der bekannten Gene dieser Familien sind sehr hoch exprimiert, so dass die relative Häufigkeit des gesuchten Orthologs entsprechend gering ist (wenn man von cDNA-Bibliotheken etc. ausgeht).
2. Die *btd*-Zink-Finger-Box enthält einen HC-link, der auch in der repetitiven Klasse der C₂H₂-Zink-Finger-Gene in stark konservierter Form gefunden wird. Gleichzeitig ist die Box nicht groß genug, um die Teile, die eine unerwünschte Hybridisierung verursachen, entfernen zu können.

Dem entsprechend bewirkt die niedrige Stringenz eine Hybridisierung mit einer so großen Anzahl von ungewollten Sequenzen, dass das Aussortieren der gesuchten Sequenz ähnlich einer "Suche nach der Stecknadel im Heuhafen" jeden vertretbaren Aufwand übersteigt.

Ähnlich problematisch ist der Ansatz der hochstringenten Hybridisierung, wenn auch aus anderen Gründen: Wie zuvor gezeigt werden konnte, sind die "typischen" *btd*-Charakteristika vermutlich erst auf der Linie der Insekten oder der Taufleie entstanden. Trifft dies zu, bedeutet das zwangsläufig, dass die Suche nach einem Gen mit den entsprechenden Unterschieden nicht funktionieren kann. Entweder weist das Maus- und Menschortholog weitgehend die Merkmale der Zink-Finger-Boxen der übrigen *Sp1*-Gene auf, oder es hat eigene Abweichungen entwickelt, die nicht in der Taufleie vorkommen und nicht vorhergesagt werden können.

Auch die Sequenzbereiche außerhalb der Zink-Finger-Box erweisen sich für die Suche nach den Vertebraten-Orthologen als ungeeignet. So kann man aus der Analyse des Drosophila-Gens unmittelbar ableiten, dass die Glutamin-reiche Region mit großer Sicherheit nicht in den entsprechenden Homologen vorkommen wird. Als einziges noch verbleibendes Merkmal bleibt die Serin/Threonin-reiche Domäne des translatierten Proteins. Hier zeigt jedoch ein Vergleich mit anderen Transkriptionsfaktoren, dass Sequenzabschnitte, die Serin/

Threonin- oder Prolin/Serin/Threonin-reiche (PST) Domänen kodieren, oft auch bei nicht homologen Genen vorkommen. Beispiele hierfür sind Oct1 (Mendel DB. et al.; 1991), Osf2 und Cbfa1 (Thirunavukkarasu K. et al.; 1998), MTF-1 (Radtke F. et al.; 1995) oder Pax6 (Mirzayans F. et al.; 1995). Hinzu kommt, dass die S/T-Domänen zwar als solche konserviert sind, aber bereits ein Vergleich von den sehr nah verwandten Sp1- und Sp4-Proteinen zeigt, dass sie hinsichtlich der exakten Sequenz keinerlei Ähnlichkeiten aufweisen (wohl aber die jeweils danach folgenden Glutamin-reichen Domänen) (Vergleich am NCBI mit “blast 2 sequences” der entsprechenden Proteinsequenzen aus der GenBank-Datenbank).

Aus dieser Analyse des Fliegengens und den Vergleichen mit den homologen Genen aus den Vertebraten kann man lernen, dass der übliche Weg des Homologie-*screens* kein geeigneter wissenschaftlicher Ansatz zur Klonierung des *btd*-Orthologs ist.

Die Regulation des Regulators

Ein weiteres Problem neben der Klonierung von Genen, die als Maus-Homologe von *buttonhead* in Frage kommen, ist die Identifizierung des wahrscheinlichen Orthologs. Aus naheliegenden Gründen war kein Wissenschaftler während der Evolution von Vertebraten und Insekten anwesend, um die entscheidenden Schritte zu dokumentieren. Somit gibt es keine objektiven Beweise für jedwede angenommene Homologiebeziehung. Stattdessen muß sich der Wissenschaftler damit begnügen, Belege (was keineswegs Beweise sind!) zu finden, die seine Schlussfolgerungen unterstützen und wahrscheinlicher machen als alle alternativen Erklärungsmöglichkeiten (Prinzip der sparsamsten Erklärungen, oder “*Ockhams Klinge*”). Tatsächlich lässt sich eine postulierte Orthologie für gewöhnlich nur solange belegen, bis ein neues Gen gefunden wird, das die Kriterien für eine solche Homologiebeziehung besser erfüllt als das vorherige.

Für die Homologiesierung von Genen stehen vier Kriterien zur Auswahl:

1. Die Sequenz

2. Homologiekriterium nach Remane: Übereinstimmungen in speziellen Qualitäten ihrer Strukturen.

Der Sequenzvergleich entsprechend der zuvor durchgeführten Analysen zu den Beziehungen von *buttonhead* und *Sp1* ist das direkteste Kriterium. Es gibt unmittelbar Auskunft hinsichtlich Übereinstimmungen und Unterschieden zwischen Genen. Hinzu kommt, dass der Grad der Ähnlichkeit, ausgedrückt in “Prozent übereinstimmender Nukleotide”, ein relativ gutes Maß für die Nähe der Verwandtschaft von Genen ist.

1. Homologiekriterium nach Remane: gleiche Lage in vergleichbarem Gefügesystem.

2. Vergleich von Ziel-Genen und Interaktionspartnern

Die Genprodukte, also die RNAs (wie im Falle von tRNA oder rRNA) oder die Proteine erfüllen spezifische biochemische Funktionen. Im Fall des Transkriptionsfaktors BTM besteht diese in der Regulierung der Aktivität von bestimmten Zielgenen. Obwohl die biochemischen Funktionen sehr

unterschiedliche Konsequenzen für den Organismus haben können, sind die unmittelbaren Interaktionspartner zumeist konserviert. Dies ist die Basis der Eingangs vorgestellten Kaskaden oder Netzwerke, die als gemeinsame Steuerprogramme in der Entwicklung von so unterschiedlichen Organismen wie der Taufleie oder der Hausmaus dienen.

Im Fall des *buttonhead*-Gens bzw. des BTD-Proteins ist der Vergleich von Zielgenen des Transkriptionsfaktors nicht möglich, da diese auch in der Fliege bislang nicht bekannt sind.

3. Vergleich der Expressionsmuster = Regulation des Gens

Da das gegenwärtige Leben prinzipiell in einer ununterbrochenen Kontinuität existiert, gibt es keinen tatsächlichen Anfang (was sich in der berühmten Frage widerspiegelt, was zuerst dagewesen ist: das Huhn, oder das Ei?). Somit gibt es auch immer Faktoren, die die Expression eines Gens bestimmen, selbst wenn das Gen im Sinne einer schematischen Vereinfachung wie in Abb. 1 an den Anfang einer Entwicklungsphase gestellt wird und selbst als Regulator dient. Sogar wenn die Identität dieser Faktoren nicht bekannt ist, kann zumindest das Resultat ihrer Aktivität dokumentiert und verglichen werden: das Expressionsmuster eines Gens hinsichtlich der räumlichen und zeitlichen Verteilung seiner Produkte. Auf dieser Überlegung basieren auch die Vorhersagen für die erwartete Expression von *buttonhead*, wie sie beim Vergleich mit *Spl* etc. gemacht wurden.

4. Vergleich von Zwischenstufen

Ein besonders starkes Argument für die Homologisierung von Genen oder morphologisch-anatomischen Strukturen ist das Vorhandensein von Zwischenstufen oder Übergängen. Dies ist auch der Grund, weshalb die Genomsequenzierung von möglichst vielen verschiedenen Organismen so wichtig für unser wissenschaftliches Verständnis ist. Im Fall von *buttonhead* liegen jedoch bislang keine beschriebenen Gene außerhalb von *Drosophila* vor, so dass dieses Kriterium nicht genutzt werden kann.

3. Homologiekriterium nach Remane:
Übergänge zwischen den untersuchten Zuständen

Nachdem das zweite und vierte Kriterium nicht untersucht werden können, bleibt neben dem Sequenzvergleich nur die Analyse des Expressionsmusters von *btd*.

Die Analyse der *buttonhead*-Expression während der Embryonalentwicklung mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (siehe Wimmer EA. et al.; 1996. Wimmer EA. et al.; 1993) ergibt folgende Daten (siehe Abb. 9):

Die Expression beginnt ringförmig in dem Bereich der späteren maxillaren, mandibularen, interkalaren und antennalen Kopfsegmente, wie in Abb. 2 schematisch dargestellt ist (Abb. 9a). Diese verschwindet im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder (Abb. 9b,c). Während der Zellularisierung des Blastoderms kommt eine Kopf-Expression in der proneuralen Region anterior zur ringförmigen Expression hinzu, die während der Keimbandverkürzung in mehrere kleine Domänen zerfällt und verschiedene Gehirnbereiche markiert (Abb. 9b und folgende). Mit fortschreitender Differenzierung findet man die *btd*-

Transkripte anschließend in den Neuroblasten und dem aus ihnen hervorgehenden Zellen des ZNS/Bauchmark. Etwas später kann ein zweites metameres Hybridisierungssignal etwas weiter lateral nachgewiesen werden, das den proneuralen *Cluster* zugeordnet werden kann, aus denen Teile des peripheren Nervensystem hervorgehen (z.B. pentascolopediales Chordotonalorgan). Zusätzlich wird *buttonhead* in den Imaginalscheiben exprimiert, aus denen die Beine der Fliege hervorgehen werden.

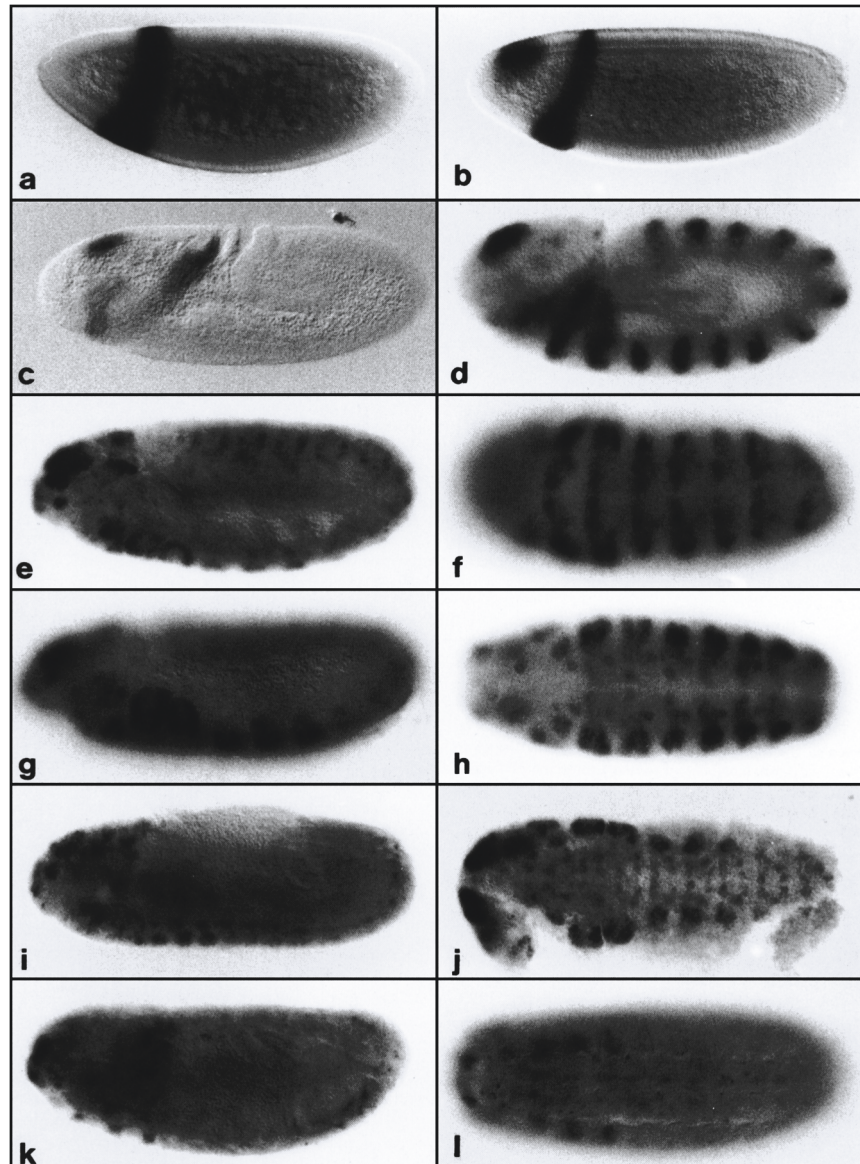


Abb.9: in situ-Hybridisierung von *Drosophila*-Embryonen mit einer *btd*-spezifischen DNA-Sonde (aus: Wimmer EA et al.; 1996) Deutlich zu erkennen ist die frühe ringförmige Expression in der Region der in der Mutante betroffenen Kopfsegmente, die anteriore Kopfexpression, die metamere Expression in ZNS und PNS und in den Beinimaginalscheiben.

Obwohl die Übertragbarkeit der Expressionsdomänen nur bis zu einem gewissen Grad möglich ist, ergibt sich das folgende "ideale Expressionsmuster" eines orthologen Gens in der Maus: das Gen sollte exprimiert sein

1. in der Kopfregeion, aber weiter caudal als die von *Otx1/2* und *Emx1/2*;
2. danach im antero-dorsalen Bereichen des Gehirns (Telencephalon?);
3. im posterioren Teil des ZNS = Rückenmark;
4. in Teilen des peripheren Nervensystems (hier ist eine Vorhersage sehr problematisch, da es z.B. vermutlich kein Homolog zu den Chordotonalorganen in Vertebraten gibt);
5. in den Beinanlagen.
6. Das Expressionsmuster des potentiellen Orthologs sollte keine oder nur wenige andere Regionen des Körpers umfassen.

Zusammenfassung und Aufgabenstellung

In der vorangehenden Studie konnte gezeigt werden, dass Homologievergleiche zwischen der Taufliege und der Maus ein geeignetes Mittel darstellen, um unser Wissen und Verständnis der Entwicklungsbiologie zu erweitern. Insbesondere bei der Frage nach der Entstehung unseres eigenen Gehirns kann diese Methode, in der Fachliteratur auch als "Evo-Devo" bezeichnet, entscheidende Beiträge leisten (Goodman CS. und Coughlin BC.; 2000). Hier ist das *buttonhead*-Gen aus der Taufliege *Drosophila melanogaster* von besonderem Interesse: auf Grund seiner Stellung in den genetischen Kaskaden der Taufliege kann erwartet werden, dass es auch in Vertebraten ein oder mehrere orthologe Gene gibt, und dass diese auch dort einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung des Kopfes und Gehirns besitzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das *buttonhead*-Ortholog in der Maus zu klonieren und charakterisieren. Hierzu wurde ein spezifischer PCR-Ansatz gewählt und die dabei erhaltenen Gene auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten und Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung hinsichtlich ihrer möglichen Homologiebeziehungen zu *btd* eingeordnet. Eines der Gene, im weiteren Verlauf als *Knopfkopf* bezeichnet, zeigte bei dieser Analyse alle notwendigen Merkmale, um als das gesuchte Ortholog zu gelten. Unterstützt wurde diese Einschätzung durch Versuche in der Taufliege (diese Versuche wurden als Kooperation mit der Abteilung von Herbert Jäckle, MPI für Biophysikalische Chemie, durchgeführt). Die funktionelle Analyse erfolgte durch eine gezielte Inaktivierung des Gens mit Hilfe der homologen Rekombination ("Knock Out"-Experiment) und anschließender Untersuchung der Mausmutanten. Zusätzlich wurden theoretische Studien durchgeführt, um die mögliche Beteiligung des murinen Gens bzw. dessen humanem Ortholog an bestehenden Mausmutanten und bei menschlichen Syndromen zu ermitteln.

Methoden

Der folgende Hauptteil der Promotionsschrift umfasst alle Methoden, die im Rahmen der Doktorarbeit eingesetzt wurden. Da ihre überwiegende Mehrzahl inzwischen weltweit standardisiert ist, wurde darauf verzichtet, allgemein gebräuchliche Vorschriften im Detail vorzustellen. Es wird davon ausgegangen, dass der Leser mit den allgemein gebräuchlichen Methoden vertraut ist. Ebenfalls vorausgesetzt wird, dass Standard-Werke wie *Molecular Cloning* von Sambrook, Fritsch, Maniatis bekannt und erhältlich sind. Gleiches gilt für verwendete Arbeitsvorschriften von allgemein bekannten Herstellern wie Qiagen, Pharmacia oder Stratagene. Es ist nicht beabsichtigt, im Rahmen der vorliegenden Promotionsschrift einen Ersatz für generell übliche und erhältliche Methoden-Bücher zu erarbeiten.

Detaillierte Angaben werden im Folgenden nur dort gemacht, wenn von den üblichen Methoden abgewichen wurde bzw. die Erfahrung gemacht wurde, dass bestimmte Schritte nicht variiert werden dürfen. Ein Beispiel für eine solche Arbeitsvorschrift ist die whole-mount *in situ* Hybridisierung, für die zahlreiche verschiedene Protokolle angewendet werden. Diese liefern für die Mehrzahl der Proben identische Resultate. Speziell die eingesetzten Proben von *Sp5* und *btd* (s.u.) reagieren jedoch bereits sehr empfindlich auf kleine Änderungen der Bedingungen, so dass die Methode detailliert beschrieben wurde.

Die detailliert dargestellten Protokolle enthalten zahlreiche Schritte (z.B. DNA-Fällungen etc.), die auch bei anderen Methoden angewandt wurden und dort nicht im Einzelnen beschrieben wurden.

Ebenfalls nicht im Detail aufgeführt sind die Bezugsquellen der Chemikalien, da die allgemeine Qualität der verschiedenen Hersteller inzwischen so hochwertig ist, dass keine praktischen Unterschiede bestehen zwischen z.B. Tris von Merck oder von Sigma. In der Arbeitsgruppe wurde i.d.R. bei Merck, Darmstadt, bestellt. Falls bei anderen Herstellern eingekauft wurde, konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Bei Arbeitsschritten, die vollständig mit einem Kit entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt wurden, werden lediglich die Bezugsquellen der Kits aufgeführt und, wenn nötig, die Arbeitsvorschriften spezifiziert.

Präparation, Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren

Rekombinante Plasmide wurden basierend auf pBluescriptIIKS+ (Stratagene) oder pGEM-T(Promega), in seltenen Fällen mit plcBS (siehe Ergebnisse) als Vektoren hergestellt. Als Standard-System diente pBluescriptIIKS+, pGEM-T(Promega) wurde bei der Klonierung von PCR-Amplifikaten eingesetzt und plcBS diente zur Klonierung von cDNA oder genomischer DNA der Gene *Sp5*, *Sp6* und *Knopfkopf*.

Die Plasmide wurden in *E. coli*, Stamm DH5 α (Gibco BRL® Life Technologies™) präpariert. Lediglich bei der Konstruktion des Knock Out-Konstruktes (siehe Ergebnisse) wurde der Stamm SURE® von Stratagene verwendet.

Es wurden generell Übernacht-Kulturen verwendet, die entweder mit $1/_{100}$ Volumen einer Start-Kultur oder mit einer einzelnen gepickten *E. coli*-Kolonie angeimpft wurden. Bei der Verwendung von TB-Kulturen wurde darauf geachtet, dass die Gesamtzeit der Kultur nicht mehr als 14h dauerte.

Analytische Plasmidpräparationen

Für analytische Zwecke reicht bei der Verwendung von high copy-Plasmiden wie pBluescriptIIKS+ (Stratagene) oder pGEM-T(Promega) i.d.R. eine Kultur von 1-2ml LB-Medium. Diese wurden nach drei alternativen Protokollen hergestellt:

1. Für Schnellpräparationen, die z.B. nur für eine einfache Kontrolle dienen, wurde die Methode nach Chowdhury (1991) eingesetzt.
2. In den meisten Fällen wurden die Plasmide mit dem *QIAprep® Spin Miniprep Kit* von Qiagen (Hilden) hergestellt. Es wurde entsprechend der Herstellerangaben - *Qiaprep® Miniprep Handbook* - gearbeitet.
3. Alternativ wurde die DNA entsprechend der Vorschrift für die alkalische Lyse nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt.

Bei der Präparation von $<10\mu\text{g}$ Plasmid-DNA unter Verwendung des *low copy*-Plasmids plcBS (siehe Ergebnisse) wurden eine 5 ml-Kultur mit TB-Medium (Sambrook J. et al.; zweite Auflage; 1989) angesetzt.

Von den 5ml TB-Kultur wurden 2ml mit dem *QIAprep® Spin Miniprep Kit* von Qiagen (Hilden) präpariert. Dabei wurde die Menge der Puffer P1, P2 und N3 auf 500 bzw. 700 μl verdoppelt und das Lysat sukzessiv auf je eine Säule aufgetragen. Die Säulen wurden je 2 \times mit PB und 1 \times mit PE gewaschen. Im Übrigen wurde entsprechend des *QIAprep® Spin Miniprep Kit*-Protokolls gearbeitet.

Präparative Plasmidpräparation Standard

Standard-DNA-
Präparationen
erfolgten mit Qiagen-
Kits

Bei Bedarf wurden 100 oder 500 µg Plasmid-DNA präpariert. Bei der Verwendung von *high copy*-Plasmiden erfolgte die Präparation mit dem *QIAfilter® Plasmid Midi / Maxi Kit* von Qiagen (Hilden) entsprechend der Angaben im *QIAGEN® Plasmid Purification Handbook (September 2000)*.

Wenn der *low copy*-Plasmid plcBS verwendet wurde, mussten für die Gewinnung von ca. 300–500 µg DNA 1,0l TB-Kulturen verwendet werden. TB wurde entsprechend Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) angesetzt. Die Bakterienkultur wurde 20 min. bei 800 g abzentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Die Bakterien wurden anschließend basierend auf dem Herstellerprotokoll für das *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* mit lysiert, wobei die Mengen der Puffer P1, P2 und P3 von je 10 ml auf 125 ml erhöht wurden.

Das Präzipitat wurde 45 min. bei 9.700 g abzentrifugiert und sukzessiv auf je 2 *QIAGEN-tip 500* aufgetragen. Die Säulen wurden mit je 4× 30 ml QC gewaschen und die DNA nach Herstellerangaben eluiert und gefällt. Nach der Fällung wurde die DNA in 500 µl TE_{pH 8,0} aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Präparative Plasmidpräparation/hochreine Präparation von (*low copy*)-Plasmid-DNA

Bei der Verwendung von *high copy*-Vektoren ist das Mengenverhältnis von der gesuchten Plasmid-DNA zu den übrigen bakteriellen Bestandteilen sehr günstig. Daher liefern die üblichen Aufreinigungen wie das oben beschriebene *QIAfilter® Plasmid Midi / Maxi Kit* von Qiagen eine ausreichende Reinheit der Präparation, um praktisch alle Arbeiten mit der gewonnenen DNA durchführen zu können.

low copy-Plasmid-
Präparationen sind mit
Standard-Methoden
durch bakterielle
Bestandteile
verunreinigt

Bei der Verwendung von plcBS ist die absolute Plasmid-DNA-Menge pro Bakterienzelle auf ca. 2% gegenüber pBluescript IKS+ reduziert. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Verunreinigungen um mindestens einen Faktor 100 höher sind. In der praktischen Beobachtung zeigte es sich, dass die Präparationen oft sogar schlechter sind als erwartet, da die Reinigungskapazität von Säulenmaterial etc. ab einem bestimmten Wert überschritten wird und keinerlei Separation mehr erfolgt. Aus diesem Grund wurde für die Gewinnung von hochreiner DNA eine erweiterte Methode entwickelt, die auch zur zusätzlichen Aufreinigung von *high copy*-Plasmiden verwendet werden kann.

CsCl-Gradienten sind
mit plcBS nicht
anwendbar

Anfänglich wurde versucht, die Plasmid-DNA durch Cäsiumchlorid-Gradienten aufzureinigen (entsprechend Sambrook J. et al.; zweite Auflage; 1989). Es hat sich jedoch gezeigt, dass die relativ große Menge an Verunreinigungen durch Lipopolysacchariden etc. aus den Bakterien die Dichte der Lösung sehr stark

beeinträchtigt. Dadurch verringerte sich die Dichte der Lösung so stark, dass die DNA präzipitierte und nicht isoliert werden konnte.

Als Alternative bzw. Ergänzung zu den weltweit standardisierten Plasmid-DNA-Präparationen wurde eine Methode entwickelt, die auf der Verwendung von CTAB (Hexadecyl-Trimethylammoniumbromid, ursprünglicher Name: Cetyl-Trimethylammoniumbromid) beruht. Ausgangspunkt hierfür war die Überlegung, dass vor allem Polysaccharide und Lipopolysaccharide etc. aus der Zellwand der Bakterien für die Verunreinigungen sorgen. Diese sind mit Anionenaustauschern etc. nicht ausreichend von der DNA zu differenzieren.

Ähnliche Probleme bestehen bei der Isolierung von DNA aus Pflanzenzellen, die ebenfalls eine Zellwand besitzen. Die Zellwände sind zwar in vielen Aspekten unterschiedlich, verursachen jedoch bei der Plasmid-Präparation ähnliche Verunreinigungen. Daher wurden die heute verwendeten CTAB-basierten Aufreinigungsmethoden aus der Botanik mit den in den 60er- und 70er-Jahren entwickelten CTAB-basierenden Protokollen für die Plasmid-Isolierung verknüpft. Das generelle Prinzip der Methode beruht auf vier Schritten:

1. Grob-Reinigung über eine Anionen-Austauscher-Chromatographie (*QIAfilter® Plasmid Midi / Maxi Kit* von Qiagen);
2. Extraktion von Polysacchariden, Lipopolysacchariden usw. mit CTAB unter Hochsalz-Bedingungen (1,4M NaCl);
3. Fällung der Plasmid-DNA mit CTAB unter Niedrigsalz-Bedingungen (0,5M NaCl);
4. Fällung der Plasmid-DNA mit PEG und Alkohol.

Die zugrundeliegenden Veröffentlichungen hierzu sind: Jones AS.; 1963. Lis JT. et al.; 1975. Lis JT.; 1980. Murray MG. et al.; 1980. Doyle JJ. et al.; 1987. Manfioletti G. et al.; 1988. Del Sal G. et al.; 1989. Hempstead PG. et al.; 1990. Murray MG. et al.; 1993. Dellacorte C.; 1994. Shahjahan RM. et al.; 1995.

Für die Gewinnung von ca. 500 µg DNA werden bei *high copy*-Plasmiden wie pBluescriptIIKS+ 100ml LB-Medium eingesetzt. Ihre Kopienzahl pro Bakterium beträgt ca. 300–500 (*QIAGEN® Plasmid Purification Handbook (September 2000)*, Seite 61). Die Kopienzahl von pSC101-abgeleiteten Plasmiden wie plcBS (siehe Ergebnisse) beträgt ca. 5 pro Zelle (*QIAGEN® Plasmid Purification Handbook (September 2000)*, Seite 61). Demnach sollte die 50–100fache Menge eingesetzt werden, also 5–10l LB-Medium. Da in TB-Medium pro Volumen ca. die dreifache Menge Bakterien kultiviert werden kann, wurde für die Präparation 1,0l TB-Medium eingesetzt. Dies entspricht theoretisch ca. 3l LB-Medium. Erfahrungsgemäß konnten aus einer solchen Kultur ca. 300–500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, also etwas mehr als erwartet.

Die Kultur wurde wie folgt angesetzt: Eine einzelne Bakterien-Kolonie wurde mit einer gelben Pipettenspitze gepickt und durch mehrmaliges aufziehen von Medium in 5,0ml TB-Medium übertragen. Die Kultur wurde über Nacht für 14h

hochreine plcBS-DNA
durch CTAB-Extraktion
und -Fällung

Lyse der Bakterien und
Grob-Reinigung der
Plasmid-DNA

bei 37°C in 50ml-Falcon®-Tubes angezogen. Am nächsten Tag wurden 2,0ml der Kultur entnommen und die DNA wie unter “analytische Plasmidpräparationen” beschrieben isoliert. Die restlichen 3,0ml wurden bei 4°C gelagert.

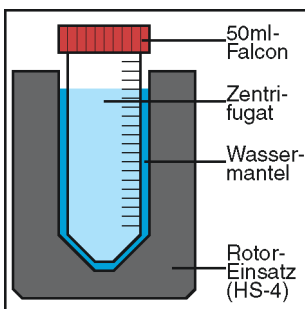
Die Plasmide wurden anschließend getestet, ob sie den erwarteten Aufbau besaßen. Dazu wurde die DNA i.d.R. für 1 h mit entsprechenden Restriktions-Endonukleasen verdaut und das Resultat auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Falls der Test positiv verlief, wurden jeweils 700 µl der gelagerten Kulturen für die Herstellung von 2 Glycerol-Stöcken verwendet. Für die Gewinnung von 300–500 µg Plasmid-DNA wurde mit der restlichen Vorkultur - ca. 1,5 ml - die präparative Kultur aus 1,0l TB-Medium angeimpft und erneut für 14 h bei 37°C inkubiert. Da die Bakterien in TB schneller die stationäre Wachstumsphase erreichen, wurde darauf geachtet, dass die Inkubationszeit nie mehr als 15h betrug, da ansonsten die Menge an lysierten Bakterien erheblich zunahm und die DNA verunreinigte.

1,0 l Hauptkultur

Die 1,0l TB-Kultur wurde am nächsten Tag 20 min. bei 800g abzentrifugiert. Es hat sich gezeigt, dass der Überstand unter diesen Bedingungen nicht klar war, aber keine lebenden Bakterien enthielt. Demnach würde eine Abzentrifugation der verbleibenden Schwebstoffe nicht dazu beitragen, mehr Plasmid-DNA zu gewinnen, sondern nur die Verunreinigungen erhöhen. Der Überstand wurde abgegossen, die Behälter nochmals kurz anzentrifugiert und der restliche Überstand vollständig mit einer Pipette entfernt.

alkalische Lyse

Das sehr große Bakterien-Pellet wurde durch schütteln sowie auf- und abpipettieren in insgesamt 125ml Puffer P1 (Qiagen) gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, dass keinerlei erkennbare Bakterien-Klumpen übrig blieben. Danach wurde mit je 125 ml P2 und P3 entsprechend den Herstellerangaben lysiert und neutralisiert (*QIAGEN® Plasmid Purification Handbook (September 2000)*).



Die Präparation wurde danach in 50 ml-Falcon®-Röhrchen umgefüllt. Diese wurden in den Rotor-Einsatz eines Sorvall® RS-4 gestellt. Um zu verhindern, dass die Falcons® bei höheren Belastungen platzen, wurde in die Bohrungen der Rotor-Einsätze Wasser gefüllt. Die Wassermenge richtete sich dabei nach der Füllung der Röhrchen, da die innere und die äußere Wassersäule weitgehend die gleiche Füllhöhe haben müssen, um einen Gleichgewichtszustand erzeugen zu können. Als “Daumenregel” wurde der äußere Wassermantel in drei Stufen gefüllt: Bei 20ml Zentrifugat wurden 2ml Wasser, bei 30ml Zentrifugat 3ml und bei 40 ml Zentrifugat wurden 4ml Wasser in den Rotor-Einsatz gegeben. Die Zentrifugation erfolgte für 45min mit ca. 9.400 g (7000rpm).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand durch einen schnelllaufenden Faltenfilter (z.B. Faltenfilter MN1640 we^{1/4} oder MN617 we^{1/4} von Macherey-Nagel (Düren)) in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Bei großen genomischen Konstrukten wurde darauf geachtet, dass das Filtrat entlang der Wand in den Kolben läuft und nicht tropft, wodurch zusätzliche Scherkräfte auf die Plasmide vermieden werden.

Das Filtrat wurde anschließend sukzessiv auf je 2 *QIAGEN-tip 500* aufgetragen. Die Säulen wurden mit je 4× 30ml QC gewaschen und die DNA nach Herstellerangaben in 50ml-Falcon®-Röhrchen eluiert. Die Fällung erfolgte entsprechend des Protokolls von Qiagen, allerdings wurde die Zentrifugation wie zuvor beschreiben in den Falcon®-Röhrchen für 60min bei 9.400g durchgeführt. Nach der Fällung wurde die DNA in 900µl TEpH 8,0 aufgenommen.

Erfahrungsgemäß enthielt die DNA-Präparation nach diesem Schritt noch erhebliche Mengen Lipopolysaccharide etc.. Daher wurde im nächsten Schritt der hochmolekulare Anteil abzentrifugiert. Dazu wurden die 900µl in je ein 2ml-Eppi gefüllt (es wurden für diesen Schritt ausschließlich 2ml-Polypropylen-Reaktionsgefäße von Eppendorf verwendet, da preiswertere Produkte von Fremderstellern z.T. nicht den Belastungen gewachsen waren und Risse gebildet haben). Die Lösung wurde dann für 20min. bei 40.000g abzentrifugiert. Dabei bildete sich in den meisten Fällen ein glasiges Pellet, das verworfen wurde. Die Überstände mit der DNA wurde anschließend in einem 15ml-Falcon®-Röhrchen gepoolt und auf 1.890µl mit TEpH8,0 aufgefüllt.

Bei der anschließenden Hochsalz-CTAB-Extraktion wurden nicht-ionische Verunreinigungen, wie z.B. Polysaccharide etc. aus der Lösung entfernt. Die Verunreinigungen werden dabei in dem CTAB-Detergenz gelöst und zusammen mit diesem aus der Lösung extrahiert.

Dazu wird CTAB bis zu einer Endkonzentration von 2,0% zugegeben. Hierzu wird auf eine Endkonzentration von 20mM EDTA, 100mM Tris pH8,0 und 1,40M NaCl eingestellt. Danach wird auf eine Endkonzentration von 2,0% CTAB eingestellt. Die hierzu verwendete wässrige CTAB-Stammlösung ist nur für einige Tage stabil, sollte also nicht längere Zeit gelagert werden.

Bei einer NaCl-Endkonzentration von 1,4M bewirkt dieses Detergenz, dass die nicht-ionischen Verunreinigungen gebunden werden, die DNA jedoch in der wässrigen Lösung verbleibt. Hierzu wird die Lösung 45min. bei 37°C inkubiert. Danach wird das CTAB mit den darin gebundenen Kontaminationen 2× mit 1,0 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) = "CIA" extrahiert (10min. vorsichtig ausschütteln – Trennung der Phasen für 10min bei 2.000g – wässrige Lösung in neues 15ml-Falcon®-Röhrchen).

Nach der CTAB- und CIA-Extraktion wird die DNA mit Isopropanol wie üblich gefällt. Dazu wird $\frac{1}{10}$ Volumen = 450µl 3,0M Natriumacetat (NaAc) zugegeben. Um zu verhindern, dass Reste des CTAB ausfallen, sollte der pH-Wert der NaAc-Lösung jedoch auf 6,0 statt auf 5,2 eingestellt werden. Zu der Lösung werden anschließend 3,8ml = 0,8 Volumen Isopropanol gegeben und die Lösung auf 5 2ml-Eppis verteilt. Die Fällung erfolgt für 30min. bei RT. Die DNA wird für 20min. bei 15.000g und 4°C abzentrifugiert, die Pellets mit kaltem 70%igem EtOH gewaschen, das EtOH abpipettiert, noch vorhandene Alkohol-Reste durch kurzes anzentrifugieren in der Spitze der Eppis gesammelt und ebenfalls abpipettiert. Danach werden die Pellets in je 100µl TEpH8,0 gelöst, gepoolt, die

Reinigung über Anionenaustausch-Chromatographie

Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation

Hochsalz-CTAB-Extraktion

1.890,0µl DNA-Lösung
450,0µl 1,0M Tris (pH8,0)
1.260,0µl 5,0M NaCl
180,0µl 0,5M EDTA (pH8,0)
720,0µl 12,5% CTAB

4.500,0µl Gesamtvolumen

Alkohol-Fällung

fünf Eppis mit 360 μ l TE_{pH8,0} gespült und die insgesamt 860 μ l in einem 2ml Eppi gepoolt.

Niedrigsalz-CTAB-Fällung

860,0 μ l	DNA-Lösung
100,0 μ l	5,0M NaCl
40,0 μ l	12,5% CTAB
<hr/>	
1000,0 μ l	Gesamtvolumen

Bei niedrigen Salzkonzentrationen (<600mM) bildet das CTAB positiv geladene Mizellen, an die die DNA bindet. Damit ist es möglich, selektiv die DNA von allen Verunreinigungen zu trennen, die ungeladen sind. Zusammen mit den beiden vorhergehenden Aufreinigungsstufen wird dadurch ein sehr hoher Reinheitsgrad für Nukleinsäuren erreicht. U.a. werden mit dieser Methode auch alle Endotoxine entfernt, die insbesondere bei späteren Arbeiten mit ES-Zellen stören könnten.

Zu der gepoolten DNA-Lösung aus der vorherigen Extraktion (860 μ l) werden 100 μ l 5,0M NaCl gegeben (Endkon.: 500 μ M) und beides vorsichtig gemischt. Anschließend werden 40 μ l der 12,5%igen CTAB-Lösung (Endkonz.: 0,5%) zugegeben. Dabei fällt die DNA mit dem CTAB nach kurzer Zeit in weißen Flocken aus. Der Ansatz wird 5 min bei 65°C und anschließend 20 min bei 37°C inkubiert. Das Präzipitat wird für 10 min bei 2.000g und RT abzentrifugiert. Bei diesem Arbeitsschritt darf die Zentrifugation nicht bei mehr als 2.000g erfolgen, da das sehr große CTAB-DNA-Pellet ansonsten sehr stark verdichtet wird und praktisch nicht mehr in Lösung gebracht werden kann! Der Überstand wird abpipettiert, Reste kurz nach unten zentrifugiert und ebenfalls sorgfältig mit der Pipette entfernt. Das Pellet darf an dieser Stelle auf keinen Fall getrocknet werden!

Damit die DNA wieder gelöst werden kann, muss das CTAB von der DNA verdrängt werden. Dazu wird auf das feuchte Pellet 2,0 ml einer Lösung aus 70%igem EtOH gegeben, die 0,2M NaAc pH5,2 enthält. Das Pellet wird mit dieser Lösung mindestens für 5–6h, besser o/n inkubiert. Dabei wird das Eppi ganz leicht bewegt. Danach wird das Pellet, das durch die Inkubation kleiner geworden ist, für 5 min. bei 2.000g und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird wie zuvor beschrieben vollständig entfernt, das Pellet wie üblich mit kaltem 70%igem EtOH gewaschen und getrocknet. Die DNA wird in 1,0ml TE_{pH8,0} aufgenommen.

PEG-Fällung

1,00ml	DNA-Lösung
0,30ml	32,5% PEG8000
0,20ml	3,0M NaCl
<hr/>	
1,50ml	Gesamtvolumen

Durch die Lyse der großen Bakterienmenge sind in der Präparation größerer Mengen RNA-Bruchstücke enthalten. Diese werden durch eine PEG-Fällung entfernt, die selektiv nur Nukleinsäuren von mehr als ca. 1 kb Länge präzipitiert.

Zu den 1,0 ml der DNA-Lösung werden 0,30 ml einer 32,5%igen Lösung PEG8000 und 0,20ml einer 3,0M NaCl-Lösung gegeben (Endkonz.: 6,5% PEG und 0,4M NaCl). Die Lösung wird für >6h (i.d.R. o/n) auf Eis inkubiert. Danach wird 10min bei 20.000g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und erneut in 1,0ml TE pH_{8,0} aufgenommen.

Phenolisieren der DNA

Um mögliche Verunreinigungen an DNase und vor allem RNasen zu entfernen, wird die DNA im nächsten Schritt phenolisiert. Außerdem werden dadurch noch vorhandene Reste des CTABs entfernt. Diese könnten insbesondere bei anschließenden Arbeiten mit ES-Zellen stören, da CTAB als Detergenz giftig ist.

Durch die Phenolisierung, Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung werden diese Reste vollständig entfernt.

Die DNA-Lösung wird zuerst mit 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) = PCI vorsichtig für 5 min ausgeschüttelt und die Phasen 5 min in einer Tischzentrifuge (ca. 16.000 g – RT) getrennt. Die wässrige Phase wird 2× mit CIA extrahiert und entsprechend der obigen Angaben mit Isopropanol/NaAc. gefällt.

Abschließend wird die DNA 2–3× in 400 µl TE pH8,0 aufgenommen und mit 2,5 Volumen EtOH – 0,3M NaAc pH5,2 für je ca. 3 h bei RT gefällt, wie oben beschrieben abzentrifugiert und getrocknet. Zuletzt wird die DNA in 500 µl TE pH 8,0 aufgenommen und die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die übliche Ausbeute mit dieser Methode lag bei 300–500 µg DNA.

Die so gewonnene DNA ist hochrein und kann für alle Zwecke inklusive ES-Zell-Arbeiten eingesetzt werden. Sie weist praktisch keine Verunreinigungen durch Endotoxine oder RNasen, RNA-Bruchstücke oder ähnlichem auf.

EtOH-Fällung der DNA

Präparation von λ-DNA

Die Identifizierung von Phagen und die Isolation von Phagen-DNA wurden im Wesentlichen nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt. Da sich im Laufe der Arbeit zeigte, dass die Phagen sehr stark zu Rekombinationen etc. neigten, wurde das ursprüngliche Protokoll variiert. Im Folgenden ist das variierte Protokoll dargestellt (allgemein gebräuchliche Arbeitsschritte werden nicht detailliert aufgeführt).

Die verwendeten λ-Banken wurden von Prof. Dr. Bridgit Hogan (cDNA in λgt11, ganzer Embryo, E8,5) bzw. Prof. Dr. Günther Schütz (genomische 129SV-Maus-DNA, Sau3A-Partialverdau in λ-DASHII von Stratagene) zur Verfügung gestellt. Für λgt11 wurde von Beginn an mit E.coli C600 gearbeitet. Nach Vergleichstests mit E.coli Le392 und einigen anderen Stämmen wurde auch für λ-DASHII mit C600 gearbeitet.

E.coli C600 (Appleyard RK.; 1954) wurden auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden 100ml LB-Medium–0,2% Maltose mit einer Kolonie angeimpft und o/n kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 15 min bei 800 g abzentrifugiert und das Medium vollständig entfernt. Die Bakterien wurden in 50 ml 10 mM MgSO₄ aufgenommen und entweder sofort für die Gewinnung von λ-Phagen bzw. -DNA eingesetzt oder bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert.

Präparation von E.coli C600

Die Bakterien wurden für 15 min bei RT mit den Phagen präinkubiert und danach mit geschmolzenem Top-Agar (50°C) gemischt und auf vorgewärmte und trockene Agar-Platten gegossen. Am nächsten Tag wurden die Platten mit den

Infektion der Bakterien mit den Phagen

Plaques für ca. 1 h auf 4°C gekühlt und Filter gezogen. Falls Filter von Bibliotheken oder einer ersten Verifizierung hergestellt wurden, wurden jeweils zwei Filter von einer Platte hergestellt. Die Filter wurden für einige Minuten bei RT getrocknet und anschließend denaturiert, neutralisiert und in 2×SSC äquilibriert.

Probenherstellung

Die Proben wurden mit dem *Megaprime DNA labelling system RPN.1605* von Amersham / jetzt Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire UK hergestellt und mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* von Qiagen, Hilden, aufbereitet. Vor der Hybridisierung mit den Filtern wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und danach zu den Filtern gegeben.

Hybridisierung

Die Filter mit der Phagen-DNA wurden mindestens eine Stunde bei 65°C in einer Lösung aus 7% SDS und 0,5 M Phosphat-Puffer (Church GM. et al.; 1984) prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte Probe zugegeben und bei 65°C o/n hybridisiert.

Waschen und Exposition der Filter

Am nächsten Tag wurden die Filter mit SSC/SDS gewaschen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden ausschließlich stringente Waschbedingungen angewandt: 2× für 20 min. mit 2×SSC/0,5%SDS – 2× für 15 min. mit 0,5×SSC/0,5%SDS – 2× für 10 min. mit 0,1×SSC/0,1%SDS bei 65°C. Die gewaschenen Filter wurden anschließend bei RT getrocknet.

Zur Identifizierung der markierten Phagen wurde ein Röntgenfilm mit den getrockneten Filtern exponiert. Die Exposition dauerte je nach Stärke des Signals zwischen 20 min und 2 Wochen.

Elution der Phagen

Die positiven Plaques wurden durch Superposition mit den Filmen lokalisiert und ausgestochen. Die Phagen wurden o/n in 500 µl SM-Puffer / 20 µl Chloroform freigesetzt. Die Phagen-Suspension wurde entweder für eine Vereinzlung oder für die Herstellung einer Hoch-Titer-Suspension erneut ausplattiert.

Rescreening und Vereinzlung

Für eine Vereinzlung der Phagen wurde bei den bearbeiteten Genen darauf geachtet, dass sie bereits nach einem, höchstens zwei Ansätzen abgeschlossen werden konnte. Durch die sehr starke Neigung zur Rekombination führte eine längere Kultur der Phagen dazu, dass die enthaltene cDNA oder genomische DNA entweder verloren wurde oder stark rekombinierte. Um die Vereinzlung so schnell wie möglich zu erreichen, wurde zuerst der Titer bestimmt und dann 100–500 Phagen auf 15 cm-Platten ausplattiert. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass zumindest bei der ersten Kontroll-Plattierung >2.000 Phagen getestet wurden, da die Phagen mit den Inserts stark unterdurchschnittlich effizient propagierten und leicht gegenüber Phagen mit anderen Inserts verloren wurden.

Präparation von Phagen-DNA

Für die Präparation der Phagen-DNA aus den vereinzten Plaques wurden "high titer stocks" hergestellt. Hierzu wurden fünf 9 cm-Platten verwendet, auf die unterschiedliche Mengen der Phagen-Suspension gegeben wurden. Von diesen Platten wurde diejenige weiter verarbeitet, bei der spätestens nach 14 Std. mehr als ca. 98% der Bakterien lysiert waren (bei 95% funktionierte die anschließende Herstellung eines Flüssiglysates oft nicht mehr).

Die Platte, bei der >98% Lyse mit der geringsten Phagen-Menge erzielt wurden, wurde mit 5 ml SM o/n eluiert, wobei am nächsten Morgen noch 2-3 ml übrig waren. Um zu verhindern, dass die Bakterien o/n in der SM-Lösung wuchsen, wurden einigen Tropfen Chloroform zugegeben. 2 ml dieses "high titer stocks" wurden in einem 2 ml-Eppi mit etwas Chloroform gelagert. Der Rest der Suspension wurde verworfen (das Eluat darf auf keinen Fall durch Nachspülen etc. verdünnt werden).

Die Phagen-DNA wurde anschließend aus Flüssiglysaten gewonnen (pro einzeltem Plaque wurden mindestens 2 oder 3 Präparationen hergestellt). Hierzu wurden die oben beschriebenen E.coli C600 verwendet. Zuerst wurden 0,7 ml C600 mit 1,0 µl des *high titer stocks* versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Phagen-Bakterien-Suspension zu 20 ml LB-Medium gegeben, die mit 15 mM MgSO₄ angereichert wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C.

Die Lyse der Bakterien erfolgt i.d.R. nach ca. 10h. Wenn die Suspension außer den Zellresten der Bakterien völlig klar war, wurden 200 µl Chloroform zugegeben und nochmals 20 min bei 37°C inkubiert. Sollte die Lyse nach 16h nicht weitgehend abgeschlossen sein, wurde der Ansatz wiederholt, wobei 0,7 ml, 0,6 ml und 0,5 ml der C600-Suspension eingesetzt wurden. Die weitgehend klare Suspension wurde 10 min. bei 3.000 g abzentrifugiert und die ca. 19,0 ml Überstand für die Isolierung der DNA verwendet.

Die Phagen-DNA wurde nach einem Protokoll des *EMBL lab books* hergestellt. 18,9 ml der Phagen-Suspension wurden mit 350 µg DNase I und 700 µg RNase A für 1h bei RT inkubiert. Danach wurden 2,10 ml 1,0 M Tris-HCl pH 8,6 / 3,0 M NaCl / 0,5 M EDTA zugegeben, wodurch die Phagen-DNA freigesetzt wurde. Zu den 21,0 µl wurden 21,0 µg Proteinase K gegeben und 30 min. bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde 1× mit PCI phenolisiert und 1× mit CIA extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit 0,8 Volumen Isopropanol / 0,3 M Natriumacetat gefällt und wie in "Präparative Plasmidpräparation / hochreine Präparation von (*low copy*)-Plasmid-DNA" beschrieben für 45 min. bei 9.400 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 500 µl TE pH 8,0 aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde abschließend spektrophotometrisch bestimmt.

Degenerative PCR zur Isolierung eines *buttonhead*-Orthologs

Die degenerative PCR zur Isolierung eines *buttonhead*-Orthologs erfolgte wie in Treichel D. et al. (2001) beschrieben. Die verwendeten Primer-Paare waren: "btd3" = CACATCTGCCAYATYCCIGGITRYGARMG (5'-3'; *buttonhead*-spezifisch = entspricht der Aminosäuresequenz HICHIPGCE^{8/5} des ersten BTZ-Zink-Fingers) und "839" = CGCCAGGTGATCRCTICKCATRAAIC (3'-5';

Sp1-spezifisch = entspricht der Aminosäuresequenz RFM^R/₅SDH-”BamHI” des dritten Sp1-Zink-Fingers).

Als Template diente genomische DNA, die, wie unter “Präparation von genomischer Maus-DNA für die Genotypisierung” beschrieben, aus Maus-Leber isoliert wurde. Die PCR erfolgte bei 47°C mit 40 Zyklen.

Die so erzeugte 230 bp-Bande wurde in einem Southern Blot mit einer *Drosophila buttonhead*-Probe (Zink-Finger-Box) hybridisiert. Anschließend wurde bis zu einer Stringenz von 0,5×SSC/0,5%SDS bei 60°C gewaschen. Die Bande wurde aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in *pGEM*[®]-T kloniert.

Insgesamt wurden 50 Kolonien gepickt und Kulturen angesetzt. Die DNA wurde entsprechend den Angaben in “Analytische Plasmidpräparationen” isoliert. Die Sequenz der DNA der verschiedenen Klone wurde nach Sanger F. et al. (1977) mit dem ³²P-*Sequencing*[™] Kit von Pharmacia Biotech, jetzt Amersham Pharmacia Biotech, ermittelt.

Die Klone wurden mit dem GCG-Software-Paket untereinander und mit der EMBL-Sequenz-Datenbank verglichen.

Southern-Blot-Analyse

Southern-Blot-Analysen von DNA wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt. Einziger Unterschied ist, dass die Proben in einer Lösung aus 7% SDS und 0,5 M Phosphat-Puffer (Church GM. et al.; 1984) hybridisiert wurden. Die Proben wurden mit dem *Megaprime DNA labelling system RPN.1605* von Amersham / jetzt Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire UK hergestellt und mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* von Qiagen, Hilden, aufbereitet. Vor der Hybridisierung mit den Filtern wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und danach zu den Filtern gegeben.

Nach der Hybridisierung wurde je nach Stringenz-Anforderungen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines SSC / SDS-Puffers gewaschen. Für hochstringente Bedingungen wurde 2× für 20 min. mit 2×SSC/0,5% SDS – 2× für 15 min. mit 0,5×SSC/0,5% SDS – 2× für 10 min. mit 0,1×SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die gewaschenen Filter wurden getrocknet und je nach Signalstärke auf Röntgenfilm exponiert. Alternativ dazu erfolgte die Auswertung mit dem *Instant Imager* von Packart.

Präparation von genomischer Maus-DNA für die Genotypisierung

Die genomische DNA für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde entweder nach dem Standard-Protokoll des Jackson Laboratory (http://www.jax.org/resources/documents/imr/protocols/tail_DNA_PCR_Phenol.html) hergestellt oder mit dem *DNeasy® 96 Tissue Kit* von Qiagen (Hilden). Falls das Qiagen-Kit eingesetzt wurde, musste die DNA anschließend phenolisiert werden, damit sie mit SpeI geschnitten werden konnte (s.u.).

Die DNA-Konzentration wurde anschließend spektrophotometrisch bestimmt. Für die Genotypisierung per Southern-Blot wurden 10 µg DNA eingesetzt. Für die Genotypisierung per PCR wurden 5 ng DNA eingesetzt.

Genotypisierung per Southern-Blot

Die Genotypisierung der Tiere wurde im Wesentlichen nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) bzw. Hogan B. et al. (1994) durchgeführt.

Für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden 10 µg genomische DNA mit SpeI verdaut. Die DNA konnte nicht vollständig verdaut werden, wenn sie nicht zuvor phenolisiert wurde. Zusätzlich mussten 50U des Restriktionsenzyms eingesetzt werden. Der Verdau erfolgte o/n bei 37°C. Die verdaute DNA wurde auf einem 0,6%igen Agarose-Gel aufgetrennt und auf positiv geladene Nylon-Membranen übertragen. Dieser Southern Blot wurde wie unter "Southern-Blot-Analyse" beschrieben analysiert.

Als Probe wurde die in Abbildung 44 gezeigte 5'-externe Probe verwendet. Lediglich für die ursprüngliche Analyse der ES-Zellen wurde zusätzlich mit EcoRV verdaut und als Probe die 3'-externe Probe eingesetzt, bzw. mit SpeI verdaut und das Neomycin-Resistenz-Gen als Probe eingesetzt.

Insgesamt 78 adulte Tiere und 57 Embryonen wurden per Southern Blot analysiert. Die so gewonnenen Daten dienen als Kontrolle für die Erarbeitung eines zuverlässigen PCR-Protokolls.

Genotypisierung per PCR

Auf Basis der Genotypisierungen per Southern Blot wurde ein PCR-Protokoll erarbeitet, das eine zuverlässige Unterscheidung von wildtypischen, heterozygoten und homozygoten (bezogen auf das *Knk*-Gen) erlaubte. Es hat sich bei den Versuchen gezeigt, dass das Protokoll sehr empfindlich auf drei Parameter reagiert, die daher nicht ohne zusätzliche Kontrollen geändert werden sollten:

1. Die Menge der genomischen DNA sollte 5 ng (± 1 ng) pro Reaktion betragen.
2. Als Taq-DNA-Polymerase sollte die *HotStarTaq*[®] von Qiagen, Hilden, entsprechend den Herstellerangaben im *HotStarTaq*[®] PCR Handbook benutzt werden.
3. Die Primer-Menge sollte entsprechend den folgenden Angaben eingesetzt werden:

Set 1			Set 2		
Primer	Sequenz	Konz.	Primer	Sequenz	Konz.
Bxcf10	CGG-TGT-GCA-ACA-AAC-GCT-TC	0,28 μ M	Bxcf9	TCG-TGT-GCA-ATT-GGC-TGT-TC	0,25 μ M
Neof1	CCA-AGC-GAA-ACA-TCG-CAT-CG	0,19 μ M	Bxcr12	AAG-CCA-CTG-TTC-TAC-CAG-AC	0,25 μ M
Bxcr10	GAA-GTT-GGG-GGA-AAG-AAC-G	0,37 μ M	Neof1	CCA-AGC-GAA-ACA-TCG-CAT-CG	0,25 μ M
			Bxcr12	AAG-CCA-CTG-TTC-TAC-CAG-AC	0,25 μ M

Tabelle 1: Primer für die Genotypisierung der Knk-Mutanten. Verwendete Primer für die Genotypisierung der Knopfkopf-Mäuse. Das Set 1 wurde in einem Ansatz durchgeführt, das Set 2 in 2 Ansätzen: a) Bxcf9 & Bxcr12. b) Neof1 & Bxcr12.

Es wurden jeweils mehrere Tiere gleichzeitig genotypisiert, so dass mit größeren Master-Mixen gearbeitet wurde. Die Einzel-Ansätze für die PCR lauten wie folgt:

PCR1

5,0000 μ l DNA à 1 ng/ μ l
 16,9191 μ l H₂O^M
 0,0703 μ l Bxcf10 à 100 pmol/ μ l
 0,0469 μ l Neof1 à 100 pmol/ μ l
 0,0938 μ l Bxcr10 à 100 pmol/ μ l
 2,5000 μ l 10 \times PCR-Puffer
 0,2500 μ l 20 mM/dNTP
0,1200 μ l Taq-DNA-Polymerase (HotStarTaq[®]) à 5 U/ μ l
 25,0000 μ l Gesamtvolumen

PCR2

5,0000 μ l DNA à 1 ng/ μ l
 17,0050 μ l H₂O^M
 0,0625 μ l Bxcf9 oder Neof1 à 100 pmol/ μ l
 0,0625 μ l Bxcr12 à 100 pmol/ μ l
 2,5000 μ l 10 \times PCR-Puffer
 0,2500 μ l 20 mM/dNTP
0,1200 μ l Taq-DNA-Polymerase (HotStarTaq[®]) à 5 U/ μ l
 25,0000 μ l Gesamtvolumen

Das PCR-Programm lautet:

15 min 95°C

1 min 94°C - 1 min 64°C - 1 min 72°C / 35 Zyklen

5 min 72°C

Die beiden Ansätze der PCR2 wurden nach dem Ende der Reaktion gemischt und zusammen geladen. Es wurde jeweils ein 1,5%iges Agarose-Gel verwendet. Die Genotypisierung hat bei über 300 analysierten erwachsenen Tieren sowie ca. 200 Embryonen keinen erkennbaren Fehler verursacht.

Plasmid-Verdau mit Restriktions- Endonukleasen

Restriktionsverdau von DNA wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt. Es wurde bei allen Verdau-Ansätzen BSA (New England Biolabs) nach Herstellerangaben zugesetzt. Der Verdau erfolgte je nach Enzym bei den Herstellerangaben entsprechenden Inkubationstemperaturen. Die Inkubationszeit betrug i.d.R. 2h.

Partieller Restriktionsverdau

Partielle Restriktionsverdau von DNA wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Dephosphorylierungen von DNA wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt.

Erzeugung von glatten DNA-Enden

Die Erzeugung von glatten DNA-Enden (*blunting*) wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt. Je nach Überhang wurde mit dem Klenow-Fragment oder T4-DNA-Polymerase gearbeitet.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Evaluation von Restriktionsverdau oder Plasmidpräparationen etc. erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die Methode ist in Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) detailliert beschrieben.

Die Agarose-Konzentration wurde je nach Bedarf an die Länge der zu trennenden DNA-Fragmente angepasst. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von >15 kb wurde ein 0,3%iges Gel verwendet, das auf ein dünnes 1%iges Unterstützungsgel gegossen wurde. Bei Fragmenten zwischen 40 und 70 bp wurde ein 3%iges Gel gegossen. Hierzu wurden 3,0g Agarose in einen ausgewogenen Erlenmeyerkolben gegeben und 100ml 0,5×TBE. Anschließend wurde zusätzlich ca. 20ml H₂O^M zugegeben. Die Agarose wurde aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Danach wurde der Kolben ausgewogen. Durch die notwendige lange Kochzeit sind über 20ml Wasser verdampft. Die fehlende Menge Wasser auf insgesamt 100g wurde mit angewärmten H₂O^M aufgefüllt.

Die Agarose-Lösung wurde mit Ethidiumbromid nach Literaturangabe versetzt, unter leichtem Schwenken bis auf ca. 50°C abgekühlt und bei RT gegossen und ausgehärtet. Die Proben wurden mit Probenpuffer gemischt und geladen. Falls die DNA sehr weit in das Gel laufen musste, um eine optimale Auflösung zu erzielen, wurde in die Kathoden-Kammer eine äquimolare Menge Ethidiumbromid zugesetzt. Die aufgetrennte DNA wurde auf einem Standard-UV-Tisch ausgewertet und mit einem elektronischen Geldokumentations-System (*GelPrint2000i*) fotografiert.

Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die Präparation von DNA-Fragmenten für die anschließende Ligation etc. wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) mittel Elektroelution durchgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte anstatt mit 0,5×TBE mit 1×TAE. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden je nach Größe der Bande mit 0,5–3,0ml

1× TAE eluiert, der Dialyse-Schlauch zusätzlich mit 0,3–1,0 ml H₂O^M gespült und die Lösungen gepoolt. Falls das Volumen größer als ca. 0,8 ml war, wurde zuerst mit 2-Butanol (Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989)) auf ca. 0,8 ml eingengt. Danach wurde 1× mit PCI phenolisiert und 1× mit CIA extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit Isopropanol und NaAc gefällt (Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989)).

Ligation

Ligationen von DNA wurden nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) durchgeführt.

Präparation von kompetenten E. coli

Elektrokompetente DH5α wurden nach Ausubel FM. et al. (1987-2001) hergestellt. Die Herstellung chemisch-kompetenter DH5α erfolgte nach dem Protokoll 7 – *FSB-Based Frozen Storage of Competent Cells* – von Hanahan D. et al. (1970).

Transformation von E. coli-Bakterien

Die Elektrottransformation erfolgte mit einem Gene Pulser[®] von BioRad entsprechend der Herstellervorgaben. Die chemische Transformation erfolgte nach Hanahan D. et al. (1970). Zusätzlich wurden die allgemeinen Vorschriften nach Sambrook J. et al. (zweite Auflage 1989) eingehalten.

Herstellung von Glycerol-Stämmen

Transformierte Bakterien, die für eine weitere Verwendung langfristig gelagert werden sollten, wurden als Glycerol-Stämme aufbewahrt. Dazu wurden 700 μl einer entsprechenden frischen Bakterien-o/n-Kultur mit 300 μl sterilem 80%igem Glycerol gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C eingefroren.

Herstellung von transgenen Mäusen

Die transgenen Mäuse (Knock Out-Mäuse) wurden von Sabine Geisendorf und Silke Schlott hergestellt. Die Methode ist im Detail in Capecchi MR. (1989) und Mansouri A. (1998) beschrieben.

X-Gal-Färbung von transgenen Mäusen

Die X-Gal-Färbung wurde nach Allen ND. et al. (1988) und Mansouri et al. (2001) durchgeführt.

Skelett-Präparation

Die Skelett-Präparationen wurden entsprechend den Angaben aus Kessel et al. (1991) durchgeführt.

***in situ*-Hybridisierung und Paraffin-Schnitten**

Die Markierung der Proben mit ^{35}S erfolgte mit dem *Megaprime DNA labelling system RPN.1605* von Amersham / jetzt Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire UK. Die Proben wurden mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* von Qiagen, Hilden, aufbereitet.

Die Embryonen wurden über Dekalin in Paraffin eingebettet (Böck P.; 1989) und 8 μm -Schnitte hergestellt. Die *in situ*-Hybridisierung wurde entsprechend Stoykova A. et al. (1994 und 2000) durchgeführt.

whole-mount *in situ* Hybridisierung (*in situ* Hybridisierung von Ganzpräparaten) von Mausembryonen/ WMISH

Das Protokoll basiert auf den Vorgaben von D.G. Wilkinson (“In situ hybridisation; a practical approach”) und seinen Variationen dieses Protokolls (persönliche Mitteilung) sowie den WMISH-Protokollen aus dem Labor von T. Pieler (Biochemie; Göttingen / persönliche Mitteilung), C. Leimeister (Ausarbeitung des Protokolls als Mitarbeiterin der GSF in Neuherberg) und dem abteilungsinternen Protokoll.

Ursprung des Protokolls

Präparation der Embryonen

Üblicherweise handelt es sich um Embryonen des Mausstammes NMRI, in einigen Fällen um 129SV- oder C57BL/6-Tiere. Die Mausstämme unterscheiden sich insofern, als dass die ausgekreuzten NMRI-Embryonen nach gleicher Tragzeit etwas weiter entwickelt sind als die ingezüchteten 129SV- oder C57BL/6-Mäuse. Die Altersbestimmung erfolgt daher zusätzlich auch anhand von objektiven morphologischen Kriterien wie der Somitenzahl (“Theiler stages”; Einteilung nach Kaufmann).

Mausstämme und Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Embryonen

Die trächtigen Weibchen werden entweder durch zervikale Dislokation oder durch Begasen mit CO₂ getötet. Beim Begasen mit CO₂ wird darauf geachtet, dass die Tiere direkt in eine reine CO₂-Atmosphäre gelangen, so dass der CO₂-Reflex ausgelöst wird, die Tiere also nicht qualvoll ersticken, sondern innerhalb von Sekunden einem vollständigen und tödlichen Kreislaufzusammenbruch erliegen. Anschließend erfolgt eine Inzision der Bauchwand unmittelbar kranial der Vulva. Dieser Schnitt wird an beiden Seiten bis zu den distalen Enden der letzten asternalen Rippen weiter geführt. Der Uterus mit den darin enthaltenen Embryonen werden entnommen und die Embryonen entsprechend der Beschreibungen in B. Hogan (“Manipulating the Mouse Embryo”) in PBS präpariert.

Töten der Tiere: CO₂-Reflex

Im Unterschied zum angegebenen Protokoll von B. Hogan werden nur Embryonen bis E9,0 - E9,5 in kaltem PBS präpariert. Ab E9,5 - E10,0 werden sie in PBS bei RT oder 37°C präpariert, da unter diesen Bedingungen das Herz weiter schlägt und über die durchtrennte Nabelschnur ein mehr oder weniger großer Teil des Blutes aus dem Körper heraus gepumpt und durch PBS ersetzt wird (Prinzip der Perfusion). Bei keinem dieser Schritte wird steril oder RNase-frei (DEPC-behandelte Lsg.) gearbeitet, da die Präparation nicht steril ist und das mütterliche sowie embryonale Gewebe selbst RNasen in großen Mengen enthalten. Diese stören solange nicht, bis die Zellen beginnen abzusterben, was entsprechend des Protokolls aber erst in der Formamid-haltigen Lösung passieren

Ausbluten älterer Embryonen (ab ca. E10.0) und Fixierung

sollte, in der ohnehin alle RNasen durch die Fixierung inaktiviert werden. Sobald das Herz aufhört zu schlagen, werden die Embryonen in kaltes PBS bzw. gleich in eisgekühltes PBS/FAI überführt. Besonders bei älteren Tieren wird dadurch die unspezifische Hintergrundfärbung im Herzen reduziert. Die Fixierung erfolgt bei 4°C o/n, bei jüngeren Embryonen z.T. auch kürzer (E6,0 - E7,5 \geq 2h / E8,0 - E9,0 \geq 5h / E9,5 \geq 10h). Dabei wird eine 20- bis 50-fache Menge an kaltem PBS/FAI relativ zum Gesamtvolumen der zu fixierenden Embryonen eingesetzt und ein entsprechend großes Gefäß gewählt. I.d.R. handelt es sich bis E8.0 um ein 2ml-Eppi oder 4ml fassendes *Probenglas N13-4G* mit Silikonverschluss (Bestellnummer 702962 bei *Schütt Labortechnik*, Göttingen), bis E9.5 um ein 15 ml-Falcon®-Zentrifugenrohr und ab E 10.0 um ein 50 ml-Falcon®-Zentrifugenrohr. Für das Übertragen der Embryonen wird entweder ein kleiner Metalllöffel verwendet oder eine silikonisierte Pasteurpipette aus PE (z.B. von *Brand*) bzw. silikonisierte, abgeschnittene blaue *Gilson*-Pipettenspitzen. Die Pipettenspitzen werden nach den Vorgaben aus *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition* von *Sambrook, Fritsch* und *Maniatis* silikonisiert. Die Fixierung und alle weiteren Schritte bis zur Prähybridisierung werden auf einem Wippschüttler mit 20-30 Zyklen / min durchgeführt.

Genotypisierung von Embryonen

Für den Fall, dass es sich um Embryonen handelt, die genotypisiert werden müssen, werden die Embryonen und die sie umgebenden extraembryonalen Membranen gründlich in PBS gewaschen, um das anhaftende mütterliche Blut zu entfernen, was zumindest im Falle einer PCR als Nachweismethode zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen kann. Anschließend werden die extraembryonalen Membranen vom Embryo entfernt und gesondert zur weiteren Aufarbeitung in nummerierten 1,5ml-Eppis aufgehoben. Embryonen bis E8.5 werden ebenfalls in 1,5ml-Eppis gegeben und dort weiter bearbeitet, ältere je nach Größe in nummerierte Flachbodenplatten mit 48, 24, 12 oder 6 Vertiefungen gegeben. Bei der Verwendung von Platten mit 24 oder 6 Vertiefungen werden meistens Netzeinsätze verwendet, die einen Austausch der Lösungen in allen weiteren Schritten durch einfaches Umsetzen der Embryonen erlauben. Bei den 6er-Platten können die Einsätze von *Becton Dickinson (Falcon® Cell Strainer, 70µm Nylon)* verwendet werden, für 24er-Platten werden diese selbst gefertigt (hierzu wird die Spitze eines 1,5ml-Eppis abgeschnitten, die Schnittkante auf einer heißen Metallplatte angeschmolzen und auf ein 70µm Nylonnetz geklebt). Die Netze können nicht verwendet werden, wenn prominente ektodermale Strukturen wie die apikale Ektodermleiste der Beinanlagen untersucht werden sollen, da diese oft auf den Netzen abgerieben werden.

Aufbereitung bis zur Hybridisierung (1. Tag)

Entwässern der Embryonen in MeOH

Die Embryonen werden über eine aufsteigende MeOH-Reihe entwässert. Zuvor wird das FAI durch dreimaliges Waschen für je 10 min in eisgekühltem PBST^{DEPC} ausgewaschen. Anschließend werden sie für je 5 min (bis E10,5), 10 min (bis E12,5), 30 min (bis E14,5), bzw. 60 min (E15.5) in eisgekühltes 25%iges, 50%iges, 75%iges MeOH/H₂O^{M-DEPC} und reines MeOH überführt. Eine

vollständige Entwässerung wird durch dreimaliges Inkubieren in reinem MeOH bei RT erreicht. Die Zeiten für die Inkubationen werden exakt wie bei den Überführungsschritten entsprechend des Alters der Embryonen angepasst. Eine nicht vollständige Entwässerung führt besonders bei älteren Embryonen zu einer schlechten Penetration des Gewebes durch die Probe und Färbesubstanzen, sowie zu mehr oder weniger stark ausgeprägter unspezifischer Hintergrundfärbung auf Grund von nicht komplett ausgewaschenen Proben- und/oder Antikörperresten. Ursächlich hierfür ist vermutlich nicht der Verbleib von Restwasser im Gewebe, sondern vielmehr eine nicht vollständige Entfernung der Plasmamembranen durch das MeOH, deren Reste das Gewebe schlecht penetrierbar machen. Daher sollte man bei der Behandlung der Embryonen mit MeOH genau genommen nicht von einer Entwässerung sprechen, sondern vielmehr von einer Entfernung der Lipidanteile des Gewebes (Zellmembranen, Endoplasmatisches Retikulum, Kernmembran etc.). Die aus diesem Grund in einigen Protokollen vorgeschlagene Verwendung von EtOH oder Isopropanol anstatt des MeOH (beide sind formal betrachtet geeigneter, da lipophiler) hat sich bei Parallelexperimenten als nicht vorteilhaft erwiesen. Zum einen dauert die Prozedur um einiges länger, da die Eindringgeschwindigkeit gegenüber MeOH deutlich geringer ist. Außerdem entfernt MeOH die Membranen deutlich besser, obwohl es weniger lipophil ist, da das Molekül auf Grund seines kleineren Radius besser in die Lipiddoppelschicht eindringen und auflösen kann. Falls es dennoch gewünscht ist, können beide Alternativen eingesetzt werden, vorausgesetzt, dass die Einwirkzeiten verdoppelt (EtOH) bzw. vervierfacht (Isopropanol) werden.

In reinem MeOH können die Embryonen für längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Dabei nimmt der Hintergrund bei der späteren Färbung zwar etwas zu, weshalb die Lagerung der Embryonen i.d.R. in Prähybridisierungslösung erfolgt, aber der Unterschied ist minimal. Es wurden Embryonen bis 9 Monate in MeOH gelagert, ohne dass der Hintergrund störend das Ergebnis beeinflusst hat. Dennoch empfiehlt sich eine Lagerung in Prähybridisierungslösung, da weniger unspezifische Hintergrundfärbung auftritt. Außerdem verdunstet das MeOH auch bei -20°C leichter, was zur Austrocknung der Embryonen führen kann, falls der Lagerungsbehälter nicht dicht schließt.

Nach der Entwässerung werden die Embryonen rehydriert, wobei sie die Entwässerungsschritte in umgekehrter Reihenfolge auf Eis gekühlt bis in PBST^{DEPC} durchlaufen (bei Einhaltung der gleichen Zeiten wie bei der Entwässerung). Nach zweimaligem Waschen in PBST^{DEPC} für je 5 min auf Eis werden die Embryonen 1 h mit 6 %igem H_2O_2 in PBST^{DEPC} auf Eis gebleicht. Dadurch wird das Gewebe entfärbt, was die Transparenz erheblich verbessert. Zusätzlich werden durch die oxidative Wirkung reaktive Gruppen zerstört, an die die RNA-Probe unspezifisch binden kann. Ein Unterschied zu Protokollen, in denen die H_2O_2 -Bleiche in MeOH durchgeführt wird, konnte in Vergleichen nicht bestätigt werden. Anschließend wird das H_2O_2 drei Mal für 10 min auf Eis mit PBST^{DEPC} ausgewaschen.

Lagerung der Embryonen in MeOH oder Prähybridisierungslsg

Rehydrierung und H_2O_2 -Bleiche

Proteinase K-Verdau

Der Proteinase K-Verdau dient zum Einen dazu, das Gewebe zu permeabilisieren, indem z.B. Basalmembranen verdaut werden. Zum Anderen befreit die Proteinase K die RNA von gebundenen Proteinen (ein Großteil der RNA liegt nicht frei im Cytoplasma vor, sondern assoziiert mit Proteinen), wodurch sie leichter zugänglich für die Probe wird. Daher wird der Proteinase K-Verdau auch bei sehr jungen Embryonen durchgeführt, was in einigen Protokollen nicht gemacht wird. Um eine zu starke Zersetzung des Gewebes zu verhindern, werden die Zeiten entsprechend der Größe der Embryonen angepasst: E 6,0 / 6,5 für 2 min – E 7,0 / 7,5 für 4 min – E 8,0 / 8,5 für 6 min – E 9,0 / 9,5 für 10 min – E 10,0 / 10,5 für 15 min – E 11,0 / 11,5 für 20 min – E 12,0 und älter für 30 min (obwohl ältere Embryonen z.T. auch länger verdaut werden können, besteht unabhängig von der Größe die Gefahr, dass die Oberfläche zu stark angegriffen wird). Da die Proteinase K nicht immer die selbe Aktivität zeigt und insbesondere die Raumtemperatur z.T. erheblich schwanken kann, sollte der Verdau immer kontrolliert und beim Auftreten von Schäden am Embryo sofort abgebrochen werden. Der Verdau wird durch eine Inkubation mit frisch angesetztem 0,2 % Glycin in PBST^{DEPC} gestoppt. Hierzu wird kurz in PBST^{DEPC} gespült und anschließend zwei Mal für 5 min (bis E 9,5) bzw. 10 min (ab E 10,0) in obiger Glycin-Lsg bei RT inkubiert. In einigen Protokollen wird auf das Glycin verzichtet, was aber dazu führt, dass die Proteinase K noch einige Zeit weiter aktiv bleibt, was den Embryo zerstören kann. Das Glycin wird danach drei Mal für 5 min (bis E 9,5) bzw. 10 min (ab E 10,0) mit PBST^{DEPC} bei RT ausgewaschen. Die Embryonen sind zu diesem Zeitpunkt bis zur Refixierung sehr zerbrechlich und müssen entsprechend vorsichtig behandelt werden.

Permeabilisierung (RIPA-Puffer)

Eine weitere, erhebliche Verbesserung der Gewebeporosität wird durch die Inkubation in RIPA-Puffer erreicht. Dieser enthält hohe Konzentrationen an verschiedenen Detergenzien, die dazu beitragen, noch verbliebene Plasmamembranen zu entfernen und Komplexe aus hydrophoben Proteinen etc. aus dem Gewebe zu lösen. Die Behandlungszeit richtet sich erneut nach dem embryonalen Stadium und erfolgt bei RT (drei Mal für je 5 min von E 6,0 bis E 7,5 – je 10 min von E 8,0 bis E 9,5 – je 15 min von E 10,0 bis E 11,5 – je 20 min von E 12,0 bis E 13,5 – je 30 min ab E 14,0). Bei der Inkubation mit RIPA-Puffer verringert sich die mechanische Stabilität der Embryonen nochmals, weshalb sie entsprechend vorsichtig zu behandeln sind.

Refixierung

Nachdem der RIPA-Puffer drei Mal für 5 min (bis E 9,5) bzw. 10 min (ab E 10,0) mit PBST^{DEPC} bei RT ausgewaschen wurde, werden die Embryonen refixiert. Hierzu werden sie für 20 min bei RT in PBS/FAI mit 0,2 % Glutaraldehyd inkubiert. Versuche, die Refixierung entsprechend der Angaben aus einigen Protokollen auszulassen, haben gezeigt, dass die Embryonen in der Mehrzahl der Fälle am Ende des Experiments zerfallen waren und in jedem Fall die Oberfläche starke Schäden aufwies. Nach der Refixierung sind die Embryonen mechanisch wieder so stabil, dass sie ohne Probleme gehandhabt werden können. Die Fixative werden drei Mal für 5 min (bis E 9,5) bzw. 10 min (ab E 10,0) mit PBST^{DEPC} bei RT ausgewaschen.

Sobald das Neuralrohr des Embryos geschlossen ist, neigen diese sehr stark dazu, die Probe bzw. die Antikörper einzuschließen. Um dies zu verhindern, werden die Ventrikel an einer oder mehreren Stellen geöffnet. Besonders geeignet sind hierzu das Dach des 4. Ventrikels und eine der beiden telencephalen Hemisphären. Da die Embryonen meistens auf der linken Seite liegend fotografiert werden, wird entsprechend in die linke Hemisphäre eingestochen. Soll der Embryo frontal fotografiert werden, wird meist nur das 4. Ventrikel geöffnet. Als Werkzeuge für das Öffnen eignen sich entweder sehr spitz angeschliffene Uhrmacherpinzetten oder Insektennadeln. In vielen Protokollen wird die Öffnung der Embryonen bereits nach der Rehydratisierung im Anschluß an die Entwässerung mit MeOH durchgeführt, was im Wesentlichen zu den gleichen Ergebnissen führt.

Zur Überführung in (Prä)Hybridisierungslösung werden die Embryonen zuerst in eine 1:1-Mischung aus PBST^{DEPC} und (Prä)Hybridisierungslösung A gegeben und 10 min (bis E9,5) bzw. 15 min (ab E10,0) bei RT inkubiert (sollten sie nach dieser Zeit noch nicht abgesunken sein - die (Prä)Hybridisierungslösung hat eine höhere spezifische Dichte als das PBST^{DEPC} und die Embryonen - wird die Inkubation entsprechend verlängert). Danach wird ein Mal für 10 min (bis E9,5) bzw. 15 min (ab E10,0) in (Prä)Hybridisierungslösung A bei RT inkubiert, wobei die Embryonen ebenfalls auf den Boden sinken müssen. Anschließend werden sie in (Prä)Hybridisierungslösung B überführt und bei 65°C in einem *Innova 4080 incubator shaker* von *New Brunswick Scientific* mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 70 UPM prähybridisiert. Die Prähybridisierung (und die Hybridisierung) erfolgen i.d.R. in 4 ml fassende *Probengläser N13-4G* mit Silikonverschluss (s.o.), oder in 6er- bzw. 24er-Platten mit Netzeinsätzen. Die Zeiten richten sich wieder nach der Größe der Embryonen: Bis E8,5 für mindestens 3 h, bis E9,5 für mindestens 4 h, ältere Embryonen als E9,5 für mindestens 6 h. I.d.R. wird für 8 h oder o/n prähybridisiert. Anschließend können die Embryonen entweder hybridisiert oder direkt bei -20°C gelagert werden. Da die verwendeten (Prä)Hybridisierungslösungen kein SDS enthalten, entstehen bei tiefen Lagerungstemperaturen keine Kristalle, die das Gewebe zerstören können. Die Lösung B unterscheidet sich von Lösung A nur darin, dass sie neben 500 µg/ml *Torula Hefe-RNA (Type VI Ribonucleic Acid from Torula Yeast* von *Sigma*, Best.Nr. R6625; 100 g = 187,40 DM) zusätzlich 50 µg/ml *Kalbsleber-RNA (Type IV Ribonucleic Acid from Calf Liver* von *Sigma*, Best.Nr. R7250; 100 mg = 105,30 DM) und deionisiertes Formamid enthält. In vielen Fällen ist die Zugabe der sehr teuren Kalbsleber-RNA ohne Wirkung und kann entsprechend ausgelassen werden, so dass alle Schritte mit (Prä)Hybridisierungslösung A durchgeführt werden können. Im Einzelfall muss der Effekt der Kalbsleber-RNA getestet werden.

Synthese der Riboprobe

Ausgangspunkt für die Synthese der Riboprobe ist ein linearisiertes Plasmid, das die entsprechende cDNA (oder auch genomische DNA) enthält, deren Transkripte im Gewebe nachgewiesen werden sollen. Bei der Auswahl der Probe

Öffnen der Ventrikel

Prähybridisierung

Vermeidung von Kreuzreaktivität der Probe

ist darauf zu achten, dass möglichst keine evolutiv in weiteren Mitgliedern der selben Genfamilie konservierten Sequenzen enthalten sind. Dabei spielt die Länge des konservierten Bereiches keine entscheidende Rolle (auch bei Verwendung eines RNase-Verdau beim Entfernen der unspezifisch gebundenen Probe; s.u.). Vielmehr ist die thermische Stabilität des RNA-RNA-Hybridmoleküls - die im Wesentlichen auf deren Gehalt an GC-Paarungen beruht - von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise führte eine 24 nt lange, konservierte Region mit 18 GC-Paaren bei einer Probengesamtlänge von >2000 nt zu einer vollständigen Imitierung des Expressionsmusters eines zweiten Gens trotz späterer RNase-Behandlung. Um sicher zu gehen, dass das ermittelte Expressionsmuster tatsächlich dem zu untersuchenden Gen entspricht, sollte zusätzlich mindestens ein Kontrollexperiment durchgeführt werden, bei dem eine weitere, nichtüberlappende Probe des selben Gens eingesetzt wird. Dafür können z.B. für eine Probe ein translatierter Teil und für die zweite Probe ein Teil des (3')-untranslatierten Bereichs des Gens verwendet werden. Damit wird die Wahrscheinlichkeit minimiert, dass beide Proben ein identisches Artefakt produzieren.

Probengröße

Die Größe der Probe sollte über ca. 300 nt betragen. Da zahlreiche Proben mit einer Länge über 2.000 nt ohne Hintergrunds- oder Penetrationsprobleme eingesetzt wurden, erscheint die oft vorgeschriebene Hydrolyse von Proben, die länger als 1.000 nt lang sind, in keinster Weise notwendig. Ursprung dieser oft vertretenen Ansicht ist möglicherweise der Umstand, dass in langen Proben mit einer höheren Wahrscheinlichkeit konservierte Bereiche enthalten sind, die für den Hintergrund verantwortlich sind, nicht aber die Länge selbst einen entscheidenden Einfluss aufweist. Ob diese Beobachtung auch für Proben von über 3.000 oder 5.000 nt noch zutrifft, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Linearisierung des Plasmids (keine 3'-Überhänge; möglichst 2 Enzyme)

Die Linearisierung erfolgt so weit als möglich nur mit Enzymen, die einen 5'-Überhang (oder ggf. ein glattes Ende) erzeugen. Ursächlich hierfür ist die Möglichkeit, dass die virale RNA-Polymerase (SP6, T3, T7) bei einem 3'-Überhang am Ende der Matrize "umdreht" und zurücklaufend einen Sinnstrang synthetisiert, was die Probe unbrauchbar machen würde (sie würde mit sich selbst hybridisieren). Vermutlich geschieht dies dann, wenn der Überhang entweder selbst lang genug ist, um eine Haarnadelstruktur auszubilden, oder aber wenn die RNA-Polymerase das Ende erreicht und dabei die beiden DNA-Stränge von einander trennt und so genügend einzelsträngige DNA vorliegt, die eine Haarnadelstruktur ausbilden kann. Diese fungiert dann wie ein *Primer*, der von der RNA-Polymerase verlängert wird. Die Wahl der Enzyme richtet sich ansonsten nach der Auswahl des zu transkribierenden Bereiches der DNA-Matrize (falls innerhalb der cDNA bzw. genomischen DNA geschnitten werden soll), bzw. der MCS. Wenn entsprechende Informationen vorliegen und ein einheitliches Puffersystem ermittelt werden kann, wird mit zwei Restriktionsendonukleasen gleichzeitig verdaut (beide 3' vom Phagenpromotor und dem zu transkribierenden DNA-Bereich). Das zweite Enzym dient hierbei nur dazu, sicher zu stellen, dass auch der sehr geringe Anteil des Plasmids, der

mit dem ersten Enzym nicht geschnitten wurde, zumindest mit dem zweiten Enzym linearisiert wird.

I.d.R. werden 10 µg Plasmid in einem 50 µl- (ein Enzym) oder 100 µl-Ansatz (zwei Enzyme) für 2h mit 5U/µg DNA verdaut. Das Protokoll hierfür entspricht den üblichen Standardvorgaben für den Verdau von DNA mit einer Restriktionsendonuklease. Anschließend wird auf 200 µl mit H₂O^{M-DEPC} aufgefüllt und mit Phenol extrahiert (ca. 3 min phenolisieren - 5 min in Tischzentrifuge bei maximalen UPM). Das Phenol wird durch einmaliges Extrahieren mit CIA entfernt (3-5 min schütteln, da sich das interkalierte Phenol aus der DNA nur langsam herauslöst - 5 min in Tischzentrifuge bei maximalen UPM). Die DNA wird mit 1/10-Vol. 3,0M NaAc^{DEPC} und 2,5 Vol. EtOH für 2h bei 4°C gefällt. Nach dem Waschen mit kaltem 70 %igem EtOH wird die DNA in 20,0 µl H₂O^{M-DEPC} aufgenommen (Endkonz.von 0,5 µg/µl) und 2 µl auf einem Gel getestet.

Verdau, Phenol-,
Chloroformextraktion,
EtOH-Fällung

Die Synthese erfolgt mit dem *DIG RNA Labeling Kit* von Roche (Boehringer M.). Der hierbei verwendete *Labeling Mix* enthält 35% DIG-gekoppeltes UTP. Als einzige Variation hierzu wurde getestet, welchen Einfluß eine ausschließliche Verwendung von DIG-markiertem UTP (100%) auf das Ergebnis der WMISH hat. Hierzu wurde nicht der *Labeling Mix* des Kits, sondern 2 µl einer Lsg. aus ATP, GTP und CTP (10mM pro NTP; Roche), sowie 2 µl DIG-UTP (10 mM, Roche) verwendet. Das H₂O^{M-DEPC}-Vol beträgt entsprechend nicht 12,0 µl, sondern 10,0 µl. Ansonsten entspricht das Protokoll den Vorgaben für das *DIG RNA Labeling Kit* von Roche. Beim Entwickeln der WMISH zeigte sich, dass zwar das Signal entsprechend stärker war, aber auch der unspezifische Hintergrund, weshalb diese Methode nicht weiter verfolgt wurde. Dennoch ist die Methode immer dann empfehlenswert, wenn die absolute Signalstärke ein Problem ist.

Herstellung der
markierten Probe
(35%- und 100%-
Markierung)

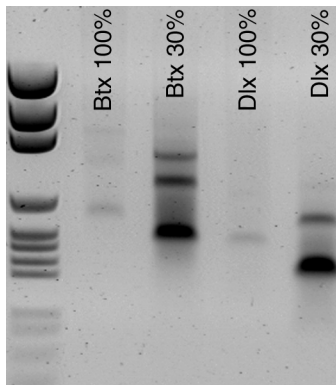
Die Herstellung der Riboprobe mit dem *DIG RNA Labeling Kit* erfolgt entsprechend der Herstellervorgaben:

- 1,0 µg linearisierter Plasmid wird entsprechend der Angaben des Kits in 20 µl Gesamtvolumen zur Herstellung der Riboprobe eingesetzt; die Synthese erfolgte für 2h bei 37°C mit SP6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase;
- die DNA wird durch Zugabe von 2 µl = 2U DNase (*RQ1 RNasefree DNase* von Promega) für 15 Min. bei 37°C verdaut;
- die Aufreinigung der Riboprobe erfolgt mit *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* von Amersham Pharmacia entsprechend der Herstellerangaben. Das Endvolumen der aufgereinigten Probe beträgt ca. 55 µl.

2,0 µl Plasmid à 0,5 µg/µl
12,0 µl H₂O^{M-DEPC}
2,0 µl 10× Transcriptionspuffer
2,0 µl Labeling Mix (Roche)
1,0 µl rRNasin à 40U (Promega)
1,0 µl RNA-Pol. à 20U (Roche)

20,0 µl Ges.Volumen

Zur fertigen Probe werden nach Entnahme von 5 µl für das Kontrollgel (s.u.) 50 µl Formamid gegeben. Dadurch wird die Lagerungsfähigkeit verbessert und die Denaturierung (s.u.) erleichtert.



Zur Kontrolle der Probensynthese werden nach der Synthese $5\mu\text{l}$ (aus $55\mu\text{l}$) auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Es ist nicht notwendig, ein spezielles RNA-Gel herzustellen. Ein übliches Agarosegel enthält bei sorgfältiger Zubereitung keine nennenswerten RNase-Mengen. Als Marker wird z.B. der *D-15 DNA Marker* von Novex verwendet (von oben nach unten: 2.645 bp, 1.605 bp, 1198 bp, 676 bp, 517 bp, 460 bp, 396 pb, 350 bp, 222 bp, 179 bp, 1267 bp, ...). Die gezeigten Synthesen (in diesem Fall Btx=Knopfkopf und Dlx3; beide mit 35%- und 100%-UTP-Markierung) repräsentieren typische Ergebnisse. Die Mehrzahl der hergestellten Riboproben weist neben einer oder zwei Hauptbanden noch einige Nebenbanden auf, z.T. enthalten die Spuren auch erheblichen "Schmier", ohne dass dies die Qualität der Probe beeinträchtigt. Lediglich wenn die Probe im Normalfall nur eine oder zwei saubere Banden aufweist und ausschließlich bei einem bestimmten Experiment zahlreiche Zusatzbanden und "Schmier" aufweist, sollte die Synthese wiederholt werden. Die etwas höheren und deutlich schwächer gefärbten Banden sind normal bei ausschließlicher Verwendung von DIG-markiertem UTP.

Denaturieren der Probe bei 80°C

Unmittelbar vor der Zugabe der Probe zu den Embryonen wird diese 5 min bei 80°C im Thermoblock denaturiert. Anschließend wird sie auf Eis abgekühlt. Die so vorbereitete Probe ist fertig für die Hybridisierung.

Hybridisierung

Hybridisierung bei 65°C mit $1/100$ -Vol. Probe

Die Hybridisierung erfolgt meistens ab dem Ende des ersten Tages. Bei einer Prähybridisierung o/n oder einer Lagerung der Embryonen bei -20°C kann sie entsprechend erst am zweiten Tag oder später erfolgen. Die Hybridisierung erfolgt meistens in 4ml fassende *Probengläser N13-4G* mit Silikonverschluss (s.o.), oder in 6er- bzw. 24er-Platten mit Netzeinsätzen. Das Volumen der Lösung richtet sich dabei nach dem verwendeten Gefäß und der Größe der Embryonen: Probenglas = 0,5-1,0ml / 24er-Platte = 1,0-1,5ml / 6er-Platte = 4,5-5,5ml. Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C in einem *Innova 4080 incubator shaker* von *New Brunswick Scientific* mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 70rpm für >12h (bis E 8,5), >18h (bis E 10,5) oder >24h (ab E 11,0). Alternativ hierzu wurden z.T. auch 2,0ml-Eppis verwendet, wobei die Temperierung in einem *Eppendorf Thermomixer* im Intervall-Mix-Modus (10 min stehen - 5 sec mit 800 UPM schütteln) erfolgte. Der Vorteil dieser Methode ist, dass relativ kleine Volumina verwendet werden können (i.d.R. $250\mu\text{l}$). Der Nachteil ist die nicht so exakte Temperatur-Regulation, da der Block nach oben offen ist, und dass sich Kondenswasser am kälteren Deckel bildet. Dadurch verändert sich die Zusammensetzung der (Prä)Hybridisierungslösung, was eine Verschiebung der Schmelztemperatur der RNA-RNA-Hybrid-Moleküle zur Folge hat. Nachdem die Prähybridisierungslösung B durch frische, vorgewärmte Lösung ersetzt ist (i.d.R. $800\mu\text{l}$ bei einem 4ml-Probenglas), wird die denaturierte Probe zugegeben. Bei einer durchschnittlich guten Synthese wird $1/100$ -Volumen verwendet: bei $800\mu\text{l}$ (Prä)Hybridisierungslösung B demnach $8,0\mu\text{l}$ der Probe in 1:1 H_2O :FAM.

Entfernen der nicht spezifisch gebundenen Riboprobe

(Alle im Folgenden angegebenen Volumina beziehen sich auf die Verwendung von 4ml-Probengläser. Sollten 24er- oder 6er-Platten verwendet werden, müssen die Volumina angepasst werden. Bei Verwendung von 4 ml-Probengläsern erfolgen alle Schritte oberhalb von 37°C in einem *Innova 4080 incubator shaker* von *New Brunswick Scientific* mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 70rpm. Die Inkubation bei 37°C erfolgt im Warmraum, wobei ebenfalls leicht geschüttelt wird. Letzteres gilt auch für die Inkubation bei RT.) Die Embryonen werden in 2ml frischer, auf 65°C vorgewärmter (Prä)Hybridisierungslösung A gespült. Der erste Waschzyklus erfolgt bei 65°C für 90min (60min, Wechseln der Lsg, 30min) in je 2ml auf 65°C vorgewärmter (Prä)Hybridisierungslösung A.

Vor dem zweiten Zyklus werden die Embryonen mit RNaseA behandelt. Dieser Schritt ist in manchen Fällen nicht notwendig, in vielen Fällen reduziert er aber den unspezifischen Hintergrund erheblich. In Parallelversuchen konnte die häufig vertretene Behauptung nicht bestätigt werden, dass durch den RNaseA-Schritt die Spezifität hinsichtlich einer möglichen Kreuzhybridisierung mit verwandten Genen verbessert wird.

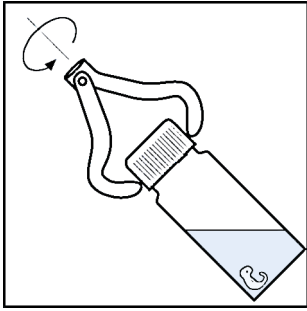
Da die RNase A nicht in formamidhaltigen Lösungen aktiv ist, müssen die Embryonen in eine wässrige Lösung überführt werden. Hierzu werden sie in 1 ml auf 65°C vorgewärmte (Prä)Hybridisierungslösung A gegeben und 10min auf RT abgekühlt. Danach wird 1 ml NTE-Lösung zugegeben (1:1-Mischung). Nach 10min (bis E10,5) bzw. 15min (ab E11,0) wird gegen 2ml NTE ausgetauscht und weitere 15min (bis E10,5) bzw. 20min (ab E11,0) bei RT inkubiert. Der RNase-Verdau erfolgt in frischer NTE-Lösung mit 100µg/ml RNase A für 30min bei 37°C. Abschließend wird gegen 1 ml frische NTE-Lösung ausgetauscht und weitere 10min bei RT inkubiert.

Der zweite Waschzyklus entspricht dem ersten, allerdings wird die Temperatur von 65°C auf 70°C erhöht. (Da eine Abweichung auf ca. 67°C bereits eine erhebliche Verstärkung des unspezifischen Hintergrundes bewirken kann, eine Abweichung auf ca. 73°C im Verlust des spezifischen Signals enden kann, wird die Einhaltung der vorgegebenen 70°C neben der geräteseitigen Temperaturkontrolle zusätzlich mit einem Thermometer überwacht.) Die Embryonen werden langsam in die formamidhaltige Lösung und eine Temperatur von 70°C überführt. Dazu wird zu dem 1 ml NTE-Lösung 1 ml der (Prä)Hybridisierungslösung A zugegeben und für 10min im *Innova 4080* auf 70°C erwärmt. Danach werden 2ml frische (Prä)Hybridisierungslösung A zu den Embryonen gegeben und 90min wie im 1. Waschzyklus bei 70°C gewaschen (60min. , Wechseln der Lsg, 30min). Nach dem Waschzyklus wird gegen 1 ml vorgewärmte (Prä)Hybridisierungslösung A ausgetauscht und für 10min auf RT abgekühlt (ebenfalls unter leichtem Schütteln). Danach wird 1 ml MABT dazugegeben (1:1-Mischung) und 10min (bis E10,5) bzw. 15min (ab E11,0) bei RT inkubiert. Das Formamid wird abschließend drei Mal für je 10min (bis E10,5) bzw. 15min (ab E11,0) mit MABT bei RT ausgewaschen.

1. Waschzyklus:
90 min bei 65°C in
(Prä)Hyb.-Lsg. A

RNaseA-Verdau

2. Waschzyklus:
90 min bei 70°C in
(Prä)Hyb.-Lsg. A



Für ein optimales Auswaschen, aber auch für das Durchdringen der Embryonen hat es sich bewährt, diese in der entsprechenden Lösung "schweben" zu lassen, was entsprechend des gezeigten Schemas erfolgt. Ein geeigneter Antrieb für die Halteklammer ist z.B. das elektronische Rührwerk *RZR1* von *Heidolph*. Die Umdrehungszahl sollte auf ca. 1 UPS reguliert sein, damit die Embryonen nicht beschädigt werden. Durch ein leichtes Abkippen des Probenfläschchens gegenüber der Rotationsachse kann außerdem eine beliebig starke Taumelbewegung erzeugt werden, die die Durchmischung weiter verbessert. Diese Art der Inkubation wird bei allen Schritten bis zur Färbung der Embryonen beibehalten, mit Ausnahme der AK-Inkubation. Diese kann zwar auch auf diese Art erfolgen, aber i.d.R. reicht das leichte Schütteln auf einem Plattformschüttler bei niedriger Umdrehungszahl aus.

Antikörper-Inkubation (Alkalische Phosphatase-gekoppelte anti-DIG AK)

Blocken der unspez. Bindungsstellen im Embryo mit FCS und *Blocking Reagent*

Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper im Gewebe des Embryo erfolgt mit 10% FCS und 2% *Blocking Reagent (for nucleic acid hybridization and detection)* von *Roche*. Hierzu werden die Embryonen erst für 20 min (bis E10,5) bzw. 30 min (ab E11,0) mit 10% FCS in MABT bei RT inkubiert, und anschließend für >2h (bis E10,5) bzw. >5h (ab E11,0) mit 10% FCS und 2% *Blocking Reagent* (aus einer 10%igen Stammlösung) in MABT bei 4°C. Eine längere Inkubationszeit beim letzteren Schritt bewirkt eine weitere Reduktion des Hintergrundes, weshalb i.d.R. o/n bei 4°C behandelt wird.

Entfernen von AKs mit unspezifischen Bindungseigenschaften

Obwohl die kommerziell erhältlichen DIG-Antikörper monoklonal sind, also alle dieselbe Bindungseigenschaft aufweisen sollten, ist dies praktisch nicht der Fall. Ein Teil von ihnen neigt zu unspezifischen Reaktionen und erhöht somit erheblich den Hintergrund in der späteren Färbung. Um diese zu entfernen, werden die Antikörper (*Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments* von *Roche*, Best.Nr. 1093274) mit Embryopuder und 2% *Blocking Reagent* in MABT vorinkubiert. Hierzu werden ca. 30mg Embryopuder mit 900µl MABT in einem 1,5- oder 2ml-Eppi vermischt (vortexen) und 30 min bei 70°C gelöst. Anschließend wird auf Eis abgekühlt und 100µl FCS dazugegeben. Die Menge an eingesetztem Antikörper richtet sich nach dem notwendigen Gesamtvolumen zur Inkubation der Embryonen. Bei einem Bedarf von 10ml werden 5,7µl der Antikörper-Lsg. von *Roche* eingesetzt (Verdünnung = 1:1750 ; Die meisten Protokolle verwenden 1:2000 ohne eine Inkubation mit Embryopuder; die etwas geringere Verdünnung gleicht die Verluste durch das Embryopuder aus). Sollten deutlich mehr oder weniger als 10ml Gesamtvolumen und damit der Antikörper benötigt werden, sollten die Mengen an Embryopuder, MABT und FCS proportional angepasst werden. Die Inkubation des Antikörpers erfolgt bei 4°C auf einem Wippschüttler für mindestens 2h, i.d.R. aber o/n. Anschließend wird das Embryopuder mit den gebundenen Antikörpern 10min mit 30.000g abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5ml-Eppi gegeben und erneut wie zuvor abzentrifugiert. Der neue

Überstand wird sofort entnommen und in ein weiteres 1,5ml-Eppi gegeben. Der so hergestellte Antikörper ist gebrauchsfertig.

Bei einem Gesamtvolumen von 10 ml zur Inkubation der Embryonen mit dem Antikörper werden 6 ml MABT mit 2 ml 10%igem *Blocking Reagent* (in MAB) und 1 ml FCS, sowie dem 1 ml der Antikörper-Lösung (s.o.) gemischt (sollte ein größeres oder kleineres Volumen benötigt werden, werden die Mengen proportional angepasst). In dieser Lösung mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:1750 werden die Embryonen o/n (mindestens 12, bei größeren Embryonen mindestens 18h) bei 4°C auf einem Wippschüttler oder im Rotor entsprechend der obigen Beschreibung inkubiert.

Inkubation der
Embryonen mit dem
Antikörper
1:1.750 bei 4°C o/n

Auswaschen der nicht spezifisch gebundenen Antikörper

Das Auswaschen der nicht spezifisch gebundenen Antikörper erfolgt zuerst für 4 bis 6h bei RT mit 10% FCS und 2% *Blocking Reagent* in MABT, wobei die Lösung drei Mal gewechselt wird. Anschließend wird wie zuvor mit 5% FCS und 1% *Blocking Reagent* in MABT gewaschen. Danach wird für mindestens 2d, besser aber 4d bei RT mit MABT gewaschen, wobei die Lösung zwei Mal täglich erneuert wird. Beim letzten Waschschrift mit MABT wird die Lösung auf 2mM Levamisol eingestellt. Kann die Waschlösung nicht regelmäßig gewechselt werden (Wochenende etc.), sollten die Embryonen für diese Zeit anstatt bei RT bei 4°C gewaschen werden.

Auswaschen der AK für
2 bis 4 d

Entwickeln der WMISH / Färben der Embryonen

Zur Einstellung des pH-Wertes für die Alkalische Phosphatase werden die Embryonen drei Mal mit frisch angesetztem NTMT für je 20 min (bis E10,5) bzw. 30min (ab E11,0) bei RT inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass der pH-Wert der Lösung nicht unter 9,4 liegt, da sonst der NBT/BCIP-Niederschlag bräunlich statt blau ist und auf Grund des dadurch geringeren Kontrastes zum embryonalen Gewebe das Signal weniger gut erkennbar ist. Anschließend wird mit frischem NTMT mit 200 µl NBT/BCIP pro 10 ml (Fertiglösung von Roche mit 22,9mM NBT und 21,7 mM BCIP; Best.Nr. 1 681 451) bei RT entwickelt. Hierzu wird die ersten 10 min leicht geschüttelt, anschließend bleiben die Embryonen unbewegt. Da NBT/BCIP lichtempfindlich sind, wird die Reaktion z.B. in einer Pappschachtel durchgeführt und nur zur Kontrolle des Färbvorganges werden die Gefäße kurz entnommen. Sollte sich die anfangs gelbliche Lösung verfärben (über orange bis zu einem kräftigen Lila), sollte sie gegen frische ersetzt werden, da ansonsten besonders der Hintergrund verstärkt wird. Wird neue Lösung zugegeben, kann es leicht passieren, dass eine anfangs nur langsam voranschreitende Färbung innerhalb von kurzer Zeit sehr kräftig wird, so dass nach einem Wechsel das Fortschreiten der Reaktion besonders sorgfältig kontrolliert werden muss. Die Färbereaktion dauert i.d.R. zwischen 1/2 und 10h. Sollte die Reaktion deutlich länger dauern, kann sie entweder bei RT weiter geführt werden, oder bei 4°C. Insbesondere bei Inkubationen o/n sollte bei

Färbung mit NBT/BCIP

4°C gearbeitet werden, da die Farbreaktion z.T. in einer relativ kurzen Zeit einen erheblichen Hintergrund erzeugen kann. Die Reaktion wird nach Erreichen der gewünschten Farbintensität (in Abhängigkeit des meistens nicht vollständig vermeidbaren unspezifischen Hintergrundes) wie unten beschrieben abgestoppt. Speziell bei größeren Embryonen kann es angeraten sein, diese noch einige Zeit weiter bei 4°C weiter zu inkubieren, wobei besonders tieferliegende Expressionsdomänen deutlicher angefärbt werden, ohne dass der Hintergrund zu stark hervortritt. In jedem Fall muß unter diesen Bedingungen regelmäßig und sorgfältig der Fortgang der Färbung kontrolliert werden, um ein Überfärben zu vermeiden. Hinsichtlich der anzustrebenden Farbintensität ist anzumerken, dass die spätere Überführung in 80 %iges Glycerin die Embryonen erstens durchscheinender werden lässt und zweitens sowohl das spezifische Signal als auch der unspezifische Hintergrund deutlich abgeschwächt werden.

***BM Purple* als Alternative**

Die Verwendung von *BM Purple* (Roche; Best.Nr. 1442074) als Alternative zu NBT/BCIP sollte auf kleinere Embryonen bis maximal E9,5 beschränkt werden, da die Penetration des Gewebes deutlich schlechter ist als mit NBT/BCIP. Dies führt zwar zu einer subjektiven Verbesserung des Färbeergebnisses, da der Hintergrund geringer ist, aber gleichzeitig werden tieferliegende Expressionsdomänen oft nicht erkannt.

Zugabe von Polyvinylalkohol bei schwacher Farbreaktion

Wenn die Färbung sehr schwach ausfällt und gleichzeitig der unspezifische Hintergrund niedrig ist, kann die obige NBT/BCIP-Färbelösung zusätzlich mit 10 bis 20 % Polyvinylalkohol angereichert werden. Entsprechende Protokolle können z.B. bei Barth und Ivarie (BioTechniques 1994, Vol. 17, Nr. 2: 324-327) nachgelesen werden. Die besten Ergebnisse wurden in eigenen Testreihen mit 10% Polyvinylalkohol (durchschnittliches Molekulargewicht 70.000-100.000 g/mol; *Sigma* Best.Nr. P 1763) erzielt. Da die Zugabe nicht nur das spezifische Signal verstärkt, sondern auch den unspezifischen Hintergrund, sollte es nur eingesetzt werden, wenn das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Färbung trotz schwachem spezifischem Signal sehr gut ist.

Nachfixierung der Embryonen

Stoppen der Reaktion und Fixieren der Embryonen

Wenn die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat, wird das NBT/BCIP durch PBST ausgewaschen (drei Mal 10min bei RT unter Lichtausschluss). Um ein weiteres Nachdunkeln der Embryonen zu verhindern, was besonders bei größeren Tieren passieren kann, werden sie o/n bei 4°C mit PBS/FAL nachfixiert, was die gekoppelte Alkalische Phosphatase vollständig inaktiviert. Am nächsten Tag wird das Formaldehyd wie zuvor das NBT/BCIP ausgewaschen, wobei bei größeren Embryonen die Zeiten auf drei Mal 30min ausgedehnt werden sollten.

Fotografieren der Embryonen

Oberflächliche Färbungen werden direkt an einem Makroskop fotografiert. Tieferliegende Signale können dagegen erst dargestellt werden, wenn der Eigenkontrast des Gewebes reduziert wird. Hierzu werden die Embryonen in ein Medium überführt, dessen Brechungsindex demjenigen des Gewebes ähnelt. In der Praxis wird hierfür meistens 80 %iges Glycerin verwendet. Um einen osmotischen Schock des Gewebes zu vermeiden, werde die Embryonen über 30%iges und 50%iges Glycerin in das 80%ige Glycerin überführt. Das Glycerin kann hierbei entweder mit PBS angesetzt werden (das dabei entsprechend verdünnt wird), oder mit H_2O^M . Aus Gründen der Praktikabilität wird die Verdünnung in Wasser angeraten (s.u.). Auf jeden Fall zu vermeiden ist das Ansetzen des 80%igen Glycerins mit einer Endkonzentration von 1xPBS (800ml Glycerin + 150ml H_2O^M + 50ml 20xPBS), da das Phosphat unter diesen Bedingungen sehr leicht ausfällt und störende Kristalle an bzw. in den Embryonen bildet.

Alternativ zu Glycerin kann auch in eine 1:1-Mischung aus Benzylbenzoat und Benzylalkohol überführt werden, die insbesondere bei den sehr dotterreichen Xenopusembryonen ihre Anwendung findet. Diese hat den Effekt, dass das nicht gefärbte Gewebe fast vollständig durchsichtig wird. Dies kann sinnvoll sein, wenn eine sehr tief liegende Expressionsdomäne getestet werden soll. Klarer Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass das Gewebe so durchscheinend und kontrastarm wird, dass i.d.R. keine anatomische Orientierung im Embryo mehr möglich ist.

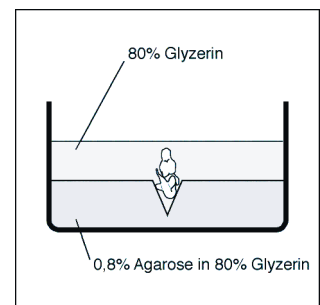
Die Fotos werden i.d.R. an einem *SV11* von *Zeiss* oder einem *SZX12* von *Olympus* mit Durchlicht gemacht. Diese zeichnen sich durch eine besonders transparente Darstellung des Gewebes aus, was für diese Anwendung ideal ist. Makroskope, die ein besonders kontrastreiches Bild liefern wie diejenigen von *Leica* sind für diese Aufgabenstellung ungeeignet.

Um die Embryonen auch von dorsal oder ventral bzw. jedem anderen beliebigen Blickwinkel betrachten und dokumentieren zu können, werden sie in einem Agarosebett fotografiert. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass durch die Lichtstreuung in der Agarose eine besonders gleichmäßige und weiche Ausleuchtung erzielt wird. Das Agarosebett wird hergestellt, indem 0,8g Agarose in 23 ml H_2O^M (3 ml werden als Verdampfungsverlust beim Aufkochen eingerechnet) und 10 ml Glycerin gegeben und in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst werden. Anschließend werden 70 ml im Wasserbad auf ca. 90°C vorgewärmtes Glycerin dazu gegeben, so dass eine Lösung aus 0,8 % Agarose in 80 % Glycerin entsteht. Diese wird in ein geeignetes Glasgefäß mit glattem Boden und ca. 5 cm Wandhöhe gegeben (z.B. Petrischalen in hoher Form oder Kristallisierschalen) und bei 4°C o/n verfestigt (durch das Glycerin wird die Agarose nur sehr langsam fest). In das feste Agarosebett werden am nächsten Tag ein oder mehrere V-förmige Einschnitte mit einem Skalpell gemacht, in die die Embryonen eingelegt werden können. Diese sind in dieser Lage frei

Aufklären der
Embryonen mit
Glycerin

Benzylbenzoat/
Benzylalkohol als
Aufklärmedium

Fotografieren im
Agarosebett



positionierbar, so dass sie z.B. aufrecht stehend oder auf dem Rücken liegend fotografiert werden können.

Verwendete Lösungen, Vorarbeiten, Kommentare

PBS (phosphate buffered saline)

Endkonzentrationen:

137,00 mM NaCl
4,00 mM KCl
7,38 mM Na ₂ HPO ₄
2,50 mM NaH ₂ PO ₄
pH7,2

- für 1,0l : 951,35 ml H₂O^M
- 27,40 ml 5,0 M NaCl
- 4,00 ml 1,0 M KCl
- 14,65 ml 0,5 M Na₂HPO₄
- 2,60 ml 1,0 M NaH₂PO₄
- die Lösung hat ohne weitere Titrierung einen pH-Wert von 7,2
- für RNase-freies Arbeiten kann PBS mit 0,1% DEPC behandelt werden
- bei Bedarf kann PBS autoklaviert werden, was für die WMISH i.d.R. nicht notwendig ist.

20×PBS

Endkonzentrationen:

1370,0 mM NaCl
40,0 mM KCl
73,8 mM Na ₂ HPO ₄
25,0 mM NaH ₂ PO ₄
pH7,2 (nach verdünnen)

- für 1,0l : 80,0 g NaCl
- 40,0 ml 1,0 M KCl
- 146,5 ml 0,5 M Na₂HPO₄
- 26,0 ml 1,0 M NaH₂PO₄
- alle Salze bzw. die Lösungen werden in ca. 750ml H₂O^M gelöst
- wenn alle Salze bzw. der überwiegende Teil gelöst ist, wird die Lösung auf 1,0l mit H₂O^M aufgefüllt
- die Lösung hat nach dem Verdünnen auf 1,0l ohne weitere Titrierung einen pH-Wert von 7,2
- für RNase-freies Arbeiten kann die Lösung mit 0,1% DEPC behandelt werden
- die 20×-Stammlösung sollte autoklaviert werden.

10% Tween-20

- 10ml Tween-20 werden mit 90ml H₂O^{M-DEPC} gemischt
- die Lösung ist bei RT mehrere Monate haltbar
- Tween-20 sollte nicht autoklaviert werden
- bei Verwendung von H₂O^{M-DEPC} gilt die Lösung als RNase-frei

PBST

Endkonzentrationen:

1,0 × PBS
0,1 % Tween-20

- für 1,0l : 990,0 ml 1 × PBS
- 10,0 ml 10,0 % Tween-20
- das Tween-20 wird zum PBS gegeben und gemischt
- bei Verwendung von DEPC-vorbehandeltem PBS und der obigen Tween-20-Lösung gilt das PBST als RNase-frei.

PBS/FAI

Endkonzentrationen:

4,0 % Formaldehyd
1,0 × PBS

- für 1,0l : 40,0 g Paraformaldehyd
- 50,0 ml 20 × PBS
- ca. 50 µl 10,0 M NaOH
- das Paraformaldehyd wird in 900ml 55–60°C warmes H₂O^M gegeben

und mit NaOH versetzt; unter Rühren löst es sich innerhalb von einigen Minuten auf, wobei es in Formaldehyd gespalten wird (Paraformaldehyd ist ein Formaldehyd-Polymer)

- nach dem Lösen des Paraformaldehydes wird das 20×PBS zugefügt
- mit H₂O^M wird auf 1,0l aufgefüllt
- das PBS/FAL ist ein bis zwei Tage bei 4°C haltbar; ansonsten kann es bei -20°C in 50ml-Falcon®-Tubes gelagert werden (das Auftauen erfolgt in der Mikrowelle mit geschlossenem Deckel, wobei sorgfältig kontrolliert werden muss, dass das Tube nicht zu heiß wird).

H₂O^{M-DEPC}

- für 1,0l : 1,0 ml DEPC
- das DEPC (Diethyl-pyrocbonat) wird in 1,0l H₂O^M gegeben und ca. 18h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert
- das restliche DEPC wird durch zwei-maliges autoklavieren entfernt
- geschlossen ist das Wasser bei RT beliebig lange lagerbar.

MeOH/H₂O^{M-DEPC} (25 %, 50 %, 75 %)

- 250, 500, bzw. 750ml MeOH werden mit H₂O^{M-DEPC} auf 1,0l aufgefüllt
- die Lagerung erfolgt bei 4°C.

PBST^{DEPC}

- Herstellung wie H₂O^{M-DEPC}, aber mit PBST statt Wasser (1×auto-klavieren)
- die Lagerung erfolgt je nach Bedarf bei 4°C oder RT.

6%iges H₂O₂ in PBST^{DEPC}

- für 100ml : 20,0 ml 30,0 %iges H₂O₂
- 80,0 ml 1 × PBST
- zu 80ml PBST^{DEPC} werden unmittelbar vor Gebrauch die 20ml der 30%igen H₂O₂-Lösung gegeben
- die Lösung muss frisch angesetzt werden, da sie nicht lagerbeständig ist.

Proteinase K-Verdauungslösung

- für 100ml : 0,100 ml 10,0 mg/ml ProteinaseK
- zu 100ml PBST^{DEPC} werden unmittelbar vor Gebrauch 100µl der ProteinaseK-Lösung gegeben
- die Verdauungslösung ist nicht lagerbeständig.

Endkonzentrationen:	
10,0	µg/ml Prot. K
1,0	× PBST

0,2 % Glycin in PBST^{DEPC}

- für 100ml : 0,200 g Glycin
- zu 100ml PBST^{DEPC} werden unmittelbar vor Gebrauch 200mg Glycin gegeben (löst sich sehr schnell)
- die Lösung ist nicht lagerbeständig.

RIPA-Puffer (RIPA = radio immuno precipitation assay)Endkonzentrationen:

150,00 mM	NaCl
50,00 mM	Tris pH8,0
1,00 mM	EDTA pH8,0
1,00 %	NP40
0,50 %	DOC
0,10 %	SDS

- für 100ml: 10,0 ml 10,0 % NP40
- 10,0 ml 5,0 % DOC
- 5,00 ml 1,0 M Tris pH8,0
- 3,00 ml 5,0 M NaCl
- 0,500 ml 20,0 % SDS
- 0,200 ml 0,5 M EDTA pH8,0
- zu 71,3ml H₂O^{M-DEPC} werden vor Gebrauch die obigen Lösungen (alle mit H₂O^{M-DEPC} angesetzt) gegeben und gemischt (NP40 = Nonidet® P40 / DOC = Natriumdeoxycholat)
- die Lösung ist nur ein bis zwei Tage bei 4°C haltbar und kann nicht autoklaviert werden.

PBS/FAI/0,2 % Glutaraldehyd

- zu 100ml PBS/FAI werden unmittelbar vor Gebrauch 800µl 25%iges Glutaraldehyd gegeben
- die Lösung sollte bei 4°C maximal 1 Tag gelagert werden.

Formamid

- entgegen den üblichen Rezepten wird das Formamid nicht mit einem Mischbett-Ionenaustauschharz vorbehandelt. Bei Verwendung der angegebenen Präparate (*Merck* Best.Nr. 1.09684.1000, für die (Prä)Hybridisierungslösung A; *Sigma* Best.Nr. F 9037, für die (Prä)Hybridisierungslösung B) kann auf die Deionisierung verzichtet werden, wenn sie nicht längere Zeit (mehrere Monate) bei RT gelagert wurden.

20× SSC pH 7,0Endkonzentrationen:

3,0 M	NaCl
0,3 M	Na ₃ -Citrat
pH7,0 (6,0)	

- für 1,0l: 175,35 g NaCl
- 88,23 g Na₃-Citrat·2H₂O
- das NaCl und Na₃-Citrat·2H₂O in 950ml H₂O^M lösen
- mit einigen Tropfen 10M (oder 1M) NaOH auf pH7,0 einstellen
- mit H₂O^M auf 1,0l auffüllen
- o/n mit 1,0ml DEPC behandeln (wie bei H₂O^{M-DEPC}, aber 1×autoklavieren)
- die Lösung ist bei RT > 1 Jahr lagerbar.
- (In vielen Protokollen wird ein pH-Wert von 4,5 angegeben. Versuche haben gezeigt, dass es keine erkennbaren Unterschiede gibt bei Verwendung des einen oder des anderen Wertes. Da ein neutralerer pH-Wert leichter einzustellen ist, wird i.d.R. nicht auf 4,5 titriert. Auf Grund der geringen Stabilität von RNA unter alkalischen Bedingungen wird vorgeschlagen, einen pH-Wert von 6,0 statt 7,0 einzustellen, was ansonsten keinen Einfluss auf die Hybridisierung hat.)

0,5M EDTA pH8,0

- für 100ml: 18,61 g Na₂-EDTA·2H₂O
- das EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat wird in 80ml H₂O^{M-DEPC} gegeben und mit 10M NaOH langsam unter ständigem Rühren auf pH8,0 eingestellt, wobei es in Lösung geht
- die Lösung wird als RNase-frei betrachtet.

50× Denhardt's-Lösung

- für 100ml: 1,0 g Ficoll 400

- 1,0 g Polyvinylpyrrolidon
- 1,0 g BSA, fraction V
- die Inhaltsstoffe unter leichter Erwärmung (37°C-Raum) lösen (nicht zu warm, da sonst das BSA denaturiert und ausfällt)
- die Lösung kann beliebig lange bei -20°C gelagert werden
- zum Auftauen im 37°C-Wasserbad erwärmen (nicht zu warm, da sonst das BSA ausfällt).

50mg/ml Torula-RNA

- 1,5g Torula-RNA (*Sigma* Best.Nr. R6625 (Type VI, from torula yeast)) wird in 20ml H₂O^{M-DEPC} gelöst
- je nach Unreinheit der Präparation wird 4-8 Mal mit PCI extrahiert
- danach 2-3 Mal mit CIA extrahieren
- Fällung mit NaAcetat^{DEPC} und Isopropanol für ca. 1h bei 4°C (RNA sollte sofort in großen Mengen ausfallen)
- Pellet mit 70%igem EtOH^{DEPC} waschen und einige Minuten trocknen (nicht zu lange - kleinere Reste von Alkohol stören nicht weiter, dafür löst sich die RNA sehr viel besser als ein zu trockenes Pellet)
- RNA in 5ml H₂O^{M-DEPC} lösen und im Spektrophotometer messen
- mit H₂O^{M-DEPC} auf 50mg/ml einstellen
- die RNA-Lösung kann problemlos ca. 6Monate bei -20°C gelagert werden, längere Lagerung sollte bei -80°C erfolgen.

50mg/ml Heparin

- für 10ml : 0,500 g Heparin
- das Heparin (*Sigma* Best.Nr. H3393) wird in H₂O^{M-DEPC} gelöst
- die Lösung wird bei -20°C gelagert

MAB (maleic acid buffer)

- für 1,0l : 11,61 g Maleinsäure
- 8,77 g NaCl
- die Maleinsäure und das NaCl wird in 950ml H₂O^M gelöst
- mit 1,0M NaOH auf pH7,5 einstellen (Maleinsäure puffert bei diesem pH-Wert nicht, so dass man beim titrieren sehr leicht einen zu alkalischen pH-Wert erhält)
- mit H₂O^M auf 1,0l auffüllen
- mit 1,0ml DEPC o/n behandeln und autoklavieren
- die Lösung ist bei RT für mehrere Monate stabil (über längere Zeiträume zerfällt Maleinsäure).

Endkonzentrationen:

150,0	mM	NaCl
100,0	mM	Maleinsäure
pH7,5		

10% Blocking Reagent in MAB

- für 500ml : 50,0 g Blocking Reagent
- *Reagent for nucleic acid hybridization and detection* von Roche (Best.Nr. 1096 176) in 450ml MAB durch Erwärmen lösen (z.B. Wasserbad bei 80°C)
- mit MAB auf 500ml auffüllen
- die Lösung kann entweder direkt bei -20°C eingefroren werden, oder zuvor autoklaviert werden, wodurch sichergestellt ist, dass alle noch ungelösten Reste aufgelöst sind, und danach bei -20°C gelagert werden (das Einfrieren geschieht am Besten als 40ml Aliquots in 50ml Falcon[®]-Tubes)
- die gefrorenen Aliquots können entweder im Wasserbad oder in der Mikrowelle aufgetaut werden.

(Prä)Hybridisierungslösung AEndkonzentrationen:

50,0	%	Formamid
10,0	mM	EDTA(pH8,0)
5,0	×	SSC pH7,0
1,0	×	Denhardt's
1,0	%	Blocking R.
0,1	%	Tween-20
0,1	%	CHAPS
0,5	mg/ml	Torula-RNA
0,1	mg/ml	Heparin

- für 100ml: 50,0 ml Formamid
- 25,0 ml 20 × SSC pH7,0
- 2,00 ml 0,5 M EDTA pH8,0
- 2,00 ml 50 × Denhardt's
- 1,00 ml 10 % Tween-20
- 1,00 ml 50,0 mg/ml Torula-RNA
- 0,20 ml 50,0 mg/ml Heparin
- 10,0 ml 10,0 % *Blocking Reagent* in MAB
- oder (!) 1,00 g *Blocking Reagent*
- 0,10 g CHAPS (*Sigma* Best.Nr. C3023)
- die Lösung basiert auf einer Vorgabe aus dem Labor von T. Pieler mit leichten Modifikationen (*Blocking Reagent*, unterschiedliche RNA)
- entweder wird 1,0g *Blocking Reagent for nucleic acid hybridization and detection* von Roche (Best.Nr. 1096 176) in 19,5ml H₂O^{M-DEPC} und 2,0ml EDTA pH8,0 gelöst (z.B. im Wasserbad bei 80°C)
 - oder
 - 10,0ml einer 10,0%igen Lösung des obigen *Blocking Reagents* in MAB (nach Verdünnung 1:10 entsprechend noch 10mM Maleinsäure pH7,5 – 15mM NaCl) werden zu 9,5ml H₂O^{M-DEPC} und 2,0ml EDTA pH8,0 gegeben
- anschließend werden die restlichen wässrigen Lösungen und das CHAPS (*Sigma* Best.Nr. C3023) zugegeben
- zuletzt wird das Formamid (*Merck* Best.Nr. 1.09684.1000; nicht deionisiert) hinzugefügt
- Kälber-RNA = *Sigma* Best.Nr. R7250 (Type IV, from calf liver)

(Prä)Hybridisierungslösung BEndkonzentrationen:

50,0	%	Formamid
10,0	mM	EDTA(pH8,0)
5,0	×	SSC pH7,0
1,0	×	Denhardt's
1,0	%	Blocking R
0,1	%	Tween-20
0,1	%	CHAPS
0,5	mg/ml	Torula-RNA
0,05	mg/ml	Kalbs-RNA
0,1	mg/ml	Heparin

- für 100ml: 50,0 ml Formamid (deionisiert)
- 25,0 ml 20 × SSC pH7,0
- 2,00 ml 0,5 M EDTA pH8,0
- 2,00 ml 50 × Denhardt's
- 1,00 ml 10 % Tween-20
- 1,00 ml 50,0 mg/ml Torula-RNA
- 0,100 ml 50,0 mg/ml RNA aus Kalbsleber
- 0,200 ml 50,0 mg/ml Heparin
- 10,0 ml 10,0 % *Blocking Reagent* in MAB
- oder (!) 1,00 g *Blocking Reagent*
- 0,100 g CHAPS (*Sigma* Best.Nr. C3023)
- die Lösung wird entsprechend der (Prä)Hybridisierungslösung A angesetzt
- mit Ausnahme des deionisierten Formamids (*Sigma* Best.Nr. F9037)
- und der zusätzlichen Kalbs-RNA = *Sigma* Best.Nr. R7250 (Type IV, from calf liver), die ganz zum Schluss zugefügt wird
- die Lagerung erfolgt bei -20°C.

NTE-LösungEndkonzentrationen:

500,0	mM	NaCl
10,0	mM	Tris pH7,5
5,0	mM	EDTA pH8,0
0,1	%	Tween-20

- für 500ml : 50,0 ml 5,0 M NaCl
- 5,0 ml 1,0 M Tris-HCl pH7,5
- 5,0 ml 0,5 M EDTA pH8,0
- 5,0 ml 10,0 % Tween-20
- die obigen Lösungen werden mit 400ml H₂O^{M-DEPC} gemischt und dann mit H₂O^{M-DEPC} auf 500ml aufgefüllt.

MABT

- für 1,0l : 10,0 ml 10,0 % Tween-20
- 990,0 ml MAB
- die Lösungen werden gemischt und sind für mehrere Wochen bei RT lagerbeständig, etwas längere Lagerungen erfolgen bei 4°C (wenn möglich sollte die Lösung frisch angesetzt werden)
- Tween-haltige Lösungen sollten nicht autoklaviert werden.

Endkonzentrationen:

150,0	mM	NaCl
100,0	mM	Maleinsäure
0,1	%	Tween-20
pH 7,5		

10% FCS / 2% Blocking Reagent in MABT

- für 100ml : 10,0 ml FCS
- 20,0 ml 10,0 % Blocking Reagent in MAB
- 70,0 ml MABT
- das bei -20°C gelagerte FCS wird im Wasserbad bei ca. 40°C aufgetaut
- das bei -20°C gelagerte Blocking Reagent in MAB wird bei Bedarf im Wasserbad bei ca. 80°C aufgetaut (oder zusammen mit dem FCS bei 40°C)
- die Lösungen werden frisch gemischt
- wenn gewünscht kann die Lösung für einige Zeit (einige Wochen oder Monate) bei -20°C gelagert werden
- die Lösung darf wegen des FCS nicht autoklaviert werden.

Embryopuder

- 10-30 Mausembryonen des Entwicklungsstadiums E13,5-E15,5 werden mit einer möglichst geringen Menge PBS homogenisiert
- die Proteine werden mit 4Vol. eiskaltem Aceton für 30min auf Eis gefällt
- das Präzipitat wird 10min bei >10.000g abzentrifugiert und mit kaltem Aceton gewaschen
- während das Präzipitat trocknet wird es in einem Mörser zu einem feinen Puder zerrieben
- nachdem das Embryopuder vollständig getrocknet ist, wird es in einem luftdichten Gefäß (z.B. 2ml-Eppi mit Schraubdeckel) bei 4°C gelagert
- sollte das angegebene WMISH-Protokoll mit Hühnerembryonen durchgeführt werden, müssen entsprechend Hühnerembryonen für die Herstellung des Puders verwendet werden.

MABT-Levamisol

- für 100ml : 48,0 mg Levamisol
- 100,0 ml MABT
- das Levamisol (*Sigma* Best.Nr. L9756) wird frisch zum MABT gegeben (löst sich sofort)
- Levamisol hat unter neutralen Bedingungen bei RT oder 4°C eine Halbwertszeit von einigen Stunden, die Lösung kann also nicht gelagert werden.

Endkonzentrationen:

150,0	mM	NaCl
100,0	mM	Maleinsäure
2,0	mM	Levamisol
0,1	%	Tween-20
pH 7,5		

NTMT

- für 100ml : 10,0 ml 1,0 M Tris pH9,5
- 5,0 ml 1,0 M MgCl₂
- 2,0 ml 5,0 M NaCl
- 1,0 ml 10,0 % Tween-20
- zu 82,0ml H₂O^M werden zuerst die MgCl₂-, NaCl- und Tween-20-Lösungen gegeben
- danach wird das Tris pH9,5 zugefügt (Mg²⁺ kann als Mg(OH)₂ ausfallen, wenn es in hoher Konzentration in eine so alkalische Lösung

Endkonzentrationen:

100,0	mM	Tris
100,0	mM	NaCl
50,0	mM	MgCl ₂
0,1	%	Tween-20
pH 9,5		

eingbracht wird)

- da das Mg^{2+} dazu neigt, als $Mg(OH)_2$ auszufallen, muss die Lösung frisch angesetzt werden.

NTMT-Levamisol

Endkonzentrationen:

100,0	mM	Tris
100,0	mM	NaCl
50,0	mM	$MgCl_2$
2,0	mM	Levamisol
0,10	%	Tween-20
pH9,5		

- die Lösung wird wie MABT-Levamisol (s.o.) hergestellt, nur dass anstatt des MABT jetzt NTMT verwendet wird
- Levamisol hat unter alkalischen Bedingungen bei RT oder 4°C eine Halbwertszeit von ca. 10 min, die Lösung muss also unmittelbar vor Gebrauch angesetzt werden.

Glycerin/ H_2O^{M-DEPC} (30 %, 50 %, 80 %)

- 300, 500, bzw. 800ml Glycerin werden mit H_2O^{MC} auf 1,0l aufgefüllt
- die Lagerung erfolgt bei RT.

Drosophila-Experimente

Die Drosophila-Experimente wurden vollständig von Dr. Frieder Schöck in der Abteilung von Prof. Dr. Herbert Jäckle durchgeführt.

Die Immunohistochemie wurde entsprechend der Angaben in González-Gaitán M. und Jäckle H. (1997) durchgeführt. Als primäre Antikörper wurde ein anti- β -Galactosidase- (Cappel) und ein anti-Engrailed/Invected-Antikörper (Patel NH. et al.; 1989). Die Detektion erfolgte mit dem *Vectastain ABC Elite Kit* von Vector. Zur Identifizierung von homozygoten mutanten Embryonen wurden *blue balancer* verwendet. Die gefärbten Embryonen wurden in Canada-Balsam (Sigma) eingebettet oder in Kapillaren aufgezogen (González-Gaitán M. und Jäckle H.; 1997). Kutikula-Präparationen erfolgten nach Wimmer EA. et al. (1996). Die gefärbten Embryonen wurden an einem *Zeiss Axiophot*-Mikroskop untersucht und fotografiert.

Für die Arbeiten wurden die folgenden Stämme verwendet:

- Oregon R als wildtypische Kontrolltiere (WT);
- *btd^{XG81}* (Wimmer EA. et al.; 1993);
- *svb^{YP17b} btd^{XG81}*-Doppelmutanten zur Identifizierung von Kutikula-Strukturen in *btd*-Mutanten;
- *btd-Knk*-Mutanten.

Die *btd-Knk*-Mutanten wurden wie folgt hergestellt: ein 2,2 kb *XbaI-EcoRV*-Fragment der *Knk*-cDNA wurde mit Hilfe von *XbaI*-Linkern in pCbtdRV-2ndAXba (Wimmer EA. et al.; 1997) inkloniert. Zur Erzeugung von transgenen *Drosophila*-Embryonen wurde das Konstrukt zusammen mit einem Helfer-Plasmid in *w sn³*-Embryonen injiziert (Spradling AC. und Rubin GM.; 1982). Es wurde eine transgene Linie gewonnen, die über TM3 balanciert wurde.

Ergebnisse

Amplifizierung von Sp1-typischen Zink-Finger-Sequenzen aus genomischer Maus-DNA

Der Homologie-*screen* wurde mit genomischer DNA aus NMRI-Mäusen durchgeführt. Diese wurde als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Als *primer* wurden insgesamt fünf verschiedene hoch degenerative Oligonukleotide für die Synthese von 5' nach 3' (5'-3') und vier verschiedene Oligonukleotide für die Synthese von 3' nach 5' (3'-5') in allen möglichen Kombinationen eingesetzt (siehe Material und Methoden).

Beginnend bei einer *annealing*-Temperatur von 37°C wurden jeweils 40 Zyklen durchgeführt mit jeweils 1 min. pro Schritt (Denaturierung, *annealing*, DNA-Synthese). Die Analyse der PCR im Agarose-Gel ergab in allen Fällen auf Grund der niedrigen Stringenz multiple Banden und z.T. einen erheblichen Hintergrund. Um mögliche spezifische Amplifikationsprodukte zu erkennen, wurde die DNA mit Hilfe des *Southern-Transfers* auf Nylonmembranen übertragen und bei steigender Stringenz (anfangs 2×SSC/0,5%SCS, am Ende 0,5×SSC/0,5%SCS bei 60°C) mit der Zink-Finger-Box des *buttonhead*-Gens hybridisiert. Die Signale wurden anschließend bestimmten Banden im Gel zugeordnet und die DNA daraus eluiert, kloniert und sequenziert. Schließlich wurden die erhaltenen Sequenzen mit der *buttonhead*-Sequenz verglichen. Je nach Ergebnis wurde die Stringenz im nächsten Versuch etwas erhöht.

Die zu Beginn gewonnenen Klone repräsentierten Sequenzen, die nicht weiter zugeordnet werden konnten. Bei steigender Stringenz wurden Amplifikate erzeugt, die Zink-Finger-Gene der repetitiven Klasse repräsentierten (Daten nicht gezeigt). Bei einer *annealing*-Temperatur von 47°C wurde mit dem *primer*-Paar "btd3" = CACATCTGCCAYATYCCIGGITRYGARMG (5'-3'; *buttonhead*-spezifisch = entspricht der Aminosäuresequenz HICHIPGCE^R/_S des ersten BTZ-Zink-Fingers) und "839" = CGCCAGGTGATCRCTICKCATRAAIC (3'-5'; *Sp1*-spezifisch = entspricht der Aminosäuresequenz RFM^R/_SSDH-"BamHI" des dritten Sp1-Zink-Fingers) neben zahlreichen unspezifischen Produkten auch eine Bande identifiziert, die einer DNA von ca. 230 bp Länge entspricht. Dies korrespondiert mit der vorhergesagten Länge einer Sp1-Zink-Finger-Box, wenn die besagten primer als 5'- und 3'-Begrenzung angenommen werden. Zusätzlich ergab die Bande im *Southern-Blot* ein starkes Signal bis zu einer Stringenz von 0,5×SSC/0,5%SCS bei 60°C. Die Bande wurde aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in *pGEM*[®]-*T* kloniert. 60 Klone wurden präpariert und durch eine *Southern*-Hybridisierung mit der *btd*-Probe erneut

Homologie-*screen* mit degenerativer PCR auf genomischer Maus-DNA

Amplifizierung der Zink-Finger-Box

getestet. 29 Klone zeigten ein stabiles Signal bei 0,5×SSC/0,5%SCS und 60°C. Davon wurden 28 Klone sequenziert, wobei sich folgendes Resultat ergab:

- Anzahl der sequenzierten Klone: 28
- Anzahl verschiedener Sequenzen (=Gene): 3
- Klone pro Gruppe: a) 19
b) 7
c) 2

Die DNA-Sequenzen repräsentativer Vertreter der drei Gruppen sind in der folgenden Abbildung 10 dargestellt.

5 / a)	CACATCTGCC ATATTCCGGG GTGCGAAAGG CTATACGCTA AGACGTCGCA TCTGAAGGCG
43 / b)	----- -C----- ---T--GC-- N-G---GC- ----- C-----
58 / c)	----- ---T--G--- N-G---GC- --G-T----- -----A--C
primer)	CACATCTGCC AYATYCCIGG ITRYGARMG
5 / a)	CACCTGCGGT GGCACAGCGG TGACCGACCC TTCGTGTGCA ACTGGCTTTT CTGCGGCAAG
43 / b)	-----T- -----C--- C--G--G--G ----- -T-----G-- -----T---
58 / c)	--T---C- -----CT-- C--GA-G--T -----C----- -----
5 / a)	CGCTTCACGC GCTCCGACGA GCTGCAGCGC CACCTTCAGA CCCACACCGG GACCAAGAAG
43 / b)	-----T----- -----G -----G-G-- -----G-- CGANG-AGC-
58 / c)	A-G-----T- ----T----- ----G----- --G-G-GC- -T-----C- -GAG-----
5 / a)	TTCCCTGTG CGGTCTGCAG CCGAGGCTTT ATGCGCAGCG ACCACCTAGG CG
43 / b)	---G---CC ---G---A -AA-C---C ---A-----
58 / c)	---A-T--CC T-C---TTC -AANC-----
primer)	GITTY ATGMGIAGYG ATCACCT.GG CG

Abb.10: DNA-Sequenz der PCR-Produkte auf genomischer Maus-DNA. Die Klone Nr. 5, 43 und 58 repräsentieren die drei Gruppen unterschiedlicher Sequenzen. Identische Nukleotide der Klone 43 und 58 relativ zu Klon 5 sind durch Striche dargestellt. Die *primer* sind zum Vergleich mit dargestellt. Zum besseren Verständnis ist die Sequenz des 3'-5'-primers komplementär zur tatsächlichen Sequenz eingetragen.

3 Amplifikate gehören
in die Sp1-Genfamilie

Ein Vergleich der übersetzten Proteinsequenz zeigte, dass die drei repräsentierten Sequenzgruppen bzw. Gene eindeutig in die Familie der Sp1-Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden können (Abb. 11). Außerdem ergab ein Vergleich mit der GenBank-Datenbank, dass keines der drei Gene zum damaligen Zeitpunkt bereits hierin enthalten war.

Sp1)	HI C HI Q CGK V Y G KT S HL R A H LR W H T GER P FM C N W SY C G K R F TR S DEL Q R H K R T H T G E K K F A C P E C P K R F M R S D H L S
5/a)	-- C -- P -- C ER L -- A ----- K -- H -- H S-- D --- V C -- L F C ----- H L Q -- H -- T --- P CA V C SR G ----- G
43/b)	C ----- C -- X -- G ----- H -- H T-- E --- C ----- C ----- H -- R -- X E A -- A C P -- C N K R-- S -----
58/c)	-- C ----- C -- X -- G -- A ----- H -- H T-- E --- C ----- C ----- E -- H V R -- H -- R E--- T CL L C-- X R-----
LKLF)	- T C S Y A -- C G-- T -- T -- S --- K -- H -- T H--- K -- Y H C -- D G C -- W K-- A --- T -- H Y-- K H-- H R P -- Q CH L C D R A -- S --- A

Abb.11: Protein-Sequenz der PCR-Produkte auf genomischer Maus-DNA. Zur Hervorhebung der Homologie der drei repräsentierten Transkriptionsfaktoren mit dem Sp1-Protein ist dieses mit in dem Vergleich enthalten, ebenso wie LKLF als typischer Vertreter der BTEB/KLF-Gruppe. Identische Aminosäurereste sind durch Striche substituiert; die Cystein- und Histidin-Reste sind zur leichteren Orientierung in allen fünf Proteinen eingetragen.

Klonierung von *Knopfkopf*-, *Sp5*- und *Sp6*-cDNA

Die amplifizierten Sequenzen aus der zuvor beschriebenen PCR wurden als ^{32}P -markierte Proben in einem hoch stringenten *screen* einer Maus-cDNA-Bibliothek verwendet (0,1×SSC/0,1 % SDS - 65°C). Diese wurde von Brigit Hogan zur Verfügung gestellt und repräsentiert poly-A-mRNA aus ganzen E8,5-Maus-embryonen. Zur Herstellung der Bibliothek wurden randomisierte Hexanukleotide als *primer* für die Erststrangsynthese verwendet. Die cDNA wurde anschließend in λ -Phagen kloniert und ein Mal amplifiziert. Es wurden bei jedem *screen* ca. 3,5-4,0 Millionen Phagen-Klone dieser cDNA-Bibliothek eingesetzt. Positive Klone wurden vereinzelt und die Phagen-DNA aus Flüssigkulturen isoliert. Die enthaltenen cDNA-Fragmente wurden anschließend ausgeschnitten, in pBluescriptII KS+ bzw. plcBS (s.u.) kloniert und weiter analysiert.

cDNA-*screen* mit den Zink-Finger-Boxen als Sonde

Der *screen* mit Gruppe (a)-PCR-Fragmenten ergab folgendes Ergebnis:

- 3 cDNAs, die ein bis dahin unbekanntes Gen repräsentieren, das im weiteren Verlauf als Sp5 bezeichnet wird;
Sp5 weist ein in der Maus-Embryogenese dynamisches, gewebespezifisches Expressionsmuster auf (s.u.).
- 1 cDNA, die ein bis dahin unbekanntes Gen repräsentiert, das im weiteren Verlauf als Sp6 bezeichnet wird;
Expressionsanalysen mit Sp6 ergaben in der Maus-Embryogenese keine Anzeichen für eine räumlich-zeitlich spezifisch regulierte Genaktivität (s.u.).

Der *screen* mit Gruppe (b)-PCR-Fragmenten ergab folgendes Ergebnis:

- 17 cDNAs, die ein bereits bekanntes Gen repräsentieren (KIAA1285 aus NCBI, accession-no. AB033111 von Nov. 1999 – accession-no. I35492 und I59504 als patentierte Sequenzen vom Mai 1997);
das Gen zeigt eine schwache, ubiquitäre Expression in der Embryogenese und gehört in die repetitive Klasse der Zink-Finger-Proteine;
die zu KIAA1285 gehörenden Klone wurden nicht weiter bearbeitet.
- 2 cDNAs, die ein bis dahin unbekanntes Gen repräsentieren, das im weiteren Verlauf als Knopfkopf (Knk) bezeichnet wird;
Knk weist ein in der Maus-Embryogenese dynamisches, gewebespezifisches Expressionsmuster auf (s.u.).

Der *screen* mit Gruppe (c)-PCR-Fragmenten ergab folgendes Ergebnis:

- aus der E8,5-cDNA-Bibliothek konnten keine Klone identifiziert werden, die unter hochstringenten Bedingungen ein stabiles Signal mit den eingesetzten Proben aufwiesen;
die Arbeit mit der Gruppe (c) wurde eingestellt.

Alle genannten Gene wurden sequenziert und mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung die Genexpression zwischen E8,5 und E10,5 getestet. Entsprechend der Hybridisierungsergebnisse wurden nur *Sp5* und *Knk* weiter analysiert.

Nutzung von *very low copy*-Vektoren (*plcBS*) für die Klonierung

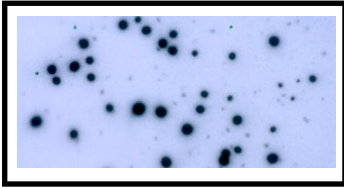


Abb.12: Hybridisierung von rekombinierten Phagen. Die Plaques gehen auf einen vereinzelt Phagen zurück. Man beachte die große Schwankung hinsichtlich der Stärke des Hybridisierungssignals.

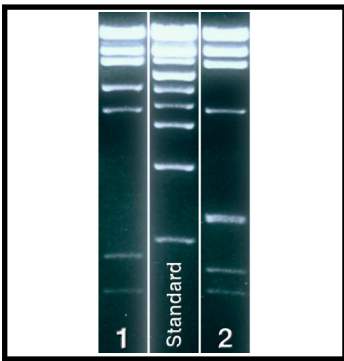


Abb.13: EcoRI-Verdau von DNA-Präparationen klonaler Phagen. Zwei unterschiedlich stark hybridisierende Plaques eines Phagenklons wurden für die Präparation der DNA verwendet. Die Unterschiede bei den Fragmenten sind offensichtlich.

Während des *screens* wurde bei der Vereinzelung der Phagen-Klone folgende Beobachtung gemacht: auch wenn eindeutig ein einzelner Plaque ausgestochen, die Phagen eluiert und neu ausplattiert wurden, zeigte sich bei einer erneuten Hybridisierung eine sehr unterschiedliche Signalstärke der Plaques (unabhängig von der Größe der Plaques). Ein typisches Ergebnis eines *screens* für genomische DNA ist in der Abbildung 12 gezeigt. Die großen Unterschiede in der Signalstärke sind deutlich erkennbar: Einige Plaques erzeugten ein sehr starkes Signal, eine zweite Gruppe erzeugt ein mittelstarkes und eine dritte ein fast nicht mehr sichtbares Signal. Dieses Verhalten war bei den meisten cDNA-Klonen zu beobachten und bei allen genomischen Klonen. Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang beobachtet, dass nach der Umklonierung in *pBluescript®IIKS+* die Bakterien zu einem großen Teil lysierten und nur sehr geringe DNA-Mengen gewonnen werden konnten.

Um zu testen, was die molekulare Grundlage für diese Beobachtung ist, wurde die DNA aus betroffenen Phagen-Klonen untersucht: Dazu wurden Phagen-Klone drei Mal vereinzelt, so dass sichergestellt war, dass es sich bei den untersuchten Phagen tatsächlich um Klone handelt. Plaques, die bei der abschließenden Hybridisierung hinsichtlich ihrer Signalstärke trotz gleicher Größe sehr unterschiedlich waren, wurden ausgestochen und die DNA aus Flüssigkulturen präpariert. Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut und die Ansätze auf einem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die dabei entstandenen Fragmentgrößen wurden verglichen. Es zeigte sich, dass die DNAs trotz klonaler Herkunft deutliche Abweichungen aufwiesen (siehe Abbildung 13).

Zur Verminderung oder vollständigen Unterbindung störender Rekombinationen wurden alle cDNAs und genomischen DNAs in einen *very low copy*-Vektor umkloniert. Die Kopienzahl pro Bakterium liegt bei diesen in ihrer Replikation streng kontrollierten Vektoren bei 1-6 gegenüber ca. 500 bei *pBluescriptIIKS+* (s.u.). Da auch das *Knock Out*-Konstrukt in diesem Vektor erstellt werden sollte und die verfügbaren *low copy*- (z.B. *pBR322*) und *very low copy*-Vektoren (z.B. *pACAY177* bzw. *pACAY184*) nicht geeignet für diese Arbeiten sind, wurde ein eigener Vektor hergestellt: *plcBS* (für "*low copy Bluescript*").

Hierzu wurde der Replikationsursprung (*Ori*) von *pBluescriptIIKS+* mit den Restriktionsendonukleasen SapI (vollständiger Verdau; eine Schnittstelle) und BspHI (partieller Verdau; zwei Schnittstellen) ausgeschnitten. Die Schnittstelle von SapI liegt bei der Base 1037, die benötigte Schnittstelle von BspHI bei der Base 1872. Das *Ori* erstreckt sich von Position 1032 bis 1972 (Angaben nach Stratagene). Es verbleiben also die ersten 100 bp sowie die letzten 5 bp des *Ori* im neu konstruierten Vektor. Das entfernte Fragment hat eine Länge von 835 bp.

Aus *pSC101* wurde mit den Restriktionsendonukleasen HincII und TaqI dessen *Ori* ausgeschnitten. Die Auswahl der Enzyme entspricht eigenen Analysen der Sequenz von *pSC101* und der veröffentlichten Literatur (siehe Diskussion). Die Gesamtgröße des Fragmentes beträgt 1937bp, es ist damit etwa 1,1 kb größer als das zuvor entfernte Stück aus *pBluescriptIIKS+*.

Die Enden der Fragmente wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend ligiert. Der neu konstruierte Vektor ist 4065 bp lang. Alle Enzyme der MCS mit Ausnahme von SpeI schneiden weiterhin nur ein Mal im Vektor. Die Ergebnisse der Präparation von Plasmid-DNA zeigten, dass die Kopienzahl pro Bakterium ungefähr den Angaben von 5-6 für *pSC101* entsprechen.

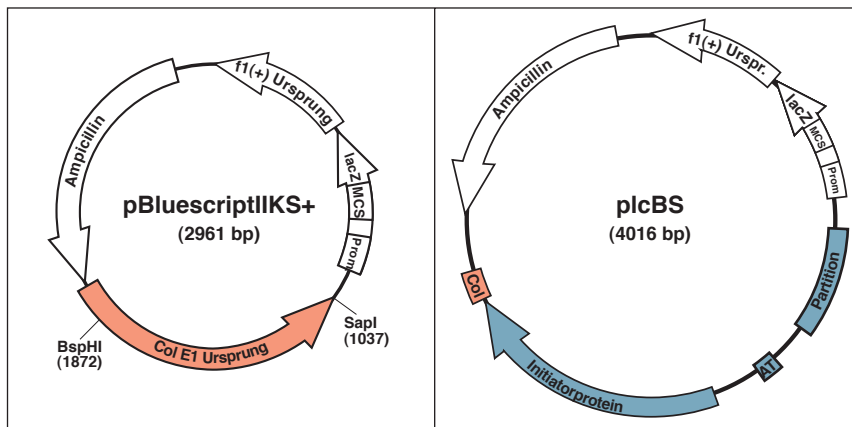


Abb.14: Vergleich der Struktur von *pBluescript*[®] *IIKS+* und *plsBS*. Der Replikationsursprung (*Ori*) ist schematisch dargestellt, wobei die relativen Größenverhältnisse in der Zeichnung berücksichtigt wurden. Das *ColE1-Ori* ist in hellrot, das *pSC101-Ori* mit seinen drei funktionellen Teilbereichen (Initiatorprotein, AT-reiche Region, Partitionslokus) ist in hellblau eingezeichnet. (Abkürzungen: Ampicillin = Ampicillinresistenzgen bzw. β -Lactamasegen, AT = AT-reiche Region, Col = ColE1 Ursprung = Replikationsursprung des ColE1-Plasmids, f1(+)-Ursprung = Replikationsursprung des filamentösen *f1*-Phagen, lacZ = *lacZ*-Gen des lac-Operons, MCS = multiple Klonierungsstelle, Partition = Partitionslokus, Prom = Promoter des *lacZ*-Gens)

Genomische DNA und cDNA, die in *plsBS* kloniert wurde (Wirtsbakterien: DH5 α [®], SURE[®], XL-10Gold[®]) zeigte keine weiteren Veränderungen auf Grund von Rekombinationen etc.. Auch die toxische Wirkung auf die Wirtsbakterien, die bei der Verwendung von *pBluescriptIIKS+* beobachtet wurde, trat nicht mehr auf. Dadurch war es möglich, trotz der geringen Kopienzahl pro Bakterium (ca. 1% im Vergleich zu *pBluescriptIIKS+*) genügend Plasmid in sehr guter Qualität zu präparieren: aus 1,0l *Terrific Broth* (siehe Sambrook J. et al.; 1989 - Seite A2) konnten ca. 400-500 μ g DNA gewonnen werden. Hierzu wurde das Standard-Protokoll (*QIAGEN Plasmid Kit Maxi*) für die Plasmidpräparation nach eigenen Versuchen und Erfahrungen verändert (siehe Material und Methoden).

Für DNA-Präparationen im kleinst-Maßstab (*Mini-Präp*) wurden ca. 2,0 ml *Terrific Broth* eingesetzt. Die Präparation erfolgte mit dem *QIAPrep*[®] *Spin Miniprep Kit* von *Qiagen*, wobei eine Ausbeute von 5-10 μ g DNA erzielt werden konnte (siehe Material und Methoden).

der *pSC101*-Ursprung zur Herstellung eines *very-low-copy*-Vektors

der *plsBS*-Vektor verhindert effektiv die Rekombination von klonierten Sequenzen

1)	CTAAATGTGA	AGCGTTAATA	TTTTGTAAAA	ATTCGCGTTA	AATTTTTGTT	AAATCAGTCT
61)	ATTTTTTAAC	CAATAGGCCG	AAATCGGCAA	AATCCCTTAT	AAATCAAAAAG	AATAGACCGA
121)	GATAGGGTTG	AGTGTGTTC	CAGTTTGAA	CAAGAGTCCA	CTATTAAGA	ACGTGGACTC
181)	CAACGTCAA	GGCGAAAAA	CCGTCTATCA	GGCGATGGC	CCACTACGTG	AACCATCACC
241)	CTAATCAAGT	TTTTTGGGGT	CGAGGTGCCG	TAAAGCACTA	AATCGGAACC	CTAAAGGGAG
301)	CCCCGATTT	AGAGCTTGAC	GGGAAAAGCC	GGCGAACGTG	GCGAGAAAGG	AAGGGAAGAA
361)	AGCGAAAGGA	GCGGGCGCTA	GGGCGCTGGC	AAGTGTAGCG	GTACACGTGC	CGGTAACCC
421)	CACACCCGCC	GCGCTTAATG	CGCCGCTACA	GGGCGCGTCC	CATTCGCCAT	TCAGGTGGG
481)	CAACTGTTGG	GAAGGGCGAT	CGGTGCGGGC	CTCTTCGCTA	TTACGCCAGC	TGGCGAAAG
541)	GGGATGTGCT	GCAAGGCGAT	TAAGTTGGGT	AACGCCAGGG	TTTTCCAGT	CACGACGTTG
601)	TAAACGACG	GCCAGTGAGC	<u>GCGGTAATA</u>	<u>CGACTCACTA</u>	<u>TAGGGCGAAT</u>	<u>TGGAGTCCA</u>
661)	<u>CCGCGTGGC</u>	<u>GGCCGCTCTA</u>	<u>GAAC TAGTGG</u>	<u>ATCCCCCGGG</u>	<u>CTGCAGGAAT</u>	<u>TCGATATCAA</u>
721)	<u>GCTTATCGAT</u>	<u>ACCGTCGACC</u>	<u>TCGAGGGGGG</u>	<u>GCCCGGTACC</u>	<u>CAGCTTTTGT</u>	<u>TCCCTTTAGT</u>
781)	<u>GAGGGTAAAT</u>	<u>TGCGGCTTGG</u>	<u>GCGTAATCAT</u>	<u>GGTCATAGCT</u>	<u>GTTCCTGTGT</u>	<u>TGAAATTTGT</u>
841)	ATCCGCTCAC	AATCCACAC	AACATACGAG	CCGGAACGAT	AAAGTGTAAA	GCCTGGGGTG
901)	CCTAATGAGT	GAGCTAATC	ACATTAATG	CGTTGCGCTC	ACTGCCCGCT	TTCAGTCCGG
961)	GAAACCTGTC	GTGCGAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG	CCGCGGGAGA	GGCGGTTTC
1021)	GTATTGGGCG	<u>CTCTCCGCT</u>	<u>CGACCTGAAT</u>	<u>GGAAGCCGGC</u>	<u>GGCACCTCGC</u>	<u>TAACGGATTTC</u>
1081)	<u>ACCACCTCCG</u>	<u>AGACCCGCCA</u>	<u>TAAAACGCCC</u>	<u>TGAGAAGCCC</u>	<u>GTGACGGGCT</u>	<u>TTTCTTGATC</u>
1141)	<u>TATGGGTAGT</u>	<u>TTCCCTGCAT</u>	<u>GAATCCATAA</u>	<u>AAGGCGCTCG</u>	<u>TAGTGCCATT</u>	<u>TACCCCATTT</u>
1201)	CACTGCCAGA	GCCGTGAGCG	CAGCGAACTG	AATGTCACGA	AAAAGACAGC	GACTCAGGTG
1261)	CCTGATGGTC	GGAGACAAAA	GGAATATTCA	GCGATTGGCC	CGAGCTTGGC	AGGGTGCTAC
1321)	TTAAGCCTTT	AGGGTTTTAA	GGTCTGTTTT	GTAGAGGAGC	AAACAGCTGT	TCCGACATCC
1381)	TTTTGTAAATA	CTGCCGAAGT	GACTAAAAGTA	GTGAGTTATA	CACAGGGCTG	GGATCTATTTC
1441)	TTTTTATCTT	TTTTTATTCT	TTCTTTATTC	TATAAATTAT	AACCACCTGA	ATATAAACAA
1501)	AAAAAACACA	CAAAGGTCTA	GCGGAATTTA	CAGAGGGTCT	AGGAAATTT	ACAAGTTTTTC
1561)	CAGCAAAGGT	CTAGCAGAAT	TTACAGATAC	CCACAATCA	AAGGAAAAGG	<u>ACTAGTAAAT</u>
1621)	ATCATTGACT	AGCCCATCTC	AATTGGTATA	GTGATTAATA	TCACCTAGAC	CAATTGAGAT
1681)	GTATGTCTGA	ATTAGTTGTT	TTCAAAGCAA	ATGAACTAGC	GATTAGCTCG	TATGACTTAA
1741)	CGGAGCATGA	AACCAAGCTA	ATTTTATGCT	GTGTGGCACT	ACTCAACCCC	ACGATTGAAA
1801)	ACCCTACAAG	GAAAGAACGG	ACGGTATCGT	TCACTTATAA	CCAATACGCT	CAGATGATGA
1861)	ACATCAGTAG	GGAAAATGCT	TATGGTGTAT	TAGCTAAAGC	AACCAGAGAG	CTGATGACGA
1921)	GAAGTGTGGA	AATCAGGAAT	CCTTGGTTA	AAGCTTTGA	GATTTTCCAG	TGGACAAACT
1981)	ATGCCAAGTT	CTCAAGCGAA	AAATTAGAAT	TAGTTTTTAG	TGAAGAGATA	TTGCCCTATC
2041)	TTTTCCAGTT	AAAAAATTC	ATAAATATA	ATCTGGAACA	TGTTAAGTCT	TTTGAAAACA
2101)	AATACTCTAT	GAGGATTTAT	GAGTGGTTAT	TAAAAGAAGT	AAACAAAAG	AAAACCTACA
2161)	AGGCAAATAT	AGAGATTAGC	CTTGATGAAT	TTAAGTTTAT	GTTAATGCTT	AAAAATAACT
2221)	ACCATGAGTT	TAAAAGGCTT	AACCAATGGG	TTTTGAAACC	AATAAGTCTA	GATTTGAAAACA
2281)	CTTACAGCAA	TATGAAATGG	GTGGTTGATA	AGCGAGCCCG	CCCGACTGAT	ACGTTGATTT
2341)	TCCAAGTTGA	ACTAGATAGA	CAAATGGATC	TCGTAACCGA	ACTTTGAGAC	AACCAGATAA
2401)	AAATGAATGG	TGACAAAAATA	CCAACAACCA	TTACATCAGA	TTCTCACTCA	CATAACGGAC
2461)	TAAGAAAAC	ACTACACGAT	GCTTTAACTG	CAAAAATTC	GCTCACCGAT	TTTGAGGCAA
2521)	AATTTTTGAG	TGACATGCAA	AGTAAGTATG	ATCTCAATGG	TTGTTCTCTA	TGGCTCACGC
2581)	AAAAACAACG	AACCAACTA	GAGAACATAC	TGGCTAAATA	CCGAAAGGATC	TGAGTTCTTT
2641)	ATGGCTCTTG	TATCTATCAG	TGAAGCATCA	AGACTAACAA	ACAAAAGTAG	AACAACGTGT
2701)	CACCGTTACA	TATCAAAGGG	AAAACGTCC	ATATGCACAG	ATGAAAACGG	TGTAAAAAAG
2761)	ATAGATACAT	CAGAGCTTTT	ACGAGTTTTT	GGTGCATTCA	CCATGAAACG	CCATGAAACG
2821)	ATCGACAATG	TAACAGATGA	ACAGCATGTA	ACACCTAATA	GAACAGGTGA	AACCAAGTAA
2881)	ACAAAGCAAC	TAGAATATGA	AATTGAACAC	CTGAGACAAC	TTGTTACAGC	TCAACAGTCA
2941)	<u>CACATAGACA</u>	<u>CGCTGAAACA</u>	<u>GGCGATGCTG</u>	<u>CTTATCGCAT</u>	<u>GAGATTATCA</u>	<u>AAAAGGATCT</u>
3001)	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAATGAA	GTTTTAAATC	AACTCAAAGT	ATATATGAGT
3061)	AAACTGGTTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	CGCATCTGTC
3121)	TATTTCTGTT	ATCCATAGTT	GCCTGACTCC	CCGTCGTGTA	GATAAAGTACG	ATACGGGAGG
3181)	GCTTACCATC	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCACCGCTCA	CCGGCTCCAG
3241)	ATTTATCAGC	AATAAACCCAG	CCAGCCGGAA	GGGCGGAGCG	CAGAAGTGGT	CCTGCAACTT
3301)	TATCCGCTTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC	TAGAGTAAAGT	AGTTCCGCG
3361)	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTGCCATTG	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCTG
3421)	TTGGTATGGC	TTTATTCAGC	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA
3481)	TGTTGTGCAA	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCTCCGAT	CGTTCGAGA	AGTAAGTTGG
3541)	CCGCAAGTGT	ATCACTCATG	GTTATGGCAG	CACATGATAA	TTCTCTTACT	GTCTGCTCAT
3601)	CCGTAAGATG	CTTTCTGTG	ACTGGTGAGT	ACTCAACCAA	GTCTCTCTGA	GAATAGTGT
3661)	TGCGGCGACC	GAGTTGCTCT	TGCCCGGCGT	CAATACGGGA	TAATACCGCG	CCACATAGCA
3721)	GAAGTTTAAA	AGTGCTCATC	ATTGGAAAAC	GTTCTTCGGG	GCGAAAACCT	TCAGGATCT
3781)	TACCGCTGTT	GAGATCCAGT	TCGATGTAAC	CCACTCGTGC	ACCCAAGTGA	TCTTCAGCAT
3841)	CTTTTACTTT	CACACCGGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGGCAAAAT	GCCGCAAAAA
3901)	AGGGAATAAG	GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT	CTTCCATTTT	CAATATTATT
3961)	GAAGCATTTA	TCAGGTTTAT	TGCTCATATGA	GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA
4021)	ATAAACAAAT	AGGGTTTCCG	CGCACATTTT	CCGAAAAGT		

Abb.15: Sequenz von plcBS. Sequenzteile aus *pBluescript@IKS+* außer der multiplen Klonierungsstelle (MCS): schwarz. MCS: blau. Replikationsursprung aus *pSC101* (außer der SpeI-Schnittstelle): rot. SpeI-Schnittstelle: blau. Die SapI-Schnittstelle (GCTCTTC[N¹/₄]) und der Rest der BspHI-Schnittstelle (TCATGA) sind unterstrichen.

Literatur: Stoker NG. et al.; 1982. Cunningham TP. et al.; 1993. Cohen NS. et al.; 1973. Churchward G. et al.; 1983. Vocke C. et al.; 1983. Meacock PA. et al.; 1980. Miller CA. et al.; 1983. Zurita M. et al.; 1984. Nakano Y. et al.; 1995.

Klonierung und Expressionsanalyse von *Sp6*

Aus dem *screen* mit Gruppe(a)-Sequenzen wurden cDNAs gewonnen, die zwei unterschiedliche Gene repräsentieren. Eines dieser Gene, das im weiteren Verlauf als *Sp6* bezeichnet wird, war durch eine cDNA vertreten.

1	ATGTCTTACG	GTCAAGGGCC	AGTTGCACAC	GAAGGGTCGG
41	TCACCGCTGT	GCCACCGCAG	GTGCGCCTTC	AGATGCGACG
81	TCTTAGCGTA	TGCCTTGCCG	CAGCCTGGGA	TGTGGCAGTT
121	GTGCAAATGC	TTCTTCTTGC	CCCCAAAGGC	TCCCGGCGAT
161	CAGTTCCCCG	CAGCTCAGGG	CAGACCGTGT	GTCGCTGCCC
201	CAACTGCCTG	GAGGCGGAGC	GACTCGGGGC	TCCGTGCGGG
241	CCCGATGGGG	GCAAGAAGAA	GCATTTGCAC	AACTGCCACA
281	TCCCAGGCTG	CGGCAAGGCA	TACGCTAAGA	CGTCGCATCT
321	GAAGGCGCAC	CTGCGGTGGC	ACAGCGGTGA	CCGACCC TTC
361	GTGTGCCTTG	ACC		

Abb.16: Nukleotidsequenz des 373bp-Fragmentes von *Sp6*. Die btd-Box ist in rot dargestellt, der 5'-Bereich der Zink-Finger-Box in rot und fett.

Die cDNA entspricht einem Genfragment von 373bp-Länge. Es enthält einen Teil der Zink-Finger-Box und 5' hiervon weitere 274bp inklusive einer btd-Box. Sieht man von potentiellen Modifizierungsmotiven ab (Phosphorylierungen, N-Myristoylierungen etc.), kodiert der 5'-Bereich neben der BTD-Domäne keine weiteren funktionellen Motive, die mit den verwendeten Suchprogrammen erkannt werden und eine signifikante Trefferwahrscheinlichkeit aufweisen

(*Pfam*; URL = <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>)

ScanProsite; URL = <http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html>

ProfileScan; URL = http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html

InterPro; URL = <http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>

BLOCKS; URL = http://blocks.fhrc.org/blocks/blocks_search.html

IMPALA; URL = <http://blocks.fhrc.org/blocks/impala.html>

ProDOM; URL = http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/doc/blast_form.html

FPScan in *PRINTS*; URL = <http://bioinf.man.ac.uk/cgi-bin/dbbrowser/fingerPRINTScan/muppet/FPScan.cgi>).

1	MSYGQGPVAH	EGSVTAVPPQ	VRLQMRRLSV	CLAAAWDVAV
41	VQMLLLAPKG	SRRSVPRSSG	QTVCRCPNCL	EAERLGAPCG
81	PDGGKKKHLH	NCHIPGCGKA	YAKTSHLKAH	LRWHSGDRPF
121	VCLD			

Abb.17: Aminosäuresequenz des übersetzten *Sp6*-Proteins. Die konservierten Aminosäurereste der BTD-Domäne sind in rot dargestellt, der N-terminale Teil der Zink-Finger-Domäne (ein kompletter Finger und die ersten drei Aminosäurereste des zweiten Fingers) in rot und fett.

Der Vergleich mit den weltweit vorliegenden Sequenzdaten (*BLAST* bzw. *tblastn* auf dem *NCBI*-Server; URL = <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?form=1>) zeigte, dass eine homologe Sequenz im Menschen vorkommt, deren Übereinstimmungsgrad eindeutig auf ein Orthologieverhältnis schließen läßt. Die humane Sequenz liegt nur in genomischer Form vor, so dass der tatsächlich translatierte Bereich nicht eindeutig abgeleitet werden kann. Ihre

Klonierung eines cDNA-Fragmentes von *Sp6*

das cDNA-Fragment kodiert u.a. für einen Teil der Zink-Finger- und der *btd*-Domäne

der Mensch besitzt putative *Sp6*-Orthologe

Zugangsnummer (*accession number*) in der Datenbank lautet AC003665. Sie ist ca. 145 kb lang und Teil des Chromosoms 17 (Klon *hCIT.211_P_7*), der homologe Bereich erstreckt sich von Base 8011 bis 8235. Allerdings zeigt eine überlagernde und gegenläufige Sequenzübereinstimmung im Bereich 8071 bis 8241, dass der Locus einen revers-komplementären Charakter hat. Die Überprüfung dieser komplementären Eigenschaften zeigte, dass fast der gesamte cDNA-Klon in sich selbst komplementär ist und extensive Sekundärstrukturen wahrscheinlich macht. Diese Selbstkomplementarität ist möglicherweise mitverantwortlich ist für die Probleme bei der Klonierung.

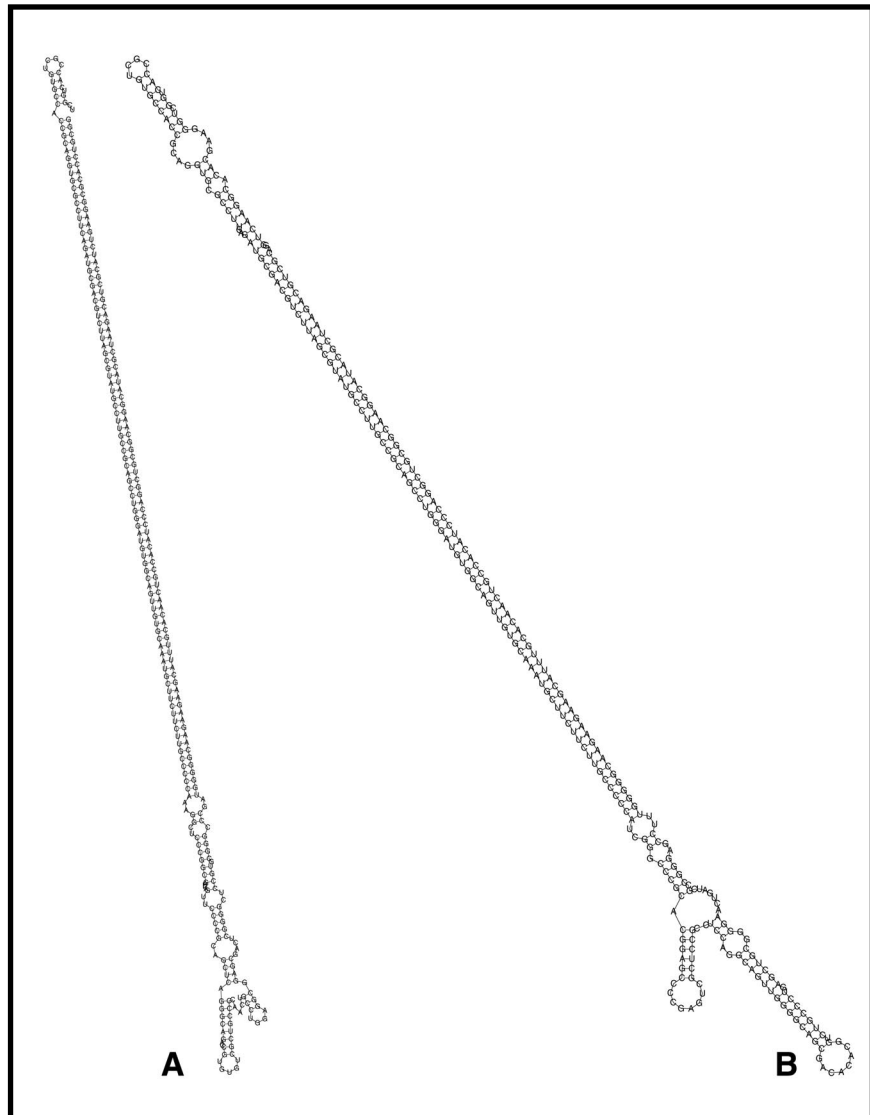


Abb.18: Selbstkomplementarität des cDNA-Klons von *Sp6*. Hypothetische zweidimensionale Darstellung der einzelsträngigen *Sp6*-DNA bzw. -RNA. A) ist die Kalkulation mit der ursprünglichen cDNA-Sequenz, B) ist die Kalkulation für die revers-komplementäre Sequenz. Da das Programm nur 300 Nucleotide als Eingabe akzeptiert, wurden je ca. 35 Nucleotide am 5'- und am 3'-Ende abgeschnitten.

hypothetische genomische Organisation des humanen *Sp6*-Gens

Die hypothetische Übersetzung des vorhandenen offenen Leserahmens im humanen genomischen Klon ergibt ein Protein von mindestens 377 Aminosäuren (siehe Abb. 20). Die genomische Sequenz weist in dem fraglichen Abschnitt 3

ATGs auf, von denen keines eine Übereinstimmung mit den üblichen Sequenzen aufweist, die mit dem Translationsstart in Verbindung stehen (*Kozak-Sequenzen* – Kozak M.; 1987. Kozak M.; 1991. Kozak M.; 1992). Einige Basen 5' von diesem Bereich besitzt der genomische Klon eine typische Spleiß-Akzeptor-Sequenz und innerhalb der weiteren 9,0 kb des Klons einige potentielle Spleiß-Donor-Sequenzen. Diese befinden sich z.T. ebenfalls in kleineren offenen Leserahmen, aber ihre Zuordnung ist unklar (siehe Abb. 19), so dass keine sichere Vorhersage des gesamten humanen Gens möglich ist.

1)	ATGCTTCGTA	GGCCCTGAGG	ACTTGGCAGC	ATCCCTGCTC	CCTCCCTTCAC	CTCCCCCTTT	GGCAGTGCCT	GTCACCTCCP	TATAAAGCC	TGGCTCTTTT
	ATCACGCCA	CTCTCCCTT	ACZKZKZK	CCAGCTGTGG	CGCTGCTTCC	CGCTGCTTCC	CGCTGCTTCC	CGCTGCTTCC	CGCTGCTTCC	CGCTGCTTCC
	GATCCAGCTC	CCACCTCAA	GTGGGGGTCA	TGAGAAGGG	TCTGGTTCCT	AGCCCAAGTG	AGAAGTGGG	TAGGATTTCA	TAGCTGGGAA	CTTTATTTCG
	GGAGAACTAA	AGGATCCCT	TGGAAGTCTT	TGACTGGGC	TGGGGTAGTC	TCACTGCCCT	GAATGACAGA	ACACCTGCAG	GGATAGTAA	GGAGAAACCA
	AGAGAAGAAG	AGGGCAATA	AATGTTAATA	GAATACAGG	GCACACACAC	CTCCTACTCA	AGCCCAAGG	TACACACAGG	CATAATATGT	ACACACATTT
501)	CTATCCACAT	CCTATGGGGA	ACTGCATTTA	CGGTGGAGGA	GAGAAGACAC	TCTTCTAGAC	TGAAAAGCGA	TGGTGGTAGC	TAGGATTTT	GAATTTATA
	GTAGATATAC	ACACACCAC	ATACAGATGC	ACTATCTCTA	GTTGGGTTCA	GTGTTTTTGG	AATGAAATTA	AGGATGAATG	AAAGAAACT	ATTTGACCC
	ATAAATATAG	TGTCACGCTA	TGTGCTTGGC	CTTAAGAGA	CCTCCGATTA	GAGGAGGGGA	ATAAGGAAT	ATGTTGGCAT	CCAGGGTCA	CAGCTTCGAC
	AGCTTTAGGC	TCTATCTGTG	TTTCTAAGAA	TCAGAGAGAT	ATGGTGGGGA	AGTGAGAGA	GGAAAACAGG	ACCAAGCTCT	GGTCTGTGCC	CAGACTCTGT
	GCTTGAAGT	CCAGCCGAG	GTTGGAGATG	GGAAATGGAG	GAGAGGAGTG	AAACAGGAGG	CTTGGACAGG	ACAATTTGGG	GCTAGACACG	CTTTGATATT
1001)	TCTAATCTGC	TACTAATCTC	CCTGTTTTGG	GTTTTGGATT	CCTTACCAGT	TGTAGAGTCT	GACTTGTCTC	AGCAATTCAG	GATGGGATCA	GTTTGTCCAT
	CTCATAGTGC	AATCTCTACA	GGACAGTGA	AGTTTGGAA	GGATCACAG	TGACTCTCAG	ATAGGAGATC	AGGATTTTAT	AGGGTCTTCC	AGAGCTTCTC
	ATTCCTCCAT	ATFGAGGCCA	GATGAGCTAG	TAGGAGGAAT	ACAGGCTTTT	GTGTTCTCTC	ACCTTCAGGC	TCTAGGGAGG	CCAGACTTCC	AGGGTCTATC
	GTAACCTGGC	GTAGATCATT	TACCTCTTCT	GACTTTRGGC	TCCCCTATCT	CTCAGACGCG	TGTGATTAAT	ATTACTTTTC	TGATGCCCA	TGAGAAATAG
	AGATATTTGT	GTAAGGATCT	TGGAACATAG	TAGGTGTCTCA	GTAATAAAT	CGCCTTTTGT	ATAAACACGC	AGACTAATGA	GATTTCTCCA	GGTCAAAAT
	GGATCACTGA	CTATAGATCA	GGTGTAGAA	GAGAGGGGT	GGCAGGAATG	GGGGTTGACG	ACTTGCAGGC	GAATCTGCAC	TATTTATTGG	AGAGAATGAG
	GARAGGACGC	AGAAATGGCC	AGGCTCAAG	AGACATCTCA	GTTTATACAG	GAGATGTGAT	CGGCTGTGTT	GTTCATTTTT	GAGTAGCAAT	AAATATATGG
	GCATTTGGCT	GTGGTGAAGT	TGCTCATTTA	ATTAACATCA	GACCATGGCC	CTCATCTCGG	TGGGAAAACA	TTTAGCAAGT	GGGAAACCAA	AAAGGCTCGA
	AGCAGGGGAC	TGCBAATAGA	GGGGGACTGG	AGGAAGAATA	GTCCCACTAC	CAGGCAGATG	GAGGGTCTTT	GCTGGTGGAA	TCCAGATGG	CTACAGGCTC
2001)	GATTTCCAG	AGCAACTGC	ATTTGTTGGT	AAITTCCTGC	TGATAGCTGT	GTGTTACTCA	TCCCTGGGCT	TAATCTCTGC	TGCTTTCCAG	GGAAAAGCCA
	GGTTGGATGC	GGGACGGGAC	TAAGTGTGAA	GTAGCAGGGA	CTTGGTCCCC	TACCCAGAGT	CAGACCCCTG	CACAGGCTTT	AGCACCTTAG	
	GARAGGGGCA	GGAAAGAGA	GCATCTGAT	GCTATAAAT	GGGAGGGGAA	CCAGAGAGTC	AAATCAGAA	CCAGAGTCCC	CCAATGGGG	CTCTGTTTTG
	GACAGTAGTA	TGCAGACCA	GAAGTCACT	TGAGAGGAGA	GGCAGGAATG	AAACCCCACT	GGCCAGGAT	TGTAGCTGA	ATGATGGAG	ACAAAGCTTC
	GACCTGATGA	GTGTTACTC	CATTCAGAG	GTAGCTGTGA	ACTAGGATAC	ACCCAGTCTC	TGTGATTAAT	CCAGAGGCTC	CCAGATTAAC	AGAGGCTAAA
2501)	TTTGTATGAG	AGGATGATT	GTCAATTTAG	CCATGCCAC	AAAGATCTAG	TCCCTGGCTT	CCAAATACCT	GTCACTTCT	TAGCTTGGT	GCTCCTTTA
	AAACAACCC	GCACATGCA	GAATCTCAA	CCCCCATG	TCAGCGGGCA	GGGTCAAGTT	AGCAATGCA	GGGCTGGGG	TAGAATTTA	ATCCGTCAAC
	CAGCATTTCA	CCAAAGAGA	AATGAGGCT	TAGAGGCACC	TGACCTGCCA	CTGGAATCTA	CTTATTAAT	AATTAACA	AGGATATCTT	CCATTTACC
	TTCTAGTCCA	CAGGCTTTG	TGATCACTC	TTAATCAAC	CAATATTTAC	CTTTAAGCCC	CCAGAGATCC	TACCAATGTT	GTACCAGGT	TGTCGGGAT
	AGGGAATGA	GCTTTAATA	AGAGGGAGAT	GCACAGATGA	ATCCAGCTGC	GATTTCTGAT	AGAAAGCTGT	CGGTGTCTGA	GGGTATACAT	GCACATACG
	ATACACACT	GGATTTGATT	TCCACCCCT	TATGCACTCG	GTTTAGCTAT	TTTTAGTATA	CAGTTTGAAT	GTGTCGAAA	CCGCGTAGCA	GGACAGTAA
	ACCAATGGC	GGGGGACTA	GGGGCTGAT	AGGCCGATT	AAATCAGCT	AAATCCAACT	ATGAATATGA	CTGTAAAGG	GAATAAGAA	TTTTAAAG
	CCGAGGGCAA	AGCCGACAGA	GGAGACGAT	CTGAAAATG	AAAGAATAG	GGAAATTAAT	CTGCAATCCC	CTGTGAAAA	AGGGTTCACA	TGGAGATCT
	AACTCTGGG	CATGGGAGT	AAAGTGGG	CCACTCAGC	GGCCAGGCAC	AAAGATGCTG	GGGTGGAGGA	CGGAATCTCC	TACCCACAG	GTGCTTGGC
3501)	GGTCTCGAAA	ATGTGACCC	ATCCAGATCT	TGAGGGAAGT	TTTTGTGAGC	TCCCGGAGCC	CGCTAAATTT	TTACAGAAAT	ATTCAGATG	ATTCAGATG
	TTTTCTCAAA	GGAAACAAG	ACCCCTCCCC	AAAGTTAGA	ACCTTGGGTT	TAGTATTCTT	GGTGAAGAT	AGAAAGGAT	GGTGGCAAG	GATAGCTCA
	TTCTCTCAAT	ATGCTGAGC	ATCCAGCTCT	TATGCACTCG	GTCTGCTGCT	GCATCTGAGT	GGTGTGAGT	GTGTCGAAA	CCGCGTAGCA	GGACAGTAA
	CGAAGACAG	GAGGGGGAG	AGAGGGGAG	TTGAGAGGCT	GATTTCTTAG	GCATCGGGGT	TCTACTCTAA	GGGAGGGGC	AGAGTACAG	CTCCTGGAC
	CTGGGACAG	AGTAAAGGGG	AAAGCAGAGC	CGGTGTGGG	CAGAGGCTGG	GAGAGGGGAG	GAGAGGAGT	GGTCAACAG	AAAGTTCAGA	GAGGGATACC
4001)	CCGGAAGGGA	GAGGAAAAGA	AAAGCCGGGA	AGGTTGGTGG	TGGAGAGAAG	CGCCCGGGG	TCCCGGGGTT	GAGGCAGGC	AGGGGACGGG	GCTCGGGGTT
	CGGGGAAATG	CCGAGAGAGG	GACGAGCAAA	CAATTTTCAC	ACGGCCTAGG	CTAGAGAGCC	AACTGGAAC	ATACTTGGG	CTCAATTTGG	TTTCTCTTCT
	TCTCCCTAGT	TGGGGGGAG	GGCTCTCGT	TCAGAGAGGG	TCAGGGGCCA	TCGAGAGTAA	CTAGAGGTTG	GTGCTTAAGG	GTGCTCTTGT	CTCCGCCCA
	GGGAGCCG	GGGAGGCTG	GGCTCTCGT	TCAGAGAGGG	TCAGGGGCCA	GGGAGGCTG	CTGCTCTGCT	GGGAGGCTG	GGGAGGCTG	GGGAGGCTG
	AGAACTTGGG	AATCACCCCA	CCCGGGCCCC	CCCTCCRRGG	AGTGAGAGGG	ACCGAGGAGG	ACCGAGGAGG	CGGGGGGGCC	AGCCCTTAGT	TATCTTCTCT
4501)	CCCCCACTCC	GGCCCAACCC	CTCTCTGGGG	CTTCCGGTGG	GCTCCGGCTG	AGCCGAGCCC	TCAAGGTTTA	AAAGGGGGCC	AGGAGGCTG	GGGGGGGGCC
	GGGAGTCCGG	GGGAAAAGCC	AGGCTGGGG	AGAGGATGAA	GGCAGAGAGC	CGGGGTGAGT	CACGGGGGGA	GCTGGCTTTG	TTCCGTCTGT	GGCTCTGCC
	CGCCCTCGCT	CCTCCGCCCC	CTCCGCTCCG	CTCACTCCCG	CGCCCTCGCC	CGCCCGGGCC	CGCCCGGGTT	CTGGCTGCC	CTGGGCTCTC	CGCCCTTAGG
	CTGGGAGAC	TCGCGCGCC	AGAGGGCTGA	TGAGCGACCC	TCAGTAGGCC	CTCCGACAGC	GGCCACCGGA	GGCCCGCCCA	GGCTGAGGT	AGGAGCCGG
	CTGGGGGAG	CCAGGGGGCA	GGCTCTCGCT	GATTTCTCTG	CTCCGCTGCT	CTCCGACAGC	GGCCACCGGA	GGCCCGCCCA	GGCTGAGGT	AGGAGCCGG
5001)	AGGATCTGAG	AGGTTAGAAC	CCCGATGGAG	GGAAAAGCTG	GGGAGCGGGA	GGAGCTGGAG	GGCCACCGGA	GGCTGAGAAC	GGGGCAACT	GGAGCGACTG
	GGACAACAG	AGGACGGGGA	CATTGAGAC	TGGAGTACT	AGCCGGTAT	CCAGAGAGCC	AGAGCCGAT	GGGGATAG	GGTGCACGA	CTTGCCTTCC
	CACCTCGGGG	AGCGAGACTC	CTGGAGTGA	CGCTGTGCTC	TCTCCTTTCC	TGAACTCTTT	TATGGCTTGG	AAATGACCG	GACACATAT	TGGCATCTAA
	TCTCTTCTCC	TCTTCTTCTC	TCAGCTCTGG	GGCAGGTGGG	TCAAGGACCA	TAGAGGCAAC	CTAAGGGTGT	CCACCTAAGG	GTGGCTTCAAT	ATCACCCCCA
	AGAGCTGGCC	CCTCCTCTAT	TCTCCTGGGT	TATGCTCTTG	CATCTTCTGC	TAGACTTACG	CAGCTCCAG	GCAGTCTTTC	ACCCAGTGG	ACTGGTCTTA
5501)	GACACTCAGA	GACCCCGCC	TTTGTGTTTT	TGAAATCTTG	GATCCAGGCT	ATCCATCTCC	AGGCTTGGG	TCTCCACTCT	CTCCGCTGCA	GAGCCTTCTG
	TGAGGCCAG	ATATCTTAG	CCTTCCAG	CTCCAGCCC	TGGGGCAGTT	CCAGAGAGCC	AGAGCCGAT	GGGGATAG	GGTGCACGA	CTTGCCTTCC
	CCCTTCTGT	GCTGGCCCA	CCCGGCTGCT	GCTCCCTTTC	CTGCAACTTC	ACCTCTTTTT	CCTCTTGTG	TAGGGAGCC	GGAGCTGAG	TAGGTGCCCC
	CGTCTCTCT	TCCCTCTC	TCCAGGCT	TCAGTGGCAC	CTCCCTGGTC	CCAGAGGACG	GAG	GATG	TAGCTTAA	GGCCCTGCT
	CATCCTGCC	CTAAGTACT	GGTCTCTCC	CCCCACGTA	GAGAAGACCC	AGGCCACAAA	AGCTGGCCAG	CTAGAGCAC	AGGGCTTCCA	GGCCTTAGG
6001)	AGAGTGGTGG	AGAAAGAGT	GACTCAAG	CCACAGATAT	GTGGTTGAGA	AGCCCTGGG	GGCTCTTAGC	GTCTTAGGG	CTACAGAAA	GATTTGTTTA
	CAGAAATA	GGTCTGAGT	CTCCAGGCTT	TGGAGAGCT	GTGAGGATTA	TGTAGAGAA	GGCTGCTG	GGGAGGCTG	GGGAGGCTG	GGGAGGCTG
	TGCTTCTCT	TCTTCAAA	AAAGAAGATT	GGCTGGAGCA	GGGTCTTCA	ACATTTCTGT	CATATAGAA	TCTTCTTGGT	GTGGGGGGA	GCTTCTGAAA
	AATGATCAT	GCCTTAGATG	CATTTGTTA	TGTCACTTT	TTGGGCAATT	CTTGCCTTCA	GGTCTTGGT	TATGACTCT	TCTTGTGGC	CTCCTCTTCC
	TGCACTGCA	CTTGTATCA	CTTAAAGGG	TGCAATTTGA	TCTTCCAGAG	TTTGTCTTCA	AGCTCTTCT	TGGGAAAGCC	ATTCCTTCCC	AACTTTTAT
6501)	CTGGGCTCC	CCTAGCATG	AGAGGAAGAT	GGGTAGCAGT	CAGAGAGTTG	CTCGGCACGT	GTATGAGTCA	AGAGAGGAT	GGAAATTTGG	TTTTCTTGG
	TGGGGTATC	TCACAGATC	CAGGGGTATC	TGTGCTCAG	AAAGTCTCT	AGCAGAGG	TGAAAGCTC	GTCTTAGGCA	AGGGGGTGG	GGCATGTAG
	TGGTATTG	GGCCCGATG	TGACAGGGC	AGCCGGGAG	CAGCTTAGAC	GGTGAAATG	TTTTCATTT	TGAAACAGT	TCTGGAAATG	CATGGATCT
	CTTTCAAGA	CTCAGACCC	GTTTGAAGCT	TATGAGGGG	CAGTCACTC	GAACTTTGG	TTTTCAAGAA	TAGACATCT	CCTCTCCAT	CTGTATCTG
	AGTTAAACT	GGGAAGTGA	GATGTGTCT	TTATCTCCAT	TTGGGCTGAC	AGCAGCTCTG	GAGGGGGAAA	ATGCCACTC	CCCTTGTGTT	GGCTGGGCA
7001)	CTTGGGTTGG	GGATGGTCT	AGCACTGTG	TGTAGGTTGA	TCTGACCTAC	CATCTGGGA	GTGGCCCAAC	TCTAGGAATG	AGCTGGTCA	TACGGCAGG
	ATCACCCAGA	GGAAAGTGA	CCTCCATCAT	CCTCTGTGCT	TGGATGAGAA	CTCACTTCT	TGAGCCCTTC	CTCGACTCC	CGAATTTCT	AAATCTACT
	CTAGTCTCTG	TCACAGATC	CATCTCTTT	TTAGACTGG	GGCAGAGAG	AGCAGCTG	GTTAGAGGG	AACTGACTC	GGTATTCTC	CTTACTTCT
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	GGCTCACCC	CACCCCGGAT	CCCGGCTG	CTAAGCCGTG	TCTGGGGCTC
	TCTGGGGAGC	CACCCACCG	AAACCCCGCA	CGCCCTCCCG	CGCCGCTCTG	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
7501)	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG	CGAGGACCTG	GAATCCAGCA	GTCCCTTGGC	CCCGGGCCCC	TTTTTCAAAG	TCCCTGACCC	GGACCTTCA	CACCAATTATG	AATCGTGGT
	CAGGCCGACT	CACCCAGGG	CGAGGAGTGG	CTGTGGTGG	GACCTTCTAT	CGGGACACAG	CTGGCTAG	CTCCCCACA	CTCAGGGCCG	GCTGACCTCA
	CTGGCCACG	GGGGGGCT	TTAGGGGGCT	AGCTCGGGA	GGCTCTCTG	CGCCCTGCTG	CTGCTCTG	CACCCACACT	CATGCTGCTC	GACTCTCTG
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
8001)	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG	CGAGGACCTG	GAATCCAGCA	GTCCCTTGGC	CCCGGGCCCC	TTTTTCAAAG	TCCCTGACCC	GGACCTTCA	CACCAATTATG	AATCGTGGT
	CAGGCCGACT	CACCCAGGG	CGAGGAGTGG	CTGTGGTGG	GACCTTCTAT	CGGGACACAG	CTGGCTAG	CTCCCCACA	CTCAGGGCCG	GCTGACCTCA
	CTGGCCACG	GGGGGGCT	TTAGGGGGCT	AGCTCGGGA	GGCTCTCTG	CGCCCTGCTG	CTGCTCTG	CACCCACACT	CATGCTGCTC	GACTCTCTG
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG	CGAGGACCTG	GAATCCAGCA	GTCCCTTGGC	CCCGGGCCCC	TTTTTCAAAG	TCCCTGACCC	GGACCTTCA	CACCAATTATG	AATCGTGGT
	CAGGCCGACT	CACCCAGGG	CGAGGAGTGG	CTGTGGTGG	GACCTTCTAT	CGGGACACAG	CTGGCTAG	CTCCCCACA	CTCAGGGCCG	GCTGACCTCA
	CTGGCCACG	GGGGGGCT	TTAGGGGGCT	AGCTCGGGA	GGCTCTCTG	CGCCCTGCTG	CTGCTCTG	CACCCACACT	CATGCTGCTC	GACTCTCTG
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG	CGAGGACCTG	GAATCCAGCA	GTCCCTTGGC	CCCGGGCCCC	TTTTTCAAAG	TCCCTGACCC	GGACCTTCA	CACCAATTATG	AATCGTGGT
	CAGGCCGACT	CACCCAGGG	CGAGGAGTGG	CTGTGGTGG	GACCTTCTAT	CGGGACACAG	CTGGCTAG	CTCCCCACA	CTCAGGGCCG	GCTGACCTCA
	CTGGCCACG	GGGGGGCT	TTAGGGGGCT	AGCTCGGGA	GGCTCTCTG	CGCCCTGCTG	CTGCTCTG	CACCCACACT	CATGCTGCTC	GACTCTCTG
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG	CGAGGACCTG	GAATCCAGCA	GTCCCTTGGC	CCCGGGCCCC	TTTTTCAAAG	TCCCTGACCC	GGACCTTCA	CACCAATTATG	AATCGTGGT
	CAGGCCGACT	CACCCAGGG	CGAGGAGTGG	CTGTGGTGG	GACCTTCTAT	CGGGACACAG	CTGGCTAG	CTCCCCACA	CTCAGGGCCG	GCTGACCTCA
	CTGGCCACG	GGGGGGCT	TTAGGGGGCT	AGCTCGGGA	GGCTCTCTG	CGCCCTGCTG	CTGCTCTG	CACCCACACT	CATGCTGCTC	GACTCTCTG
	TGCTTCTTGG	CTCTCTAG	GGTCTGCT	AGTCCCTG	GACTCCCTCT	ACCTGGAGCC	TCTCCAACT	TACCAGGGCC	ACAGAGGCC	TGAGGGCCGG
	GACTACCCCT	CCCGCTGCA	GCTCGAGAG	CTCAGAGCC	TCCCGCTGGG	CCCGGAGGTG	GACTTCTCCG	AGGGCTATGA	GCTCCAGGG	GGCTCTCGC
	GGGTAACCTG									

die klonierte Maus-cDNA stimmt nur z.T. mit der humanen cDNA überein

Die in Abb. 19 rot dargestellte Sequenz zwischen Position 7371 und 8505 ist homolog zum murinen Gen Sp6. Die weiter 5'-gelegenen rot hervorgehobenen Bereiche des genomischen Klon sind mögliche Exons, deren Richtigkeit aber nicht überprüft wurde. Es wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, die Art des Homologieverhältnisses einzugrenzen. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen in Abb. 19 zeigt, dass die Übereinstimmung nur in den letzten 75 von insgesamt 117 besteht. Es wurden keine Untersuchungen durchgeführt, um zu klären, ob die Unterschiede darauf beruhen, dass es sich um nicht-orthologe Gene handelt, eine divergente Entwicklung ursprünglich gleicher Gene oder um einen Artefakt im ersten Teil der Sequenz handelt (bei der eigenen cDNA oder beim humanen genomischen Klon).

1)	PSLPPPALGS	MDWTCPLIHS	PWWLVLRPLL	DRASSRAVPH	PAGRVLEFGN	HPTRAPLFGS	(h)
61)	GGDQGGARER	AAHALVIFPP	PLPPTFSSRP	WLGSGFAEFS	RVKGGRRLSV	PPFWSQRQEM	(h)
121)	VFSEVPLTVP	ALTPPRIFAM	LTAVCGSLGS	QHTEAΦHASP	PRLDLQPLQT	YQGHTSPEAG	(h)
181)	DYPSPLQFGE	LQSLPLGFEV	DFSQGYELPG	ASSRVTCEDL	ESDSPLAFGP	FSKLLQPDMS	(h)
241)	HYESWFRPT	HPGAEDGSWW	DLHFGTSWMD	LPHQTQGALTS	FGHFGALQAG	LGGYVGDHQL	(h)
301)	CAPPPHΦHAH	HLLPAAGGQH	LLGPPDGAKA	LEVAAΦESQG	LDSSLDGAAR	PKGSRRSVPR	(h)
	MSYQGGP	VAHEGSVTAV	PPQVRLQMRR	LSVCLAAAWD	VAVVQMLLLA	PKGSRRSVPR	(M)
361)	SSGQTVCRCP	NCLEAERLGA	PCGPDGGKKK	HLHNCHIPGC	GKAYAKTSHL	KAHLRWHS GD	(h)
	SSGQTVCRCP	NCLEAERLGA	PCGPDGGKKK	HLHNCHIPGC	GKAYAKTSHL	KAHLRWHS GD	(M)
421)	RPFVCNWLFC	GKRFTRSDEL	QRHLQTHGT	KKFPCA VCSR	VFMRS DHLAK	HMKTHEGAKE	(h)
	RPFVCLD						(M)
481)	EAAGAASGEG	KAGGAVEPPG	GKGKREAEGS	VAPSN			(h)

Abb.20: Mögliche Aminosäuresequenz des humanen Homologs zu Sp6 und Vergleich der Sequenz mit der des murinen cDNA-Fragmentes. Die Zink-Finger-Domäne ist rot und fett dargestellt, die BT-Domäne rot und normaler Strichstärke. Prolin-Reste sind hellblau dargestellt. Im Vergleich der Mensch- und Maus-DNA sind übereinstimmende Aminosäurereste durch einen vertikalen Strich verbunden. (Abkürzungen: h = human; M = Maus).

die *whole mount in situ*-Hybridisierung zeigte keine eindeutigen Ergebnisse

Der vorliegende cDNA-Klon wurde in einer Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierung (*whole mount in situ* Hybridisierung = WMISH; siehe Methoden) eingesetzt, um das Expressionsmuster des Gens zu testen. Die RNA-Probe wurde auf Mausembryonen eingesetzt, die sich 8,5 bzw. 9,5 Tage entwickelt hatten (E8,5 bis E9,5). Unter verschiedenen Stringenzbedingungen zeigte sich ein schwaches, weitgehend ubiquitäres Hybridisierungssignal. Versuche, mit einem Teilbereich ein möglicherweise anderes, spezifischeres Muster sichtbar machen zu können, haben kein Ergebnis erbracht, was an der geringen Größe des Sp6-Klon liegen dürfte.

es konnten keine weiteren Sp6-cDNA-Fragmente isoliert werden

Um zu testen, ob das erhaltene Signal einer tatsächlich ubiquitären Expression entspricht, wurde versucht, weitere cDNA-Klone zu erhalten. Sollten diese mit dem ursprünglichen Klon nur teilweise überlappen und zusätzlich andere Regionen des Gens repräsentieren, wären diese unter Umständen bessere Proben in einem WMISH-Versuch gewesen. Um neue cDNA-Bereiche zu klonieren, wurde der beschriebenen Sp6-Klon in einem *screen* auf der selben cDNA-Bibliothek (E8,5; polyA-mRNA - siehe oben) eingesetzt. Bei diesem Experiment

konnten keine weiteren *Sp6*-cDNAs gewonnen werden. Eine mögliche Ursache für das Fehlschlagen ist die Ausbildung stabiler Haarnadelstrukturen der Probe, wie sie in Abbildung 18 gezeigt sind. Diese können verhindern, dass eine effektive Hybridisierung stattfindet, was sowohl den *screen*, als auch die *in situ*-Hybridisierung massiv beeinträchtigen kann.

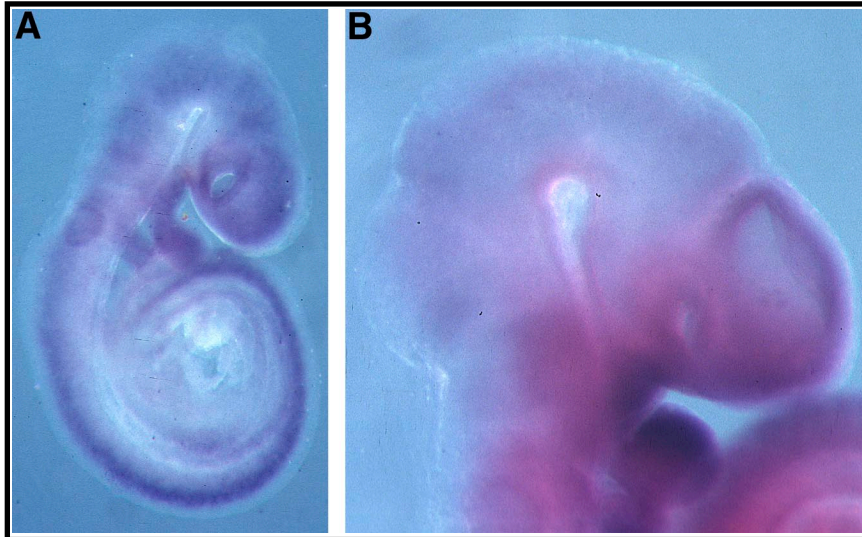


Abb.21: Whole mount *in situ* Hybridisierung eines ca. 9,5 Tage alten Maus-Embryos mit der *Sp6*-Probe. Gezeigt ist ein typisches Ergebnis einer WMISH mit dem vorliegenden *Sp6*-Klon. Das Signal ist schwach und weitgehend uniform im gesamten Embryo. Eine leichte Verstärkung der Farbreaktion im Bereich des ZNS konnte zwar in einigen Fällen beobachtet werden (A, seitliche Ansicht des ganzen Embryo), war aber unter Einbeziehung aller Ergebnisse nicht zu belegen. Gleiches gilt für das z.T. beobachtete Signal im Bereich der Branchialbögen (B, seitliche Ansicht des Kopfes).

Eine weitere Bearbeitung von *Sp6* wurde nicht durchgeführt, da

- die WMISH keine reproduzierbaren Daten hinsichtlich einer spezifischen Expression während der Embryogenese ergab,
- kein weiterer Klon aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden konnte, die bekanntermaßen sehr gut ist und das relevante Entwicklungsstadium zur Klonierung eines *buttonhead*-Orthologs repräsentiert,
- die beiden weiteren Gene (*Sp5* und in besonderem Maße *Knopfkopf*) die gesuchten Kriterien erfüllten (siehe die weiteren Ergebnisse),
- die Sequenzdaten darauf hin deuten, dass *Sp6* eher mit der BTEB/*KLF*-Genfamilie und *Sp5* und verwandt ist als mit *buttonhead* (siehe Einleitung und Diskussion).

Datenbankanalysen (BLAST am NCBI, FASTA am EBI) haben beim Stand vom 16.01.2001 keine weiteren publizierten Sequenzen ergeben, die dem *Sp6*-Gen in der Maus zugeordnet werden können.

Sp6 wurde nicht weitergehend analysiert

Klonierung und Expressionsanalyse von *Sp5*

Die Arbeiten zu *Sp5* wurden als wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht (Treichel D. et al.; 2001).

die isolierten *Sp5*-
cDNA-Klone umfassten
1253 von 1878
Nukleotiden

Wie im Kapitel "Klonierung von *Knopfkopf*-, *Sp5* und *Sp6*-cDNA" dargestellt wurde, konnten neben dem *Sp6*-cDNA-Klon drei weitere Klone isoliert werden, die ein Gen repräsentieren, das im weiteren Verlauf als *Sp5* bezeichnet wird. Die Konsensussequenz der drei Klone ist mit einer Gesamtlänge von 1253 bp in Abbildung 22 dargestellt. Eine Datenbankanalyse (BLAST am NCBI) ergab, dass das korrespondierende *Sp5*-Gen auch von einer zweiten Arbeitsgruppe kloniert worden war (Harrison SM. et al.; 2000). Der Vergleich der eigenen Konsensussequenz mit der von Harrison et al. zeigte, dass die mRNA am 5'-Ende um 636 Nukleotide länger ist als die selbst klonierte cDNA. Der von Harrison et al. beschriebenen Sequenz fehlen mindestens 53 Nukleotide vom 3'-Ende gegenüber der mRNA, wobei die Länge des polyA-Schwanzes nicht bekannt ist.

1)	CGGAGGCACG	CTGGGCGGCC	GTTCGTCTCT	GCCTTCGGGT	GTCCATGCCT	CGGCGGCGGC
61)	CGCGTCTGTC	TCCACAGCGA	GCGGCCTTCA	AGCAGTAGCC	ATGGCCGCTG	TGGCCGTCTCT
121)	CCGGAACGAC	TCACTGCAGG	CCTTCCTCCA	GGACCGCACC	CCCAGCGCCT	CCCCGGACCT
181)	GGGCAAGCAC	TCGCCCTGG	CGCTGCTGGC	CGCCACCTGT	AGCCGGATCG	GCCAGCCCGG
241)	CGCTGCGGGC	GCACCCGACT	TCCTTCAGGT	GCCCTATGAC	CCAGCGCTGG	GTTACCCCTC
301)	CAGACTTTTC	CACCCTTGGA	CTGCCGACAT	GCCCGCGCAC	TCGCCAGGCG	CCCTGCGCGC
361)	CCCACACCCC	AGCCTGGGGC	TGACGCCGCA	GAAACACAC	CTGCAGCCGT	CCTTCGGGGC
421)	AGCCCACGAG	CTCCCCTCA	CGCCCCCGC	GGATCCGTCG	TACCCCTACG	AGTTCGCGC
481)	GGTCAAGATG	CTGCCCTCGA	GCATGGCTGC	TCTGCCTGCC	AGTGCAGCGC	CCGCTACGTC
541)	GCCCTACGCC	GCGCAGCGCG	CGTTGCCCCC	GGGCTACTCC	AACCTGCTGC	CCCCGCGCGC
601)	GCCACCGCCT	CCACCGCCCA	CCTGCCGCCA	GTTATCCCCC	GCCCCGGCTC	CGGACGACCT
661)	CCCCTGGTGG	AGCATCCCGC	AATCGGGGCG	GGGGCCGGGG	AGTCCCGGGG	TTCAGGGGAC
721)	CAGCCTCTCC	AGCGCCTGTG	CCGACCTTCC	CCACGCTCCC	CGTTCCTCTC	CCTCAGCCGC
781)	CGCTGTCTGA	GCGGCGGCTG	CTGCCCTGCA	ACGGGGTCTA	TGTTGGGGCC	CGTCGGACTT
841)	TGCACAGTAC	CAGAGCCAGA	TCGCCGCGCT	GCTGCAGACC	AAGGCCCCCC	TGGCGGCCAC
901)	GGCCAGGAGG	TGCCGCGGCT	GCCGCTGCCC	CAACTGCCAG	GCGGCTGGCG	GTGCCCCCGA
961)	GGCGGAACCG	GGCAAAAAGA	AGCAACACGT	GTGCCACGTG	CCAGGCTGTG	GCAAGGTGTA
1021)	CGGCAAAACG	TCGCACCTGA	AGGCGCACCT	GCGCTGGCAC	ACGGGCGAGC	GGCCCTTCGT
1081)	GTGCAACTGG	CTCTTCTGCG	GCAAGAGCTT	CACGCGCTCG	GACGAGCTGC	AGCGGCACCT
1141)	GCGGACTCAC	ACGGGCGAGA	AGCGTTTCGC	TTGTCCCGAG	TGGGCAAAAC	GCTTCATGCG
1201)	AAGCGATCAC	CTCGCCAAGC	ACGTGAAGAC	GCACCAAAAT	AAGAAGCTCA	AAGTCGCTGA
1261)	GGCCGGGGTG	AAGCGGGAGA	ATCCGCGGGA	CCTATGAGCG	CACCGGGACA	CCTTCGAGGC
1321)	CACTCCTGCC	CAAGACATCT	TTCACGACAC	CCTTGCTGGC	ACACCGAGGT	ACTTGCATTC
1381)	GAGGTAGCTG	ACAAAGAGTA	ACTTTTAAA	TGAACCTTTT	ATTCTCCTCC	GCCCAAGTTC
1441)	TTGCTGTCCA	GCCCAAGAGC	AGAGGGCAGG	GCAGGCAGGA	CAGGAAACTG	GGTCGTAGTT
1501)	GAGTTACCCC	AGGAGGATTC	CAAAGTCCGA	GCCATCGCCT	GCCTGGGAGA	CTTACATTTT
1561)	ACCCAGGGCT	GGCCTTGCTT	GTGGGAGTCG	CTGCTGAAAA	AAAATTTTAA	AAAGAAGGCT
1621)	CTTGGGAGAT	TTAAAACAA	GGCCTAAGTT	TTTGCTAGGC	CCGATTCGGA	CCTTGTACAG
1681)	GTTATTTAAT	AATAGCTTTG	TTAAAGAGTA	ATTATGATTA	TAACGTTAAT	AAATGTTTCT
1741)	GTGTGTTCTA	GCTCCACGCA	GAGCTACAGC	ATGGTACGTT	TCTGTAAAGC	GAACAGCAGT
1801)	TGGCAGCGTG	AAAATAAAAA	CTTCATTCCA	GGGTCTCCTC	GGGAGACCC	CCACAGAAAA
1861)	AAAAAAAAAA	AAAAAAAA	(polyA)			

Abb.22: Nukleotidsequenz der *Sp5*-cDNA. Dargestellt ist die Konsensussequenz der drei eigenen cDNA-Klone (636-1878 Nukleotide) sowie der von Harrison et al. veröffentlichten Sequenz (*accession number* der Sequenz: *NM_022435*; Nukleotide 1-1825). Der Bereich, der den drei eigenen cDNA-Klonen entspricht, ist schwarz umrandet (636 bis 1879). Das vermutliche ATG ist rot unterlegt, das erste Stopptriplett ist rot umrandet. Die *btd*-Box ist mit roten Buchstaben, die Zink-Finger-Box mit roten Buchstaben in Fettdruck hervorgehoben. Das polyA-Signal ist in Grün eingetragen. Die Länge des polyA-Schwanzes ist nicht bekannt.

Die übersetzte Aminosäuresequenz ist in Abbildung 23 wiedergegeben. Das Protein besteht aus 395 Aminosäureresten, die ein rechnerisches Molekulargewicht von 41781 g/mol besitzen. Der statistische Vergleich zeigt eine Überrepräsentanz von Alanin- (15,4%) und Prolin-Resten (14,7%). Die Gesamtladung des Proteins beträgt +18 (23× Asparagin und Glutamin / 41× Arginin und Lysin). Es kodiert für eine Sp1-typische Zink-Finger- und BTD-Domäne. Der N-terminale Bereich ist sehr Prolin-reich und weist eine Polyalanin-Domäne auf.

1)	MAAVAVLRND	SLQAFLLQDRT	FSASFDLGKH	SPLALLAATC	SRIGQFGAAA
51)	APDFLQVFPYD	PALGSPSRLF	HPWTADMPAH	SPGALPPHP	SLGLTPQKTH
101)	LQPSFGAAHE	LELTFPADPS	YPYEFSEVKM	LPSMAALPAS	CAPAYVPYAA
151)	QAALPPGYSN	LLPPPPPPPP	PPTCRQLSPA	SAPDDLFWWS	IPQSGAGPGS
201)	GVPGTSLSAC	AGPPHAFRFP	ASAAAAAAAA	AALQRGLVLG	PSDFAQYQSQ
251)	IAALLQTKAP	LAATARRCRR	CRCPCNQAAAG	GAPEAEPGKK	KQHVCHVPGC
301)	GKVYGKTSHL	KAHLRWHTGE	RPFVCNWLFC	GKSFTRSDEL	QRHLRTHTGE
351)	KRFACPECGK	RFMRSDHLAK	HVKTHQNKKL	KVAEAGVKRE	NPRDL

Abb.23: Translatierte Aminosäuresequenz des Sp5-Proteins. Die Zink-Finger-Domäne ist rot und fett gedruckt, die BTD-Domäne ist normal gedruckt. Prolin-Reste sind in blau dargestellt, die Alanin-reiche Domäne ist gelb unterlegt.

Die Analyse mittels *WMISH* vom embryonalen Tag 7,25 bis 10,5 (E7,25 - E10,5) zeigte für *Sp5* eine dynamisch regulierte Genaktivität in zwei Phasen:

1. eine frühe Aktivität, die mit der primären und sekundären Gastrulation in Verbindung steht,
2. eine zweite Aktivität während der Organogenese, die insbesondere das Zentrale Nervensystem umfasst.

Am E7,25 war *Sp5* in der gesamten Region des Primitivstreifens exprimiert (Abbildung 24A) mit Ausnahme des darunter liegenden viszeralen Endoderms (Abbildung 25A). Wie weit die in Abbildung 24A und 24C sichtbare laterale Ausdehnung der Expression zwischen E7,25 und E8,00 reicht, konnte nicht geklärt werden. Sowohl das Neuroektoderm als auch das einwandernde Mesoderm wiesen im seitlichen Bereich Zellen auf, in denen keine *Sp5*-mRNA nachweisbar war (Abbildung 25A).

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung blieb das ISH-Signal hinsichtlich der gastrulationsspezifischen Expression auf den sich zurückziehenden Primitivstreifen beschränkt (Abbildung 24E-I). Am E8,00 war das posteriore Ende des Neuroektoderms und das darunter liegende Mesoderms *Sp5*-positiv (Abbildung 24D). Mit Einsetzen der sekundären Gastrulation und Bildung der Schwanzknospe waren nur noch dort Transkripte detektierbar (Abbildung 25I). Gleichzeitig veränderte sich auch die Expression im Ektoderm: das Neuroektoderm, das an der Gastrulation beteiligt ist, exprimiert *Sp5* (s.o.). Das Ektoderm, das die Mesenchymzellen der Schwanzknospe umschließt und nicht mit dem Gastrulationsprozess assoziiert ist, war dagegen *Sp5*-negativ (Abbildung 25E).

die abgeleitete Sp5-Proteinsequenz umfasst 395 Aminosäurereste, die u.a. eine Zink-Finger- und btd-Domäne bilden

whole mount in situ-Hybridisierung zur Analyse der Sp5-Expression

Sp5-Expression während der Gastrulation

In der primären Gastrulation waren die Transkripte bis mindestens E8,25 im gesamten Bereich der Neuralplatte nachweisbar; nur die Ränder, die später nicht Teil des Neuralrohres werden, sondern als Neuralleistenzellen auswandern, zeigten keine Farbreaktion. Es wurden allerdings keine spezifischen Marker für frühe Neuralleistenzellen wie z.B. *Cadherin-6B* oder *Slug* (Nakagawa S. und Takeichi M.; 1995. Nieto MA. et al.; 1992. LaBonne C. und Bronner-Fraser M.; 1999) getestet, um die Identität der *Sp5*-freien Zone zu überprüfen.

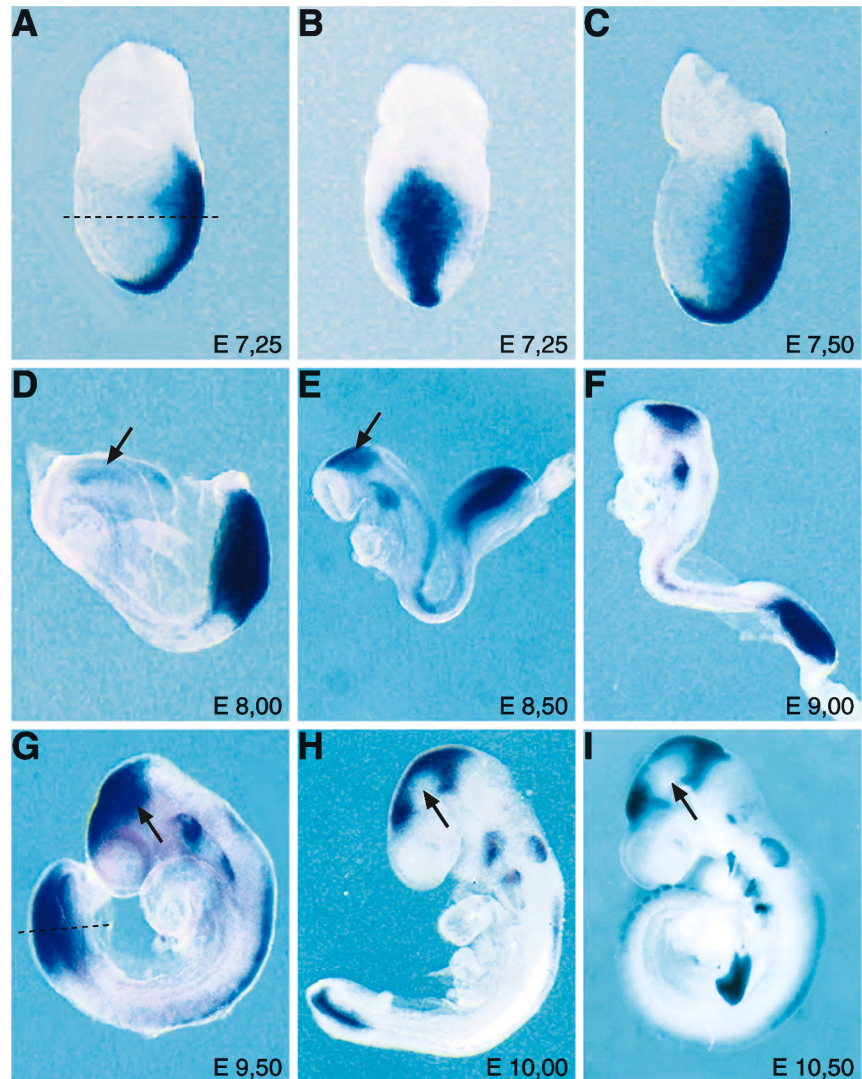


Abb.24: *Sp5* ist in zwei Phasen während der Embryogenese exprimiert: in der Gastrulation und in der Organogenese. Whole-mount in situ-Hybridisierungen von Mausembryonen vom E7,25 bis E10,50. In (A) und (C) ist anterior links und posterior rechts. (B) zeigt den posterioren Teil des Embryos aus (A). Die Pfeile in (D) und (E) zeigen die beginnende Expression im ZNS, die Pfeile in (H) und (I) die Inaktivierung des Gens im lateralen Mesenzephalon.

Sp5-Expression in der Chorda dorsalis

Während der Gastrulation wird das Mesoderm gebildet, das weitgehend *Sp5*-positiv war (siehe oben). Auch im definitiven Endoderm und der Chorda dorsalis (Notochord) konnte die mRNA in großen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 25C). Interessanterweise änderte sich die Expression in der Chorda dorsalis mit dem Übergang von der primären zur sekundäre Gastrulation. In allen während der primären Phase gebildeten Zellen der Chorda konnte die mRNA

nachgewiesen werden (Abbildung 25C). In dem Teil der Chorda, der aus der Schwanzknospe hervorgeht und direkt mit diesem kontinuierlich ist (Abbildung 25D) zeigte nur die innerste Zelle eine Farbreaktion in der WMISH, während die sie umgebenden Zellen der Chorda *Sp5*-negativ waren (Abbildung 25F).

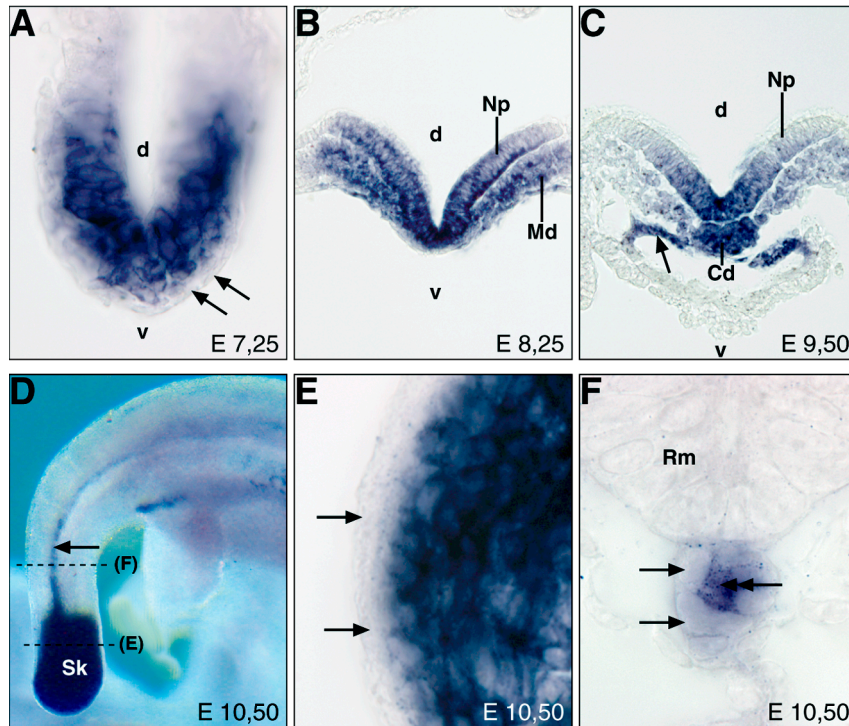


Abb.25: Sp5-Expression während der primären (A-C) und sekundären Gastrulation (D-F). (A) Horizontaler Schnitt durch den Embryo aus Abb.24A entlang der gestrichelten Linie. Pfeile: *Sp5*-negative Zellen des viszeralen Endoderms. Die lateralen *Sp5*-negativen Zellen des Mesoderms liegen außerhalb der Fokusebene. (B) E8,25 - Cross-Schnitt durch caudale Region des Embryos - Färbung in der Neuralplatte und dem darunter liegende Mesoderm; die laterale Grenze war fließend. Das viszerale Endoderm ist negativ, was in der Aufnahme nicht erkennbar ist. (C) Cross-Schnitt durch den Embryo in Abb.24G entlang der gestrichelten Linie - *Sp5*-Expression im gesamten Durchmesser der Chorda dorsalis. Pfeil: *Sp5*-positives definitives Endoderm. (D) E10,50 - Seitenansicht der Schwanzknospe - Pfeil: Chorda dorsalis-Expression. (E) Querschnitt durch die Schwanzknospe aus (D) entlang der markierten Linie. Pfeile: *Sp5*-negatives Ektoderm. (F) Schnitt durch die Chorda dorsalis in (D) entlang der markierten Linie. Einfache Pfeile: *Sp5*-negative äußere Zellen der Chorda dorsalis; Doppelpfeil: einzelne innenliegende *Sp5*-positive Zelle. (D) WMISH - (A-C,E,F) Paraffinschnitte durch Embryonen nach WMISH. Abkürzungen: Cd=Chorda dorsalis, d=dorsal, Md=Mesoderm, Np=Neuralplatte, Rm=Rückenmark, Sk=Schwanzknospe)

Die zweite Phase der *Sp5*-Expression begann ca. am E 8,00. Zu diesem Zeitpunkt war der gesamte Embryo mit Ausnahme des posterioren Endes (Ort der primären Gastrulation) *Sp5*-negativ. Innerhalb der nächsten zwei Tage wurde das Gen in einem spezifischen Muster in verschiedenen Regionen des Embryos in der Organogenese aktiviert.

Organogenese-
spezifische *Sp5*-
Expression

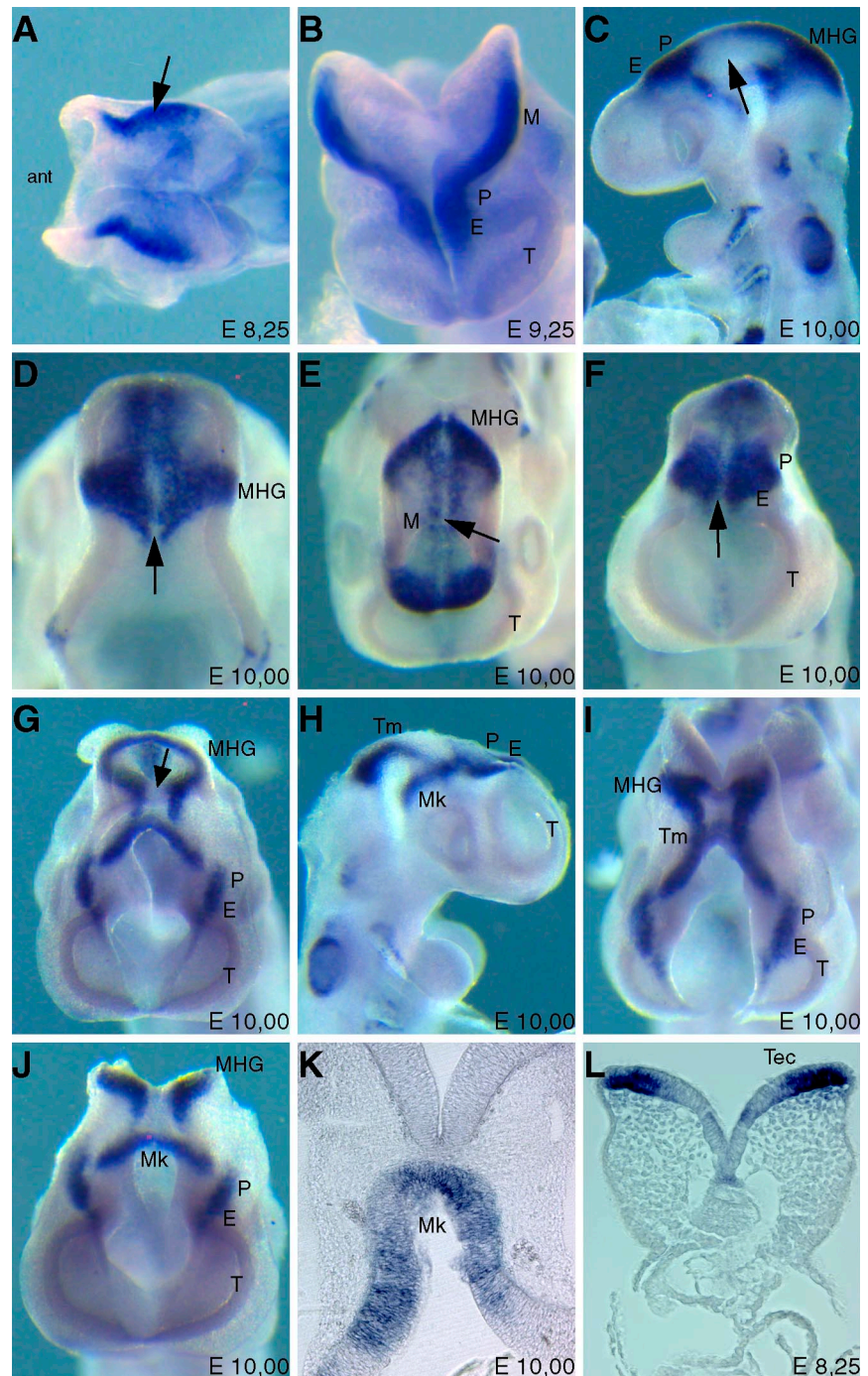


Abb.26: Expression von Sp5 im Gehirn. (A) E8,25 - Aufsicht - Expression im Mes- und Diencephalon. Pfeil: Signal in den Neuralfalten. (B) E9,25 - Aufsicht - Färbung in den Neuralfalten des Mesenzephalons und Prätektums sowie der Anlage des Epithalamus. (C-K) E10,0 (C) Seitenansicht des Kopfes - ISH-Signal im Prätektum und Epithalamus sowie ringförmige MHG-Expressions. Pfeil: expressionsfreie laterale Zone des Mesenzephalons. (D-F) Aufsicht - Pfeile: Sp5-mRNA-freie Deckplatte. (G) Aufsicht nach Entfernen des dorsalen Tel- und Diencephalons - Pfeil: Sp5-negative Bodenplatte in der MHG. (H) Seitenansicht bzw. (I,J) Aufsicht nach zusätzlicher Entfernung des dorsalen und lateralen Mesenzephalons - Expression im mesenzephalen Tegmentum ausgehend von der MHG, laterale und ventrale Färbung des Prätektums / Anlage des Mammilarkörpers. (K) Schnitt durch die Anlage des Hypothalamus mit ISH-Signal in der Bodenplatte. (L) E8,25 - frontaler Schnitt durch das Mesenzephalon mit dorso-lateralem Sp5-Signal.

Das erste Anzeichen für die Expression in der zweiten Phase war eine leichte Farbreaktion in der WMISH im Bereich des Mesenzephalons und Dienzephalons (Pfeil in Abbildung 24D). Innerhalb der nächsten 12h der Embryonalentwicklung nahm die Expression deutlich an Stärke insbesondere im dorso-lateralen Bereich (Pfeil in Abbildung 24D und 26A) zu.

Im Dienzephalon war die Sp5-mRNA nur in der Region des prospektiven Prätektums und Epithalamus nachzuweisen (Abbildung 26A und C). Das Telenzephalon zeigte bis E10,5 kein Signal in der WMISH (Abbildung 26A und C).

Im Mesenzephalon waren bis zum E9,5 sowohl die dorsalen als auch die lateralen Bereiche Sp5-positiv (Pfeil in Abbildung 24G). Lediglich die äußersten Bereiche der Neuralfalten und, nach der Fusion der Neuralfalten und Ausbildung des Neuralrohres aus der Neuralplatte, die Dachplatte zeigten keine Signale in der WMISH (Abbildung 26L und Pfeil in Abbildung 26E). Während der weiteren Entwicklung bis E10,5 verschwand die Expression in den lateralen Bereichen (Pfeile in Abbildung 24H und I sowie 26C). Einzige Ausnahme hiervon war die sogenannte Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG). Diese zeigte in allen untersuchten Stadien entlang ihrer gesamten dorsoventralen Achse ein sehr starkes Hybridisierungssignal. Lediglich in der Dach- (Pfeile in Abbildung 26 D-F) und der Bodenplatte (Pfeil in Abbildung 26G) konnte keine Sp5-mRNA nachgewiesen werden. Zusätzlich entstand in der Entwicklung vom E9,5 bis E10,5 eine weitere Expressionsdomäne im mesenzephalen Tegmentum ("Tm" in Abbildung 26H und I), die aber ebenso wie in der MHB nicht bis in die Bodenplatte hinein reichte (Pfeil in Abbildung 26G).

Im Gegensatz zum Mesenzephalon konnten im dienzeptalen Prätektum auch im lateralen und ventralen Bereich bis zum E10,5 Sp5-Transkripte gezeigt werden. Diese finden sich in einem Streifen, der sich von der Basis des prospektiven Prätektums bis in den tuberalen Hypothalamus erstreckt, welcher später die Mammilarkörper bildet (Tm bzw. Mk in der Abbildung 26 G-K). Die Anlage der Mammilarkörper ist die einzige ZNS-Struktur, in der Sp5 auch in der Bodenplatte exprimiert wird.

Im Rückenmark konnten Sp5-Transkripte ab dem E8,0-8,25 nachgewiesen werden. Das entsprechende Signal wies in allen folgenden Stadien bis zum E10,5 ein Maximum in der oberen Thoraxregion auf und verschwand graduell in Richtung des Rautenhirns und der Schwanzknospe (Abbildungen 24G-I, Pfeil in 27A). Färbte man im Verlauf der WMISH nur kurz, konnte man erkennen, dass das Signal nicht gleichmäßig in allen Zellen des entsprechenden Bereiches auftrat, sondern in vereinzelt, z.T. in Gruppen auftretenden Zellen (Pfeil in Abbildung 27B). Bezogen auf die dorsoventrale Achse fanden sich Sp5-exprimierende Zellen ausschließlich im am weitesten dorsal gelegenen Bereich der Alarplatte (Flügelplatte) (Pfeil in Abbildung 27C). Die Dachplatte zeigte jedoch kein Signal.

Weitere Expressionsdomänen mit Bezug zum ZNS waren die otischen Vesikel sowie die Anlage des trigeminalen Ganglions. Die Anlage des Trigeminus konnte

Sp5-Expression im
prospektiven Gehirn

Sp5-Expression im
prospektiven
Rückenmark

Expression in der Ohr-
anlage und Trigeminus

ab ca. dem E10,0 deutlich in der WMISH angefärbt werden (Pfeile in Abbildung 27D-F). Die otischen Plakoden waren etwa ab dem E9,0-9,5 Sp5-positiv, allerdings nur sehr schwach (z.B. in Abbildung 24G nicht erkennbar). Die Vesikel zeigten dagegen ab dem E10,0 eine klare Färbung (Abbildung 27G). Diese umfasste jedoch nicht das gesamte Vesikel, sondern nur die medio-dorsalen Teile, welche unmittelbar an das Neuralrohr angrenzten (Abbildung 27H, I).

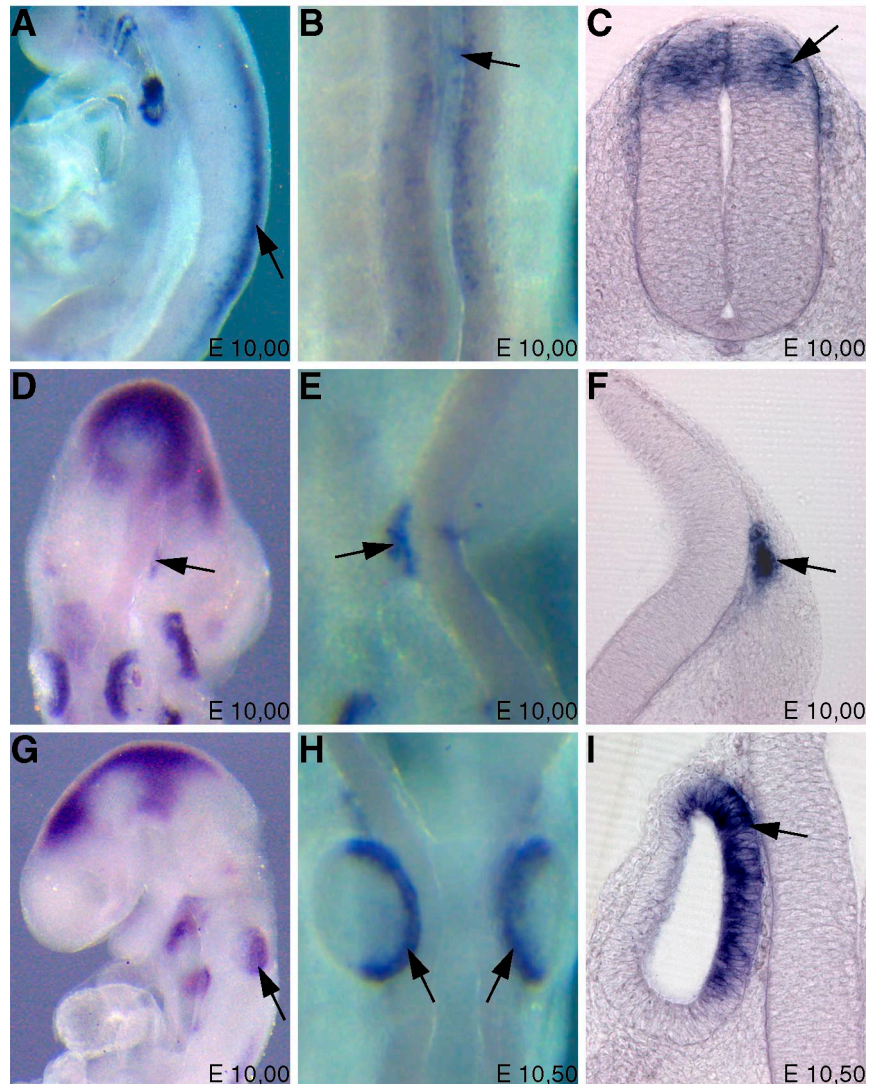


Abb.27: Expression von Sp5 im Rückenmark, den Trigeminalganglien und den otischen Vesikeln. (A-G) E10,0 - (H,I) E10,5). (A-C) Expression von Sp5 im Rückenmark. (A) Dorso-laterale Ansicht auf Höhe des präsumptiven Thorax' - Pfeil: Expression von Sp5. (B) Detail-Aufnahme aus (A) - Pfeil: Einzelne Sp5-positive Zellen. (C) Vibratomschnitt durch Embryo auf Höhe des Pfeils in (A) - Pfeil: Expression im am weitesten dorsal gelegenen Teil des Rückenmarks. (D-F) Expression im trigeminalen Ganglion. (D) Lage des Signals an den Außenwinkeln des vierten Ventrikels (Pfeil). (E) Nahaufnahme der WMISH-Färbung - Pfeil: Anlage des Ganglions. (F) Vibratomschnitt durch die Ganglionanlage - Pfeil: Färbung in der Anlage. (G-I) Expression von Sp5 in der Ohr-Anlage. (G) Seitenansicht - Pfeil: Signal im otischen Vesikel. (H) Detailaufnahme der otischen Vesikel - Pfeil: Sp5-positive dorso-mediane Region des Vesikels. (I) Vibratome-Querschnitt durch Vesikel in (H) - Pfeil: Expression im dorsalen und medianen Teil des Vesikels (zeigt, dass die Expression trotz des Eindrucks aus (H) nicht ringförmig ist). (A,B, D, E, G, H = *whole mount in situ*-Hybridisierungen / C, F, I = Vibratome-schnitte durch Embryonen nach *whole mount in situ*-Hybridisierungen).

Abgesehen von den genannten Regionen, die entweder mit dem Prozess der Gastrulation oder dem Nervensystem in Verbindung stehen, konnten Sp5-Transkripte in drei weiteren Bereichen der untersuchten Embryonen nachgewiesen werden: im Branchialbogen-System, den Somiten und den Extremitäten.

Mit der Ausbildung des 2. Branchialbogens begann die Expression in den dazwischen liegenden Furchen (Ektoderm) und Taschen (Endoderm) (Abbildung 28A, B). Im Laufe der fortschreitenden Bildung weiterer Branchialbögen war die mRNA auch in den zweiten und dritten Branchialfurchen und -taschen nachzuweisen (Abbildung 24G-I und 27G). Lediglich die vierte Furche und Tasche waren Sp5-negativ (Abbildung 28A).

In den individuellen Somiten war die mRNA nur für einen Zeitraum von jeweils 15-20 Stunden während ihrer Entwicklung nachweisbar, was auf den Embryo bezogen bedeutet, dass ca. 10-12 Somiten gleichzeitig Sp5 exprimieren (Abbildung 24I und 28E). Die früheste Expression konnte ca. ab dem E 8,0 nachgewiesen werden (Pfeile in Abbildung 28D). Das Signal trat 1-2 Somiten rostral der Kondensationszone der Somiten auf, was etwa 2 Stunden nach deren Entstehung entspricht. Die stärkste Färbung trat ca. in den Somiten Nr. 8 auf. Von dort aus verschwand das Signal nach caudal (in die Entstehungszone) und rostral (Bereich der weiteren Differenzierung). Im Querschnitt wurde sichtbar, dass Sp5 nur in der epaxialen Dermomyotomlippe exprimiert wurde, also dem proliferativ aktiven Gewebe unmittelbar neben dem Rückenmark (Abbildung 28D und I).

In den Extremitäten konnte die Sp5-mRNA in einzelnen Zellen kurz nach der Entstehung der Beinknospen nachgewiesen werden. Diese liegen vereinzelt im Mesenchym der Anlage (Pfeile in Abbildung 28G). Die Zellen sind zuerst nur dorsal zu erkennen (Abbildung 28G, 28H zeigt dieselbe Beinknospe von ventral ohne sichtbare WMISH-Signale). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurde die Expression deutlich stärker, sowohl hinsichtlich der Färbung einzelner Zellen als auch der Anzahl der Zellen (Abbildung 28I). Ab dem in Abbildung 28I gezeigten Stadium waren die positiven Zellen auch auf der ventralen Seite nachweisbar.

Zusammenfassend ergab sich folgendes Bild hinsichtlich der Sp5-Expression:

Phase 1: Expression in der primären (ab ca. dem E 7,25) und sekundären Gastrulation. Die Expression erstreckt sich auf das Neuroektoderm und Teile des Mesoderms. Das primitive Endoderm ist negativ.

Phase 2: Expression in der Organogenese. Diese umfasst das ZNS mit einer komplexen Expression im Di- und Mesenzephalon sowie der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze, weiterhin das Rückenmark, die trigeminalen Ganglien und die otischen Vesikel. Neben dem ZNS findet sich die Sp5-mRNA in Teilen des definitiven Endoderms, der Chorda dorsalis, dem Branchialbogen-System, den Somiten und den Extremitäten.

Sp5-Expression im Branchialbogen-System

Expression in den Somiten

Expression in den Extremitäten-Anlagen

Zusammenfassung

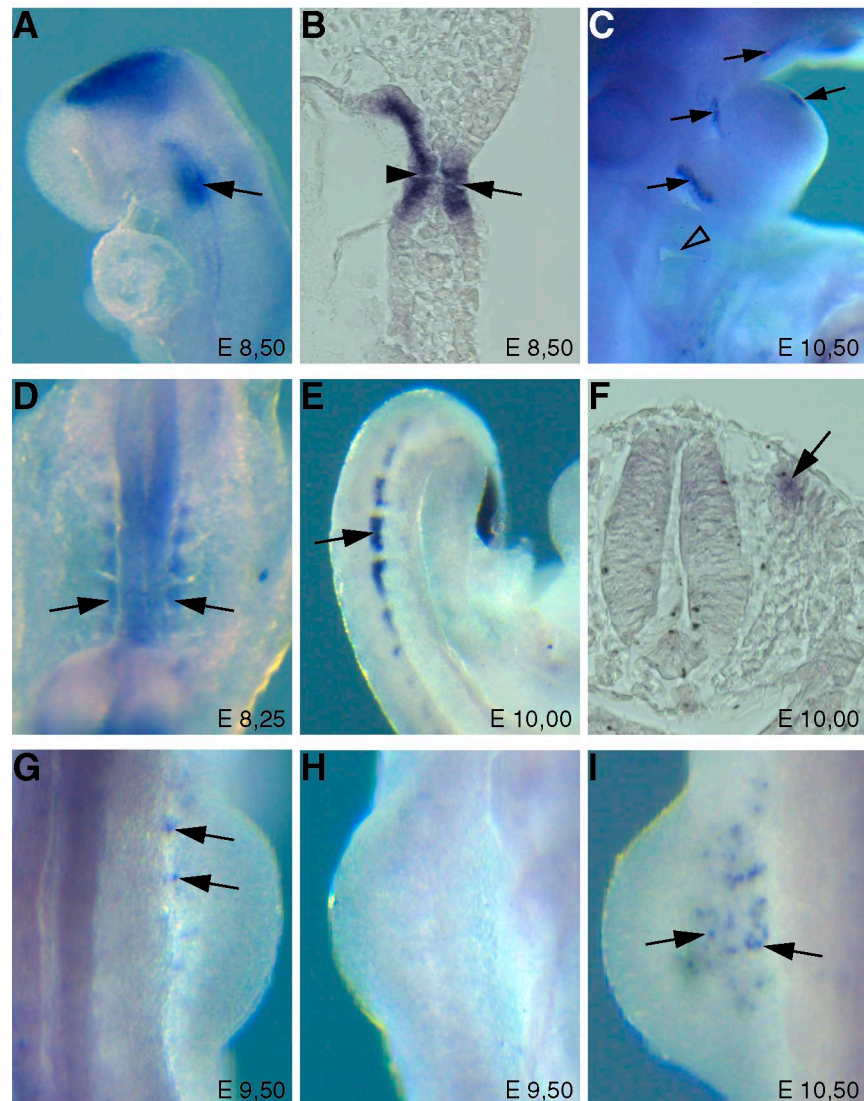


Abb.28: Expression von *Sp5* im Viszeralbogensystem, den Beinknospen und den Somiten. (A-C) Expression von *Sp5* im Viszeralbogensystem. (A) E8,0 - Seitenansicht des Kopfes - Pfeil: Hybridisierungssignal der ersten viszeralen Furche/Tasche. (B) E8,50 - frontaler Paraffinschnitt durch Embryo in (A) - Pfeil: *Sp5*-positive Viszeralfurche - Pfeilkopf: *Sp5*-positive Viszeraltasche. (C) E10,5 - Viszeralbogensystem. Pfeile: Expression in den ersten drei Viszeralfurchen - leerer Pfeilkopf: *Sp5*-negative vierte Viszeralfurche. (D-F) Expression von *Sp5* in den Somiten. (D) E8,25 - dorsale Ansicht auf Rückenmark und Somiten - Pfeile: WMISH-Signal in den Somiten. (E) E10,0 - dorso-laterale Ansicht der Somiten auf lumbaler Höhe - Pfeil: Färbung des achten Somiten von der Schwanzknospe aus gezählt. (F) E10,0 - Paraffinquerschnitt durch Somit in (E) - Pfeil: Expression in der epaxialen Dermomyotom-Lippe. (G-I) Expression in den Beinanlagen. (G) E9,50 - dorsale Ansicht der frühen Vorderextremitätenanlage - Pfeile: Einzelne Zellen oder Gruppen von Zellen mit Färbung. (H) wie (G), aber ventrale Ansicht - es ist keine Färbung erkennbar. (I) E10,50 - dorsale Ansicht der Extremitätenanlage - Pfeile: Einzelne Zellen oder Gruppen von Zellen mit Färbung.

Da das beschriebene Expressionsmuster nur teilweise den Erwartungen für ein Ortholog des *buttonhead*-Gens entspricht (siehe Einleitung und Diskussion), wurde das *Sp5*-Gen nicht über die vorliegende Beschreibung hinaus analysiert.

Klonierung von Knopfkopf und "Artefact "

Wie weiter oben dargestellt, konnten mit den PCR-Amplifikaten der Gruppe (b) insgesamt 19 cDNA-Klone isoliert werden. Hierzu wurde erneut die bereits beschriebene E8,5-Maus-Bibliothek verwendet.

Die erste Zuordnung der cDNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der *whole mount in situ* Hybridisierung. Diese zeigten keine Unterschiede des Expressionsmusters, außer dass die WMISH-Sonden unterschiedlich starke Hintergrundfärbung verursachten (s.u. / im Unterschied zum WMISH-Protokoll aus dem Methoden-Teil wurde kein RIPA-Puffer verwendet und die Waschschriffe erfolgten bei 65°C anstatt bei 70°C). Da die eingangs durchgeführten Sequenzierungen nur kurze Sequenzen von schlechter Qualität ergaben und keine klare Aussagen zuließen, wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass es sich bei den isolierten 19 Klonen um cDNAs nur eines Gens handelte. Für diese Annahme sprachen

1. die Hybridisierung unter hoch stringenten Bedingungen auf *Southern Blots* und beim Phagen-*screen*;
2. die Sequenzfragmente, die zeigten, dass es sich bei allen Klonen zumindest um Zink-Finger-Gene handelt;
3. die, mit Ausnahme des Hintergrunds, identischen Signalmuster bei der *whole mount in situ* Hybridisierung.

Analyse der 19 cDNA-Klone aus dem *screen* der cDNA-Bank mit dem PCR-Amplifikat Nr. 43

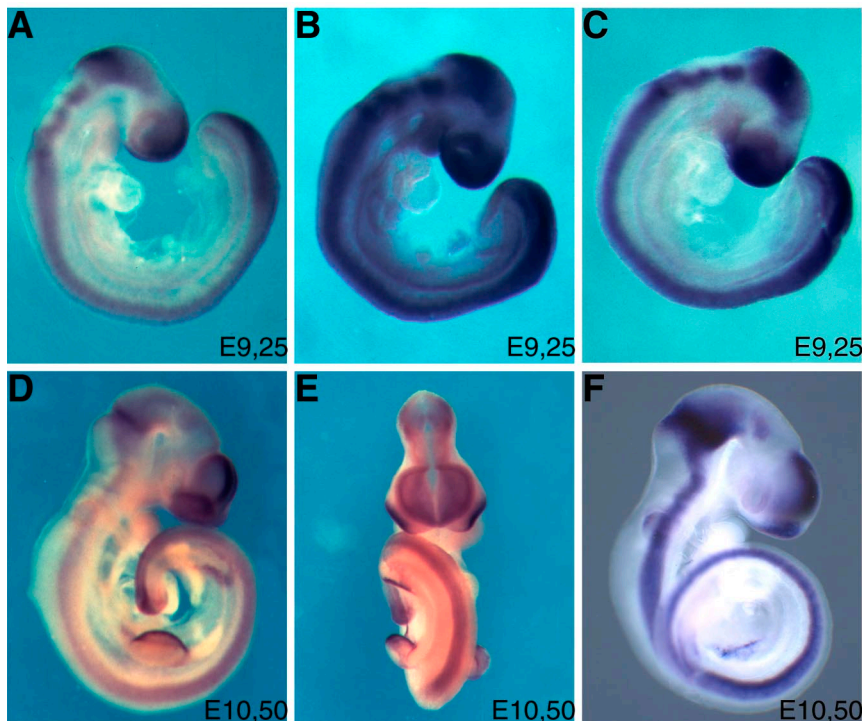


Abb.29: Vergleich der WMISH-Färbungen mit Btx1 und Btx2 als Probe. (A, D, E) Btx2-Sonde bei reduzierter Stringenz. (B) Btx1-Sonde bei reduzierter Stringenz. (C, F) Btx1-Sonde bei höchster Stringenz bzw. mit Btx1-Fragmenten, die die Zn-Finger-Box nicht enthielten.

Die Sequenzierung (SeqLab, Göttingen) von insgesamt 4 Klonen (ein Sp5-Klon = SpRB-2 / 1253 bp, ein Sp6-Klon = SpRA / 373 bp, zwei vermutete Knk-Klone = Btx1 / 2085 bp und Btx2 / 2162 bp; Angaben inklusive der Linker-Sequenzen) stieß auf Schwierigkeiten. Nur durch eine Zerlegung der ursprünglichen Klone in sehr kleine Fragmente war es möglich, die Nukleotidabfolge der vier Klone vollständig zu ermitteln. Diese Probleme bei der Sequenzierung und der *whole mount in situ* Hybridisierung durch z.T. sehr starke Hintergrundfärbungen entsprachen den Beobachtungen bei den zuvor klonierten Genen Sp5 und Sp6 (s.o.).

die 19 cDNA-Klone
repräsentieren zwei
verschiedene Gene

Das Ergebnis der Auftragssequenzierung zeigte, dass es sich bei den Klonen Btx1 und Btx2 nicht um cDNAs des selben Gens handelt. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit den Datenbanken (NCBI) und allgemeiner Erkennungsmuster konnte der Klon Btx2 als Mitglied der sogenannten repetitiven Zink-Finger-Gene (siehe Abbildung 5 in der Einleitung) identifiziert werden, wohingegen Btx1 den in der Einleitung beschriebenen Merkmalen eines Sp1- bzw. btd-Homologs entsprach (siehe Kapitel "abgeleitete Proteinsequenz des Knk-Gens").

```

1)  MEDDRSSPLS FSSVPHEESV RQAPARLPRE TVFPSCILPP KEVPLSPTA
51) SRQGVLPQTD STTKQETSSQ MSHVLQKGPS LLYPATSEQD TPHQVSLASQ
101) EETQCSPSAA AQGIPFLSHS AHRQEAPLHS PEVPEKDSL T LSPTVPETDM
151) DPLLQSPTLQ KDTPFHTSSA AQKEQLPPTA EITRLAVWAA VQAVERKLEA
201) QAMRLLTLEG RTGTNEKKIA DCERTAVEFA NHLESKWVVL GTLLQEYGLL
251) QRRLENMENL LKNRNFWILR LPPGSNGEVP KVPVTFDDVA VHFSEQEWGN
301) LSEWQKELYK NVMRGNYESL VSMDYAI SKP DLMSQMERGE RPAMQE QEDS
351) EEGETPTDPS AAHDGIVIKI EVQTNDEGSE GLETPEPLMG QVEEHGFQDS
401) ELGDPCGEQP DLDMQEQENA LEESTEGSSE FSELKQMLVQ QRNCTEGIVI
451) KTEEQEEEE EEEEEDELPHQ LQSLGQLSGR YEASMYQTPL PGEMSP EGEE
501) SPPPLQLGNP AVKRLAPSIH GHTHGHGHGH GHSERHLGEN RGNSSQQQRN
551) RRGERPFTCM ECGKSFRLKI NLIHQRNHI KEGPYECAEC EISFRHQQL
601) TLHQRIHRVR SGYASPERGS AFNPKHSLKP RPKSPSSGSG GGPKPYKCPE
651) CDSSFSHKSS LTKHQIHTG ERPYTCPECK KSFRLHISLV IHQRVHAGKH
701) EVSFICSLCG KSFSRPSHLL RHQRHTTGER PFKCECEKS FSEKSKLTNH
751) CRVHSRERPH ACPECGKSF I RKHHLEHRR IHTGERPYHC AECGKRFTQK
801) HHLEHQRAH TGERPYPCTH CAKCFRYQOS LKYHLRHTG E

```

Abb.30: postulierte Aminosäuresequenz des "ARTEFACT"-Proteins. Die neun Zink-Finger-Domänen sind durch Unterstreichungen hervorgehoben, Die komplexierenden Cystein- und Histidin-Reste in rot und die Leuzin-Reste an Position 10 in orange. Falls vorhanden, ist der konservierte H/C-Link in blau gekennzeichnet. Die Zink-Finger-Domänen zeigen nicht die typischen Sp1-homologen Sequenzen, sind also in die repetitive Zink-Finger-Protein-Klasse einzuordnen.

```

1  GGTCTCGGTC CAGCAGCTGG ACATGGAGGA CGATCGCTCG TCACCACTGT
51  CATTCTCCAG TGTCCCACAC GAAGAGTCTG TCGTTCAGGC CCCTGCTCGA
101 TCCTCCTTAG AAACGTGTGT CCCTTCTTGC ATTCTTCCTC CAAAAGAAGT
151 TCCTCCTTTG TCTCCCACTG CCTCCCGGCA AGGTGTCTTG CCCCAGACTG
201 ACAGTACTAC TAAGCAAGAG ACATCCAGCC AGATGTCACA TGTCTTTCAG
251 AAAGGACCTT CACTCCTGTA TCCTGCCACT TCTGAGCAAG ACACACCTCA
301 CCAGGTATCC CTTGCTTCCC AGGAAGAAAC CCAGTGCTCT CCTTCAGCAG
351 CTGCTCAGGG GATCCCCTTC CTCTCGCACT CCGCCCACCG TCAGGAAGCT
401 CCACTCCACT CTCCTGAGGT TCCTGAGAAA GACTCGTGA CTCTCTCACC
451 CACAGTTCCC GAGACCGACA TGGACCCCTT GCTCCAGAGT CCCACTTTGC
501 AAAAGGACAC TCCCTTCCAT ACCTCTTCTG CCGCCCAGAA AGAACAGCCA
551 CTGCCCACTG CAGAGATCAC TCGATTGGCT GTGTGGGCTG CTGTCCAAGC
601 AGTGGAGAGG AAACGTGGAG CCCAGGCCAT GCGACTACTG ACTCTGGAGG
651 GCAGGACAGG GACAAATGAG AAGAAGATAG CAGACTGTGA GAGAACGGCT
701 GTGGAGTCCG CAAATCATCT GGAGAGCAAG TGGGTTGTAC TGGGGACCTT
751 ACTGCAGGAG TATGGGCTGC TGCAGCGGCG CCTGGAGAAC ATGGAGAATC
801 TGCTGAAAAA CAGAAACTTC TGGATCCTGC GGCTGCCCCC AGGCAGCAAT
851 GGAGAAGTTC CCAAGGTTCC TGTACATTC GATGATGTCG CCGTCCATTT
901 CTCTGAGCAG GAATGGGGAA ATCTCTCTGA GTGGCAGAAG GAGCTCTACA
951 AGAATGTAAT GAGGGGCAAC TATGAGTCTC TGGTCTCTAT GGACTATGCA
1001 ATATCCAAAC CCGACCTCAT GTCACAGATG GAGCGTGGAG AGAGGCCAGC
1051 CATGCAAGAA CAAGAGGATT CTGAGGAGGG TGAGACGCCC ACAGATCCCA
1101 GTGCTGCACA TGATGGCATC GTGATTAAGA TCGAGGTGCA GACCAACGAT
1151 GAGGGCTCAG AAGTCTGGA GACACCAGAG CCACTGATGG GACAAGTGGG
1201 GGAACATGGC TTTCAAGACT CAGAGCTGGG TGACCCCTGT GGAGAGCAGC
1251 CAGACCTGGA CATGCAGGAA CAAGAGAACG CGCTCGAGGA GTCCACGGAA
1301 GGCTCCAGCG AGTTCAGTGA GCTCAAGCAG ATGCTGGTGC AGCAGAGAAA
1351 CTGCACGGAG GGGATCGTGA TCAAGACAGA GGAGCAGGAG GAGGAGGAGG
1401 AAGAGGAAGA GGAGGACGAG CTGCCACAGC ACTTGCAATC CCTTGGGCAG
1451 CTGTCTGGGA GGTACGAGGC CAGTATGTAC CAGACCCCCC TACCTGGGGA
1501 GATGTCCCCC GAGGGCGAGG AAAGCCCCCC ACCCCTGCAG TTGGGCAACC
1551 CAGCAGTGAA GAGGCTGGCA CCCAGCATTC ATGGGCATAC GCATGGGCAT
1601 GGGCACGGGC ACGGGCACAG TGAACGGCAC CTGGGTGAGA ACCGTGGGAA
1651 CTCTAGCCAG CAGCAGCGGA ATCGGCGTGG TGAGAGGCCC TTCACTTGCA
1701 TGGAGTGTGG CAAAAGCTTT AGGCTGAAGA TTAACCTCAT CATCCACCAG
1751 CGTAACCACA TCAAGGAGGG GCCCTACGAG TGTGCCGAGT GTGAGATCAG
1801 CTTCCGCCAC AAGCAGCAAC TCACGCTGCA CCAGCGCATC CACCGGGTAC
1851 GCAGCGGCTA TGCCTCCCCT GAGCGCGGCT CAGCCTTCAA TCCCAAGCAC
1901 TCGCTCAAAC CACTGCCAA ATCGCCAGC TCAGGCAGTG CCGCGCGCCC
1951 CAAACCCTAC AAATGCCCTG AGTGTGACAG CAGCTTCAGC CACAAGTCAA
2001 GCTTGACCAA GCACCAGATC ACACACACGG GTGAGCGGCC CTACACGTGC
2051 CCAGAAATGCA AGAAGAGCTT CCGCTTGCA TATCAGTCTGG TGATCCACCA
2101 GCGTGTGCAT GCAGGCAAGC ACGAAGTCTC CTTCAATTTG AGTCTGTGCG
2151 CAAAGAGTTT CAGCCGCCCC TCGCATCTGC TCGGCCACCA GCGGACTCAT
2201 ACTGGTGAAC GGCCTTTTAA GTGCCCGGAG TCGGAGAAGA GCTTCAGTGA
2251 GAAATCTAAG CTCACCAACC ACTGCCGCGT GCACTCCCCG GAGCGGCCGC
2301 ACGCCTGCCC TGAGTGCAGC AAGAGCTTCA TCCGCAAGCA CCACTTGCTG
2351 GAACACCGGC GCATCCACAC GGGTGAGCGG CCTACCCTC GCGCCGAGTG
2401 TGGCAAGCGC TTCACGCAGA AGCACCACCT GCTGGAGCAT CAGCGTGCAG
2451 ACACAGGCGA CCGGCCATAC CCCTGCACGC ACTGCGCCAA GTGCTTCCGC
2501 TACAAACAGT CCGTCAAGTA CCACCTGCGG ACCCACACGG GCGAGTGAGC
2551 AYCGGCCCCG CCCCTGCCCC GGCAGATGT GCAGCCAGGT GCAAGGGTCT
2601 AAGGCCCTGT GGACAGGTAC CTCGGCTGCC CCCAGACTGA GCTCAGTGGG
2651 CGGGAGCGGG GCGCCCAAG CCTTCTGCT GTGAACCCTC CTCCCTCCC
2701 GTCCCTTCTT CCCCAGGACG GGGTAGTGAG ACCAGGTGCG TTCTTGCTG
2751 CTTCCCAGG CCCCAGGGG GGAGTGCTTG GCCTGGGGA ACCCCTCAG
2801 GCTGTTAATT TCCTTGACAA TAAAATGGAT GAAAACAATC TGCACGGGGG
2851 CAGTGATTTG GCTGCCAGCC ACTCGCAGGC GCGATGCAGG GCCATTTAGT
2901 CGGGATAGA ACTTCTAAT TACCTTTTGG ATACTGTGGT TCTATTTGAT
2951 AATAATAGAG TAATTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

Abb.31: Nukleotidsequenz der "Artefact"-cDNA. cDNA-Sequenz entsprechend der Konsensussequenz der Klone Btx2-6 und Btx8-19. Die möglichen Start- und Stopp-Codone sind grün bzw. rot hervorgehoben. Die in Abbildung 32 dargestellte Sequenz mit vollständiger Übereinstimmung zur Knopfkopf-Sequenz ist unterstrichen.

1)	TAAAAAAAC	ACTGCCTCTG	ATTTATCAAT	ATAAAAAGA	TCCTCTGAGA
51)	GGAGGAGGGC	GCTTCTGTGT	GATGGCAACT	TCACCTCTAG	GGCGTGGCGC
101)	TTTGCTCCAG	AATCAGACGC	TCGCCGCCAA	ACTTGTCCCC	TCCTGTAGAG
151)	TAGGAGGCAG	CCGGCGCCG	GGCAGCTGG	GGTGCAGG	AAGAACCAG
201)	GTTGGGATCC	ACTCCTCTGG	CCATGCTTGC	TGCTACCTGT	AATAAGATCG
251)	GCAGCCCCAG	CCCGTCTCCC	TCCTCCCTGT	CGGACAGCTC	TTCTTCCTTC
301)	GGTAAAGGCT	TCCACCCTTG	GAAACGCTCC	TCGTCTTCTT	CCTCCGGCAG
351)	CTGCAACGTA	GTGGTTCCA	GTCTCTCTAG	CTTCGGTGTG	TCGGGGGCTT
401)	CCCAGAACGG	CGGCTCCTCC	TCAGCCGCAG	CGGCGGCAGC	GGCGGCAGCA
451)	GCGGCGCCG	CAGCCCTGGT	GTCCGACTCT	TTTAGCTGCG	GAGGCTCGCC
501)	CGGCTCCAGC	GCCTTCTCTC	TCACCTCCAG	CAGCGCCGCG	GCAGCGGCAG
551)	CAGTGCAGC	GGCTGCCGCT	TCCAGTCCG	CCTTTGCCAA	CGACTACTCT
601)	GTGTTCCAGG	CTCCGGGCGT	CTCGGGGGC	AGCGCGGGC	GCGGCGGGG
651)	AGGCGGCGG	GGTCCGGAG	CGCACTCGCA	GGATAGCTCC	CATCAGCCAG
701)	TGTTTATCTC	CAAGGTGCAC	ACGTCCGTGG	ACGGACTGCA	GGGTATCTAC
751)	CCGCGCGTGG	GAATGGCGCA	CCCGTATGAG	TCCTGGTTCA	AGCCTTCGCA
801)	CCCGGGCCTT	GGCGCCGCG	CCGACGTGG	CTCCGCGGG	GCCTCCAGCT
851)	GGTGGGATGT	GGGCGCGGG	TGGATCGACG	TGCAGAACC	CAATGGGGCG
901)	GCAGCGCTGC	CCGGCTCGCT	GCACCCGGCG	GCCGGGGGG	TTCAGACGTC
951)	GCTGCATTCA	CCGCTGGGAG	GCTACAACCT	GGATTATTCC	CCCTGAGCC
1001)	ACTCCGCATT	CAGTAGCGGT	GCCTCGTCGC	ACCTGCTCAG	CCCTGCAGGA
1051)	CAGCACCTCA	TGGACGTTT	CAAGCCGGTA	TTGCCCGGCT	CTTACCCCGA
1101)	TTCCGCCCCG	TCGCCGCTGG	CCGGCGCGG	CAGCTCCATG	CTGAGCGCGG
1151)	GGCCCGCGG	GCAGTTAGGG	GGTCCCAC	GCTCGTCCG	TCGCCGCTAC
1201)	TCCGGCCGCG	CCACTTGCGA	CTGCCCAAC	TGCCAGGAGG	CTGAGCGGCT
1251)	GGGCCAGCG	GGAGCGAGCC	TGCGTCGCAA	AGGGCTGCAT	AGCTGCCACA
1301)	TCCCGGGCTG	CGGCAAGGTG	TACGGCAAGA	CGTCGCACCT	GAAGGCGCAC
1351)	CTGCGTTGGC	ACACCGGCGA	GCGGCCGTTT	GTGTGCAATT	GTGTGCTCTG
1401)	CGGTAAGCGC	TTTACGCGCT	CCGACGAGCT	GCAGCGGCAC	<u>CTGCGGACCC</u>
1451)	<u>ACACGGGCGA</u>	GAAGCGCTTC	GCCTGCCCGG	TGTGCAACAA	ACGCTTCATG
1501)	CGCAGCGACC	ACCTGAGCAA	GCACGTGAAG	ACACACAGTG	GTGGCGGGCG
1551)	CTCGGCGGGC	TCCGGCGGCG	GCAAGAAAGG	CAGCGACACC	GACAGCGAGC
1601)	ACAGCGCGGC	GGGAAGCCCT	CCTTGCCACT	CCCTGAGCT	GTTGACGCTT
1651)	CCAGAGCCGG	GCCACCGCAA	CGGCCTGGAG	TGACTGTCTG	GATGCCTCCC
1701)	ACCTGAATCC	CGTCGGGCTT	GTGTACCTAG	ACTGGGCTCC	AGCTTAGGCT
1751)	AGCTGTGCGT	TCTTTCCTCC	AACTTCTCAT	TCTCTCTCTC	ACCGTTTTTC
1801)	TGCTCTTAAC	TTTTAGGATG	TGGACAGTAA	GTAGCACACA	TCGGTGGCTG
1851)	AATCCTTGGC	TCCCTTCTGC	ACAGTGACAG	CCATGCGGGG	CGCAGTGGA
1901)	ACCCGCTCCT	CCAGCACTGG	GCTGGCGGAA	CCTTGAAGAG	GCTGTGGCCT
1951)	CTGGGGTTAG	GACGGGATGA	ATGGGTGTG	TGGTAGAACA	GTGGCTTTTG
2001)	TGGCCTTGGA	AAGAACAGTG	TTCAACCCGC	TTGAGCCGCA	GCTGTAGGGA
2051)	GAGGGATGTA	GGAGTCTTGC	CAAGGAATCC	CCTCCTGGAC	CCCCGAGTGC
2101)	TCCCCTTGGA	CTGTCCTGTG	CTGAGCATT	CACCTGTGGG	AGGACTGTCTG
2151)	CAACCCAGAC	CGGGTTAGCA	GAGTTTAGAT	CTCCCATTCC	AGCTCTGGCT
2201)	AGGTCTTTGT	GCCCTGCGGG	TGAACCGATG	AGAGTTCTGC	GAACGGGAAT
2251)	CAATGCCTCC	CCCTCCTTTC	TTCTTTGTAA	CTTTTATTTT	TTTAACTGAA
2301)	AACTGAGAG	GAAAAAATA	AACAAGCAAT	CTTCTCTTTA	GCTTCTCGTT
2351)	TAGATAGTTT	TCCTCTGCTT	GCGAGCACGT	TTCTCTCCAA	ACTGCAATA
2401)	TTGATCCCAA	AGTTATTTTG	GTCGCCGTAA	TTTATGGGGT	GGGGCGGGGA
2451)	GTGAGGGTAG	GTGCTTTTTC	TTATGCAAAA	ATACCCCTT	TCCGGTGAGA
2501)	CCAGGATTAA	GTATCTTCGT	GTTTGTCTTT	TTCTACCTCG	GTTTTTTCAC
2551)	CATCCCAAG	CATATTCTTC	CAACTTCCCA	CATCACCACC	ACTTTTGGGT
2601)	TAGTCTAGGA	ATCAATTTAT	CTACTGATTT	CTGCAATTA	TT

Abb.32: Sequenz der Knopfkopf-cDNA. Die möglichen Start-Triplets sind grün markiert. Vergleich mit der Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak M.; 1987, 1991, 1992): Übereinstimmungen sind in blau hervorgehoben, widersprüchliche Basen sind durchgestrichen. Das Stopp-Triplett ist rot markiert. Die 3'-untranslatierte Region ist nicht vollständig enthalten bzw. das Ende des letzten Exons nicht bekannt. Die in Abbildung 31 dargestellte Sequenz mit vollständiger Übereinstimmung zur Artefact-Sequenz ist unterstrichen.

Knopfkopf:	1438	cacctgctggaccacacgggag	1461
Artefact:	2522	cacctgctggaccacacgggag	2545

Abb.33: Sequenzübereinstimmung zwischen der Knopfkopf- und der "Artefact"-cDNA. Eine Sequenz von 24 Nucleotiden mit insgesamt 18 G/C-Basenpaaren kommt sowohl in der cDNA von Knopfkopf, als auch von "Artefact" vor. Die cDNA-Sequenz kodiert für das Ende des zweiten Zink-Fingers des KNK-Proteins bzw. des letzten Zink-Fingers des ARTEFACT-Proteins.

Um zu testen, welches der beiden Gene wie exprimiert wird, wurden mit Hilfe der vorliegenden Sequenzinformationen Teilbereiche der cDNA-Klone Btx1 und Btx2 ausgewählt und dann in WMISH-Experimenten als Proben eingesetzt. Außerdem wurde die Stringenz der WMISH erhöht (entsprechend des Protokolls aus "Material und Methoden", z.B. Waschschr. bei 70°C statt 65°C). Hierbei zeigte sich, dass alle Teilsequenzen von Btx2 das spezifische Muster verloren und statt dessen eine sehr viel schwächere, ubiquitäre Farbreaktion verursachten (Daten nicht gezeigt). Die weiteren Arbeiten mit Btx2 wurden daraufhin eingestellt. Dies galt auch für alle übrigen cDNA-Klone, die dem von Btx2 repräsentierten Gen (welches im anschließenden Verlauf der Arbeit den operativen Namen "Artefact" erhielt) entsprachen. Hierbei handelte es sich um die Klone Btx3-6 und Btx8-19.

Die Btx1-Fragmente dagegen wiesen alle ein spezifisches Muster auf, welches vollständig den Ergebnissen der Anfangs durchgeführten Versuche entsprach. Einziger Unterschied war, dass durch die Vermeidung der Zink-Finger-Box und die erhöhte Stringenz die zuvor speziell bei Btx1 beobachtete starke Hintergrundfärbung vermieden werden konnte. Eines dieser Fragmente (Btx1, geschnitten mit DraIII und von der T7-RNA-Polymerase transkribiert, so dass nur der Teil 5' der btd-Box als Probe entsteht) erwies sich als besonders gut geeignet für die Hybridisierungsexperimente und wurde daher im weiteren Verlauf zur exakten Ermittlung der Expressionsmuster verwendet. Das Gen, welches vom Btx1-cDNA-Klon sowie dem Klon Btx7 repräsentiert wurde, wurde im Rahmen der folgenden Arbeiten als Knopfkopf bzw. Knk bezeichnet.

Da nur zwei identische Knk-Klone (Btx1 und Btx7) vorlagen, die weder ein sicheres 5'-Ende noch das polyA-Ende aufwiesen, wurde ein neuer *screen* durchgeführt, um die fehlenden Sequenzbereiche zu erhalten. Hierzu wurden zwei verschiedene cDNA-Bibliotheken verwendet:

1. eine λ -Phagen-Bibliothek von Stratagene (E10,5 - ganze Embryonen - Mischung aus oligo-dT und randomisierten primern - kloniert in IZAP);
2. eine λ -Phagen-Bibliothek aus dem Labor von Prof. Dr. Gruss (E10,5 - Kortex - Mischung aus oligo-dT und randomisierten primern - kloniert in λ gt10 oder λ gt11);
3. eine Plasmid-Bibliothek, die von Prof. Dr. Herrmann zur Verfügung gestellt wurde (E9,5 - ganze Embryonen - randomisierte primer für das 5'-Ende,

17 der 19 Klone repräsentieren ein nicht-Sp1-homologes Gen und wurden nicht weiter analysiert

die cDNA-Klone Btx1 und Btx7 repräsentieren Teile des Knopfkopf-Gens

Isolierung weiterer cDNA-Klone des Knopfkopf-Gens

Fraktionen "R6", "R7" und "R8" - poly-dT-primer für das 3'-Ende, Fraktionen "T5", "T6" und "T7" - gerichtet über NotI = 3'-Ende und SalI = 5'-Ende kloniert in pSV Sport1 von Gibco-BRL - die MCS von pSV Sport1 enthält an der NotI-Schnittstelle den T7-primer und an der SalI-Schnittstelle den SP6-primer).

Für den *screen* der λ -Phagen-Bibliotheken wurde ein HaeIII-Fragment von Btx1 verwendet, das 5' von der Zink-Finger-Box liegt und in der WMISH besonders wenig Hintergrund erzeugt (siehe auch Abbildung 34). Aus der Phagen-Bank von Stratagene konnten fünf unabhängige Klone gewonnen werden, die über die vorhandenen 5'- und 3'-Enden hinausreichten: BtxII-02, BtxII-05, BtxII-06 und BtxII-12.

splice-Varianten der Knopfkopf-cDNA

Die Klone BtxII-02, BtxII-06 und BtxII-12 verlängerten die bestehende Sequenz am 5'-Ende um 203 bp. Ein Vergleich der drei BtxII-Sequenzen und der von Btx1 untereinander zeigte, dass die zusätzlichen Bereiche auf zwei Exone (Exone 1 und 2) verteilt waren. Das Argument hierfür war, dass die Exone alternativ *spliced* vorlagen: während die Klone BtxII-02 und -12 die Exone 1, 2 und 3 enthielten, fehlte beim Klon BtxII-06 das zweite Exon. Später durchgeführte Vergleiche mit genomischen Sequenzen bestätigten diese Annahme (siehe Abbildung 42).

Ob die unterschiedliche Einbeziehung des Exons 2 eine biologische Rolle spielt, konnte nicht ermittelt werden. Versuche, mögliche Expressionsdomänen den verschiedenen *splice*-Varianten zuzuordnen, blieben erfolglos, was mit großer Wahrscheinlichkeit daran lag, dass die ersten beiden Exone mit 90 bzw. 96 bp Länge nicht ausreichten, um bei den durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen ein Signal zu erhalten.

der cDNA-Klon BtxII-05 belegt, dass die 3'-untranslatierte Region der Knopfkopf-cDNA mindestens 1,0 kb lang ist

Der Klon BtxII-05 wies eine Länge von insgesamt ca. 3,6 kb auf und verlängerte die cDNA-Sequenz am 3'-Ende. Er begann an der Position 588, wodurch sich eine Verlängerung der 3'-UTR um ca. 1,6 – 1,7 kb ergibt. Letztere wurde allerdings nicht vollständig überprüft: Die Sequenzierung erwies sich auch bei diesem Klon als sehr problematisch, so dass auf eine Ermittlung der kompletten Nukleotid-Abfolge verzichtet wurde.

Für die Annahme, dass die zusätzlichen 1,6 – 1,7 kb kein Klonierungsartefakt darstellen, spricht, dass ein kurzes Sequenzstück des 3'-Endes des Klons BtxII-05 ermittelt werden konnte, welches auch in der genomischen Sequenz gefunden wurde. Die genomische Sequenz lag in dieser Region allerdings nicht mehr als durchgehender *contig* vor, sondern als einzelne Sequenz-Fragmente, so dass eine klare Aussage über die gewonnene zusätzliche Sequenz nicht möglich ist. Insbesondere bleibt das endgültige 3'-Ende unklar, da der Klon keinen polyA-Schwanz bzw. ein erkennbares Signal hierfür enthielt.

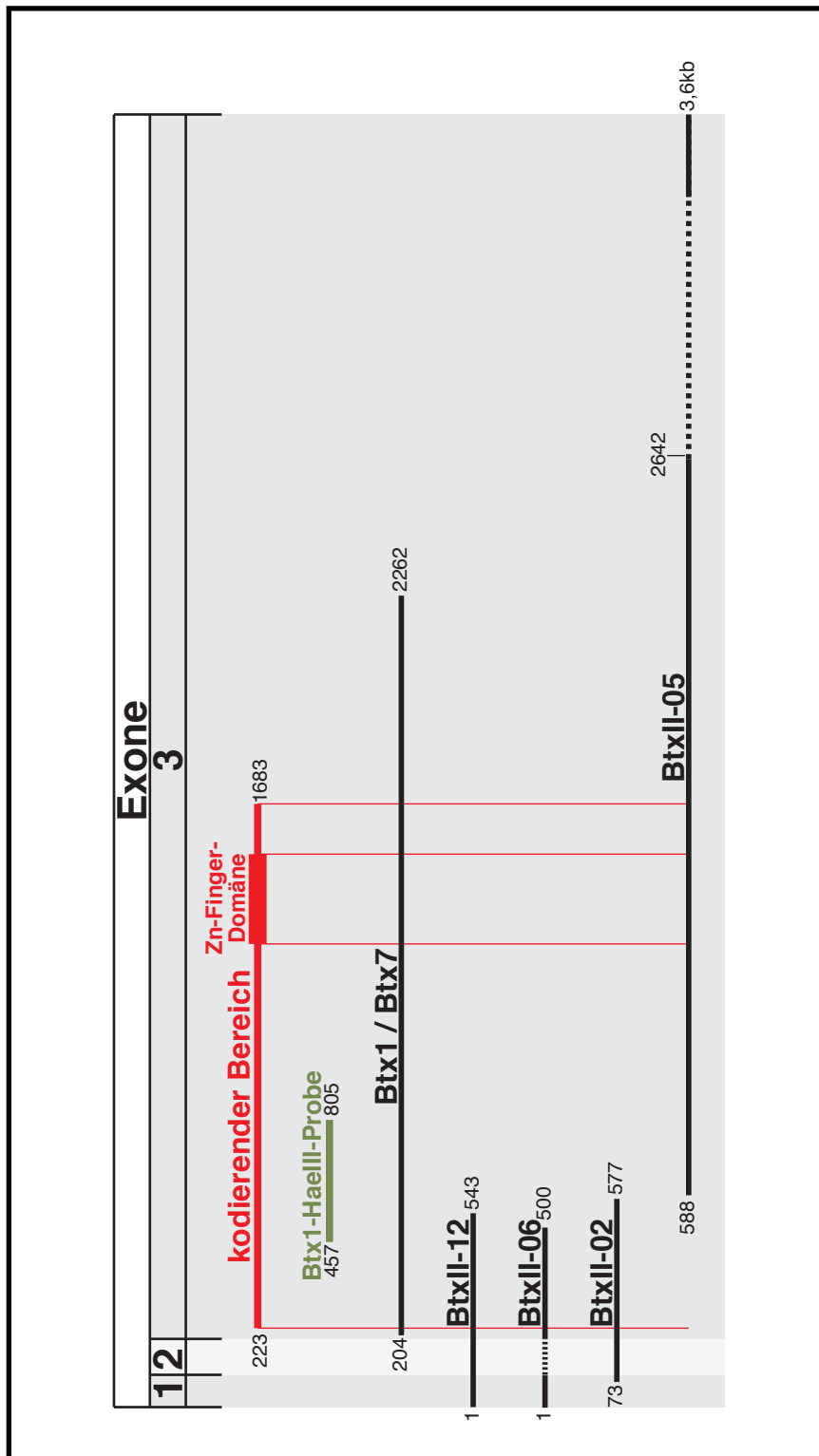


Abb.34: Schematische Darstellung der verwendeten cDNA-Klone von Knopfkopf. Darstellung der sechs in der Arbeit verwendeten cDNA-Klone: Btx1, Btx7, BtxII-02, BtxII-05, BtxII-06 und BtxII-12 (schwarze Linien; das fehlende Exon in Klon BtxII-06 ist fein gestrichelt; der nicht sequenzierte Teil von BtxII-05 ist grob gestrichelt). Zusätzlich ist die Lage der häufig verwendeten HaeIII-Probe aus Btx1 eingetragen (grün), sowie der kodierende Bereich mit der putativen Zink-Finger-Domäne (rot). Die Exone 1 (1-90) und 3 (188-ca. 3600) sind dunkelgrau eingetragen, das Exon 2 (91-187) hellgrau.

Damit existieren zwei Möglichkeiten hinsichtlich des mRNA-Endes: entweder entspricht der isolierte Klon einer hnRNA, die noch nicht durch den *cleavage complex* prozessiert wurde und dessen Erkennungssequenz möglicherweise in dem noch nicht sequenzierten Bereich liegt, oder der cDNA-Klon BtxII-05 enthält noch nicht das mRNA-Ende, was auf eine ungewöhnlich lange 3'-UTR von über 2,5 kb schließen lassen würde.

Da bei einem weiteren *screen* der Bibliotheken mit dem Klon BtxII-05 keine weiteren unabhängigen cDNA-Klone gewonnen werden konnten und die 3'-UTR nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war, wurde der Versuch zur Gewinnung der fehlenden Sequenzinformationen aus cDNA-Phagen-Banken an dieser Stelle nicht fortgeführt.

Der *screen* der Plasmid-Bibliothek von Prof. Herrmann erfolgte mit Hilfe der PCR, wobei jeweils ein Vektor-spezifischer primer in der MCS und ein primer aus der schon bekannten cDNA als Paare eingesetzt wurden.

Die PCR-Versuche zur Gewinnung des fehlenden Restes der untranslatierten 3'-Region bzw. zur Verifizierung der Ergebnisse aus dem Phagen-*screen* blieben erfolglos. Da auszuschließen ist, dass weitere Exone am 3'-Ende existieren, die durch alternatives *splicing* eine Veränderung des translatierten Proteins verursachen, wurden keine weiteren Versuche unternommen, dass noch fehlende Stück der 3'-UTR zu klonieren.

die isolierte cDNA
umfasst den gesamten
kodierenden Bereich

Die Basis für die Annahme, dass hinsichtlich des 3'-Endes keine Änderung der translatierten Region möglich ist, war die genomische Organisation von Knk: Vergleiche der cDNA-Sequenzen (siehe Abbildung 32) und der genomischen Sequenz (siehe Abbildung 42) zeigten, dass ein wesentlicher Teil der translatierten Region inklusive der entscheidenden btd- und Zink-Finger-box in einem Exon liegen. Innerhalb dieses Exons findet sich auch das STOP-Codon. Weder vor dem angenommenen STOP-Codon, noch vor denen in den anderen beiden Leserastern ist ein begründbarer *splice*-Donor erkennbar. Daher wurde angenommen, dass mögliche weitere 3'-gelegene Exone ausschließlich untranslatierte Bereiche enthalten. Diese können nur Auswirkungen auf die Transkription oder Translation haben. Da beide Aspekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden, konnte auf ihre Klonierung verzichtet werden.

Die PCR-Analyse der Plasmid-Bank von Prof. Herrmann zur Identifizierung möglicher fehlender 5'-Sequenzen wurde wie folgt durchgeführt: je 1 ng der in pSV Sport1 klonierten cDNA-Fraktionen "R6" - "R8", die laut Angaben von Prof. Herrmann die längsten cDNA-Fragmente enthielten (Erststrang-cDNA-Synthese mit randomisierten primern), wurden mit dem SP6-primer aus der MCS und drei cDNA-spezifischen internen primern (Bxcr1 - Bxcr3) bei 64°C und 35 Zyklen (5 min Denaturierung, Zyklenschritte à 1 min) amplifiziert. Mit dem primer-Paar SP6/Bxcr3 konnte ein ca. 380 bp langes Amplifikat gewonnen werden, dass sowohl direkt kloniert, als auch für eine weitere nested-PCR eingesetzt wurde. Für die nested-PCR wurden ca. 500 ng des Ausgangsamplifikats eingesetzt. Als weiter innen gelegener primer wurde Bxcr2 eingesetzt, die PCR erfolgte bei

60°C, 62°C und 64°C mit 40 Zyklen (5 min Denaturierung, Zyklenschritte à 1 min). Bei allen drei Reamplifikationen wurde ein ca. 160 bp-langes Amplifikat erzeugt, was dem erwarteten Größenunterschied entsprach. Die reamplifizierte DNA wurde ebenfalls kloniert und sequenziert.

Der Vergleich der PCR-Sequenzen mit denen der cDNA-Klons Btx2, BtxII-06 und BtxII-12 bestätigte die Ergebnisse aus dem Phagen-*screen*: die Amplifikate stimmten hinsichtlich des 5'-Endes exakt mit der Sequenz von BtxII-12 überein; lediglich das erste Thymidin (bzw. als RNA: Uridin) fehlte, das allerdings vermutlich noch Teil des Linkers aus der Klonierung ist. Letztere Annahme entspricht auch der Erfahrung, dass die mRNA von Eukaryonten zumeist mit einem Adenosin beginnen, welches posttranskriptionel mit einer Cap-Struktur versehen wird (Bannerjee AK.; 1980).

Auf Basis der von einander unabhängigen Ergebnisse - den zwei cDNA-Klonen BtxII-06 und -12, sowie der PCR-Amplifikate - wurde davon ausgegangen, dass die Knopfkopf-mRNA die in Abbildung 32 gezeigte Teilsequenz besitzt. Sie enthält nach dem jetzigen Stand des Wissens den gesamten translatierten Bereich, sowie die 5'-untranslatierte Region. Zusätzlich sind ca. 1 kb der 3'-untranslatierten Region wiedergegeben. Möglicherweise fehlen jedoch weitere 1,5 kb oder mehr bis zum polyA-Schwanz der prozessierten mRNA (s.o.).

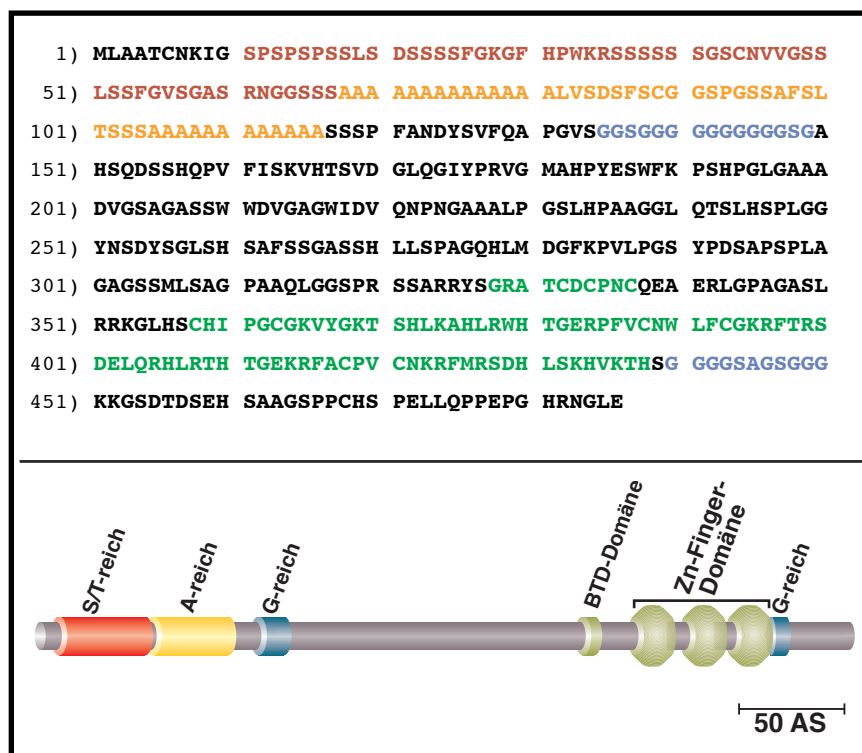


Abb.35: Aminosäuresequenz des Knopfkopf-Proteins und schematische Darstellung des Proteinaufbaus. Abgeleitete Sequenz des Knopfkopf-Proteins. Die Zink-Finger-Domänen und die BTD-Domäne sind in grün hervorgehoben, die Serin-reiche Domäne in rot, die Alanin-reiche Domäne in orange und die Glycin-reiche Domänen in blau. Je nach Verwendung der Start-Kodone könnte sich das Protein N-terminal um die Sequenz MATSLLGEEPRLGSTPLA verlängern. Darunter: Protein als Schemazeichnung.

das *Knopfkopf*-Gen kodiert für ein hypothetisches Protein der Sp1-Transkriptionsfaktoren-Familie

Die hypothetische Übersetzung der *Knopfkopf*-cDNA-Sequenz ist in Abbildung 35 dargestellt. Das *in silico* translatierte Protein weist 486 Aminosäurereste auf. Es besitzt am C-Terminus 3 Zink-Finger-Domänen des Sp1-Typs (siehe Diskussion) und eine BTD-Domäne. Der mittlere Bereich entsprach keinen bekannten Proteinmotiven der durchsuchten Datenbanken (nähere Angaben zu den verwendeten Datenbanken in "Klonierung und Expressionsanalyse von Sp6").

Der N-Terminus weist drei Domänen auf, die durch ein überdurchschnittlich häufiges Auftreten unterschiedlicher Aminosäurereste gekennzeichnet sind. Hierbei handelt es sich um eine ca. 57 Aminosäurereste umfassende Serin-reiche und eine unmittelbar anschließende Alanin-reiche Domäne mit ca. 49 Aminosäurereste. Zusätzlich finden sich zwei kürzere Glycin-reiche Domänen (15 bzw. 11 Aminosäurereste) unmittelbar hinter den S/T- und A-reichen Domänen bzw. direkt hinter der Zink-Finger-Domäne am C-Terminus. Weitere Domänen konnten nicht identifiziert werden.

Expression von *Knopfkopf*

Analyse der *Knopfkopf*-Expression mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung und LacZ-Färbung der Embryonen

Die Expressionsanalyse von *Knopfkopf* erfolgte zu Beginn der Arbeit mit Hilfe der WMISH (siehe Material und Methoden). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Analyse zusätzlich mittels der β -Galactosidase-Färbung (siehe Material und Methoden) durchgeführt. Die Verwendung des β -Galactosidase-Enzyms war möglich, da das *knock out*-Konstrukt ein in den Leseraster des *Knopfkopf*-Gens eingesetztes LacZ-Gen enthielt (siehe "Material und Methoden" und "Gezielte Inaktivierung des *Knopfkopf*-Gens mittels homologer Rekombination"). Die mit den beiden unterschiedlichen Methoden ermittelten Expressionsmuster stimmten in allen Punkten überein und wurden daher als gleichwertig nebeneinander verwendet.

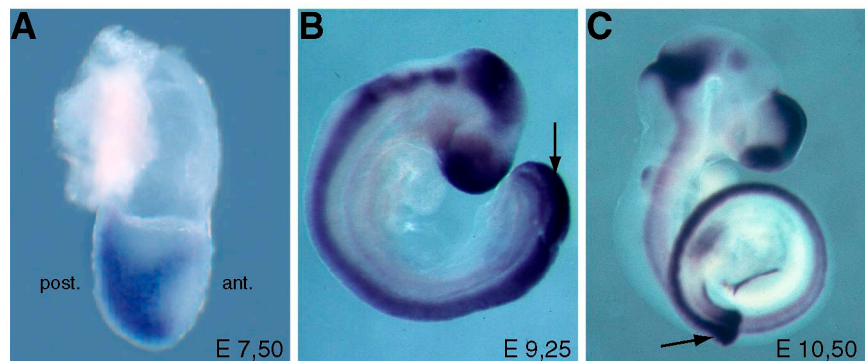


Abb.36: *Knopfkopf* ist wie *Sp5* während der Embryogenese in zwei Phasen exprimiert. Whole mount *in situ*-Hybridisierung mit *Knopfkopf*-Probe. Die erste Phase beginnt zwischen E7,0 und E7,5 posterior zum Kopffortsatz und beschränkt sich im weiteren Verlauf auf die Schwanzknospe während der sekundären Gastrulation. Die zweite Phase beschränkt sich auf das ZNS, die Nasen- und Ohren-Anlage und die Extremitäten. Pfeile: Expression während Gastrulation (in (C) = Schwanzknospe).

Wie bei Sp5 konnte eine zweiphasige Expression gezeigt werden:

1. Eine erste Expression während der primären und sekundären Gastrulation;
2. eine zweite Phase im Rahmen der Organogenese, die ausschließlich das Zentrale Nervensystem und die Extremitätenanlagen umfasste.

Wie bei Sp5 startete die Expression zwischen dem E7,0 und E7,25 caudal vom mesenchymalen Kopffortsatz in der gesamten Region des Primitivstreifens. Im Verlauf der Gastrulation folgte die *Knk*-Aktivität dem sich zurückziehenden Primitivstreifen und war mit dem Einsetzen der sekundären Gastrulation ausschließlich auf die Schwanzknospe begrenzt. Im Unterschied zu Sp5 konnte die *Knk*-mRNA aber nur im Neuroektoderm nachgewiesen werden. Sowohl das im Laufe der Gastrulation gebildete Mesoderm als auch das primitive und endgültige Endoderm waren vollständig *Knk*-negativ (siehe Abbildung 37A, B).

Gastrulations-
spezifische Expression
von *Knk*

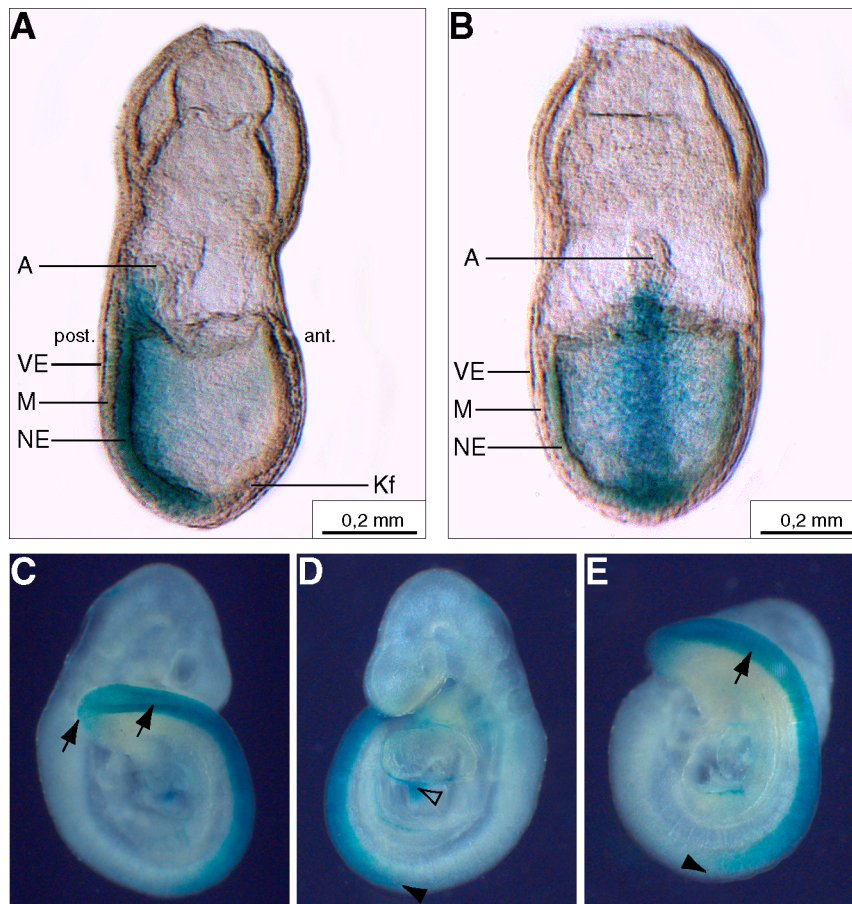


Abb.37: Expression von *Knopfkopf* während der Gastrulation. LacZ-Färbung. (A, B) E7,5 - Durch Schräglichtbeleuchtung wurden optisch Schnitte erzeugt. Deutlich erkennbar ist die Färbung im Neuroektoderm, besonders in der Mittellinie. Im Gegensatz zu Sp5 war kein Signal im Mesoderm (und viszeralem Endoderm) nachweisbar. (C-E) E9,5 - LacZ-Expression unter der Kontrolle des Promotors aus dem KO-Konstrukt (siehe nächstes Kapitel). Pfeile: Expression in der Schwanzspitze und junge Neuralplatte; Pfeilkopf: rostrales Ende der Expression; leerer Pfeilkopf: unspezifische Färbung im Herzen. Abkürzungen: A=Allantois, ant.=anterior, Kf=Kopffortsatz, M=Mesoderm, NE=Neuroektoderm, post.=posterior, VE=viszerales Endoderm.

Gastrulations- spezifische Kontrollelemente

Die Expression während der Gastrulation war auch genetisch von der zweiten Phase während der Organogenese zu differenzieren. In transient-transgenen Embryonen nach Mikroinjektion mit einem Konstrukt, das den genomischen Teil von *gBtxII-6-8,5-1* fusioniert mit KC414 mit dem LacZ-Gen trägt (siehe: Gezielte Inaktivierung des *Knopfkopf*-Gens mittels homologer Rekombination), konnte die Gastrulations-spezifische Expression ohne eine Genaktivität in der Organogenese erzielt werden. Diese Expression ging fließend in die Neuralplatte und das neu gebildete Neuralrohr über. In weiter rostralen Bereichen des Neuralrohres und dem Gehirn war die LacZ-Färbung nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 37C–E).

Expression von *Knk* im zentralen Nervensystem

Die Expression im ZNS setzte ca. ab dem E8,0 ein. Die mRNA war anfangs im gesamten ZNS vom Prosenzephalon bis inklusive der Neuralplatte nachzuweisen. Eine besonders starke Farbreaktion konnte dabei im prospektiven und endgültigen Telenzephalon sowie in der zukünftigen und endgültigen Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG) gezeigt werden. Der Bereich des Dienzephalons war dagegen anfangs nur schwach, im weiteren Verlauf regional sehr begrenzt *Knk*-positiv. Im Rhombenzephalon konnte ebenfalls ein spezifisches Muster erkannt werden. Die Rhombomere R1 und R3-R5 zeigten nur eine schwache Reaktion während die Rhombomere R2 und die caudal vom otischen Vesikel gelegenen Rhombomere 6-8 eine sehr starke Färbung aufwiesen. Im weiteren Verlauf war die *Knk*-mRNA bis ca. E 10,5 im dorsalen Telenzephalon nachweisbar, wohingegen das Dienzephalon nur im prospektiven Präectum eine lokal begrenzte Aktivität des Gens aufwies.

Ausgehend von der MHG wies *Knk* einen steilen Aktivitätsgradienten sowohl nach rostral als auch nach caudal auf. Dieser ging Anfangs in die sehr schwache Expression des ersten Rhombomers über (s.o.), ab ca. dem E10,0 mehr oder weniger kontinuierlich in die Expression des Rückenmarks. An der MHG war *Knk* im gesamten Umfang des Neuralrohres nachweisbar, während es im Rückenmark nur in der ventralen Hälfte, der Basalplatte, zu einer Farbreaktion kam. Die Rückenmarksexpression ging mit dem Fortschreiten von der primären zur sekundären Gastrulation unmittelbar in die Schwanzknospe über.

Expression in den otischen und olfaktorischen Plakoden bzw. Vesikeln

Neben dem ZNS waren die neurogenen otischen und olfaktorischen Plakoden bzw. Vesikel *Knk*-positiv. Ab ca. dem E 9,75 konnten beide Domänen nachgewiesen werden und am E 10,0 zeigten sie eine sehr starke Färbung. Die Expression in der olfaktorischen Plakode ging im weiteren Verlauf der Embryogenese in eine sehr starke Aktivität im olfaktorischen Nasenepithel über.

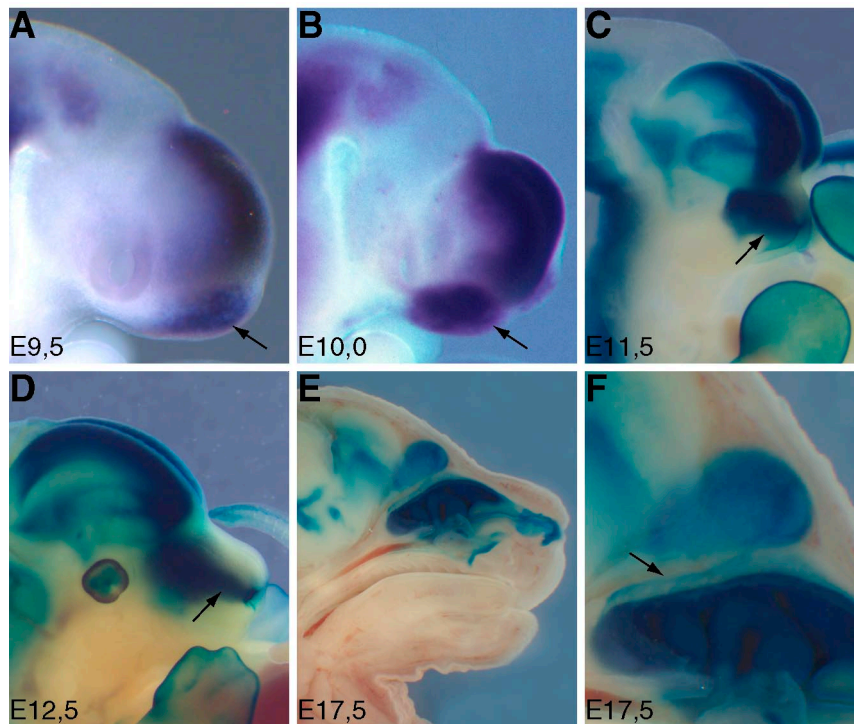


Abb.38: Expression des Knopfkopf-Gens in der Nasen-Anlage. Ab ca. E9,00–9,25 zeigt die WMISH ein Signal im Bereich der Nasenplakode. Die Färbung ist ab E9,5 sehr stark (Pfeile in A und B) und die Färbung bleibt bis ins Adultstadium im Riechepithel bestehen. Mit der Einsenkung der Nasengrube (Pfeile in C und D) zeigt sich, dass die äußeren Nasenstrukturen keinerlei erkennbare Knk-Aktivität aufweisen. In späteren Stadien exprimieren die Neuronen des Riechepithels Knk, die resultierende LacZ-Färbung in den heterozygoten Tieren markiert die Axone (Pfeil in F), die das Riechepithel mit dem Bulbus olfactorius verbinden. Die Riechkolben sind die einzigen Strukturen im ZNS, die Knk bis mindestens 6 Monate post partum in hohem Maße exprimieren. (A, B: *whole mount in situ*-Hybridisierung. C–F: LacZ-Färbung; Vergleiche bis E15,5 zeigten keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Hybridisierung und der X-Gal-Reaktion. Allerdings sind die LacZ-Färbungen bedingt durch die unterschiedlichen Techniken in älteren Tieren deutlicher zu erkennen. Die Ergebnisse der Hybridisierungen waren bei E15,5 nur noch direkt mit einem Makroskop sichtbar, die hergestellten Fotos waren jedoch nicht mehr auswertbar.)

Außerhalb des ZNS bzw. der genannten neurogenen Plakoden war Knk nur noch in den Beinanlagen nachzuweisen. Die Expression hier zeigte sich mit der Bildung der Beinknospe anfangs als diffuse Färbung in der gesamten Region des sich verdickenden Ektoderms. Später war besonders die apikale ektodermale Leiste (AEL) Knk-positiv und zu einem geringeren Maße die ventrale Seite der Beinanlage. Später fanden sich die Transkripte im distalen Ektoderm der auswachsenden Extremitäten.

Expression von *Knk* in den Beinanlagen

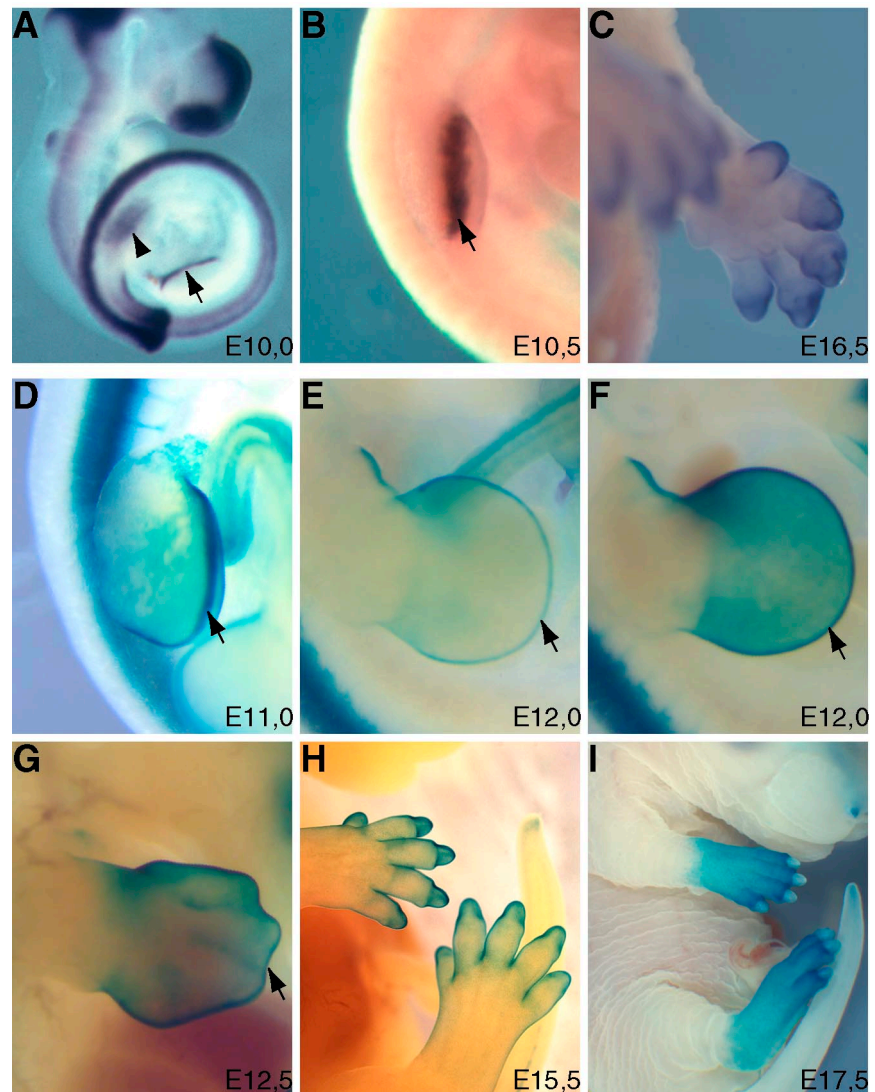


Abb.39: Expression von Knopfkopf während der Beinentwicklung. Noch vor der Ausbildung einer sichtbaren Extremitätenanlage zeigt die *whole mount in situ*-Hybridisierung eine deutliche Knk-Aktivität im Epithel der kurze Zeit später gebildeten Beinknospe (Pfeilspitze in A). Mit der Differenzierung der Beinknospe reduziert sich die Knk-Expression immer stärker auf die sich bildende apikale ektodermale Leiste (AEL) (Pfeile in A, B, D, E, F und G). Insbesondere bei der LacZ-Färbung zeigt sich aber, dass auch die dorsale und ventrale Seite der sich entwickelnden Extremitätenanlagen im distalen Bereich Knk exprimieren, allerdings deutlich schwächer als in der AEL. Ab ca. E15 ist keine AEL mehr erkennbar, aber die allgemeine Färbung der distalen Extremitäten-Bereiche bleibt weiter bestehen. (A–C: *whole mount in situ*-Hybridisierung. D–I: LacZ-Färbung. Der Vergleich von C und H zeigt, dass zumindest bis E16,5 keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierung und der LacZ-Färbung bestehen. Allerdings sind die LacZ-Färbungen technisch bedingt immer besser erkennbar, besonders nach E16,5.)

Gezielte Inaktivierung des *Knopfkopf*-Gens mittels homologer Rekombination

Um die Funktion des *Knopfkopf*-Gens während der Embryonalentwicklung der Maus zu studieren, wurde das Gen mit Hilfe der homologen Rekombination im Rahmen eines sogenannten *Knock out*-Experimentes gezielt inaktiviert. Zu diesem Zweck wurde ein *Knock out*-Konstrukt erstellt, bei dem der Großteil der kodierenden Region (Exon 3) durch eine Marker/Selektions-Kassette (LacZ/Neo) ersetzt wurde. 5' und 3' von dieser Kassette wurden 8,5 bzw. 6,5 kb homologe Sequenz des *Knk*-Lokus erhalten.

Das vom LacZ-Gen kodierte β -Galactosidase-Enzym dient hierbei der Darstellung des Expressionsmusters von Knopfkopf. Das Neomycin-Resistenz-Gen, das für die Aminoglycosid-phosphotransferase APH[3']-II kodiert, dient der positiv-Selektion von erfolgreich integrierten Konstrukten in das Genom der ES-Zellen. Weitere allgemeine Informationen zur Strategie und praktischen Umsetzung der gezielten Inaktivierung mittels homologer Rekombination können z.B. Mansouri A. (1998) entnommen werden.

Explizite Ziele der gewählten Klonierungs-Strategie im vorliegenden Fall waren:

1. eine vollständige Inaktivierung des KNK-Proteins,
2. die Beibehaltung des Expressionsmusters, wiedergespiegelt in der Aktivität des β -Galactosidase-Enzyms.

Ausgangspunkt für das Konstrukt waren zwei Klone, die in einem ersten *screen* aus einer genomischen λ -Phagen-Bank gewonnen wurden (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Schütz, DKFZ, Heidelberg). Als Probe diente bei diesem ersten Versuch das PCR-Amplifikat "43" ("b", siehe Amplifizierung von Sp1-typischen Zink-Finger-Sequenzen aus genomischer Maus-DNA). Die Kontrolle der erhaltenen Klone durch weitere *Southern-Blot*-Hybridisierungen mit unterschiedlichen Bereichen der Knopfkopf-cDNA ergab, dass in diesem ersten Durchgang neben zahlreichen falschen Klonen ein Klon enthalten war, der praktisch die gesamte kodierende Region enthielt (gBtx2).

Dieser Klon wurde im Laufe der Arbeiten wie alle übrigen Klone zuvor auf Grund der sehr starken Neigung zur internen Rekombination in plcBS umkloniert (siehe Nutzung von *very low copy*-Vektoren (plcBS) für die Klonierung). Um die unter "Kartierung von genomischen Klonen mittels Restriktionsendonukleasen" beschriebene Methode anwenden zu können, wurde die Umklonierung nicht gerichtet, sondern nach Auffüllen der 5'-Überhänge des λ -Inserts in beiden Orientierungen relativ zur MCS von plcBS (Klone gBtx2-2 und gBtx2-3) durchgeführt.

Zur Feststellung der relativen Lage der kodierenden Regionen auf den gBtx2-Klonen und für die weiteren Klonierungsarbeiten hinsichtlich eines *Knock out*-Konstruktes wurde das genomische Fragment mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen kartiert. Hierzu wurden sie entsprechend des Protokolls unter

Strategie der gezielten Inaktivierung mittels homologer Rekombination (*Knock Out*)

Herstellung des *Knock Out*-Konstruktes

"Kartierung von genomischen Klonen mittels Restriktionsendonukleasen" mit ca. 90 Enzymen verdaut, deren Erkennungssequenz 6 oder mehr Basenpaare lang sind. Von diesen schnitten 20 nur ein oder zwei Mal innerhalb der genomischen Sequenz, wodurch die Positionen der Schnittstellen unmittelbar abgeleitet werden konnten. 6 Enzyme wiesen keine Schnittstellen auf, bzw. nur in der MCS des Vektors, so dass sie für eine spätere Linearisierung des fertigen Konstruktes in Frage kamen (das endgültige Konstrukt wurde mit XhoI linearisiert). Die so erstellte Karte ist in Abbildung 41 dargestellt.

Entfernung des 3. Exons zur funktionellen Inaktivierung des *Knk*-Gens

Ein Vergleich der Schnittstellen auf den beiden genomischen Klonen mit denen der cDNA zeigte, dass der Großteil der translatierten Sequenzen in einem einzigen Exon liegt. Dies wurde durch eine anschließende Sequenzierung des entsprechenden Bereiches von gBtx2 bestätigt. Weiterhin ergab der Vergleich, dass sich dieses Exon unmittelbar am 5'-Ende von gBtx2 befand.

5'- und 3'-homologe Sequenzbereiche

Für das *knock out*-Konstrukt wurden auch 5' von der Region, der durch die LacZ-Neo-Insertionskassette ersetzt werden sollte, homologe Bereiche zum endogenen Locus benötigt. Daher wurde ausgehend vom Klon gBtx2 die genomische Bank von Prof. Dr. Schütz ein weiteres Mal *gescreent*. Um die Zink-Finger-Box als mögliche Ursache für falsch-positive Hybridisierungssignale auszuschließen, wurde für diesen *screen* ein unmittelbar 3' von STOP-Codon gelegener Teil des Klons gBtx2 verwendet. Dieser lag zwischen der NruI- und der StuI-Schnittstelle von gBtx2 und war ca. 3,7kb lang (siehe Abbildung 41).

Aus diesem *screen* konnten insgesamt 4 weitere genomische Klone gewonnen werden, die dem Knopfkopf-Locus zugeordnet werden konnten: gBtxII-1, gBtxII-5, gBtxII-6 und gBtxII-9. Sie wurden durch den Verdau mit den Restriktions-Endonukleasen EcoNI, HpaI, NcoI, NotI und Sall untereinander abgeglichen und die relative Lage der einzelnen Klone zueinander bestimmt. Hierbei zeigte sich das in Abbildung 40 dargestellte Ergebnis.

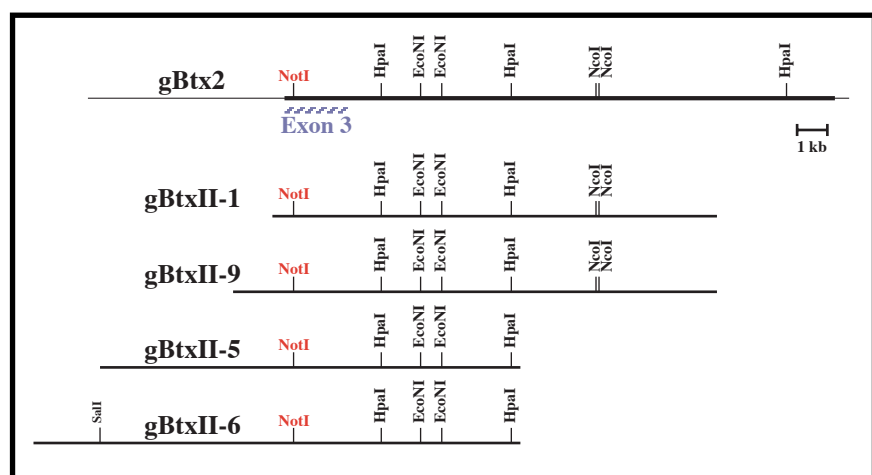


Abb.40: Verifizierung der verwendeten genomischen Klone durch den Vergleich ihrer Restriktionsschnittstellen. Vergleich der fünf isolierten unabhängigen genomischen Klone. Die Übereinstimmungen in den Restriktionsmustern zeigen, dass die Klone nicht durch Rekombinationen verändert wurden und damit den "realen" Locus repräsentieren sollten.

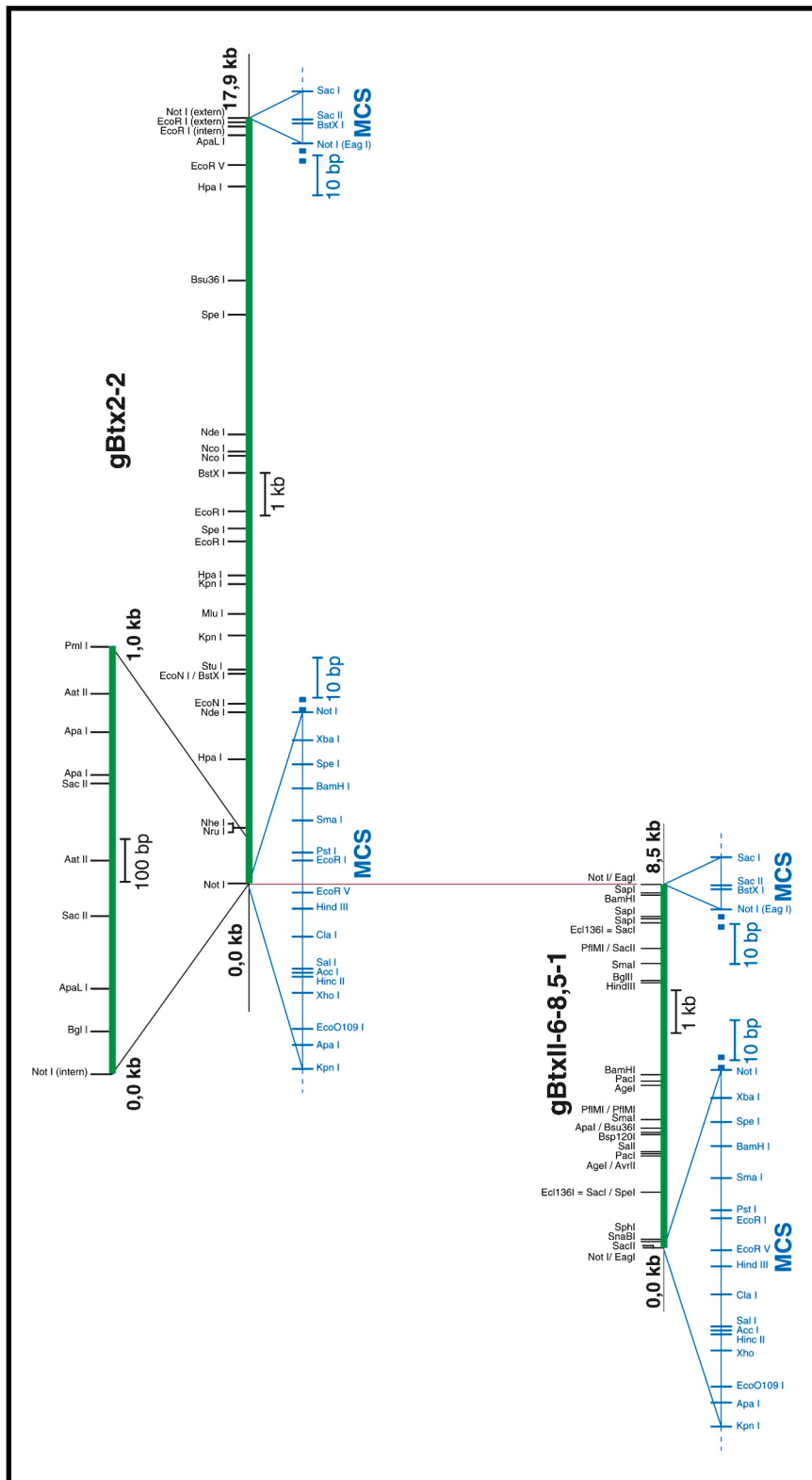


Abb.41: Schematische Darstellung der verwendeten genomischen Fragmente des Knopfkopf-Lokus zur Klonierung des Knock Out-Konstruktes. Die Karte zeigt eine maßstabgerechte Karte der genomischen Klone gBtx2-2 und gBtxII-6-8,5-1. Es sind neben den MCS nur solche Schnittstellen eingezeichnet die pro Klon nur 1× oder 2× vorkommen (Ausnahme: EcoR I in gBtx2-2, das neben der MCS noch 3× in dem genomischen Insert schneidet).

Klonierung des β -Galactosidase-Gens in das offene Leseraster des *Knk*-Gens

Unter Einbeziehung von gBtx2 und gBtxII-6 ergab sich eine Gesamtlänge von ca. 26,4kb des *Knopfkopf*-Lokus, die mit den gewonnenen genomischen Klonen abgedeckt werden konnte. Der Klon gBtxII-6 wurde wie gBtx2 analysiert. Dabei ergaben sich die in Abbildung 41 dargestellten Restriktionskarten.

Da beabsichtigt wurde, die Expression von *Knk* neben der Analyse mittels *in situ*-Hybridisierung auch über die Expression von LacZ zu ermitteln bzw. zu bestätigen, sollte eine Veränderung möglicher regulatorischer Sequenzen im *Knock out*-Konstrukt, wenn möglich, verhindert werden. Daher wurden nur Teile des dritten Exons entfernt, die für das Protein kodierten. Es wurde angenommen, dass die Transkriptionskontrolle mit hoher Wahrscheinlichkeit über Erkennungsmotive erfolgt, die 5' vom Transkriptionsstart liegen (eventuell vorhandene Teile des distalen Promotors, auf jeden Fall der komplette proximale Promoter) oder in den Intron-Sequenzen bzw. 3' vom translatierten Bereich (mögliche Enhancer-Elemente). Weiterhin wurde vorausgesetzt, dass die Translationskontrolle über die 5'- oder 3'-untranslatierten Regionen (UTR) erfolgt.

Basierend auf diesen Annahmen wurde zur Erzielung des ersten Ziels (vollständiger Funktionsverlust des KNK-Proteins, s.o.) der Bereich zwischen der SapI- und der NruI-Schnittstelle im dritten Exon entfernt. Damit wurden 461 der angenommenen 486 Aminosäuren entfernt, u.a. die Zink-Finger- und die btd-Boxen. Da nur die ersten 25 Aminosäurreste übrig bleiben, die lediglich eine Hälfte der Serin-reichen Domäne kodieren, wurde vorausgesetzt, dass damit die vollständige Inaktivierung des KNK-Proteins erreicht wurde.

Bezogen auf die zweite Zielsetzung (Beibehaltung sämtlicher regulatorischer Sequenzen) wurde angenommen, dass die Deletion keine Veränderungen bei der Transkription oder Translation bewirkt. Lediglich 6 Basenpaare 3' vom STOP-Codon wurden durch die dargestellte Deletion als nicht-translatierte Bereiche entfernt (siehe Abbildung 42 und 44), so dass der sehr unwahrscheinliche Fall eintreten müsste, dass die instruktive Information für die Proteinssequenz überlagert ist von regulatorischen Informationen.

Integration des *Thymidin-Kinase*-Gens in das *Knock Out*-Konstrukt zur Negativ-Selektion

Zur Verbesserung der Ausbeute an korrekt rekombinierten ES-Zell-Klonen wurde neben der LacZ/ Neo-Kassette (Expressions-Analyse und positiv-Selektion) auch eine Kassette mit dem *Thymidin-Kinase*-Gen des Herpes simplex Virus (HSV-TK) an das Ende des 3'-Homologiebereichs in das Konstrukt eingefügt. Diese dient zur negativ-Selektion gegen zufällige Integrationen. Bei der homologen Rekombination wird das TK-Gen nicht mit in das ES-Zell-Genom eingebaut und geht verloren. Sollte das Konstrukt zufällig in das Genom integrieren, würde das Gen erhalten bleiben und die betreffenden ES-Zellen bei Gabe von Gancyclovir durch die Aktivität des Thymidin-Kinase-Enzyms abgetötet werden.

Da eine homologe Rekombination nur effektiv verläuft, wenn das Konstrukt als linearisierte DNA vorliegt, musste verhindert werden, dass das TK-Gen nicht durch exonukleolytischen Verdau in den ES-Zellen inaktiviert wird. Hierzu wurde eine Klonierungs-Strategie gewählt, bei der die abschließende Linearisierung mit XhoI in der MCS des fertigen Konstruktes dazu führt, dass der

gesamte Vektoranteil (ca. 4,0kb von plcBS) das TK-Gen vor einem Angriff durch Exonukleasen schützt. Eine schematische Darstellung des Knock out-Konstruktes ist in Abbildung 43 wiedergegeben.

Table with 10 columns of genomic coordinates and corresponding DNA sequence. The table contains 1050 rows of data, representing a genomic region. The first column shows coordinates from 1) to 1050), and the subsequent columns show the DNA sequence in a 10-column format.

Abb.42: genomische Sequenz des Knopfkopf-Lokus. Bezogen auf den angenommenen Startpunkt der Transkription zeigt die Sequenz 7,0kb des Knk-Promotors sowie die ersten beiden Exons. Ebenfalls enthalten ist der gesamte kodierende Bereich des dritten Exons und ein Teil der 3'-untranslatierten Region (UTR). (dunkelrot: Exon 1, 2 und der translatierte Bereich von Exon 3. Hellrot: 3'-UTR des Exons 3.)

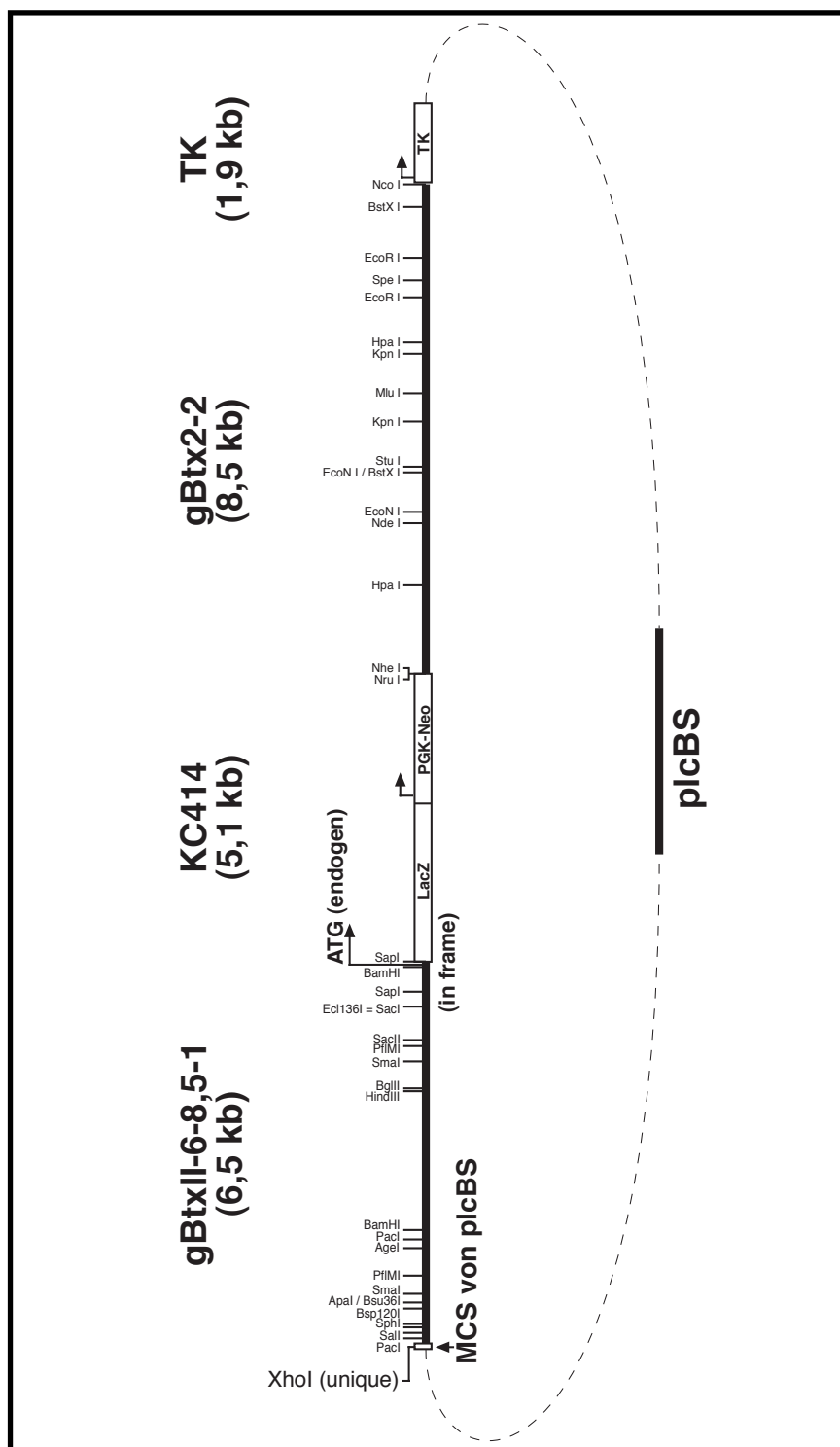


Abb. 43: Schematische Darstellung des Knock Out-Konstruktes. Das Konstrukt enthält 6,5kb homologe Sequenzen auf der 5'-Seite (aus gBtxII-6-8,5-1 entnommen) und 8,5kb homologe Sequenz auf der 3'-Seite (aus gBtx2-2 entnommen). Die Insertionskassette wurde im Leseraster des *Knopfkopf*-Gens kurz hinter dem endogenen ATG-Start-Codon einkloniert und verbindet das β -Galactosidase-Gen (LacZ) mit dem Promotor von *Knk*. Dahinter liegt das Neomycin-Resistenz-Gen, das über einen eigenen Promotor verfügt, der dem Phosphoglyceratkinase-Gen (PGK-Gen) entstammt. Die Insertionskassette ersetzt bis auf einen sehr kleinen Rest am 5'-Ende den gesamten kodierenden Bereich für das *KNK*-Protein, so dass von einer vollständigen Inaktivierung auszugehen ist. Die Linearisierung erfolgte über die eingetragene XhoI-Schnittstellen.

Das *Knock out*-Konstrukt wurde anschließend zur Elektroporation von ES-Zellen (die Zellen wurden aus Embryonen des Inzuchtstammes 129SV gewonnen) entsprechend des Protokolls aus Material und Methoden (auf Grund eines Missverständnisses wurde nicht auf die Präsenz des *TK*-Gens selektioniert). Von insgesamt 287 getesteten ES-Zell-Klonen wiesen ca. 60% bei einer *Southern Blot*-Analyse mit der 5'-externen-Probe nach Verdau der genomischen DNA mit *SpeI* das erwartete Bandenmuster für einen heterozygoten Zustand der *Knk*-Loci auf (Protokoll entsprechend der Angaben aus Material und Methoden). Diese unterscheiden sich nach einem Verdau mit *SpeI*, da im Wildtyp-Allel die Probe an ein ca. 15,6kb großes Fragment bindet, wohingegen im *Knock out*-Konstrukt auf Grund einer zusätzlichen *SpeI*-Schnittstelle im *LacZ*-Gen das hybridisierende Fragment nur noch ca. 10,7kb groß ist (siehe Schema in Abbildung 44). Diese Veränderung der Bandengröße wurde im weiteren Verlauf neben der Genotypisierung mittels PCR (siehe unten) auch zur Analyse der Mäuse bzw. Embryonen eingesetzt (siehe Abbildung 45).

Die Überprüfung der in Frage kommenden ES-Zell-Klone mit der 3'-externen Probe auf *EcoRV*-verdauter genomischer DNA ergab, dass acht Klone auch auf der anderen Seite das erwartete Muster aufwiesen, wobei die exakte Bandengröße nicht bekannt ist. Im Wildtyp-Allel ist lediglich eine der Schnittstellen bekannt und es konnte auf Basis der Kartierungen ausgeschlossen werden, dass innerhalb des bekannten Bereichs (mindestens 25,2kb) eine weitere *EcoRV*-Erkennungssequenz existiert. Im *Knock out*-Lokus ist eine zusätzliche Schnittstelle im *LacZ*-Gen enthalten, so dass das entsprechende Fragment nur noch ca. 18,4 kb groß ist (siehe Abbildung 44). Auf Grund des sehr starken Hintergrundes, den die 3'-externe Probe in der *Southern Blot*-Hybridisierung erzeugte, wurde die Probe nicht zur Genotypisierung der Mäuse bzw. Embryonen eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Eine Hybridisierung mit einer *LacZ*- und einer *Neo*-Probe zeigte, dass die weiter bearbeiteten Klone nur eine Integration pro Genom aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Von den insgesamt 9 ES-Zell-Klonen, die mit beiden externen Proben das erwartete Ergebnis zeigten, wurde anschließend ein Teil der genomischen ES-Zell-DNA mit *SmaI* und *XbaI* verdaut und durch *Southern Blot*-Hybridisierung mit einer *Neo*-Probe auf multiple Insertionen getestet. In allen Fällen konnte nur eine Insertion gezeigt werden, so dass davon ausgegangen wurde, dass die homologe Rekombination korrekt erfolgt war (Rekombinationsfrequenz ca 1:32).

homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen und Überprüfung der Rekombinations-Ereignisse

von 287 getesteten ES-Zell-Klonen entsprechen 9 Klone den Erwartungen für eine erfolgreiche homologe Rekombination

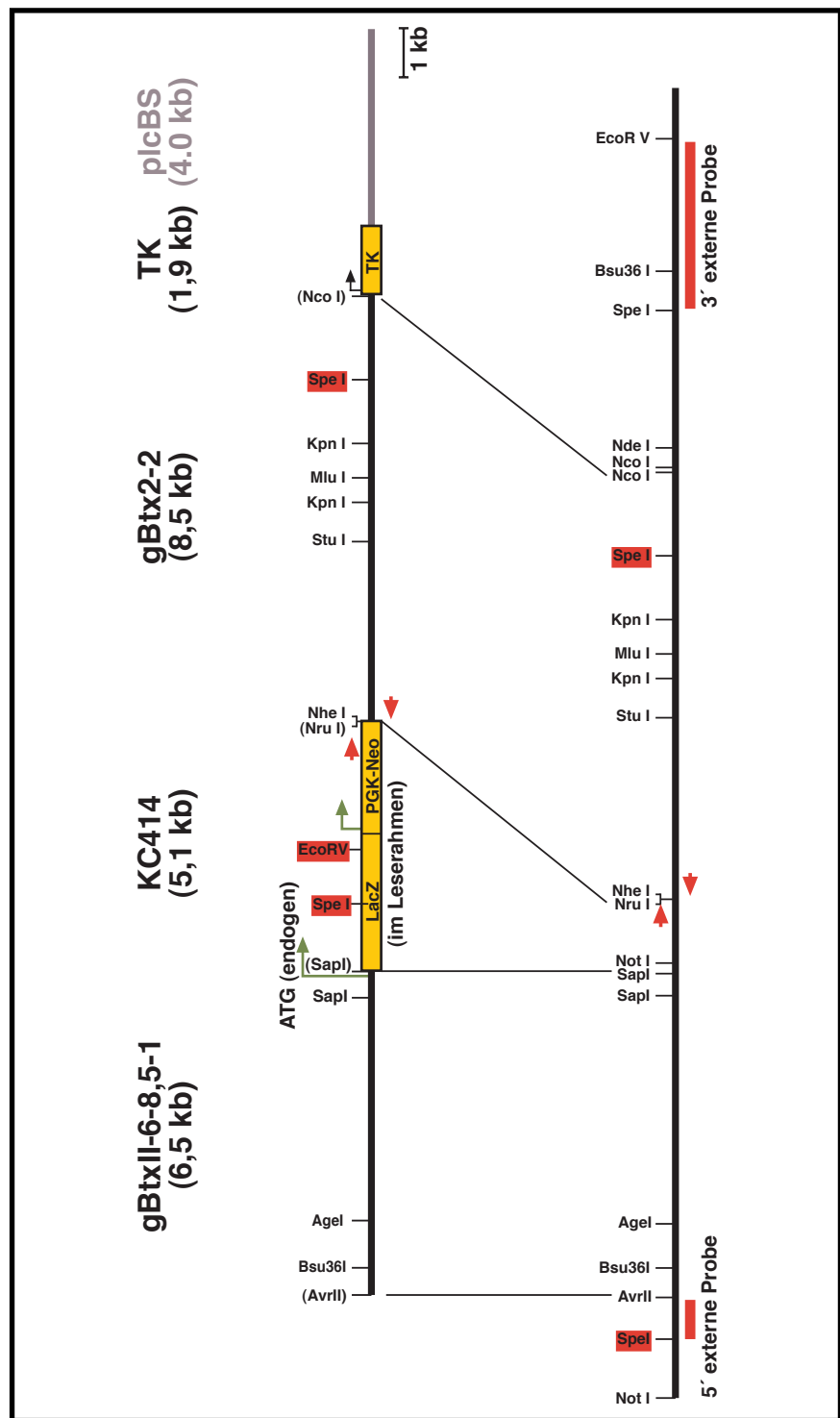


Abb.44: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Knock Out-Konstruktes und des Wildtyp-Allels. Vergleich des rekombinanten mit dem wildtypischen (WT) *Knopfkopf*-Allels. Eingetragen sind die 5'- und 3'-externen Proben, sowie die Lage der verwendeten PCR-Primer. Der Verdau mit SpeI führt beim WT-Locus zu einem ca. 16kb großen Fragment, beim KO-Locus zu einem ca. 11 kb großen Fragment, dass mit der 5'-externen Sonde hybridisiert. Der Verdau mit EcoRV führt beim WT-Locus zu einem >25kb großen Fragment, dass mit der 3'-Sonde hybridisiert. Das KO-Fragment muss mindestens 8,5kb kleiner sein (die genaue Größe ist in beiden Fällen unbekannt). Die PCR-Genotypisierung erzeugt ebenfalls unterschiedlich große Amplifikate (siehe Abbildung 45).

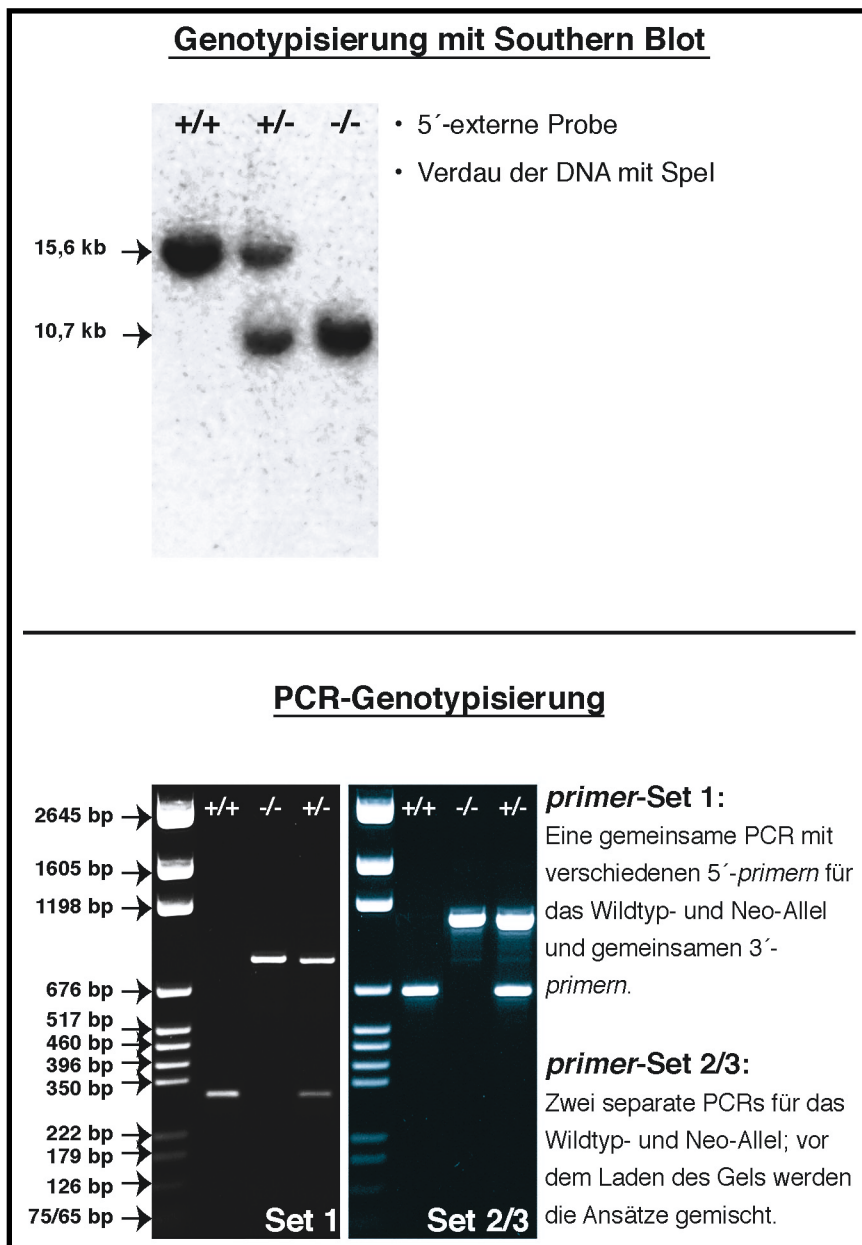


Abb. 45: Genotypisierung der Knopfkopf-Mutanten. Ergebnisse der in Abbildung 44 theoretisch dargestellten Genotypisierung. Die Wildtyp-Bande verringert sich durch den Austausch des *Knk*-Gens mit der LacZ-Neo-Kassette von 15,6kb auf 10,7kb. Die verwendeten PCRs erzeugen je nach Primer-Set eindeutig unterscheidbare Banden für den Wildtyp- und KO-Locus (PCR mit Set 2/3 erfolgt in zwei unterschiedlichen Ansätzen, die erst nach der PCR für die Analyse per Agarose-Gelelektrophorese gemischt werden).

Die ES-Zell-Klone 16 und 92 wurden anschließend per Morulae-Aggregation zur Erzeugung von männlichen chimären Mäusen verwendet. Die Chimären wurden mit NMRI-Weibchen verpaart und die Nachkommen an Hand der Augenfarbe auf Keimbahntransmission getestet. Die Chimären des Klons 16 zeigten keine Weitergabe des genetischen Materials der ES-Zellen und wurden nicht weiter verwendet. Die Chimären des Klons 92 dagegen wiesen eine Keimbahntransmission der rekombinanten DNA auf und wurden zur Zucht einer Kolonie weiter verwendet.

Erzeugung von chimären Mäusen mittels Morulae-Aggregation

Aufbau von transgenen NMRI- und 129SV-Mauskolonien

Auf Grund der höheren Nachkommenzahl wurde die Kolonie im Wesentlichen mit NMRI-Auskreuzungen aufgebaut. Um sicher zu gehen, dass der heterogene genetische Hintergrund der NMRI-Tiere keine Artefakte hinsichtlich des Phänotyps der homozygoten Mäuse erzeugt, wurde zusätzlich eine kleinere Kolonie mit 129SV-Mäusen aufgebaut. Da auch die ES-Zellen aus diesem genetischen Hintergrund gewonnen wurden, handelte es sich demnach bei den Tieren um reine Inzuchtstämme. Ein Vergleich der Phänotypen zwischen NMRI- und 129SV-Mutanten zeigte keine Unterschiede, so dass sie als gleichwertig betrachtet wurden.

Überprüfung der Genotypen der Nachkommen mittels *Southern-Blot* und PCR

Da die *Southern-Blot*-Hybridisierung langwierig und bei kleinen Embryonen (< E8,5) auf Grund der geringen DNA-Menge problematisch ist, wurde auf Basis von 100 DNAs, die Mittels der 5'-Probe bereits genotypisiert waren, zwei PCR-Protokolle zur weiteren Genotypisierung ausgearbeitet. Das erste Protokoll nutzt einen gemeinsamen 3'-5'-Primer und je einen 5'-3'-Primer für die Insertions-Kassette bzw. den Wildtyp-Lokus (WT-Lokus) in einem gemeinsamen Reaktionsansatz, die aber zu unterschiedlich großen Amplifikaten führen. Beim zweiten Protokoll werden zwei verschiedene PCR-Ansätze verwendet, die ebenfalls unterschiedlich große Amplifikate erzeugen (siehe Abbildung 45).

Die erste PCR-Genotypisierung erfolgt mit den Oligonukleotiden Bxcf10 und Neof1 (5' nach 3') sowie Bxcr10 (3' nach 5'). Die zweite erfolgt mit den Oligonukleotiden Bxcf9 (5' nach 3') und Bxcr12 (3' nach 5'), bzw. Neof1 (5' nach 3') und Bscr12 (3' nach 5'). Eine genaue Beschreibung des Protokolls findet sich in den Methoden. Die Primersequenzen sind dort in Tabelle 1 angegeben.

Analyse des Phänotyps der Knk-Mutanten

homozygote *Knk- Knock Out*-Mäuse waren nicht lebensfähig

Die Verpaarung von heterozygoten Knk-Mutanten ergaben keine lebensfähigen Mäuse. Daher wurden die trächtigen Weibchen vor der Geburt getötet und die Embryonen präpariert. Bei der Analyse der Embryonen zeigte sich, dass entsprechend des erwarteten Wertes nach Mendel 25 % homozygote Mutanten durch Genotypisierung der DNA mittels *Southern-Blot*-Hybridisierung bzw. PCR nachgewiesen werden konnten. Die Embryonen starben erst bei der Geburt bzw. unmittelbar danach. Die Beobachtung, dass bei der Untersuchung der Würfe keine toten Mutanten gefunden werden konnten, erklärt sich damit, dass die Muttertiere i.d.R. tote Jungtiere unmittelbar nach der Geburt auffressen.

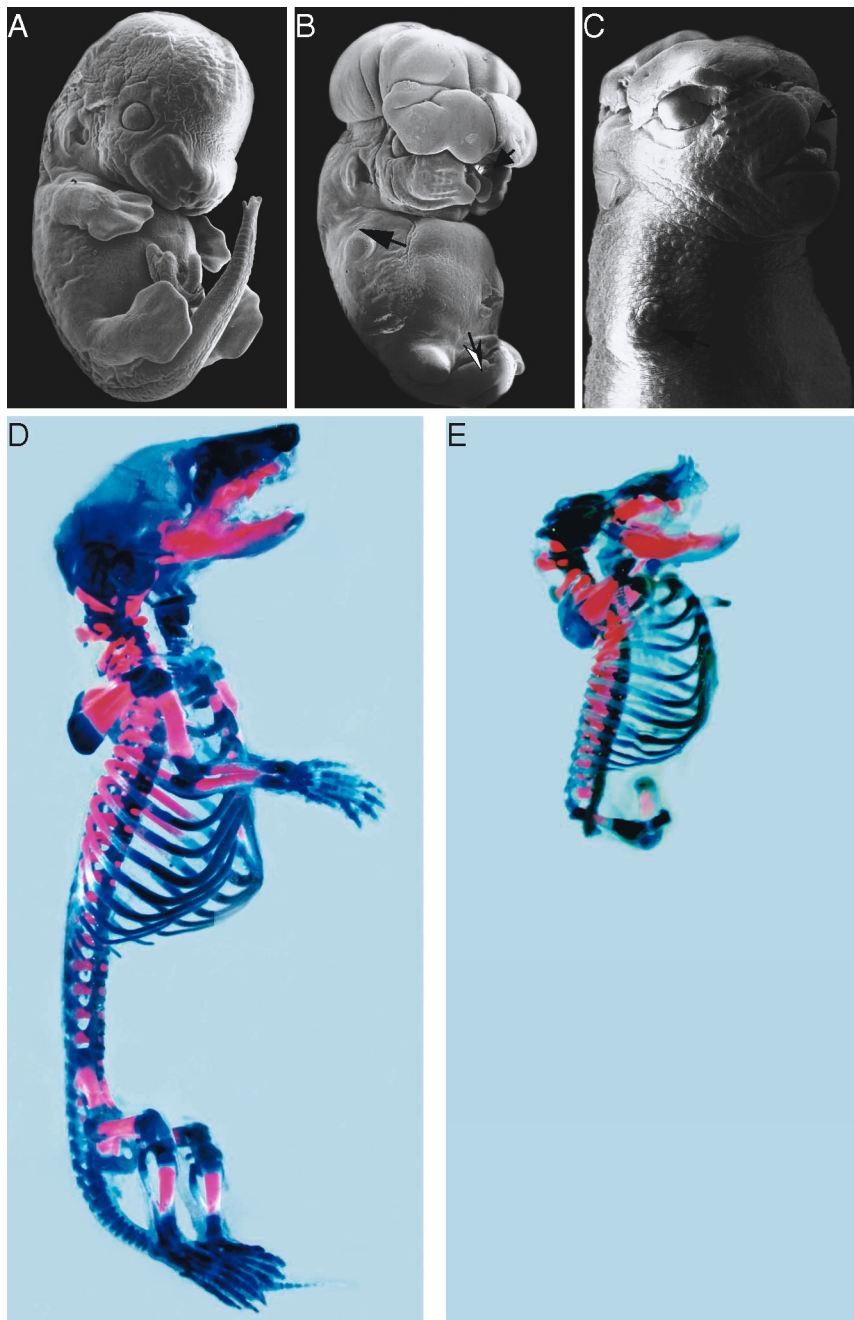


Abb. 46: Übersicht des Phänotyps der *Knopfkopf*-Mutante. Der Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen (A und D) zeigt, dass die Geschwister, die homozygot für die *Knk-Knock Out*-Mutation sind, starke phänotypische Veränderungen aufweisen. Diese betreffen alle morphologischen Strukturen, in denen während der Embryogenese das *Knk*-Gen exprimiert wird. Besonders auffällig ist 1. der Verlust der Extremitäten (lange Pfeile in B und C), 2. der Nase und des Gaumens (kurze Pfeile in B und C), 3. der Verlust der lumbalen, sakralen und Schwanzwirbelsäule, die u.a. in einer Spina bifida resultiert (schwar-weißer Pfeil in B) und 4. ein vollständig ausgeprägter Holoprosenzephalus. Der Holoprosenzephalus führt dazu, dass der gesamte obere Schädelbereich fehlt. Im Skelettpräparat ist ebenfalls zu erkennen, dass ein Teil des Oberkiefers mit der Nase fehlt. (A–C: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. D und E: Skelett-Präparationen. A und B sind E12,5 alte Geschwister. C ist ein 17,5Tage alter Embryo, D und E sind ebenfalls 17,5Tage alte Embryonen, aber Geschwister aus einem Wurf.)

homozygote *Knk- Knock Out*-Embryonen zeugten multiple phänotypische Veränderungen

nicht-betroffene Skelettstrukturen der homozygoten Mutanten waren ca. 10% kleiner als bei wildtypischen Kontrolltieren

Wie in Abbildung 46 dargestellt, wiesen die Mutanten multiple phänotypische Veränderungen auf. Diese korrelierten vollständig mit den Expressionsdomänen des *Knopfkopf*-Gens: Das Vorderhirn, die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG), die Nasenanlage, die Extremitäten (AER) und die Schwanzknospe. Die einzige Ausnahme war das Rückenmark, das zumindest im thorakalen Bereich weitgehend normal gebildet wurde, obwohl hier *Knk*-mRNA in wildtypischen (WT) Tieren nachgewiesen werden konnte, allerdings in geringeren Mengen als in den übrigen genannten Regionen (siehe WMISH).

Besonders zu beachten ist, dass trotz der sehr gravierenden morphologischen Konsequenzen die Körperteile, die nicht unmittelbar von der Mutation betroffen waren, nur um lediglich ca. 10% kleiner waren als bei den WT- bzw. heterozygoten Geschwistern (siehe Abbildung 47). Die entsprechenden Messergebnisse von vier Skelettmerkmalen sowie dem Kehlkopf sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst (E18,5).

morphol. Struktur	Wildtyp	Mutante	Mutante in % von WT
Unterkiefer (Mandibular)	5,42 mm	4,91 mm	90,6 %
Kehlkopf (Cartilago cricoidea)	1,18 mm	1,10 mm	93,2 %
Atlas (1. cervic. Wirbel)	2,68 mm	2,41 mm	89,9 %
14. Wirbel (7. thorac. Wirbel)	1,53 mm	1,40 mm	91,5 %
Schulterblatt (Scapula)	4,10 mm	3,49 mm	85,1 %

Tabelle 2: Größenvergleich von Skelettelementen zwischen wildtypischen Embryonen und homozygoten *Knk*-Mutanten aus dem selben Wurf. Der Vergleich zeigt, dass die Strukturen, die nicht von der Mutation betroffen sind, fast normal entwickelt sind. Der prozentuale Größenunterschied beträgt lediglich ca. 10%. Selbst beim Schulterblatt, dass als Teil der Extremitätenanlage etwas stärker durch die Mutation betroffen ist, werden noch ca. 85% der Wildtyp-Größe erreicht. (siehe auch Abbildung 47.)

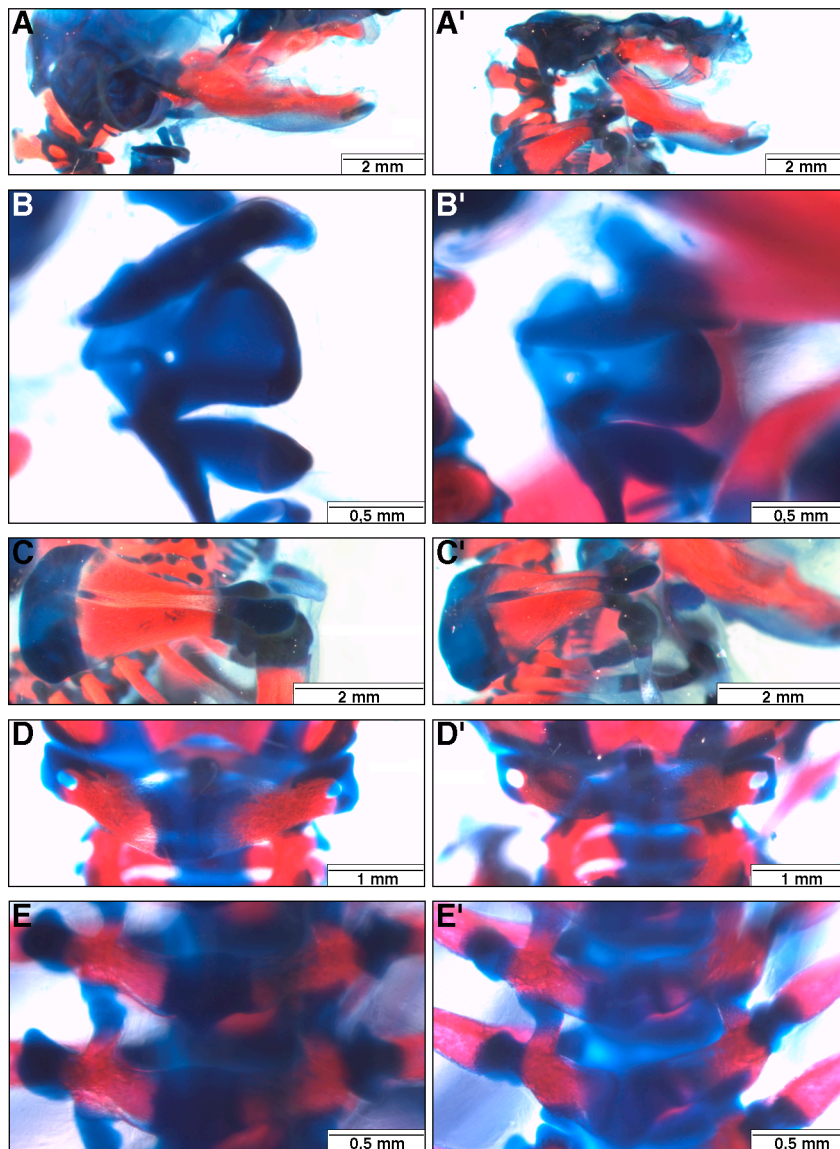


Abb.47: Das Größenwachstum der Knopfkopf-Mutanten ist um ca. 10 % reduziert. Der Vergleich von fünf verschiedenen Skelettelementen zeigt, dass die nicht von der Mutation betroffenen Strukturen nur unwesentlich kleiner sind als diejenigen der Wildtyp-Geschwister. Verglichen wurden der Unterkiefer (A, A'), der Kehlkopf (B, B'), das Schlüsselbein (C, C'), der Atlas (D, D') und der 7. thorakale Wirbel (E, E'). Die dargestellten Embryonen sind 17,5Tage alt und entstammen demselben Wurf.

Ebenfalls hervorzuheben ist, dass die phänotypischen Veränderungen lokal ausschließlich auf die Knk-exprimierenden Strukturen begrenzt waren. Deutlich wird dies bei der Betrachtung des Gehirns und der Augen. Während die WMISH und LacZ-Färbung eine starke Aktivität im Telenzephalon und der MHG belegten, war das Dienzephalon weitgehend Knk-negativ. Dies spiegelte sich bei den homozygoten Mutanten darin wider, dass trotz der erheblichen Veränderungen in den genannten Strukturen bzw. den aus ihnen hervorgehenden Geweben die Augen, die im Zusammenspiel von Dienzephalon und Ektoderm gebildet werden,

die phänotypischen Veränderungen der homozygoten Mutanten betreffen nur Knk-exprimierende Strukturen

keine offensichtlichen Veränderungen aufwiesen und auch die Sehnerven inklusive des optischen Chiasmas vorhanden waren (Daten nicht gezeigt).

Für die phänotypischen Änderungen als direkte Folge der fehlenden Knk-Aktivität sprachen auch die weitgehend normalen heterozygoten Tiere. Sollte z.B. die Expression des Neomycin-Resistenzgens für die Missbildungen verantwortlich gewesen sein (eine Beobachtung, die in mehreren Fällen belegt werden konnte), wäre damit zu rechnen gewesen, dass auch die heterozygoten Tiere betroffen sind. Diese sind jedoch bis auf eine leichte Veränderung an der Schwanzwirbelsäule nicht von ihren WT-Geschwistern unterscheidbar gewesen. Diese Anomalie trat bei ca. einem Drittel aller heterozygoten Tiere auf und äußerte sich als leichter Knick in den letzten 5-10mm der Schwanzspitze (Daten nicht gezeigt).

Die spezifischen Defekte der Knopfkopf-Mutation bei homozygoten Tieren konnten in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

1. ein weitgehendes Fehlen,
2. eine drastische Veränderung der betroffenen Struktur.

bei den homozygoten Mutanten werden die Extremitäten induziert, aber nicht ausgebildet

Wie in Abbildung 48 zu erkennen ist, fehlten die Extremitäten fast vollständig. Die Induktion war von der Mutation nicht betroffen, da bis ca. E 10,5 die Beinanlagen normal angelegt wurden. Erst mit der Ausbildung der apikalen ektodermalen Leiste (AEL) zeigte sich der Effekt der fehlenden Knk-Aktivität; während im WT ab ca. E 10,5 und in späteren Stadien eine rasterelektronenmikroskopisch deutlich sichtbare Leiste sichtbar war, fehlte diese bei den Mutanten. Das daran anschließende Auswachsen von proximalen zu distalen Extremitätenstrukturen konnte in den homozygoten Knopfkopf-negativen Embryonen nur noch in Ansätzen beobachtet werden. An Skelettpräparationen zeigte sich, dass nur rudimentäre Skelettelemente distal vom Schulter- bzw. Beckengürtel ausgebildet wurden, die als Humerus- und Femur-Reste gedeutet werden können.

die Mutanten durchlaufen keine sekundäre Gastrulation

Der Schulter- und Beckengürtel waren in unterschiedlichem Maße von der fehlenden Knk-Aktivität betroffen: Während die Scapulae fast normale Größe erreichten (siehe Tabelle 2), waren die Beckenknochen deutlich in Größe und Form fehlgebildet. Der sehr viel stärker ausgeprägte Defekt in diesem Bereich fällt räumlich mit der zweiten betroffenen Struktur zusammen, der Schwanzknospe. Die Schwanzknospe bildet während der sekundären Gastrulation die Wirbelsäulenstrukturen caudal von den thorakalen Wirbel. Diese fehlen den Mutanten vollständig und in keiner Phase der Embryonalentwicklung sind differenzierte Somiten oder die aus ihnen entstehenden Strukturen erkennbar. Als Folge liegen die Beckenknochen ohne eine feste Verbindung zur Wirbelsäule im Gewebe.

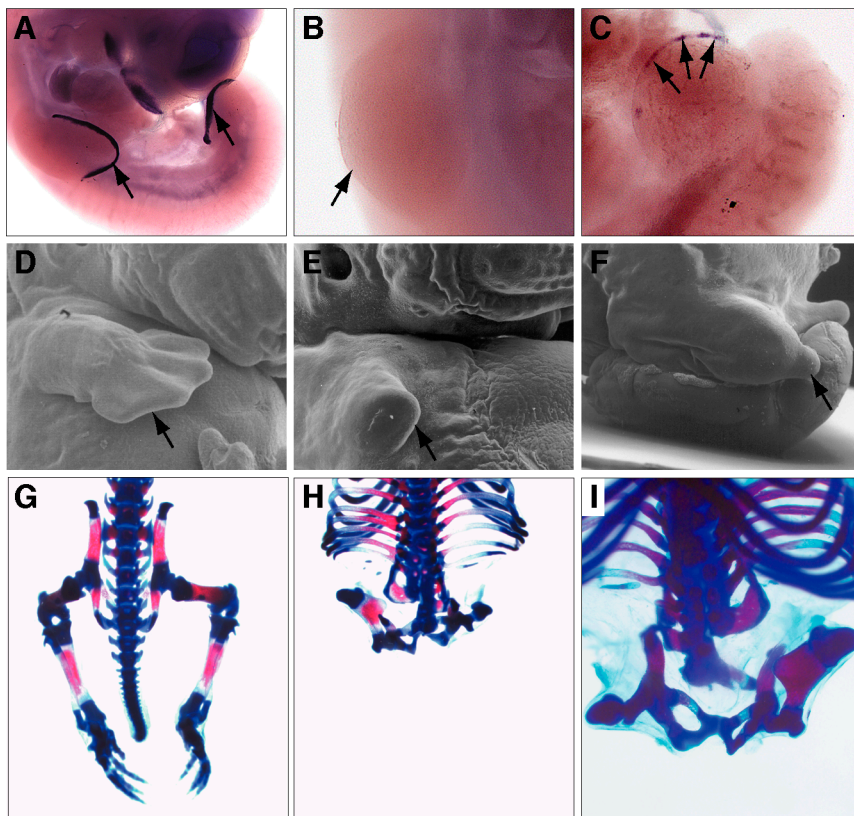


Abb.48: Der Verlust der Knk-Aktivität führt zu einem Verlust der apikalen ektodermalen Leiste (AEL) und einer weitgehenden Reduktion der Extremitäten. Bei den homozygoten Knk-Mutanten ist die AEL weder durch die Expression von Fgf8 (A–C), noch morphologisch mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (D–F) nachweisbar. Allerdings wird sie zumindest zu Beginn der Entwicklung der Extremitätenanlagen angelegt, was durch die schwache Fgf8-Expression in den Beinknospen sichtbar wird (C). In der weiteren Embryogenese führt dies zu einem weitgehenden Verlust der Beine, von denen nur rudimentäre Reste gebildet werden (H und I). Eine weitere deutliche Veränderung gegenüber den wildtypischen Tieren ist, dass das Becken nicht mehr an der Wirbelsäule angesetzt ist. Durch das Fehlen der lumbalen und sakralen sowie der Schwanzwirbelsäule liegt das Becken frei im Gewebe. (A–C: WMISH mit Fgf8 auf ca. E10,5 Embryonen; B zeigt die etwas weiter entwickelte Vorderbeinanlage, die keinerlei Fgf8-Expression zeigt, C zeigt die jüngere Hinterbeinanlage, die ein sehr schwaches anfängliches Fgf8-Signal aufweist – die Pfeile in A deuten auf die AEL im WT-Embryo, die Pfeile in B und C auf die Region der Beinanlage, die die AEL ausbilden sollte. D–F: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 12,5 (D, E) bzw. 13,5 (F) Tage alten Embryonen; der Pfeil in D weist auf die Region der AEL, die bereits eine deutlich ausgebildete Hand umschließt, die Pfeile in E und F deuten auf die Region, die eine entsprechende AEL aufweisen sollte; die Aufnahme in F zeigt, dass zumindest anfänglich eine Knospe gebildet wird, die trotz des Fehlens der AEL und Fgf8-Expression auswächst. G–I: Skelettpräparationen des Beckengürtels und der Hinterbeine; G zeigt das WT-Kontrolltier, H und I die Knk-Mutante; bei den Mutanten sind die Beine auf zwei verkümmerte Skelettreste reduziert, die möglicherweise dem Oberschenkel entsprechen; die Abbildung I zeigt, dass das gesamte Becken frei im Gewebe liegt und keine Verbindung zur Wirbelsäule besitzt.)

Ähnlich schwere Defekte zeigten sich im Bereich der Nase und des Oberkiefers. Der gesamte nasale Bereich fehlte den homozygoten Mutanten inklusive des Gaumendaches und große Bereiche des Oberkiefers. Der Unterkiefer dagegen, der keine direkte Verbindung zur Nase hat, entwickelte sich in den untersuchten

den Mutanten fehlt die Nase und große Teile der Gesichts- und Schädelknochen

Knk-negativen Embryonen fast zur normalen Größe und Form (siehe Tabelle 2 und Abbildung 48).

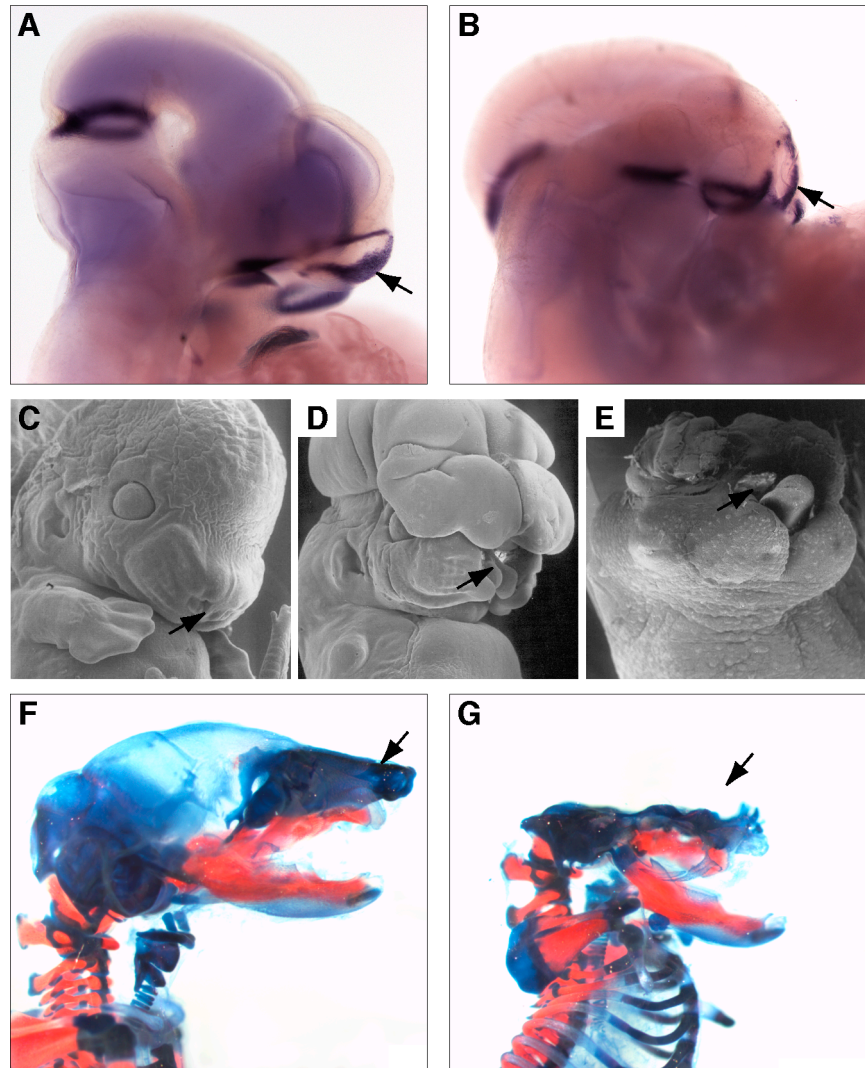


Abb.49: In der Knk-Mutante werden die äußeren Nasenstrukturen induziert, aber nicht ausgebildet. Die Nasenplakode, die das prospektive neurogene Riechepithel bildet, induziert in den Wildtyp-Embryonen im umgebenden ektodermalen Gewebe die Expression von Fgf8 (A). Ein Vergleich mit der Knk-Mutante (B) zeigt, dass auch hier Fgf8 induziert wird. In der weiteren Entwicklung können die Nasenstrukturen, die sowohl das Riechepithel als auch das Nasenskelett und den Gaumen bilden, nicht ausgebildet werden. (A, B: WMISH mit einer Fgf8-Sonde (Pfeile: Fgf8-Signal). C–E: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Nasenentwicklung (Pfeile: Nase bzw. Missbildung aufgrund der defekten Nasenbildung). F, G: Skelettpräparation des Kopfes (Pfeile: Nase bzw. Missbildung aufgrund der defekten Nasenbildung). A, C, F: Wildtypembryonen. B, D, E, G: homozygote Knk-Mutanten. A, B: E10,5. C, D: E12,5. E: E19,5. F, G: E17,5.)

die homozygoten Mutanten wiesen Fehlbildungen des Telencephalons und der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze auf

Die Defekte in der Nasenregion gingen direkt in einen Holoprosenzephalus über, bei dem die Reste des Telencephalus lappenförmig über die offenen Schädelränder herausragten. Im Bereich des Dienzephalons fand zwar in vielen Fällen anfänglich eine Fusion der Neuralfalten statt, in der späteren Entwicklung ab ca. E 12,0 brach das dort gebildete Neuralrohr jedoch wieder auf, was vermutlich auf die Wachstumsbewegungen im Bereich des Telencephalons

zurückzuführen ist. Auch im Bereich des Stammhirns fand keine Fusion der Neuralfalten statt und das Zerebellum fehlte vollständig. Anfänglich war der zephale Bereich bis ca. E 13,0 durch ein deutlich zu starkes Wachstum gekennzeichnet, was zu einem blumenkohlartigen Aussehen führte (siehe Abbildung 46B). Im weiteren Verlauf der Entwicklung reduzierte sich das relative Wachstum jedoch erheblich, wodurch zum Zeitpunkt der Geburt nur noch kleine Reste des Gehirns als "Knopf" auf dem offenen Kopf der Embryonen sichtbar war (Abbildung 49E).

Die molekulargenetische Analyse ergab, dass keiner der untersuchten genetischen Marker von der Mutation betroffen waren. An der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze konnten z.B. die Transkripte von *Otx2*, *FGF8*, *Pax2* oder *Wnt1* in vergleichbarer Menge und Position zu den wildtypischen Geschwistern nachgewiesen werden.

Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang die molekulare Architektur des sich entwickelnden Telenzephalons. Obwohl dies wie oben gezeigt massiv von der fehlenden *Knk*-Aktivität betroffen war, konnten alle untersuchten genetischen Marker bis mindestens E 15,5 nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen eine *inside-out*-Architektur: Die ventrikulären Schichten (z.B. durch *Pax6* gekennzeichnet) befanden sich auf der jetzt außen liegenden Oberfläche des Telenzephalons und die äußeren Schichten umgaben eine neue gebildete Kavität (siehe *Ngn2*). Diese "umgestülpte" Entwicklung ist in einer schematischen Darstellung zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierungen in den Abbildungen 51 und 52 dargestellt.

die Mittelhirn-
Hinterhirn-Grenze
wurde normal angelegt

trotz der Fehlbildungen
zeigte sich eine
ausgeprägte molekulare
Differenzierung des
Telenzephalons, die
jedoch "*inside-out*"
erfolgte

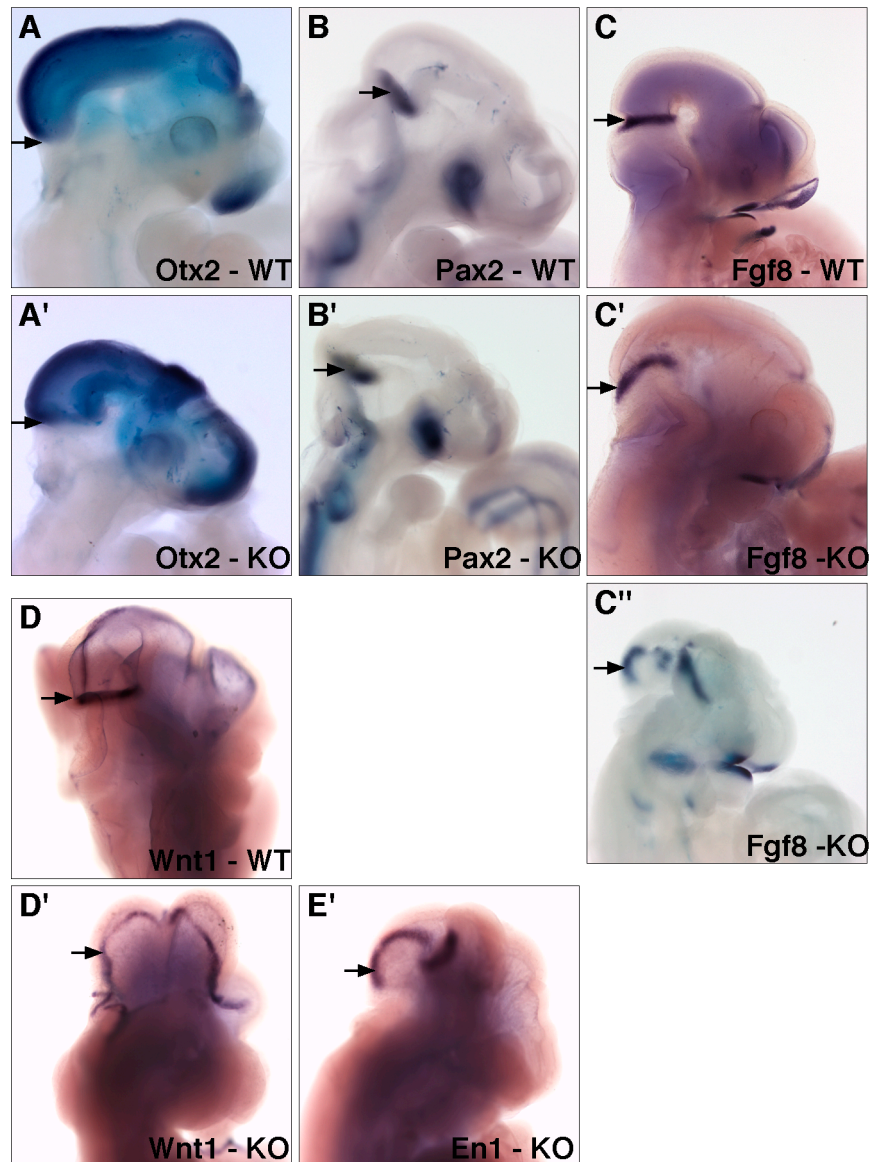


Abb.50: Die Knk-Mutation beeinträchtigt nicht die frühe molekulargenetische Musterbildung der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze. Die Abbildung zeigt, dass alle untersuchten molekularen Marker weitgehend normal exprimiert werden. Durch die bereits stattfindenden morphologischen Veränderungen resultiert eine räumliche Verschiebung der Expression. Dennoch bleibt die MHG (Pfeile in den Fotos) eindeutig erkennbar, selbst wenn das Neuralrohr nicht mehr geschlossen ist, wie bei den Embryonen in C'' und D'. (A–E': WMISH auf wildtypischen Embryonen (A–D) oder homozygoten Knk-Mutanten (A'–E')). Die WMISH mit der En1-Probe ergab bei den wildtypischen Tieren eine starke Hintergrundfärbung, auf Grund derer die makroskopisch klar erkennbaren Expressionsdomänen nicht mehr photographisch abgebildet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Alle Embryonen sind ca. 9,5 Tage alt.)

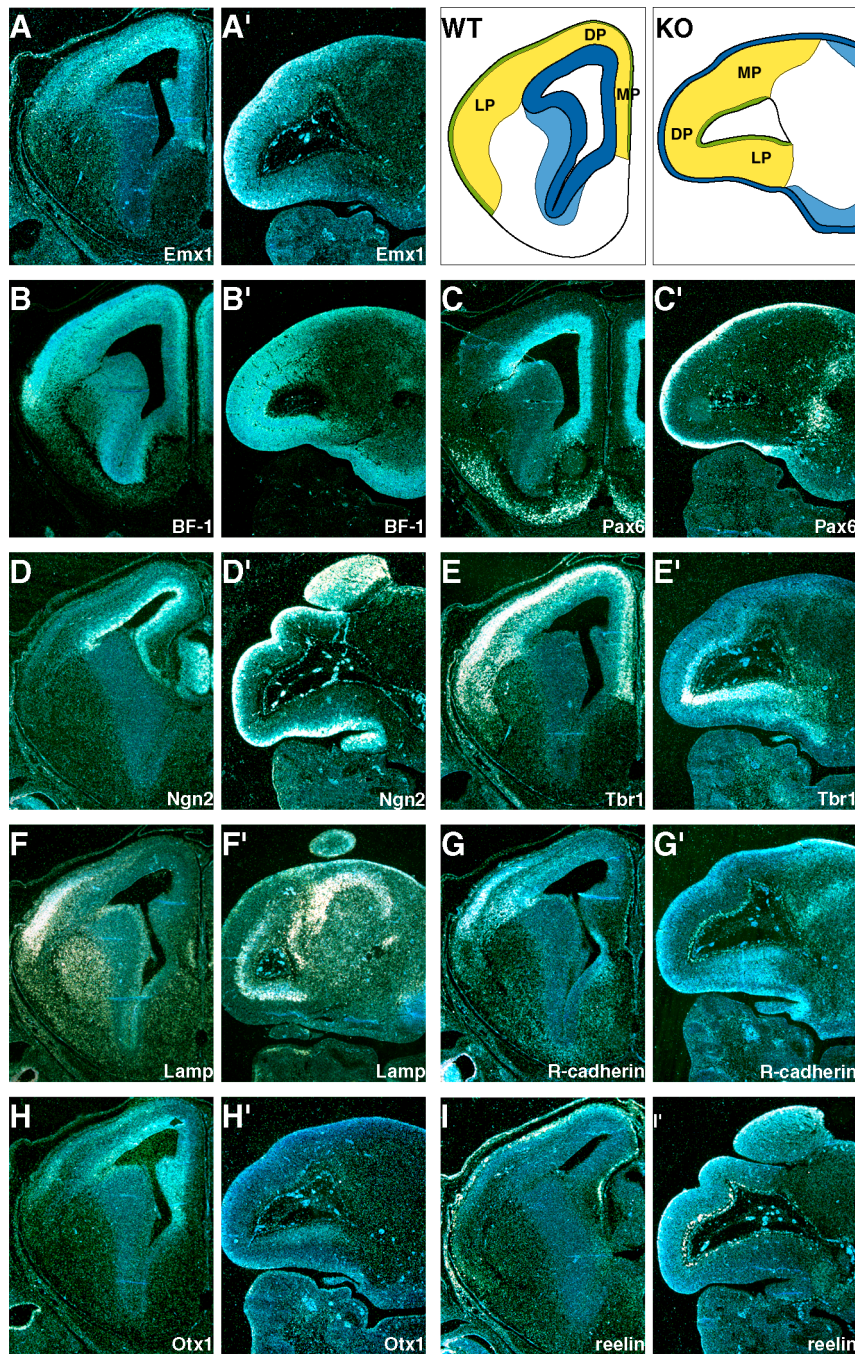


Abb.51: Differenzierung des dorsalen Telenzephalons (E15.5). Vergleich der wildtypischen telencephalen Differenzierung (A–I) mit derjenigen von homozygoten *Knk*-Mutanten (A'–I'). Alle getesteten Marker sind klar nachweisbar, aber in einer "inside out"-Architektur. Die Zusammenfassung der Resultate ist schematisch in den Zeichnungen der Wildtyp-Situation (WT) und der *Knock Out* (KO)-Situation dargestellt. *Emx1* markiert sowohl die ventrikuläre Zone als auch die Mantelzone fast im gesamten dorsalen und medialen Pallium. Eine ähnliche Verteilung weist *Pax6* auf, ist aber weitgehend auf die ventrikuläre Zone beschränkt. Interessant ist, dass sogar der Strom von Zellen, die im Wildtypen an der Grenze vom ventralen Pallium zur lateralen ganglionischen Erhebung sichtbar ist und einen "Klumpen" *Pax6*-positiver Zellen erzeugt, der demnach der Anlage des piriformen Cortex und der anterioren Amygdala entspricht. Ebenfalls vorhanden sind relativ späte Differenzierungsmarker der corticalen Platte, wie z.B. *reelin*.

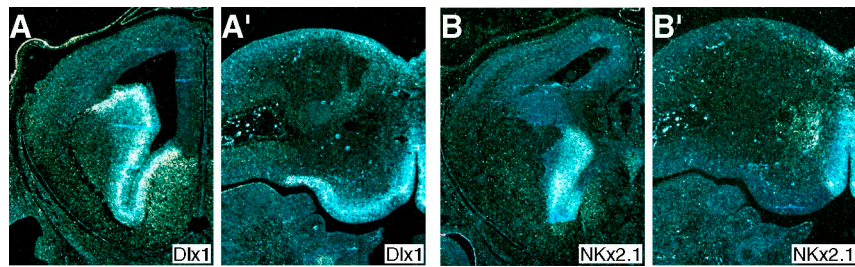


Abb.52: Differenzierung des basalen Telencephalons (E15.5). Das Ergebnis bei der Untersuchung von basalen Markern entspricht den Ergebnissen der dorsalen Marker. Sowohl Dlx1 als auch Nkx2.1 werden exprimiert, sind bei den Mutanten aber nicht innerhalb des Telencephalons in der ventrikularen und subventrikularen Zone zu finden, sondern auf der Oberfläche des mutierten Gewebes. Die Stärke der Expression ist dabei jedoch kaum verändert und die Expressionsgrenzen nach wie vor sehr scharf abgegrenzt. Dies zeigt, dass die Musterbildung trotz der massiven Strukturveränderungen weitgehend normal ablaufen. (A, B: Wildtyp; A', B': *Knopfkopf*-Mutante.)

das Rückenmark zeigte keine morphologischen oder molekularen Veränderungen

Vergleichbar mit den Ergebnissen für das Telencephalon konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch das Rückenmark im thorakalen Bereich trotz seiner morphologisch fast normalen Entwicklung in seiner molekularen Architektur verändert war (das Rückenmark ist wie z.B. der Kehlkopf etc. um ca. 10-15% kleiner hinsichtlich des Durchmessers). Daher wurde auch hier das Expressionsprofil unterschiedlicher Marker untersucht. Diese zeigten jedoch keinerlei Veränderungen, wie der Abbildung 53 zu entnehmen ist.

die fehlende sekundäre Gastrulation führte zu einer *Spina bifida* caudal des thorakalen Bereiches

Caudal vom thorakalen Bereich lag eine starkt ausgeprägte Spina bifida vor. Diese konnte als direkte Folge des Ausbleibens der sekundären Gastrulation betrachtet werden, da z.B. keine Wirbelsäule in diesem Bereich gebildet wurde. Das Gewebe der Neuralplatte zeigte keine erkennbaren Differenzierungen und zahlreiche Zellen waren im TUNEL-Essay positiv, also apoptotisch.

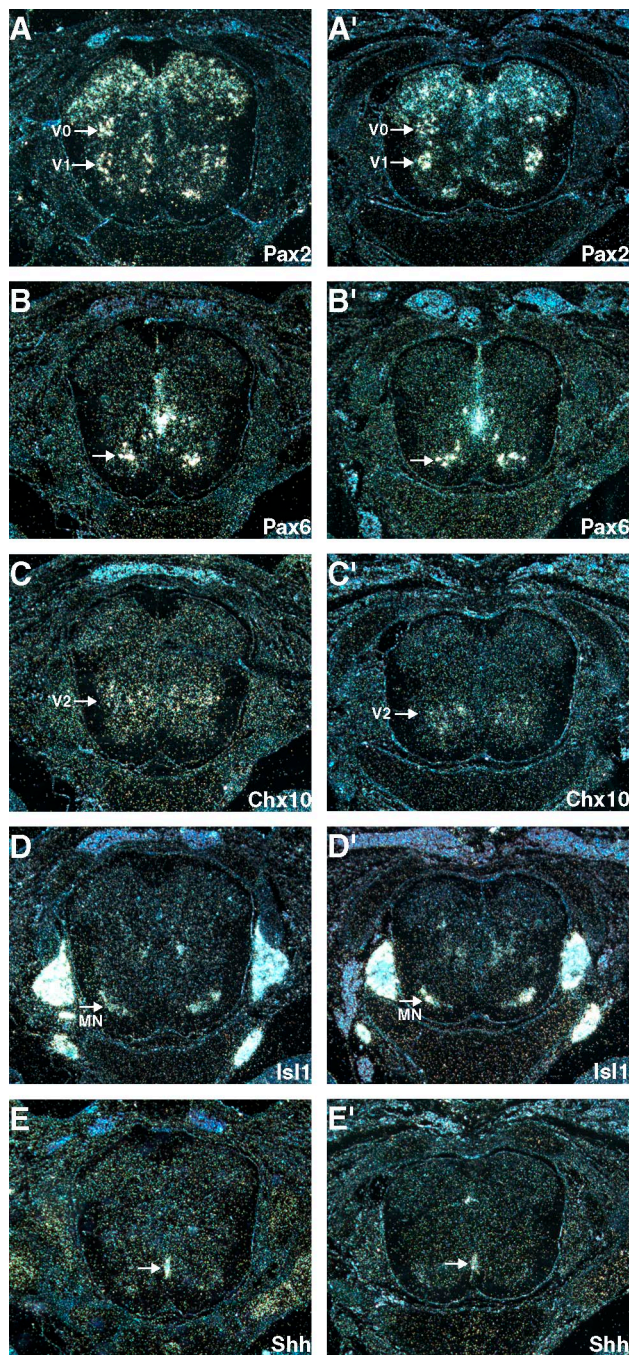


Abb.53: Differenzierung des Rückenmarks in der Knopfkopf-Mutante. Es ist deutlich erkennbar, dass im Unterschied zu der Situation im Telenzephalon praktisch keine morphologische Veränderung in den Mutanten (A'–E') gegenüber den Wildtypen (A–E) auftritt. Die Größe ist wie zuvor beschrieben etwas geringer, aber abgesehen davon sind alle untersuchten Strukturen und Marker zu finden.

Partielle Rettung von *Drosophila*-*buttonhead*-Mutanten durch das *Knopfkopf*-Mausgen

Die Versuche zur Rettung des *buttonhead*-Phänotyps in *Drosophila*-Mutanten mit Hilfe des *Knopfkopf*-Mausgens wurden von Dr. Frieder Schöck, Abteilung Prof. Dr. Herbert Jäckle (MPI für Biophys. Chemie) als Kollaboration durchgeführt.

eine Expression des *Knk*-Gens in *Drosophila buttonhead*-Mutanten führte zu einer Rettung des mandibularen und interkalaren Segmentes

In *btd*-Mutanten, denen die maxillaren, mandibularen und interkalaren Segmente fehlen (siehe Einleitung), wurde unter der Kontrolle der von Dr. Ernst Wimmer beschriebenen *btd* cis-aktiven Promotor-Region das *Knk*-Gen exprimiert. Dies führte dazu, dass die in der Mutante fehlenden maxillaren, mandibularen und ein Teil der interkalaren Kopfsegmente gerettet werden konnten (siehe Methoden und Abbildung 54).

Kontrollversuche mit dem humanen *Sp1*-Gen (Wimmer EA. et al.; 1993), dem humanen oder Maus-*Sp4*-Gen und dem *Xenopus*-*Sp5*-Gen (Dr. Lore Bally-Cuif, persönliche Mitteilung) führten dagegen nur zu einer Rettung des maxillaren und mandibularen Segmentes (Daten nicht gezeigt).

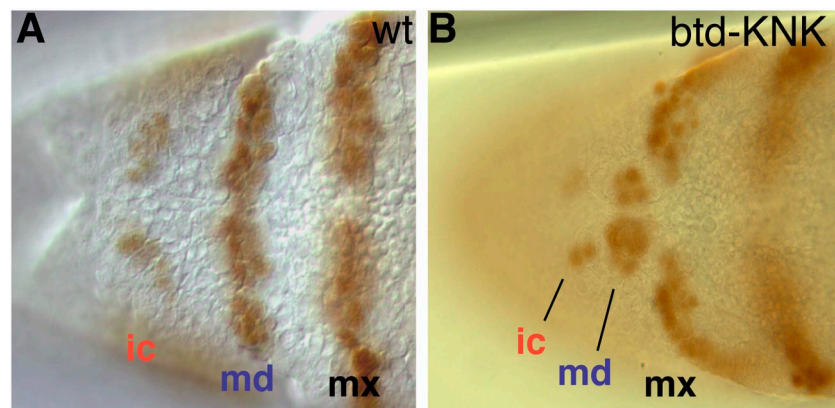


Abb.54: Das *Knk*-Transgen führt bei einer *btd*-Mutante zu einer partiellen Rettung des Phänotyps. Der Vergleich mit der wildtypischen Situation zeigt, dass die Expression des *Knk*-Gens in einem *btd*-defizienten Hintergrund dazu führt, dass der *buttonhead*-Phänotyp stark abgemildert wird. Während in den *btd*-Mutanten neben dem antennalen auch die mandibularen und interkalaren Segmente vollständig fehlen (Wimmer EA. et al.; 1993), führt die *Knk*-Expression zu einer Rettung der mandibularen und interkalaren Segmente. (Abkürzungen: ic=interkalares Segment, md=mandibulares Segment, mx=maxillares Segment)

Chromosomale Lokalisation des *Knopfkopf*-Gens bei der Maus und dem Menschen

Mit der chromosomalen Lokalisation des *Knopfkopf*-Maus-Gens wurde das kanadische Unternehmen SeeDNA Biotech Inc. beauftragt. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs- (FISH)-Kartierung zeigte, dass das Gen auf dem Maus-Chromosom 12 in der Region F2 lokalisiert ist.

das Maus-*Knk*-Gen wurde auf Chromosom 12, Region F2 lokalisiert

Ein Vergleich der Maus-*Knopfkopf*-Sequenz mit den Datenbanken am NCBI zeigte, dass ein fast identisches Gen auf dem humanen Chromosom 7 in der Region p15-p21 lokalisiert ist. Die *in silico*-Translation ergibt ein Protein, dass in 477 von 490 Aminosäuren mit dem Maus-Protein übereinstimmt (siehe Abbildung 55). Zusätzlich stimmt die genomische Organisation weitgehend überein. Die Intron-Exon-Struktur ist identisch und die putativen Intron-Sequenzen stimmen zu über 90% mit denen der Maus überein. Ein Vergleich der angenommenen Promotor-Sequenzen 5' vom Transkriptionsstart zeigte ebenfalls zahlreiche ausgedehnte Sequenzblöcke mit einer über 90%igen Sequenzübereinstimmung (Daten nicht gezeigt).

das putative humane *Knk*-Ortholog wurde auf Chromosom 7, Region p15-p21 identifiziert

Vergleich der *Knopfkopf*-Protein-Sequenz mit anderen Spezies

Eine fast identische Proteinsequenz konnte im Menschen aus den NCBI-Daten abgeleitet werden (siehe vorhergehendes Kapitel und Abbildung 55). Zusätzlich konnten homologe Sequenzen mit 62-73% Aminosäureübereinstimmungen im Zebrafisch und 51-70% Übereinstimmungen im Südafrikanischen Krallenfrosch abgeleitet werden (siehe Abbildungen 56 und 57).

Knk-Homologe konnten durch eine *in silico*-Analyse im Zebrafisch und Südafrikanischen Krallenfrosch identifiziert werden

```
>gi|10445386|gb|AC005060.3|AC005060 Homo sapiens BAC clone CTB-86D3 from 7p21-p15.3
Score = 975 bits (2521), Expect = 0.0
Identities = 477/490 (97%), Positives = 479/490 (97%), Gaps = 4/490 (0%), Frame = -1

Query: 1      MLAATCNKIGSPSPSSLSLSDSSSSFGKGFHPWKRSSSSSSGSCNVVGSLSLSSFGVSGAS 60
             MLAATCNKIGSPSPSSLSLSDSSSSFGKGFHPWKRSSSSSS SCNVVGSLSLSSFGVSGAS
Sbjct: 120130 MLAATCNKIGSPSPSSLSLSDSSSSFGKGFHPWKRSSSSSSASCNVVGSLSLSSFGVSGAS 119951

Query: 61     RNGGSSSAAAAAAAAAAAAALVSDSFSCGGSPGSSAFSLTSSSAAAAAAAAAAAAASSP 120
             RNGGSSSAAAAAAAAAAAAALVSDSFSCGGSPGSSAFSLTSSSAAAAAAAAAAAAASSP
Sbjct: 119950 RNGGSSSAAAAAAAAAAAAALVSDSFSCGGSPGSSAFSLTSSSAAAAAAAAAAAAASSP 119771

Query: 121    FANDYSVFPAPGVSGGGGGGGGGGSAHSQDSSHQPVFISKVHTSDVGLQGIYPRVG 180
             FANDYSVFPAPGVSGGGGGGGGGGSAHSQD SHQPVFISKVHTSDVGLQGIYPRVG
Sbjct: 119770 FANDYSVFPAPGVSGGGGGGGGGGSAHSQDGHQPVFISKVHTSDVGLQGIYPRVG 119591

Query: 181    MAHPYESWFKPSHPGLGAAADVGSAGASSWVDVGAGWIDVQNPNGAAALPGSLHPAAGGL 240
             MAHPYESWFKPSHPGLGAA +VGSAGASSWVDVGAGWIDVQNPN AAALPGSLHPAAGGL
Sbjct: 119590 MAHPYESWFKPSHPGLGAAEVGSAGASSWVDVGAGWIDVQNPNSAAALPGSLHPAAGGL 119411

Query: 241    QTSLSHPLGGYNSDYSGLSHSAFSSGASHLLSPAGQHLMDGFKPVLPGSYDPSAPSPLA 300
             QTSLSHPLGGYNSDYSGLSHSAFSSGASHLLSPAGQHLMDGFKPVLPGSYDPSAPSPLA
Sbjct: 119410 QTSLSHPLGGYNSDYSGLSHSAFSSGASHLLSPAGQHLMDGFKPVLPGSYDPSAPSPLA 119231

Query: 301    GAGSMLSAGPAAQLGGSRRSSARRYSGRATCDCPNCQEAERLGPAGASLRKRLGHSCHI 360
             GAG SMLSAGP+A LGGSRRSSARRYSGRATCDCPNCQEAERLGPAGASLRKRLGHSCHI
Sbjct: 119230 GAGSMLSAGPAAQLGGSRRSSARRYSGRATCDCPNCQEAERLGPAGASLRKRLGHSCHI 119051

Query: 361    PGCGKVYKTSHLKAHLRWHTGERPFVCNWLFCGKRFRSDELRHLRTHTEKRFACPV 420
             PGCGKVYKTSHLKAHLRWHTGERPFVCNWLFCGKRFRSDELRHLRTHTEKRFACPV
Sbjct: 119050 PGCGKVYKTSHLKAHLRWHTGERPFVCNWLFCGKRFRSDELRHLRTHTEKRFACPV 118871

Query: 421    CNKRFMRSDHLSKHVKTHS---GGGGSAGSG-GGKGSDDTSEHSAAGSPCHSPELLQP 476
             CNKRFMRSDHLSKHVKTHS GGGGSAGSG GGKGSDDTSEHSAAGSPCHSPELLQP
Sbjct: 118870 CNKRFMRSDHLSKHVKTHSGGGGGGGSAGSGGGKGSDDTSEHSAAGSPCHSPELLQP 118691

Query: 477    PEPGHRNGLE 486
             PEPGHRNGLE
Sbjct: 118690 PEPGHRNGLE 118661
```

Abb.55: Vergleich der KNK-Proteinsequenz von Maus und Mensch (Übersetzung einer genomischen Sequenz). Der Vergleich zeigt, dass ein fast identisches Protein im Menschen existiert. Die humanen Expressionsdaten sind nicht bekannt.

```
>gb|BF613731.1|BF613731 de85c08.y1 Wellcome CRC pRN3 St19 26 Xenopus laevis cDNA
Score = 152 bits (383), Expect = 5e-37
Identities = 83/160 (51%), Positives = 88/160 (54%), Gaps = 21/160 (13%), Frame = +3

Query: 155 SSHQPVFISKVHTSDVGLQGIYPRVGMHPYESWFKPSHPGLXXXXXXXXXXXXXXXXXWVDV 214
             S HQPVF+SKVH SVDGLQ IYPRVGMHPYESWFKPSHPG WW+VG
Sbjct: 63 SHHQPVFLSKVHASVDGLQSIYPRVGMHPYESWFKPSHPG--EVSAAAAGGASSWVEVG 236

Query: 215 AGWIDVQNPNGAAALPGSLHPAAGGLQTSLSHPLGGYNSDYSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 274
             AGWIDVQ+P AAL HP G LQ SLHSPLGGY +DY
Sbjct: 237 AGWIDVQSPGAGAAL---HP--GALQGLSHSPLGGYTDYSAAGLGHFTGGGGGVGSG 398

Query: 275 XX-----QHLMDGFKP-VLPGSYD 293
             QHLMDGFKP + PGSYD
Sbjct: 399 GGAAGTGGGGGGSHLLSPGGQHLMDGFKPGIGPGSYD 518

>gb|AW643693.1|AW643693 cm32f10.w1 Blackshear/Soares normalized Xenopus egg library
Score = 191 bits (484), Expect = 1e-48
Identities = 83/117 (70%), Positives = 94/117 (79%), Frame = +1

Query: 322 SARRYSGRATCDCPNCQEAERLGPAGASLRKRLGHSCHIPGCGKVYKTSHLKAHLRWHT 381
             SAR R C CPNC++ G +L +K H CHIPGCGKVYKTSHL+AHLRWH+
Sbjct: 1 SARGRLRRVACTCPNCKDG---AGRGTNLGKKKQHVCHIPGCGKVYKTSHLRAHLRWHS 171

Query: 382 GERPFVCNWLFCGKRFRSDELRHLRTHTEKRFACPVCNKRFMRSDHLSKHVKTH 438
             GERPFVC W+FCGKRFRSDELRH RTHTEK+F CP C+KRFRMRSDHL+KH+KTH
Sbjct: 172 GERPFVCTWFCGKRFRSDELRHRRTHTEKRFVCEPKRFRMRSDHLAKHIKTH 342
```

Abb.56: tblastn gegen Xenopus-ESTs. Im südafrikanischen Krallenfrosch existieren mindestens zwei Proteine mit einer signifikanten Übereinstimmung zur Maus-Sequenz.

```

>gi|15077805|gb|AF388363.1|AF388363 Danio rerio zinc finger buttonhead-
related transcription factor 1
      (bts1) mRNA, complete cds
      Length = 3062

Score = 191 bits (486), Expect = 1e-49
Identities = 89/121 (73%), Positives = 95/121 (77%)
Frame = +1

Query: 318  SFRSSARRYSGRATCDPCNCQEAERLGPAGASLRRKGLHNSCHIPGCGKVGKTSHLKAHL 377
            SP ++ARR      C CPNCQ +      G  +K H CHIPGCGKVGKTSHLKAHL
Sbjct: 814  SPLATARRCR---RCRCPCNCQSSSSSDEPG---KKKQHICHIPGCGKVGKTSHLKAHL 972

Query: 378  RWHGTGERPFVNCNWLFCGKRFTRSDELQRHLRTHTGEKRFACPVCKRFRMSDHLKHKVKT 437
            RWH+GERPFVNCNWLFCGK FTRSDELQRHLRTHTGEKRF CP C KRFMRSDHL+KHKVKT
Sbjct: 973  RWHGGERPFVNCNWLFCGKSFTRSDELQRHLRTHTGEKRFVCPDCKRFRMSDHLAKHKVKT 1152

>gb|AI877530.1|AI877530 fc48e06.y1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio
cDNA

Score = 200 bits (509), Expect = 2e-51
Identities = 107/171 (62%), Positives = 111/171 (64%)
Frame = +2

Query: 180  GMAHPYESWFKPSHPGLXXXXXXXXXXXXXXXXXWVDVGAGWIDVQNPNGAAALPGSLHPAAGG 239
            G+AHPYES F SHPG+      WVDVGAGWIDVQNPNGAA L SLH +GG
Sbjct: 11   GVAHPYESCF*SSHPGIPDGDVGTGASA-WVDVGAGWIDVQNPNGAA-LQTSLH--SGG 178

Query: 240  LQTSLSHSPGGYNSDYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXQHLMDGFKPVLPGSYPDXXXXXX 299
            LQTSLSHSPGGYNSDY      QHLMDGFKPVL  SYPD
Sbjct: 179  LQTSLSHSPGGYNSDYSLSHSFAFSTSASPHLLTTG-QHLMDGFKPVL-SSYPDSSPSPL 352

Query: 300  XXXXXMRLSAGPAAQLGGSPRSSARRYSGRATCDPCNCQEAERLGPAGASL 350
            ML+ GP A L GSPRSSARRYSGRATCDPCNCQEAERLGPAGASL
Sbjct: 353  GGAGGMLTGGPTASLAGSPRSSARRYSGRATCDPCNCQEAERLGPAGASL 505

>gb|AI657942.1|AI657942 fc18h09.y1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio
cDNA

Score = 184 bits (467), Expect = 1e-46
Identities = 81/121 (66%), Positives = 94/121 (76%)
Frame = +2

Query: 318  SFRSSARRYSGRATCDPCNCQEAERLGPAGASLRRKGLHNSCHIPGCGKVGKTSHLKAHL 377
            SP +++ R + R C CP C+ E P+      +K H CHIPGCGKVGKTSHL+ AHL
Sbjct: 293  SPNTASSRTRREACTCPYCKDGEGRDPS----KKKQHICHIPGCGKVGKTSHLRAHL 457

Query: 378  RWHGTGERPFVNCNWLFCGKRFTRSDELQRHLRTHTGEKRFACPVCKRFRMSDHLKHKVKT 437
            RWHGTGERPFVC+W FCGKRFTRSDELQRH RTHTGEK+F+C C KRFMRSDHLS H+ T
Sbjct: 458  RWHGTGERPFVCSWSFCGKRFTRSDELQRHKRTHTGEKRFSCTECPKRFMRSDHLSXHIXT 637

>gb|AW778404.1|AW778404 fk49a03.y1 Zebrafish 15-19hr embryonic cDNA Danio
rerio cDNA

Score = 181 bits (459), Expect = 1e-45
Identities = 84/114 (73%), Positives = 86/114 (74%), Gaps = 3/114 (2%)
Frame = +1

Query: 375  AHLRWHTGERPFVNCNWLFCGKRFTRSDELQRHLRTHTGEKRFACPVCKRFRMSDHLKSH 434
            AHLRWHTGERPFVNCNWLFCGKRFTRSDELQRHLRTHTGEKRFACPVCKRFRMSDHLKSH
Sbjct: 1   AHLRWHTGERPFVNCNWLFCGKRFTRSDELQRHLRTHTGEKRFACPVCKRFRMSDHLKSH 180

Query: 435  VKTHXXXXXXXXXXXXXXXX---XXDSEHSAAGSPCHSPELLQPPEPGRNGL 485
            VKTH      DTDSEHS GSP CHSP+LLQ PE      G+
Sbjct: 181  VKTHSAGGSSGSGSAGGKRGSDTDSEHSVPGSPSCHSPDLLQAPESVPTTGM 342

```

Abb.57: tblastn gegen Zebrafisch-ESTs. Im Zebrafisch, *Danio rerio*, existieren mindestens vier Proteine, die eine signifikante Übereinstimmung mit der Maus-Sequenz aufweisen.

Sequenz- und phylogenetischer Vergleich der Sp1/KNK/BTEB/XKLF-Proteinfamilie

Betrachtet man nur die Zink-Finger-Domänen der in der Einleitung („Sp1/Sp4 und btd - ein ungleiches Paar“) vorgestellten Transkriptionsfaktoren der Sp1/BTEB/XKLF-Familie, finden sich zahlreiche Übereinstimmungen. Diese sind in den Abbildungen 58 und 59 gezeigt. Die Reihenfolge und Gruppierung der Proteine in der Übersicht stützt sich auf die Resultate des ClustalW-Programmes (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), mit dessen Hilfe der danach gezeigte Stammbaum abgeleitet wurde.

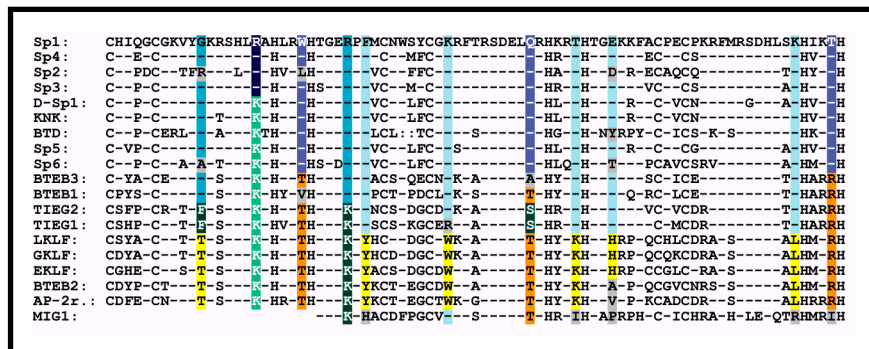


Abb.58: Vergleich der Zink-Finger-Domäne der Sp1/BTEB/XKLF-Familie / Teil 1. Die Reihenfolge der dargestellten Proteindomänen entspricht dem weiter unten folgenden phylogenetischen Stammbaum. Lediglich das Sp1-Protein wurde zur besseren Vergleichbarkeit als Referenz-Sequenz beibehalten. Farblich hervorgehoben sind alle korrespondierenden Aminosäurereste der untereinander ausgerichteten Protein-Domänen, die die postulierte phylogenetische Beziehung vollständig unterstützen. Autoapomorphien sind grau unterlegt.

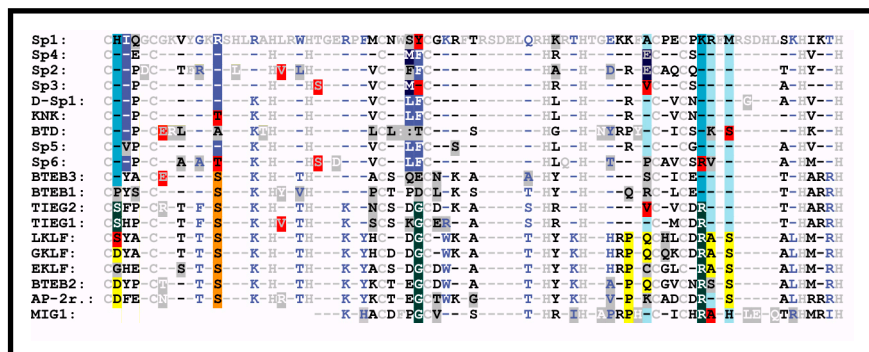


Abb.59: Vergleich der Zink-Finger-Domäne der Sp1/BTEB/XKLF-Familie / Teil 2. Die in der vorhergehenden Abbildung behandelten Aminosäurereste sind blau dargestellt. Die Positionen ohne Aussagekraft für die Verwandtschaftsbeziehung sind mit grauen Buchstaben dargestellt (Plesiomorphien). Alle Autoapomorphien, die ebenfalls nicht zur Rekonstruktion der Verwandtschaftsbeziehungen beitragen können, sind grau hinterlegt. Die korrespondierenden Aminosäurereste in Positionen, die weitgehend dem postulierten Stammbaum entsprechen sind farbig unterlegt, insofern nicht mehr als zwei Reste der Zuordnung widersprechen (rot unterlegt). Weiterhin existieren zusätzlich einige Positionen, die einer Zuordnung eines Teilstes des Stammbaums entsprechen; diese sind ebenfalls farbig unterlegt. Alle Aminosäurereste an Positionen, die mit mehr als zwei Abweichungen dem postulierten phylogenetischen System widersprechen, sind schwarz dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass anhand der abweichenden Positionen kein alternatives Anordnungssystem abgeleitet werden kann, ohne gleichzeitig mehr neue Abweichungen zu erzeugen als behoben werden.

Für die Stammbaum-Ermittlung wurden nicht nur die Zink-Finger-Daten verwendet, sondern zusätzlich die Merkmale der übrigen Proteindomänen. Hierzu wurden per Hand, falls vorhanden, 10 Aminosäurereste angefügt, die eine Konsensussequenz der BTD-Domäne widerspiegeln, bzw. dort, wo diese fehlt, wurden entsprechend 10 „X“ angefügt. Weiterhin wurden durch jeweils zwölf Aminosäurereste, die ebenfalls nachträglich entsprechend des Vorkommens angefügt wurden, die weiteren Teile der Proteine repräsentiert:

- Sp5, Sp6, BTEB3, TIEG1, TIEG2, LKLF, GKLF, EKLF, BTEB2 und AP-2REP mit jeweils 12x Prolin;
- BTEB1 mit 8x „X“ und 4x Serin;
- D-Sp1, KNK und BTD mit 4x Alanin, 4x Serin und 4x Glycin;
- Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4 mit 6x Glutamin und 6x Serin.

Ermittlung eines hypothetischen Stammbaums der Sp1/XKLF-Überfamilie

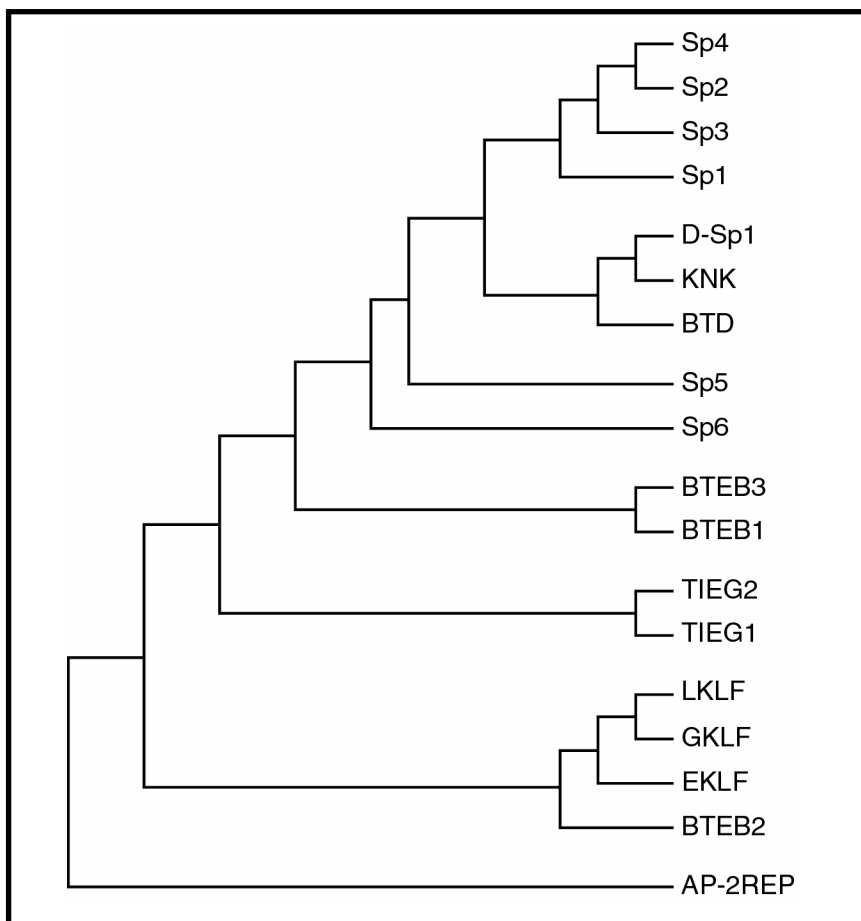


Abb.60: Hypothetischer phylogenetischer Stammbaum der BTEB/XKLF/Sp1-Transkriptionsfaktoren. Innerhalb der Vertebratenlinie weist die Analyse mit dem ClustalW-Programmes das AP-2rep-Gen als Außengruppe aus. Hiermit eng verwandt ist die XKLF-Familie, die auch BTEB2 umfasst. Diese leitet über die TIEG-Proteine und BTEB1/BTEB3 zur Gruppe über, die als Synapomorphie über eine BTD-Domäne verfügt. Den Übergang bilden Sp5 und Sp6, deren Proteine sowohl über abgeleitete Merkmale wie die BTD-Domäne verfügen, gleichzeitig aber noch die Prolin-reiche Domäne der vorherigen Gruppe tragen. Hieran schließt sich die BTD/D-Sp1/KNK-Subfamilie an, deren Zink-Finger-Domäne noch typische Merkmale der phylogenetisch älteren Gruppen tragen, gleichzeitig aber nicht mehr über die Prolin-reiche Domäne verfügen. Die Sp1-Subfamilie *in sensu strictu* bildet die Schwestergruppe der BTD/D-Sp1/KNK-Subfamilie mit den typischen Kombinationen von Glutamin- und Serin/Threonin-reichen Domänen.

Die Sequenzvergleiche zeigen, dass die mit dem ClustalW-Programm ermittelten Abstammungslinien durch zahlreiche Merkmale begründet sind. Sie belegen u.a. bei einem Vergleich mit dem Hefeprotein MIG1, dass die BTEB/XKLF-Subfamilie die phylogenetisch ältere Gruppe bildet. Innerhalb der Subfamilie kann eine Einordnung von AP-2rep als Außengruppe der Vertebraten belegt werden.

Zusätzlich zu den oben dargestellten Übereinstimmungen gibt es weitere Sequenzmerkmale, bei denen nur ein bis zwei Aminosäurereste nicht vollständig dem postulierten Abstammungsbaum entsprechen. Aufgrund des Alters der homologen Gruppe, das durch das Hefe-Gen Mig1 belegt wird, erscheinen diese Widersprüche jedoch als nicht-signifikant, zumal die Abweichungen kein neues Muster bilden, welches einen alternativen Stammbaum rechtfertigen würde.

Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde die Isolierung des Maus-*Knopfkopf*-Gens (*Knk*) und einiger weiterer homologer Gene sowie eine funktionelle Analyse der *Knopfkopf*-Gens bzw. des postulierten Proteins durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine *in silico*-Analyse von Einträgen in der NCBI-Sequenzdatenbank und ein Vergleich mit bekannten biologisch-medizinischen Daten. Im Rahmen von zwei Zusammenarbeiten wurden weiterhin Experimente in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durchgeführt und mögliche Zusammenhänge mit der Entstehung von Hodentumoren untersucht.

Auf dieser Basis wird eine weitergehende Diskussion zu den folgenden Punkten durchgeführt:

- postulierte Homologie-Verhältnisse der Knk-, Sp5-, Sp6- und BTD-Proteine auf Basis von Sequenzvergleichen und deren Expression; postulierte Evolution der Sp1/XKLF-Transkriptionsfaktoren;
- Funktion des *Knk*-Gens bzw. des KNK-Proteins in der Maus;
- mögliche homologe Gene in weiteren Spezies.

Weiterhin werden basierend auf den phänotypischen Beobachtungen und weiteren Übereinstimmungen mögliche Zusammenhänge des *Knk*-Gens mit folgenden Aspekten diskutiert:

- legless-Maus-Mutante;
- humanes Roberts-Syndrom;
- Entstehung von Hodentumoren bei der Maus und dem Menschen.

Zusätzlich werden methodisch-technische Punkte und deren Bedeutung für die vorliegende Arbeit diskutiert. Letzteres erfolgt als gesondertes Kapitel am Ende der Diskussion.

Viel gemeinsam und doch verschieden:

Untergruppen in der Familie der Sp1- Transkriptionsfaktoren

Im Kapitel „Sp1/Sp4 und btd - ein ungleiches Paar“ der Einleitung wurde bereits dargelegt, dass die noch vor kurzem als weitgehend redundant und damit funktions- und strukturähnlich betrachteten Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie in unterschiedliche Subfamilien aufgetrennt werden können bzw.

müssen. Konzentriert man die Betrachtung ausschließlich auf die strukturellen Merkmale, so ergibt sich auf Basis der publizierten Daten unter Berücksichtigung von Treichel D. et al. (2001) zumindest eine Aufteilung in drei (oder mehr) Gruppen: Sp1 bis Sp4 als Vertreter der Sp1-Familie im engeren Sinne als erste Subfamilie; die Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe Ap2-rep, XKLF-, TIEG-, BTEB2- sowie BTEB3 bilden die zweite Subfamilie; Sp5 als putatives „Hybrid-Molekül“ mit einem typischen Sp1-Anteil (der Zink-Finger- und BTD-Domäne) und einem XKLF-typischen N-Terminus bildet die dritte Subfamilie. Zusätzlich kann das BTEB1-Protein als vierte Subfamilie aufgefasst werden, da es weder eine Prolin-reiche Domäne aufweist, noch die Sp1-typische Kombination von Glutamin- und Serin/Threonin-reichen Domänen. Zusätzlich ist keine BTD-Domäne erkennbar, wodurch sich BTEB deutlich von den übrigen Homologen absetzt.

Ebenfalls wurde in der Einleitung gezeigt, dass die vordergründigen Ähnlichkeiten des BTD-Proteins mit der Sp1-Subfamilie bei einer genaueren Überprüfung keine nähere Homologiebeziehung unterstützen und eine weitere Aufspaltung der Familie mit den Transkriptionsfaktoren BTD und D-Sp1 als bislang einzigen Vertretern sehr wahrscheinlich machen (Serin- und Alanin-reiche Domänen). Gleichzeitig wurde in der Einleitung auf Grund theoretischer Überlegungen (siehe „Geschwistergene erzählen von den Eltern“) gezeigt, dass die in der Literatur als signifikant dargestellten Besonderheiten der Zink-Finger-Domäne vermutlich keineswegs typisch für die postulierten orthologen Proteine sind, sondern vielmehr eine divergente Entwicklung auf der Stammlinie der Fruchtfliege widerspiegeln.

Sp5 und Sp6: paralog und redundant?

Sp5 bildet eine Untergruppe der Sp1/XKLF-Überfamilie

In der vorgelegten Arbeit konnte die Subfamilie der „Sp1/BTEB/XKLF-Hybrid-Transkriptionsfaktoren“ mit Sp5 als inzwischen publiziertem Protein etabliert werden. In der Veröffentlichung von Harrison SM. et al. (2000) wird noch davon ausgegangen, dass Sp5 unmittelbar zur Gruppe der Sp1-Transkriptionsfaktoren im engeren Sinne gehört, obwohl die charakteristischen Glutamin- und Serin/Threonin-reichen Domänen fehlen. Mit Hilfe eines umfassenden Sequenzvergleiches konnte jedoch gezeigt werden, dass erhebliche Übereinstimmungen mit den Proteinen der BTEB/XKLF-Gruppe bestehen, die nach den Vorgaben der sparsamsten Erklärung nur im Rahmen eines Homologieverhältnisses begründbar sind (Treichel D. et al.; 2001).

Sp6 gehört in dieselbe Untergruppe wie Sp5

Weiterhin konnte durch die Klonierung von Sp6 gezeigt werden, dass es noch mindestens einen weiteren Vertreter dieser Gruppe im Proteom der Maus gibt. Obwohl nur ein kleines Fragment der zugehörigen cDNA isoliert werden konnte, zeigte sie eine deutliche Übereinstimmung mit der Sp5-Sequenz. Diese Annahme wurde durch die putative Sp6-cDNA im Menschen klar unterstützt (siehe „Klonierung und Expressionsanalyse von Sp6“). Wesentlicher Aspekt der

Homologisierung ist hierbei das gemeinsame Auftreten einer Sp1-typischen Zink-Finger- sowie BTEB/XXLF-typischen Prolinreichen Domäne in den abgeleiteten Proteinen.

Die beiden Gene bzw. Proteine wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter funktionell untersucht, weshalb keine ausführliche diesbezügliche Diskussion erfolgen kann. Daher wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich aufbauend auf der relativ nahen Verwandtschaft der Gene bzw. Proteine die folgende funktionelle Hypothese ergibt: Die von Harrison SM. et al. (2000) vorgelegte Arbeit zeigte, dass sich trotz des sehr spezifischen Expressionsmusters von Sp5 nur minimale Veränderungen des Phänotyps der Nullmutanten gegenüber den wildtypischen Kontrolltieren ergaben. Obwohl die durchgeführten Hybridisierungsexperimente mit Sp6 keine befriedigenden Ergebnisse zeigten (siehe „Klonierung und Expressionsanalyse von Sp6“), sprechen die bisherigen Resultate der Expressionsanalyse dafür, dass Sp6 ein ähnliches Aktivitätsmuster aufweist wie Sp5. Damit kann postuliert werden, dass es sich bei Sp5 und Sp6 um ein „Redundanz-Paar“ zweier paraloger Gene handelt, bei dem ein Gen zumindest zu einem großen Teil die fehlende Funktion des anderen Gens ausgleichen kann.

Angesichts des insbesondere im ZNS sehr interessanten Expressionsmusters von Sp5 (siehe „Klonierung und Expressionsanalyse von Sp5“) ergibt sich damit ein konkreter experimenteller Ansatz für weitere Analysen: sollte das Redundanzverhältnis von Sp5 und Sp6 tatsächlich bestehen, würde eine gezielte Inaktivierung beider Gene, ein sogenannter „Doppel-Knock out“, möglicherweise dazu führen, dass phänotypische Veränderungen in der Maus erzielt werden können. Mögliche Konsequenzen wären u.a in den folgenden Strukturen zu erwarten, die innerhalb der Abteilung für Molekulare Zellbiologie bereits im Zusammenhang mit anderen gezielten Geninaktivierungen untersucht werden:

- das Tegmentum des Mittel- und Hinterhirns, z.B. in den Mammilarkörpern - siehe *Fkh5-KO* (Wehr R. et al.; 1997. Alvarez-Bolado G. et al.; 1999);
- die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG) - siehe *Knk-Knock Out* und *Pax2/Pax5-Knock Out* (vorliegende Promotionsschrift und Schwarz M. et al.; 1997);
- die Ohranlagen - siehe *Netrin1-Knock Out* (Salminen M. et al.; 2000);
- die Somiten - siehe *Pax3-*, *Pax7-* und *Uncx4.1-Knock Outs* (Mansouri A. et al.; 1996. Mansouri A. et al.; 1998. Mansouri A. et al.; 2000. Mansouri A. et al.; 2001);
- die Schwanzknospe bzw. den aus ihr entstehenden Derivaten - siehe *Knk-Knock Out* (vorliegende Promotionsschrift).

Desweiteren könnten z.B. Derivate des Branchialbogensystems betroffen sein sowie die Entwicklung des trigeminalen Ganglions, die jedoch mit Ausnahme der Schilddrüsenentwicklung nicht gezielt in der Abteilung bearbeitet werden (siehe *Pax8-Knock Out* - Mansouri A. et al.; 1998).

Sp5 und Sp6 haben möglicherweise redundante Funktionen während der Embryogenese

Ein Doppel-Knock Out von Sp5 und Sp6 führt vermutlich zu phänotypischen Veränderungen

Für die Annahme, dass ein Sp5-Sp6-Doppel-*Knock Out* einen phänotypischen Effekt aufweisen sollte, sprechen auch die Erfahrungen mit den übrigen Mitgliedern dieser Transkriptionsfaktor-Superfamilie. So weisen sowohl die Mutanten aus der BTEB/XKLF-Gruppe zumeist deutliche Veränderungen auf, als auch die der Sp1-Gruppe *in sensu strictu*. Gleiches gilt für die btd/Knk-Familie (Gollner H. et al.; 2001. Kuo C.T. et al.; 1997a. Kuo C.T. et al.; 1997b. Marin M. et al. 1997; Tewari R. et al.; 1998. Wani M.A. et al.; 1998. und diese Arbeit).

Wenn Geschwister und Verwandte zueinander finden: *btd*, *D-Sp1* und *Knk* bilden eine neue Genfamilie

Mit Ausnahme der im Rahmen der Doktorarbeit vorgelegten Publikation (Treichel et al.; 2001) ordnen alle übrigen Autoren die bisher beschriebenen Gene bzw. Proteine dieser Transkriptionsfaktorklasse entweder in die Sp1- oder BTEB/XKLF-Gruppe ein. Einzige Bezugspunkte hierbei sind meistens das Vorhandensein der BTD-Domäne und die Sequenzähnlichkeiten der Zink-Finger-Domäne. In einigen Fällen wird auch der „Rest“ der Proteine (der immerhin 30 - 80% der Gesamtgröße ausmacht) berücksichtigt, wobei - wie im Fall des BTB-Proteins - keine detaillierte Analyse erfolgt. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass Einordnungen auf dieser oberflächlichen Ebene z.T. signifikante Unterschiede verdecken, was im Kapitel „Sp1/Sp4 und btd - ein ungleiches Paar“ der Einleitung dargelegt wurde.

bilden *buttonhead* und *D-Sp1* eine eigene Untergruppe der Sp1/XKLF-Überfamilie?

Im genannten Kapitel wurde die Hypothese aufgestellt, dass das *btd*-Gen zusammen mit dem *D-Sp1*-Gen vermutlich eine eigene Untergruppe bildet, dessen Vertebraten-Orthologe noch nicht bekannt sind. Die Argumente hierfür waren die Unterschiede in der Glutamin-reichen Domäne, die daraus folgende Neubewertung der Serin-reichen Domäne und das Vorkommen einer Alanin-reichen Domäne. Diese Argumentation wurde zum einen gestützt durch die Sequenzvergleiche der Zink-Finger-Domäne. Aber auch die übrigen Bereiche der beiden Proteine deuten auf eine evolutive Alleinstellung hin. So weist *D-Sp1* eine Glutamin-reiche Domäne auf, die der von BTB entspricht und typisch für *Drosophila*-Gene ist, aber nicht die Merkmale der Sp1-Transkriptionsfaktoren *in sensu strictu* zeigt. Weiterhin besitzt *D-Sp1* wie auch BTB einen poly-Alanin-Bereich, der als funktionelle Domäne z.B. in den HOX/HOM-Proteinen beschrieben ist (Goodman FR. et al.; 1997). Ebenfalls besitzen beide Proteine Serin-reiche Regionen, die allerdings beim BTB-Protein deutlicher ausgeprägt sind als beim *D-Sp1*-Protein. Letzteres weist zusätzlich eine Glycin-reiche Domäne auf, die beim BTB-Protein nicht erkennbar ist. Zusammen mit den funktionellen Analyseergebnissen eines redundanten Verhaltens der beiden Proteine (Schöck et al.;1999) lassen die vorgelegten Daten darauf schließen, dass BTB und *D-Sp1* zueinander im Verhältnis von Paralogen stehen, also Schwesterproteine hinsichtlich ihrer Homologiebeziehung sind.

Diese Hypothese wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse klar unterstützt: Das klonierte *Knopfkopf*-Gen weist auf der Ebene des putativen translatierten Proteins alle Kriterien auf, die eine gemeinsame Homologisierung mit *btd* und *D-Sp1* rechtfertigen. So besitzt das KNK-Protein eine typische Sp1-Zink-Finger- und BTD-Domäne, sowie eine Serin-, Alanin- und Glycin-reiche Domäne. Weiterhin ist die Serin-reiche Domäne nicht an eine Glutamin-reiche Domäne gekoppelt, wie es bei Sp1 - Sp4 der Fall ist.

In der Einleitung (siehe: "Geschwistergene erzählen von den Eltern") wurde eine hypothetische Abstammung des *btd*-Gens von der Sp1-Subfamilie *in sensu strictu* postuliert. Insbesondere der Vergleich mit dem Hefeprotein MIG1 zeigt, dass entgegen dieser Annahme die BTEB/XKLF-Subfamilie phylogenetisch die älteste Vertebraten-Gruppe bildet und erst über die Sp5/Sp6- und Knk/btd/D-Sp1-Subfamilien die Sp1-Subfamilie *in sensu strictu* ableitbar ist. Dies bedeutet auch, dass entgegen der einleitenden Hypothese die Merkmale, die *btd* (und *Knk*) mit der *BTEB/XKLF*-Subfamilie verbinden, als plesiomorphe Positionen zu betrachten sind.

In Übereinstimmung mit den einleitenden Annahmen ist weiterhin klar erkennbar, dass ein Großteil der "charakteristischen" Merkmale des BTD-Proteins als autapomorphe Merkmal gewertet werden müssen, die einer divergenten Entwicklung innerhalb des *Drosophila*-Stammbaums entstammen. Sowohl D-Sp1 als auch KNK weisen an den fraglichen Positionen durchgängig Aminosäurereste auf, die dem erwarteten Übergang zwischen den Subfamilien entsprechen. Eine weitere Konsequenz aus dieser phylogenetischen Abstammungslinie ist, dass das Sp1-Gen bzw. -Protein kein geeigneter Namensgeber für diese Klasse der Transkriptionsfaktoren ist. Dies ergibt sich nicht nur aus dessen stark abgeleiteter Sequenz, sondern auch aus der Funktion im Organismus: Fast alle Mitglieder dieser Familie besitzen ein sehr spezifisches Expressionsmuster und eine selektive Bedeutung in der Organogenese. Erst die relativ spät evolvierten Sp1-, Sp2- und Sp3-Proteine scheinen eine ubiquitäre Expression zu besitzen und können mit einer "unspezifischen" Rolle bei der Transkriptionskontrolle von nachgeschalteten Genen in Verbindung gebracht werden.

Zusammenfassend ergibt sich aus der vorgelegten Sequenzanalyse, dass die Sp1/BTEB/XKLF-Transkriptionsfaktoren mindestens vier Subfamilien umfasst:

- als phylogenetisch älteste Gruppe die BTEB/XKLF-Gruppe, die z.B. Ap2-REP, BTEB2, EKLF, GKLF, LKLF, TIEG1, TIEG2 und BTEB3 umfasst;
- die Sp5/Sp6-Gruppe, die zwar bereits eine BTD-Domäne besitzen, gleichzeitig aber noch die Prolin-reiche Domäne der vorherigen Gruppe;
- die KNK/D-Sp1/BTD-Gruppe, deren Zink-Finger-Domäne noch mehrere plesiomorphe Sequenzmerkmale aufweist, die aber nicht mehr die Prolin-reiche Domäne besitzen sondern Serin- und Alanin-reiche Domänen (D-Sp1 und KNK zusätzlich eine oder zwei Glycin-reiche Domänen);
- die Sp1-4-Gruppe, deren Zink-Finger-Domäne am weitesten abgeleitet ist und die als gemeinsames Merkmal eine typische Kombination von Glutamin- und Serin/Threonin-reichen Domänen besitzen.

KNK weist zahlreiche Homologie-Merkmale zu BTD auf

zahlreiche BTD-Merkmale sind autapomorphe Ableitungen

Zusammenfassung der phylogenetischen Analyse

Zusätzlich kann man BTEB1 von allen übrigen Proteinen differenzieren, da es neben den drei Zink-Fingern ausschließlich eine kurze und wenig ausgeprägte Serin-reiche Domäne besitzt.

Als letzte Untergruppe mit nur einem bekannten Vertreter kann Sp4 von den übrigen drei Sp-Proteinen differenziert werden. Obwohl es keine Anhaltspunkte in der Proteinsequenz hierfür gibt, spricht dessen Expressionsmuster für eine gesonderte Betrachtung. Während Sp1, Sp2 und Sp3 weitgehend ubiquitär exprimiert sind, was als synapomorphe Eigenschaft betrachtet werden kann, weist Sp4 ein spezifisches Aktivitätsmuster während der Embryogenese auf und entspricht in dieser Hinsicht deutlich stärker den evolutiv älteren Proteinen als Sp1 - Sp3.

Von der Sequenz zur Expression:

Die Regulation als Homologiekriterium

In der Einleitung (“Die Regulation des Regulators”) wurde dargelegt, dass für die Homologisierung von Genen bzw. Proteinen drei Kriterien verwendet werden können, die als Abwandlungen der drei Homologiekriterien nach Remane betrachtet werden können:

2. Homologiekriterium nach Remane

1. Homologiekriterium nach Remane

3. Homologiekriterium nach Remane

1. Übereinstimmung in speziellen Qualitäten ihrer Strukturen - entspricht besonderen Sequenzmerkmalen (z.B. der BTD-Domäne).
2. Gleiche Lage in vergleichbarem Gefügesystem - entspricht der Interaktion mit Zielgenen bzw. -proteinen oder der Genregulation (z.B. die Expression)
3. Übergänge zwischen den untersuchten Zuständen - entspricht dem Vergleich von postulierten homologen Genen bzw. Proteinen in unterschiedlichen Spezies (z.B. (a) die *Otx/otd*-Gene in unterschiedlichen Spezies zur Begründung von Orthologiebeziehungen. b) die *Pax/paired*-Gene insgesamt zur Begründung von Paralogiebeziehungen, z.T. auch Orthologiebeziehungen).

Da bislang keine weiteren *btd*-Orthologe außerhalb von *Drosophila* identifiziert werden konnten, entfällt folglich die Möglichkeit entsprechend Punkt 3 die Übergänge von verschiedenen Genzuständen zu vergleichen.

Der im vorhergehenden Kapitel durchgeführte Sequenzvergleich (entsprechend Punkt 1 und Punkt 3b) lieferte für die Homologisierung zahlreiche begründete Argumente für den in Abbildung 60 dargestellten Stammbaum. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeiten in der Zink-Finger-Box und dem hohen evolutiven Alter der Gene, besteht jedoch eine gewisse “Unschärfe” bei der Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen auf der genannten Ebene. Dies zeigt sich z.B. daran, dass der mit ClustalW berechnete Stammbaum ohne die artifizielle Einbeziehung des Restes der Proteine, der von den bisher entwickelten Programmen nicht verglichen werden kann, deutlich von dem gezeigten Ergebnis

abweicht. Hier spielen z.B. die autapomorphen Merkmale eine relativ große Rolle, so dass z.B. BTD je nach Auswahl der verglichenen Proteine sehr unterschiedlich eingeordnet wird (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Probleme wurde im genannten Kapitel der Einleitung die Bedeutung des Homologiekriteriums in Punkt 2 hervorgehoben. Basierend auf der sehr viel höheren Komplexität von Gen- bzw. Proteinkaskaden verglichen mit einem einzelnen Gen ergibt sich eine deutlich geringere Veränderung im Verlauf der Evolution von Organismen. Außerdem bietet der Vergleich von Kaskaden den Vorteil, dass zumindest in vielen Fällen die Evolution divergent verläuft und nur selten konvergent, die Unterschiede also deutlicher hervortreten als bei Sequenzvergleichen.

Im Falle des *buttonhead*-Gens bzw. BTD-Proteins sind die Zielgene nicht bekannt und nur einige Interaktionspartner innerhalb des Transkriptions-initiationskomplexes (Schöck F. et al.; 1999) identifiziert werden, weshalb ein Vergleich der nachfolgenden Kaskade nicht möglich ist. Obwohl auch die Faktoren, die das *btd*-Gen regulieren, also die vorgeschaltete Kaskade, nicht bekannt sind, ist deren Effekt im Sinne der Genaktivierung technisch darstellbar. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung kann die entsprechende mRNA detektiert und somit die Genaktivität räumlich und zeitlich aufgelöst werden.

Anhand der Expressionsdaten des *btd*-Gens in der Fruchtfliege wurde in der Einleitung ein "ideales Expressionsmuster" eines *btd*-Orthologs in der Maus abgeleitet:

1. in der Kopffregion, aber weiter caudal als die von *Otx1/2* und *Emx1/2*;
2. danach im antero-dorsalen Bereichen des Gehirns (Telencephalon?);
3. im posterioren Teil des ZNS = Rückenmark;
4. in Teilen des peripheren Nervensystems (Vorhersage sehr problematisch, da es keine den Chordotonal-Organen homologen Vertebraten-Strukturen gibt);
5. in den Beinanlagen;
6. keine oder nur wenige andere Regionen des Körpers.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden drei Gene identifiziert und charakterisiert (*Sp5*, *Sp6* und *Knopfkopf*), die bezogen auf die Sequenz der Zink-Finger-Box als mögliche Orthologe des *buttonhead*-Gens in Frage kommen. Obwohl im Falle von *Sp5* und *Sp6* der Rest der Gene bzw. der postulierten Proteine darauf schließen lässt, dass sie eine eigene Subfamilie bilden (siehe vorhergehendes Kapitel), kann nur auf Basis der Sequenzvergleiche nicht ausgeschlossen werden, dass sie in einem Orthologieverhältnis zu *btd* stehen.

Die Expressionsanalyse von *Sp6* war mit den isolierten cDNA-Fragmenten nicht zufriedenstellend möglich und kann entsprechend nicht diskutiert werden. Generell scheint die Aktivität des Gens aber ähnlich zu sein wie die von *Sp5*.

die Genregulation ist das entscheidende Homologiekriterium

das "ideale Expressionsmuster" eines *btd*-Orthologs

Vergleich der Expressionsmuster von *Sp5*, *Sp6* und *Knk* mit dem "idealen Muster"

eine Analyse der *Sp6*-Expression war nur bedingt möglich

Eine ausführliche Analyse der Sp5-Expression wurde im Rahmen der Doktorarbeit als gesonderte Publikation veröffentlicht (Treichel D. et al.; 2001) und im Kapitel "Klonierung und Expressionsanalyse von Sp5" der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Sp5 weist zahlreiche Übereinstimmungen mit dem "idealen Muster" auf

Die Sp5-Aktivität lässt sich in zwei Phasen einteilen: eine Gastrulations-assoziierte Expression und eine Expression während der Organogenese. Aufgrund der sehr starken Abwandlung der Gastrulationsprozesse in der Fruchtfliege kann keine Homologisierung bezogen auf diese Phase erfolgen. Die Organogenese-spezifische Expression von Sp5 zeigt dagegen zahlreiche Übereinstimmungen mit dem "idealen Expressionsmuster". Dazu zählt insbesondere die ZNS-Aktivität im Di- und Mesencephalon, die später die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG) umfasst, sowie spezifische Regionen des Diencephalons. Zusätzlich ist Sp5 im Rückenmark exprimiert, was ebenfalls den Erwartungen entspricht.

signifikante Unterschiede zwischen der Sp5- und *btd*-Expression

Neben diesen Übereinstimmungen ergeben sich jedoch auch zahlreiche Unterschiede. So ist *btd* in den Beinanlagen exprimiert, von denen gezeigt wurde, dass im Vergleich zwischen Drosophila und der Maus alle wesentlichen Gene als Orthologe in beiden Spezies eine Rolle spielen (Weatherbee SD. et al.; 1999. Zeller R. et al.; 1997). Sollte das *btd*-Ortholog in der Taufliege in eine der dort bestehenden Kaskaden eingebunden sein, würde man auch in der Maus eine entsprechende Expression erwarten. Umgekehrt existieren mit den Expressionsdomänen in den Somiten, der Chorda dorsalis und dem Branchialbogen-System Aktivitätsbereiche des Sp5-Gens, die nicht in der Taufliege auftauchen. Obwohl die Somiten und die Chorda dorsalis keine unmittelbar homologisierbaren Strukturen in der Fliege besitzen, kann die Mesodermbildung allgemein durchaus verglichen werden, was sich auf molekularer Ebene z.B. durch die orthologen Gene des Hox- und Hom-Clusters zeigt. Analog hierzu wäre eine Expression von *btd* in mesodermalen Strukturen von Drosophila zu erwarten, die jedoch bislang nicht gezeigt werden konnten.

Sp5 und Sp6 stehen vermutlich in keinem Orthologie-Verhältnis zu *buttonhead*

Zusammenfassend ergibt sich somit für Sp5 (und Sp6) ein uneinheitliches Bild bezüglich der Expressiondaten als Homologiekriterium: Ein Teil entspricht der hypothetischen "Idealexpression" (ZNS), während die Mehrzahl der Daten gegen eine solche Verwandtschaftsbeziehung deutet (Somiten und Branchialbogen-system sowie die fehlende Expression in den Extremitäten). Zusammen mit den phylogenetischen Rekonstruktion auf Basis der Sequenzähnlichkeiten im vorhergehenden Kapitel kann gefolgert werden, dass Sp5 (und Sp6) mit großer Wahrscheinlichkeit keine orthologen Gene von *buttonhead* sind. Ob es auf der anderen Seite in Drosophila orthologe Gene zu Sp5 und Sp6 gibt, ist nicht bekannt. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass das gesamte Genom der Fruchtfliege sequenziert vorliegt und man erwarten kann, dass ein solches Ortholog aufgrund der sehr charakteristischen Zink-Finger-Box-Sequenz erkennbar sein sollte.

Das dritte in der Arbeit beschriebene Maus-Gen ist das *Knopfkopf*-Gen (*Knk*). Auch hier wurde eine ausführliche Expressionsanalyse durchgeführt, die in den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsschrift dargestellt ist. Wie *Sp5* besitzt auch *Knk* eine zweiphasige Expression während der Gastrulation und der Organogenese. Wie zuvor bei *Sp5* gilt, dass die Gastrulationsexpression nur bedingt auf die Situation in *Drosophila* übertragbar ist, da dort ein stark abgewandelter Mechanismus vorliegt und eine ursprünglich vorhandene Aktivität während der Gastrulation möglicherweise im Verlauf der Evolution verloren ging. Allerdings kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die Genaktivität in der Gastrulation erst nach der Speziation entstanden ist, die zur Aufspaltung in den Insekten- und Vertebraten-Ast führte.

Für die Annahme eines spezifischen Verlustes in der Insektenlinie bzw. eines Erwerbs in der Vertebratenlinie der gastrulationsspezifischen *Knk*-Expression spricht, dass die Regulation während der Gastrulation und Organogenese vollständig getrennt erfolgt. Dies konnte gezeigt werden, in dem ein Teil des *Knk*-Promoters und -Gens mit dem β -Lactamase-Gen gekoppelt wurden. Die Sequenzbereiche des *Knopfkopf*-Locus' umfassten in diesem Versuch ca. 8,2kb und entsprechen 7,0kb der Promotor-Region sowie Exon 1, Intron 1, Exon 2, Intron 2 und ca. 150bp des Exons 3 (siehe Abbildung 37C–E). Das Fusionskonstrukt wurde in Blastozysten injiziert und die resultierende LacZ-Aktivität der transient transgenen Tiere mit X-Gal sichtbar gemacht.

Dabei zeigte sich, dass das β -Lactamase-Gen ausschließlich in gastrulierendem Gewebe aktiv war. Weder eine Expression im zentralen Nervensystem, noch in den Extremitäten (siehe unten) konnte mit diesem Konstrukt gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur eine funktionelle Trennung der beiden Expressionsphasen besteht, sondern auch eine räumliche Trennung der verantwortlichen Promotorelemente.

Obwohl eine solche Trennung kein unmittelbares Argument für einen Verlust bzw. nachträglichen Erwerb darstellt, ist sie eine notwendige Voraussetzung für einen effektiven Austausch bzw. Verlust von Kontrollelementen. Würden diese stattdessen alternierend in dem Locus verteilt sein, wäre eine Deletion praktisch unmöglich, ohne auch andere Kontrollelemente zu treffen und ein nachträglicher Erwerb hätte in mehreren Stufen folgen müssen, bei denen jedoch die einzelnen Elemente funktionslos wären, was ein solches Ereignis statistisch sehr unwahrscheinlich macht.

Ein Vergleich der Expression während der Organogenese von *Knk* mit der "idealen Expression" zeigt, dass es eine praktisch vollständige Korrelation gibt. Die erste und stärkste Färbung bei der WMISH tritt im Bereich der prospektiven Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (MHG) auf, also einer Region die dem Übergang vom Gnathozephalon zum Prosencephalon der Insekten entspricht. Diese Region entspricht sehr gut der *btd*-Expression in den maxillaren, mandibularen, intercalaren und antennalen Kopfsegmenten der Fliegenlarve. Auch relativ zur *Otx*- und *Emx*-Aktivität entspricht dies den Vorhersagen einer weiter caudalen Expression eines postulierten Orthologs.

Vergleich des Expressionsmusters von *Knopfkopf* mit dem "idealen Muster"

Unterschiede während der Gastrulation in der Expression von *Knopfkopf* und *buttonhead*

die Organogenese-spezifische Expression von *Knk* entspricht den Annahmen für ein "ideales Muster" eines *btd*-Orthologs

In *Drosophila* ist die nächste deutliche Expressionsdomäne eine nicht exakt definierte Region Prosencephalon. Auch dies korreliert mit den Mausdaten, die eine starke, etwas verzögerte Aktivität von *Knk* im Telencephalon zeigen. Anschließend kann die *btd*-mRNA im Bauchmark der Larven nachgewiesen werden, was wiederum mit der Rückenmarks-Expression von *Knk* homologisiert werden kann. Bezüglich der neuronalen Aktivität bleibt als einzige nicht homologisierbare *btd*-Expression ein Teil des peripheren Nervensystems, das Chordotonal-Organ. Hierzu gibt es jedoch auch keine morphologische Entsprechung in Vertebraten.

Außerhalb des Nervensystems konnte *btd*-mRNA nur in den Beinanlagen der Larven in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Auch dies entspricht exakt den Mausdaten, die zeigen, dass eine sehr frühe *Knk* in den Beinanlagen und anschließend in der apikalen ektodermalen Leiste exprimiert wird.

Ein möglicher Unterschied zwischen der Regulation von *btd* und *Knk* ist die sehr starke Farbreaktion in der WMISH in der Nasenanlage der Maus (siehe Abbildung 38). Diese ist jedoch dadurch erklärbar, dass die Nasenplakode neurogen ist, also Neuronen bildet, die die Verbindung zum ZNS herstellen und auf Grund ihrer Myelinisierung durch Oligodendrozyten als Bestandteil des ZNS aufgefasst werden. Zusätzlich gibt es Daten aus *Drosophila*, die eine Rolle von *btd* bei der Antennenentwicklung andeuten. Obwohl die Homologisierung von Antennen und der Nase von Mammaliern nicht im Detail bekannt ist, handelt es sich in jedem Fall um Chemorezeptoren, also auf neuronaler Ebene vergleichbare Systeme.

Zusammenfassung der Expressions- vergleiche zwischen *Knopfkopf* und *buttonhead*

Zusammenfassend zeigen die Daten der Sequenzvergleiche und Expressionsanalysen, dass *Sp5* und *Sp6* eine eigene Untergruppe innerhalb der *Sp1/XKLF*-Familie bilden und Paraloge zu *buttonhead* bilden. Demgegenüber erfüllt *Knopfkopf* alle Kriterien für ein Ortholog zu *buttonhead*. Die Überprüfung der *Knk*-Expression erfolgte sowohl durch die *in situ*-Hybridisierungen als auch mit LacZ als Marker für die endogene Aktivität.

***Knk* spielt eine wesentliche Rolle in der Embryogenese der Maus**

Inaktivierung des *Knk*- Gens zur funktionellen Analyse

Zur funktionellen Analyse des *Knopfkopf*-Gens wurde es mittels homologer Rekombination gezielt ausgeschaltet ("*Knock Out*"-Experiment). Mit dieser inzwischen weltweit etablierten Technik wird der endogene Locus durch einen veränderten Locus ersetzt, der kein funktionelles Protein kodiert. Zusätzlich wurde in diesem Experiment das endogene Gen durch das Gen für die β -Galactosidase (LacZ) ersetzt, so dass mit einer einfachen Farbreaktion die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen überprüft werden können.

Ein Vergleich der Hybridisierungsdaten mit denen der LacZ-Färbungen zeigte, dass keine Unterschiede erkennbar waren. Daher kann man davon ausgehen, dass der experimentell erstellte Locus keine Veränderung in den regulatorischen Sequenzen aufwies. Da die heterozygoten Tiere nur einen minimalen Phänotyp gegenüber den wildtypischen Tieren aufwiesen (siehe unten), stellen sie erstens ein geeignetes System dar, um die *Knk*-Expression im Detail mit Hilfe von anti-β-Galactosidase-Antikörpern auch auf zellulärer Ebene zu studieren. Zweitens kann der *Knk-KO*-Locus der heterozygoten Tiere bei Bedarf als Marker für die Analyse von anderen Experimenten eingesetzt werden. Letzteres ist im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit jedoch nicht erfolgt.

Bei der Zucht von mutanten Tieren zeigte sich, dass die homozygoten Mäuse bis zur Geburt überleben ("hetero-" bzw. "homozygot" bezieht sich im Folgenden ausschließlich auf den Zustand der rekombinant veränderten *Knk*-Allele, bei denen die *Knk*-kodierenden Bereiche durch das LacZ-Gen ersetzt wurden). Trotz der sehr schweren phänotypischen Veränderungen in den homozygoten Mutanten betreffen diese offensichtlich keine unmittelbar vitalen Funktionen des Organismus' wie z.B. das Herz-Kreislauf-System.

Warum die Tiere unmittelbar nach der Geburt sterben, ist nicht bekannt. Zum einen kommt als Ursache der Holoprosencephalus in Frage (siehe unten). Eine weitere Möglichkeit, die nur indirekt mit den phänotypischen Veränderungen im Zusammenhang stehen würde, ist eine erhebliche Beeinträchtigung oder vollständige Unterbindung der Atmung. Hierfür spricht, dass trotz des sehr stark verkürzten Rumpfes (siehe unten) alle internen Organe auch bezüglich ihrer Größe normal angelegt werden. Daraus folgt, dass die Lungen der Tiere durch die nach oben gedrückten Organe des Bauchraumes (z.B. die Leber und Magen/Darm) so stark komprimiert werden, dass sie schließlich ersticken.

Theoretisch wäre diese Möglichkeit dadurch zu verifizieren, dass die Jungtiere bei der Geburt überwacht werden. Erstens könnte dabei überprüft werden, ob sie sichtbare Atembewegungen ausführen. Sollte dies zutreffen, könnte nach dem Tod der Tiere überprüft werden, ob die Lungen entfaltet und mit Luft gefüllt sind. Sollte dies nicht der Fall sein, wäre dies ein starkes Argument für die Hypothese, dass die Tiere unmittelbar nach der Geburt ersticken.

Gegen die Möglichkeit, dass bereits die Atembewegungen nicht erfolgen, spricht die Beobachtung bei der operativen Präparation von Embryonen aus den Muttertieren. Hierbei zeigt sich, dass sie zumindest unter den Bedingungen der Präparation klar erkennbare Atembewegungen ausführen.

Die Entfaltung der Lungen und Füllung mit Luft wurde nicht untersucht. Die Muttertiere werden sehr leicht durch die Anwesenheit eines Menschen gestört und können die bevorstehende Geburt hinauszögern, weshalb es nicht möglich war, unmittelbar bei der Geburt der Jungtiere anwesend zu sein. Dies wäre jedoch die Voraussetzung für eine Analyse der Todesursache, da die Muttertiere die toten Jungen bereits kurz nach der Geburt auffressen und damit eine weitere Untersuchung unmöglich ist.

Das *LacZ*-Gen dient auch zur Expressions-Analyse von *Knk*

Die Inaktivierung von *Knk* hat einen letalen Phänotyp zur Folge

Heterozygote Tiere weisen eine nur leichte phänotypische Veränderung auf

Erfahrungen mit ähnlichen Experimenten haben in der Vergangenheit gezeigt, dass z.T. nicht nur die Inaktivierung des Gens zu einem Phänotyp führen können, sondern auch die Einbringung von zusätzlichen Genen wie z.B. dem Neomycin-Resistenz-Gen (Olson EN. et al.; 1996. Meyers EN. et al.; 1998). Sollte das Neomycin-Resistenz-Gen des gewählten Konstruktes selbst für einen Teil des weiter unten beschriebenen Phänotyps verantwortlich sein, sollte dieser Effekt dosisabhängig sein und somit auch in heterozygoten Mutanten auftreten, allerdings in abgeschwächter Form.

Die heterozygoten Mutanten entstehen bei der Zucht von homozygoten Mutanten. Sie traten im Verhältnis 1:1 auf (Mendelsche Verteilung) und zeigten in den meisten Fällen keinen Phänotyp, der mit den angewandten Methoden detektierbar war. Lediglich in ca. einem Drittel der Fälle wiesen die Tiere eine leichte phänotypische Veränderung auf. Diese äußerte sich in einer Skelettanomalie der Schwanzspitze (Daten nicht gezeigt).

Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der beobachtete heterozygote Phänotyp eine direkte Folge des Neomycin-Resistenz-Gens ist. Verglichen mit den sehr schweren phänotypischen Veränderungen der homozygoten Mutanten (siehe Ergebnisse und die folgende Diskussion) ist der Knick in der Schwanzspitze jedoch eine unverhältnismäßig viel schwächere Veränderung. Daher ist sie einfacher als Folge der *Knk*-Expression während der Gastrulation zu deuten als eine Folge der Einbringung von zusätzlichem genetischen Material wie dem *Neomycin-Resistenz-Gen*.

Wie in den Abbildungen 46 bis 52 dargestellt, weisen die homozygoten Embryonen einen sehr starken Phänotyp auf. Dieser betrifft mit einer Ausnahme alle morphologischen Strukturen, in denen *Knk* exprimiert wird.

in *Knk*-defizienten Mäusen ist die sekundäre Gastrulation blockiert

Wie in den Ergebnissen dargestellt, kann die *Knk*-Expression in zwei Phasen aufgetrennt werden: eine gastrulationsspezifische und eine organogenese-spezifische Aktivität. Bei grober Betrachtung zeigt sich die Gastrulation unverändert, da die Embryonen in die Neurulation etc. übergehen. Die Skelettpräparationen (siehe Abbildung 46D, E; und 48G–I) zeigen jedoch, dass alle Wirbel unterhalb des thorakalen Bereichs vollständig fehlen.

Dieser Phänotyp kann auf Basis der zweistufigen Gastrulation von Vertebraten erklärt werden. Die primäre Gastrulation erfolgt, indem bereits existierende Zellen durch Wanderungsbewegungen neue Eigenschaften annehmen und Strukturen bilden. Hierbei wird der Großteil des Kopfes gebildet und die meso- und (neuro-)ektodermalen Anteile des Rumpfes bis einschließlich des Thorax'. Unterhalb des Thorax' dagegen entstehen die meso- und (neuro-)ektodermalen Strukturen während der sekundären Gastrulation aus einer Schwanzknospe, die mesenchymale Zellen enthält, die sich rostral z.B. in Somiten differenzieren. Dabei wird die Schwanzknospe selbst immer weiter nach caudal verschoben und bildet auf diese Weise den gesamten Rumpf unterhalb des Thorax'.

Die Teilung und/oder Differenzierung dieser mesenchymalen Zellen der Schwanzknospe, in der *Knk* stark exprimiert wird (siehe Abbildung 36B, C und 37C–E), scheint in den homozygoten Mutanten nicht mehr zu funktionieren. Der Effekt ist, dass alle Strukturen, die während dieses Prozesses normalerweise gebildet werden, in den KO-Mäusen fehlen. Am deutlichsten ist dies am völligen Fehlen der Wirbel zu erkennen, die aus den Somiten hervorgehen und in wildtypischen Mäusen die lumbale und sakrale Wirbelsäule sowie den Schwanz bilden. Stattdessen endet die entwickelte Wirbelsäule unterhalb des Thorax in einer Spina bifida, also einem nicht geschlossenen Neuralrohr, was auf die Defekte bei der Wirbelsäule zurückgeführt werden kann.

Dieses Ergebnis erklärt auch den leichten heterozygoten Phänotyp, bei dem bei einigen Tieren ein leichter Knick in der Schwanzspitze zu beobachten ist. Offensichtlich funktioniert der Prozess der sekundären Gastrulation bei heterozygoten Embryonen noch weitgehend ungestört. Lediglich ganz am Ende der Entwicklung kommt das Fehlen eines Allels zum Tragen, was sich in den Missbildungen der Wirbel ausdrückt.

Ähnlich stark sind die Konsequenzen im sich entwickelnden Gehirn. Wie die Schwanzknospe selbst werden auch alle Bereiche des Gehirns angelegt. Sogar die Ausbildung von Unterteilungen werden noch normal angelegt, was im Fall der MHG an der Expression von *Fgf8* oder der caudalen Aktivitätsgrenze von *Otx2* deutlich sichtbar ist (siehe Abbildung 50). Erst in der späteren Wachstums- und Differenzierungsphase kommt das Fehlen der *Knk*-Aktivität zum Tragen. So fehlt z.B. das Cerebellum vollständig und auch das Telencephalon kann sich nicht korrekt entwickeln.

Besonders bemerkenswert hierbei ist die weitere Entwicklung des Telencephalons. Obwohl in allen Fällen ein vollständig entwickelter Holoprosencephalus zu beobachten war, das Neuralrohr also nicht geschlossen wurde, werden wie an der MHG auch hier alle getesteten Differenzierungsmarker exprimiert. Allerdings bilden sich auf Grund des fehlenden Verschlusses des Neuralrohres keine Ventrikel aus, von denen aus die weitere Differenzierung in einer von innen nach außen gerichteten Abfolge erfolgt. Stattdessen bilden die offenen Halbseiten des Neuralrohres im Bereich des Telencephalons einen Hohlraum innerhalb des Gewebes (siehe Abbildung 51).

Dieser entsteht vermutlich dadurch, dass die im Wildtyp innen liegenden Zellen der Ventrikularzone in der mutierten Struktur jetzt außen liegen und von dieser Oberfläche ausgehend die Zellen radial auswandern und zumindest einen Teil ihrer normalen Differenzierung durchlaufen. Hierbei entsteht die in Abbildung 51 dargestellte “*inside-out*”-Architektur. Diese enthält alle typischen molekularen Marker und die relative Lage der einzelnen Marker zueinander ist konserviert, unabhängig vom insgesamt umgekehrten Aufbau.

In der Mitte der Wand des Neuralrohres treffen dann die Zellen aufeinander, die von den Seiten ausgehend in das Gewebe radial eingewandert sind und normalerweise auf der Oberfläche des Telencephalons die Cortical-Platte und Marginal-

Das ZNS weist massive Fehlbildungen bei den *Knk*-Mutanten auf

zone bilden würden. Dabei bilden sie vermutlich entsprechend ihrer natürlichen Funktion eine neue "Oberfläche" innerhalb des Gewebes, die schließlich zur Bildung des Hohlraums führt.

Besonders interessant ist diese Beobachtung unter dem Aspekt, dass die Zellen theoretisch von den Außenflächen (der Ventrikularzone in den Mutanten) ausgehend immer weiter wandern könnte, bis sie auf der anderen Seite die gegenüberliegende Ventrikularzone erreicht haben. Dies würde dazu führen, dass die Architektur vollständig verloren ginge, da sich die Zellen auf diese Weise vollständig untereinander mischen würden.

Eine Erklärung dafür, dass die Zellen sich nicht mischen, sondern in der Mitte "steckenbleiben", wäre, dass sie den Abstand oder die Zeit ihrer Wanderung auf unbekannt Art und Weise messen und nach einer definierten Strecke oder Zeitspanne die Mobilität verlieren. Alternativ hierzu wäre die Möglichkeit, dass sich z.B. ausgehend von der Ventrikularzone, die wie im Wildtyp eine definierte Oberfläche bildet und damit als "Orientierungspunkt" dienen könnte, ein Gradient aus anziehenden und / oder abstoßenden Molekülen bildet. An diesem könnten sich die migrierenden Zellen ausrichten und ihre relative Position bestimmen. Welche der verschiedenen Möglichkeiten tatsächlich genutzt wird, wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht weiter untersucht.

den homozygoten
Mutanten fehlt die Nase
und der Gaumen

Ebenfalls überraschend ist der Effekt der Mutation auf die Entwicklung der Nase. Wie die LacZ-Färbung zeigt, ist die Nasenplakode stark *Knk*-positiv und später die Neuronen, die vom Riechepithel ausgehend die Verbindung zum Riechkolben des ZNS bilden (siehe Abbildung 38).

Die morphologische Analyse der Mutanten zeigt, dass den Tieren nicht nur die Neuronen fehlen, die das Riechepithel bilden, sondern dass sie keinerlei Nasenstrukturen ausbilden und auch das Pallatum völlig fehlt. Diese Strukturen werden vom Ektoderm der Mundbucht bzw. als Oberkieferfortsätze (sekundärer Gaumen) gebildet und sind selbst *Knk*-negativ. Demnach würde die Expression von *Knk* erwarten lassen, dass der Nasen-Rachen-Raum normal gebildet wird und lediglich das Riechepithel fehlt.

Die empirische Beobachtung, dass entgegen dieser Annahme die gesamte Struktur fehlt, deutet darauf hin, dass, als eine Möglichkeit, ausgehend von den Nasenplakoden bzw. den sich bildenden Neuronen ein induktives Signal ausgeht, dass für die Bildung der Nase und des Gaumens notwendig ist. Fehlen die Neuronen, käme es nach diesem Modell nicht zur Induktion mit der Folge, dass die Strukturen nicht angelegt werden.

Eine alternative Erklärung für das Fehlen der Nase und des Gaumens wäre, dass die Effekte im Tel- und Mesencephalon dazu führen, dass die Neuralleistenzellen aus diesen Regionen nicht mehr gebildet werden. Diese sind an der Bildung von Nase und Gaumen beteiligt und könnten somit indirekt zum Verlust der Strukturen führen (Osumi-Yamashita N. et al.; 1994). Weitere Unter-

suchungen zur Klärung des Mechanismus' wurden im Rahmen der Doktorarbeit nicht durchgeführt.

Eine ähnliche Situation wie in der Schwanzknospe und im Gehirn zeigt sich auch bei der Entwicklung der Extremitäten. Auch sie werden ursprünglich angelegt, können sich aber nicht so entwickeln, wie es bei den Wildtypen der Fall ist. Die Untersuchung der Embryonen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigt, dass als vermutlich wesentlicher Effekt der Knk-Mutation die apikale ektodermale Leiste (AEL) nicht ausgebildet wird (siehe Abbildung 48). Obwohl z.B. Fgf8 ähnlich wie im Fall der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze exprimiert wird, kann keine morphologisch differenzierte AEL erkannt werden. Das Fehlen dieser Struktur dürfte letztlich für den beobachteten späteren Phänotyp verantwortlich sein. Insbesondere die Skelettpräparationen (siehe Abbildung 48G–I) zeigen, dass nur noch ein sehr kleiner Rest der Extremitäten gebildet wird (vermutlich ein Stück vom Humerus und Femur).

Eine Besonderheit bezüglich der Induktion der Extremitätenanlagen ergibt sich für die Hinterbeine. Es wird allgemein angenommen, dass die Somiten eine entscheidende Rolle bei den ersten Induktionsereignissen spielen. Arbeiten am Huhn haben gezeigt, dass auf der Höhe der Somiten 15–20 die Flügel entstehen und auf Höhe der Somiten 26–32 die Hinterbeine (z.B. Ohuchi H. und Noji S.; 1999. Lance-Jones C.; 1988). Molekular haben hierbei die FGF-Signale und FGF-Rezeptoren eine große Bedeutung (z.B. Martin GR.; 1998. Cohn MJ. und Tickle C.; 1996).

Während in den Knk-Mutanten die Bildung der Somiten auf der Höhe der Vorderextremitäten ohne erkennbare phänotypische Veränderungen erfolgt, kann ein in der anterior-posterioren Achse gemustertes Mesoderm nur bis zum letzten thorakalen Somiten beobachtet werden, dem Somiten Nr. 24 (siehe z.B. Kaufman MH. und Bard JBL.; 1999). Alle weiter caudal gelegenen mesodermalen Strukturen, die bei wildtypischen Embryonen während der sekundären Gastrulation angelegt werden, fehlen dagegen in den Knk-Mutanten.

Damit ergibt sich die Situation, dass die Induktion der Hinterbeine erfolgt, obwohl die Strukturen, die nach bisheriger Meinung zumindest eine entscheidende Rolle bei diesen Prozessen spielen, nicht angelegt werden. Eine weitergehende Analyse dieser Beobachtung ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Strukturen, die massiv durch das Fehlen der Knk-Aktivität betroffen sind, weist das Rückenmark keine morphologischen oder molekularbiologischen Unterschiede zu den wildtypischen Kontrolltieren auf (siehe Abbildung 53). Mögliche Erklärungen hierfür sind

1. die niedrige Expressionsrate von Knk im Rückenmark. Verglichen mit den betroffenen Strukturen ist die relative Signalstärke bei den WMISH hier deutlich geringer. Diese Beobachtung kann dahingehend interpretiert werden, dass das KNK-Protein ebenfalls eine geringere Rolle bei der

die Hinterbeine werden induziert, obwohl keine Somiten caudal der thorakalen Region angelegt werden

im Rückenmark kann keine Funktion von Knk nachgewiesen werden

Transkriptionskontrolle anderer Gene spielt und ein Fehlen durch andere Faktoren zumindest teilweise ausgeglichen werden kann. Dadurch würde eine mögliche Fehlregulation so geringe Konsequenzen haben, dass phänotypische Veränderungen nur unterhalb der Detektionsgrenze mit den durchgeführten Tests entstehen.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, könnte z.B. mit Hilfe eines konditionalen KO-Experimentes ausschließlich ein Effekt im Rückenmark untersucht werden. Da die Tiere bei einer entsprechenden Gestaltung des konditionalen Systems außerhalb des Rückenmarks keine phänotypischen Veränderungen aufweisen und somit lebensfähig sein sollten, wäre ein längerfristiger Effekt sichtbar und zusätzlich die allgemeine Vergleichbarkeit verbessert, da durch das Fehlen von Wirbeldefekten (s.o.) eine indirekte Veränderung ausgeschlossen wäre.

2. Ebenfalls nicht ausgeschlossen ist die Möglichkeit eines weiteren *btd / D-Spl*-Orthologs in der Maus. Die Situation in *Drosophila* zeigt, dass besonders bei der Entwicklung des Bauchmarks, das als Homolog zum Rückenmark gewertet werden kann, eine Redundanzbeziehung zwischen *buttonhead* und *D-Spl* besteht (Wimmer et al.; 1996. Schöck F. et al.; 1999). Sollte ein vergleichbares Paralog auch in der Maus existieren, könnte der Verlust der *Knk*-Aktivität durch dieses postulierte zweite Gen ausgeglichen werden.
3. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Knopfkopf keine spezifische Funktion im Rückenmark hat. Prinzipiell kann nur eine Selektion auf solche Eigenschaften eines Gens oder Protein erfolgen, die einen Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit des Individuums bzw. dessen Nachkommen haben. Sollte die relativ schwache Expression im Rückenmark lediglich ein indirekter Effekt z.B. der Kontrollelemente für die Expression im Gehirn sein - sie also nur passiv beibehalten wurden - würde ein Verlust der *Knk*-Aktivität keinen Effekt auf die Entwicklung haben.

Welche dieser drei alternativen Erklärungsmöglichkeiten tatsächlich zutreffen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Hinsichtlich einer Funktionskontrolle wäre lediglich durch die konditionale Inaktivierung von *Knk* eine positive Antwort zu erhalten.

die phänotypischen Veränderungen sind ausschließlich auf die *Knk*-exprimierenden Gewebe beschränkt

Ein weiterer Punkt bei der Beurteilung der erzeugten Mutation ist die Frage der Spezifität. Insbesondere durch die wechselseitigen Induktionen von verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung von Vertebraten besteht die Möglichkeit, dass Teile des beobachteten Phänotyps nur indirekt auf das Fehlen der *Knk*-Aktivität zurückzuführen sind. Eine solche mittelbare Veränderung wäre z.B. daran zu erkennen, dass Gewebe, die *Knk* nicht oder nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimieren, phänotypische Veränderungen aufweisen.

Insbesondere im Gehirn könnte eine solche Situation erwartet werden, da sowohl der anteriore Anteil, das Telenzephalon, als auch der posteriore Anteil, die MHG, sehr stark von der Mutation betroffen sind. Die Analyse des Diencephalons und

der Augenentwicklung zeigten, dass dieser zwischen dem Telencephalon und der MHG liegende Teil des Gehirns keine sichtbaren Veränderungen aufweist (Daten nicht gezeigt). Damit kann nur bei der Nasenentwicklung von einem indirekten Effekt durch fehlende induktive Prozesse oder dem Verlust von Neuralleisten-Zellen ausgegangen werden.

Zusammenfassend ergibt sich als Gemeinsamkeit der beobachteten phänotypischen Veränderungen, dass

1. **die betroffenen Strukturen zu Beginn der Embryonalentwicklung entstehen und**
2. **alle getesteten frühen Differenzierungsmarker weitgehend normal exprimiert werden.**
3. **im weiteren Verlauf der Entwicklung dieser Vorläuferstrukturen jedoch nicht dazu in der Lage sind, die molekulargenetischen Informationen “umzusetzen” und die wildtypisch Morphologie / Anatomie durch ein weiteres Wachstum und Differenzierung zu erzeugen.**
4. **der Effekt der Mutation sehr spezifisch ist, da mit Ausnahme von Nase und Gaumen nur solche Strukturen betroffen sind, in denen *Knk* exprimiert wird.**
5. **lediglich eine *Knk*-exprimierende Struktur, das Rückenmark, keine morphologische Veränderung aufweist.**

Zusätzlich deuten die Beobachtungen darauf hin, dass insbesondere das Telencephalon eine hohe Selbstorganisations-Fähigkeit besitzt und sogar in einer “umgestülpten Anordnung” eine anfängliche Regionalisierung durchläuft. Weiterhin zeigen die Daten bei der Nasenentwicklung, dass vermutlich ausgehend von den Neuronen der nasalen Plakode ein Signal zur Induktion der Nase und des Gaumens erfolgt.

Knopfköpfe im Tierreich

Auf Grund der divergenten Evolution des *btd*-Gens bzw. -Proteins in der *Drosophila*-Linie war es bislang nicht möglich, durch Sequenzvergleiche mögliche *btd*-Orthologe zu identifizieren. Mit Hilfe der Maus-Informationen konnten die Datenbanken erneut durchsucht werden und zahlreiche Kandidaten für die gesuchten Orthologe in anderen Spezies zu finden.

Durch die relativ große Nähe zwischen der Maus und dem Menschen als Vertreter der Säugetiere ist es nicht verwunderlich, dass ein praktisch identisches Gen in den humanen Datenbanken identifiziert werden konnte (siehe Abbildung 55). Insbesondere auf Basis der über 90%igen Sequenzübereinstimmung außerhalb der Zink-Finger-Domäne kann mit Sicherheit angenommen werden, dass es sich bei dem *in silico* identifizierten Gen tatsächlich um das gesuchte humane

Zusammenfassung des *Knk*-Phänotyps

das humane Genom weist mit großer Wahrscheinlichkeit ein Ortholog zum *Knopfkopf*-Gen auf

Ortholog handelt, obwohl keine Informationen über das Expressions-Muster vorliegen.

Außerhalb der Säuger nehmen die Sequenz-Unterschiede zwischen orthologen Genen erfahrungsgemäß deutlich zu. Daher ist nicht zu erwarten, dass eine Datenbank-Suche für andere Vertebraten außerhalb der Mammalia-Linie eine ähnlich hohe Übereinstimmung mit der Maus- bzw. humanen Sequenz ergibt. Daher ist es in jedem Fall notwendig, die möglichen Kandidaten auch anhand ihrer Expressionsmuster als zusätzliches Homologie-Kriterium zu beurteilen.

in *Xenopus laevis* und *Danio rerio* wurden Homologe zu *Knk/ btd* identifiziert, deren Orthologie-Beziehungen jedoch unklar sind

Im Südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) als Vertreter der Amphibien konnten anhand der Sequenzübereinstimmungen in der Zink-Finger-Domäne zwei Gene identifiziert werden, die als mögliche Orthologe in Frage kommen. Es handelt sich dabei um die Sequenzen BF 613731 und AW 643693 (siehe Abbildung 57). Da für keines der beiden Gene bislang die Expressions-Muster bekannt sind, kann z.Z. nicht beurteilt werden, ob eines von ihnen eine Aktivität aufweist, die derjenigen von *Knk* in der Maus bzw. *btd* in der Fruchtfliege entspricht.

Auch im Zebrafisch (*Danio rerio*) als Vertreter der Fische konnten insgesamt vier Gene identifiziert werden, die hinsichtlich der Sequenzübereinstimmungen als Orthologe von *btd* bzw. *Knk* in Frage kommen. Es handelt sich hierbei um die Sequenzen AF388363, AI877560, AI657942 und AW778404 (siehe Abbildung 56). Von diesen wurde das erste in der Literatur als Zebrafisch-Ortholog von *btd* beschrieben und als *Bts1* benannt (Tallafuß A. et al.; 2001).

ein Vergleich von *Bts1* mit *Knk* und *Sp5* macht eine Orthologie zu *btd* unwahrscheinlich

Der Vergleich der WMISH-Daten zeigt jedoch, dass trotz der hohen Sequenz-ähnlichkeit in der Zink-Finger-Domäne und den teilweise vorhandenen Übereinstimmungen mit den erwarteten Expressions-Domänen eine solche Orthologie-Beziehung sehr unwahrscheinlich ist.

Auch bezogen auf die Aminosäuresequenz außerhalb der Zink-Finger-Domäne entspricht *Bts1* nicht vollständig den Erwartungen. Zwar weist das Protein keine Prolin-reiche Domäne wie *Sp5* auf, hat aber eine Glutamin-reiche Domäne, die erst später in der Entwicklung entstanden ist (siehe Abbildung 8 und 60). Auf der anderen Seite fehlt eine Alanin-reiche Domäne, die in *BTD* und *KNK* vorkommt und z.B. in *HOX*-Proteinen als wichtiger Bestandteil der Aktivierungs-Domäne identifiziert wurde.

Expressionsdomäne	<i>Knk</i>	<i>Bts1</i>	<i>Sp5</i>
Gastrulation, Schwanzknospe	++	++	++
Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze	++	++	++
Telencephalon	++	-	-
Rückenmark	+	+	+
Extremitätenanlage	++	?	-
nasale Placode	++	?	-
otisches Vesikel	+	+	+
Diencephalon	-	++	++
Trigeminus	-	?	++
Somiten	-	++	++
Branchialbogen-System	-	?	++

Abb.61: Vergleich der Expressionsdomänen von *Bts1* mit den murinen Genen *Knk* und *Sp5*. Der Vergleich der Expressionsdomänen zeigt eine sehr große Übereinstimmung zwischen *Sp5* und *Bts1*. Diese ist bereits auf Basis der untersuchten Stadien offensichtlich. In der Publikation von Tallafuß et al. wurden nur frühe Stadien untersucht, so dass die etwas später entstehenden Strukturen wie die Extremitäten-Anlagen oder das Branchialbogensystem nicht in die Analyse einbezogen wurden. Demgegenüber ist die Übereinstimmung mit der *Knk*-Expression sehr gering und entspricht dort, wo Abweichungen gefunden werden, nicht den Erwartungen eines "idealen Expressions-Musters" für ein *btd*-Ortholog.

Auf Basis dieser Vergleiche erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass das Zebrafisch-Gen *Bts1* ein Ortholog von *btd* ist. Insgesamt sprechen die Daten vielmehr dafür, das es sich um ein Gen handelt, das in einem Orthologie-Verhältnis zu *Sp5* steht, aber bereits einige Charakteristika der *Sp1*-Familie *in sensu strictu* (*Sp1*-*Sp4*) enthält.

Insgesamt zeigt die Analyse, dass zahlreiche mögliche Orthologe in weiteren Organismen existieren. Aus der Existenz von *btd* in *Drosophila* und *Knk* in der Maus folgt unmittelbar, dass es auch in allen evolutiven Zwischenformen ein entsprechendes Homolog gegeben haben muss. Da es keine begründeten Argumente für ihre nachträgliche Eliminierung gibt, kann angenommen werden, dass sie auch in den heute existierenden Vögeln, Amphibien, Fischen usw. existieren.

Mit Hilfe der in vorliegenden Promotion erarbeiteten Kriterien - Sequenz-Ähnlichkeit und Expressions-Profile - sollte es möglich sein, sie als Orthologe zu identifiziert. Das erste Kriterium, die Sequenz-Ähnlichkeit, ist durch die anfängliche Identifizierung der Kandidaten mit Hilfe der *in silico*-Vergleiche bereits teilweise erfüllt. Im nächsten Schritt müssen die allgemeinen Proteinstrukturen insbesondere außerhalb der Zink-Finger-Domäne und die Expressions-Daten der einzelnen Kandidaten-Gene systematisch ermittelt und verglichen werden, wie es z.B. für *Bts1* durchgeführt wurde. Bei der Mehrzahl der Gene wird man wie bei *Bts1* im Ausschlussverfahren zu dem Ergebnis kommen, dass eine Orthologie-

Beziehung zu *btd* und *Knk* zumindest unwahrscheinlich ist. Gleichzeitig sollten die Kriterien aber auch ausreichen, um bei einigen Genen eine positive Aussage machen zu können, also dass die überwiegende Mehrzahl der Daten übereinstimmt mit den "idealen Erwartungswerten". Sobald dies geschehen ist können die experimentellen Vorzüge der unterschiedlichen Modellorganismen genutzt werden, um die vielfältigen Fragen zu Funktion und Wirkungsweise von *btd*/*Knk* zu beantworten.

Maus-Mutanten und das Roberts-Syndrom: Welche Rolle spielt *Knk* in der Humangenetik?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *Knopfkopf*-Gen eine zentrale Rolle in der Embryogenese der Maus spielt und dass dessen experimentelle Inaktivierung zu schweren Missbildungen führt. Bei der Analyse anderer Gene hat sich gezeigt, dass in vielen Fällen auch natürliche Maus-Mutanten existieren, bei denen ein Gen entweder vollständig ausgeschaltet ist oder dessen Funktion teilweise in Form von hypomorphen Allelen verloren wurde. Beispiele hierfür sind die *Pax*-Gene: *Pax2* = Nierendefekte und Coloboma (Sanyanusin P. et al.; 1995), *Pax3* = Waardenburg Syndrom (Tassabehji M. et al.; 1993) oder *Pax6* = Aniridie (Hanson IM. et al.; 1993).

Um solche natürliche Mutanten zu finden, können erstens die phänotypischen Beschreibungen in entsprechenden Datenbanken und der Literatur mit denen der *KO*-Mäuse verglichen werden. Diese Methode ist allerdings nur zielführend, wenn die natürlichen Mutanten ebenfalls auf einer vollständigen Inaktivierung des Gens beruhen, da die hypomorphen Allele oder die Deletionen eines Locus' mit mehreren Genen zu anderen Phänotypen führt. Eine zweite Methode nutzt die Kenntnis der exakten genomischen Lokalisation von Mutationen, die mit der entsprechenden Lokalisation des fraglichen Gens verglichen werden.

das Maus-*Knopfkopf*-
Gen liegt auf dem
Chromosom 12

Ein Vergleich von beschriebenen Maus-Mutanten mit den Ergebnissen der gezielten Inaktivierung von *Knopfkopf* hatte keine verwertbaren Übereinstimmungen erbracht. Daher wurde die genomische Lokalisation des *Knk*-Gens bei einem kommerziellen Anbieter (SeedDNA; Windsor, Kanada; Internet: www.seedna.com) bestimmt. Die dort durchgeführte Analyse ergab, dass *Knk* auf dem distalen Arm des Chromosoms 12 (Region F2) liegt.

das *Knopfkopf*-Gen co-
lokalisiert mit *Sp4*, *iv*
und der *legless*-
Mutante

Ein Vergleich mit Literaturdaten hat gezeigt, dass in der gleichen chromosomalen Region neben *Knk* auch *Sp4* (Supp DM. et al.; 1996) und *situs inversus viscerum* (*iv*) (de Meeus A. et al.; 1992) sowie die Mutation *legless* (Supp DM. et al.; 1996) liegen. Vergleicht man die Phänotypen der *Knk*-, *iv*- und *legless*-Mutationen miteinander ergibt sich folgendes Bild:

Struktur / Phänotyp	Knopfkopf-Mutante	legless-Mutanten	iv-Mutante
Vorderbeine	stark reduziert (100%)	reduziert (100%)	-
Hinterbeine	stark reduziert (100%)	stark reduziert (100%)	-
lumbale & sacrale Wirbels.	fehlen (100%)	normal?	-
Zerebellum	fehlt (100%)	normal?	-
Riechkolben	fehlen (100%)	reduz./fehlen (>95%)	-
Telencephalon	reduziert (100%)	Läsionen (?%)	-
Hydro-/Holoprosencephalus	Holoprosenc. (100%)	Hydrozephalus(?%)	-
Rückenmark	Spina bifida (100%)	disorganisiert (100%)	-
Nase	fehlt (100%)	reduz. Nasenseptum	-
Gaumen	fehlt (100%)	Kiefer-Gaumen-Spalte	-
<i>Situs inversus</i>	-	JA (50%)	JA (50%)
chromosomale Lokalisation	12, distal	12, distal	12, distal

Abb. 62: Phänotypischer Vergleich der Knopfkopf-Mutante mit der Legless- und iv-Mutante. Die legless-Mutante weist in den meisten Strukturen, die bei der Knk-Mutante betroffen sind, phänotypische Veränderungen auf. Umgekehrt weist die legless-Mutante keine Veränderungen in Strukturen auf, die nicht auch in der Knk-Mutante betroffen sind mit Ausnahme des *situs inversus*.

Die molekulare Basis für den legless-Phänotyp ist nur z.T. bekannt. Die legless-Mäuse wurden durch eine retrovirale Insertionsmutation erzeugt, die zu einer chromosomalen Deletion von ca. 100kb geführt hat (McNeish JD. et al.; 1988. Schreiner CM. et al.; 1993. Supp DM. et al.; 1999). In dieser Deletion wurde u.a. das *iv*- und *Sp4*-Gen lokalisiert.

Unterteilt man den legless-Phänotyp in den *Situs inversus*, der mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Fehlen des *situs inversus viscerum*-Gens verursacht wird, und die übrigen Veränderungen, so zeigt sich eine deutliche Korrelation mit den betroffenen Strukturen der Knopfkopf-Mutante. Der Hauptunterschied ist die Stärke des Phänotyps der betroffenen Strukturen - die Veränderungen sind bei den legless-Tieren deutlich schwächer ausgeprägt.

Ebenfalls in der Deletion lokalisiert ist das *Sp4*-Gen, das in den meisten der betroffenen Strukturen exprimiert wird und in der Vergangenheit oft als mögliches Ortholog zu *buttonhead* beschrieben wurde. Der Knock Out von *Sp4* zeigt jedoch nur einen sehr schwach ausgeprägten Phänotyp und erklärt nicht die Beobachtungen bei den legless-Mutanten (Supp DM. et al.; 1996).

Demgegenüber ist die Übereinstimmung zwischen dem *Knk*-Knock Out und der legless-Mutante sehr hoch, sieht man von der Stärke der Veränderungen ab. In ausnahmslos allen Fällen sind die legless-Phänotypen schwächer ausgeprägt. Damit gibt es, aufbauend auf den *Knk*-Daten, zwei unterschiedliche Erklärungsansätze:

1. Die Deletion hat das *Knk*-Gen nicht vollständig eliminiert, sondern ein hypomorphes Allel erzeugt. Da die unmittelbar flankierenden Sequenzen der Deletion in der Arbeitsgruppe von Prof. Potter sequenziert wurden und nicht den kodierenden Bereich des *Knopfkopf*-Gens enthielten, bleibt als mögliche

die *legless*-Mutante weist eine Deletion von ca. 100 kb auf

der *legless*-Phänotyp umfasst als Teilaspekt den *situs inversus viscerum*-Phänotyp

die *Sp4*-Deletion erklärt nicht den *legless*-Phänotyp

der *Knk*-Phänotyp weist Gemeinsamkeiten mit dem *legless*-Phänotyp auf

möglicherweise besitzt die *legless*-Mutante ein hypomorphes *Knk*-Gen

Erklärung hierfür eine Deletion von Kontrollelementen des distalen Promotors.

Die in Abbildung 37C–E gezeigten Experimente zeigen, dass nur die vollständigen Kontrollelemente für die Expression während der Gastrulation in unmittelbarer Nähe des kodierenden Bereiches liegen. Dies würde übereinstimmen mit der Beobachtung, dass bei der *legless*-Mutante anscheinend keine Defekte an der Wirbelsäule auftreten, die bei den *Knk*-Mäusen durch eine fehlerhafte sekundäre Gastrulation erklärt werden können.

Entsprechend dieser möglichen Erklärung könnten Enhancer-Elemente, die für die Organogenese-spezifische Expression notwendig sind, deletiert worden sein. Wenn der Verlust der Enhancer-Elemente eine minimale Restaktivität des Gens erlauben, könnte dies den postulierten hypomorphen Charakter des Allels erklären.

Sp4 könnte ein Modulator der *Knopfkopf*-Aktivität sein

2. Alternativ dazu ist es möglich, dass der gleichzeitige Verlust der *Knk*- und *Sp4*-Aktivität zu dem beschriebenen Phänotyp führt. In den meisten Fällen führt ein sogenannter Doppel-Knock Out zu schwereren phänotypischen Veränderungen. Da die DNA-Bindung der unterschiedlichen Mitglieder der *SP1/BTEB/XKLF* jedoch weitgehend identisch sind, ist es denkbar, dass *Sp4* die Funktion eines (reprimierenden) Modulators von *Knk* hat (Philipsen S. et al.; 1999). Sollte dies der Fall sein, würde der Verlust eines solchen Modulators möglicherweise dazu führen, dass die Konsequenz des Verlustes der *Knk*-Aktivität weniger stark ist als bei dem *Knk*-Knock Out selbst.

Diese Hypothesen könnten getestet werden, indem erstens überprüft wird, ob Teile des *Knk*-Gens tatsächlich in der Deletion liegen. Zweitens müsste ein Doppel-*Knock Out* hergestellt werden, bei dem sowohl *Knk* als auch *Sp4* inaktiviert wurden. Dies ist jedoch nicht durch eine einfache Kreuzung der Mutanten möglich, da beide Gene auf dem selben Chromosom liegen. Daher müsste eine solche Doppelmutation unmittelbar in den ES-Zellen hergestellt werden.

Vergleich der Maus-*Knopfkopf*-Daten mit der OMIM-Datenbank am NCBI

Entsprechend der Annahme, dass hypomorphe Allele von *Knopfkopf* zu phänotypischen Veränderungen führen, die von der extrem starken Ausprägung im *Knk*-*Knock Out* bis zur deutlich abgeschwächten Form in der *legless*-Mutante schwanken können, wurde in der OMIM nach humanen Syndromen gesucht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>). Diese sollten signifikante Übereinstimmungen hinsichtlich der betroffenen Strukturen aufweisen und in ihrem Schweregrad mit den Maus-Daten korrelieren. Zusätzlich wurde die genomische Lokalisation überprüft.

Bei der genomischen Lokalisation einer möglichen Mutation wurde die Position des humanen *Sp4*-Gens als Vergleichswert angenommen. Der Gen-Locus wird in der Literatur mit 7p15 angegeben (Kalff-Suske M. et al.; 1995). Bei der Suche in der OMIM-Datenbank konnten keine erblichen Erkrankungen entdeckt werden, die in diesem Locus kartiert wurden und Ähnlichkeiten mit den Maus-Mutanten aufwiesen.

Auf der phänotypischen Ebene konnte ein humanes Syndrom identifiziert werden, dass große Übereinstimmungen mit den Ergebnissen aus der Maus aufweist. Es handelt sich hierbei um das sehr seltene und bislang nicht chromosomal kartierte Roberts Syndrom (long bone deficiencies associated with cleft lip-palate)(Roberts, J. B.; 1919. Maserati E. et al.; 1991. Van Den Berg DJ. et al.; 1993).

Der Begriff Roberts Syndrome umfasst vermutlich mehrere molekulargenetisch nicht weiter miteinander verwandte Phänotypen, die als Gemeinsamkeit ein gleichzeitiges Auftreten von Schäden in der Entwicklung der Extremitäten und eine Kiefer-Gaumen-Spalte aufweisen. Die Mehrzahl der betroffenen Personen ist deutlich geringer betroffen als es bei dem obigen Fall zutrifft. Die Patienten haben zumeist leichte Defekte in der Entwicklung der Arme und/oder Beine und oft nur eine sogenannte Hasenscharte. Die Gehirnentwicklung ist oft normal und ihr Intelligenz-Quotient liegt im Durchschnitt nur leicht unter dem Schnitt in der Bevölkerung.

das Roberts Syndrom weist zahlreiche Ähnlichkeiten zum *Knk*-Phänotyp auf

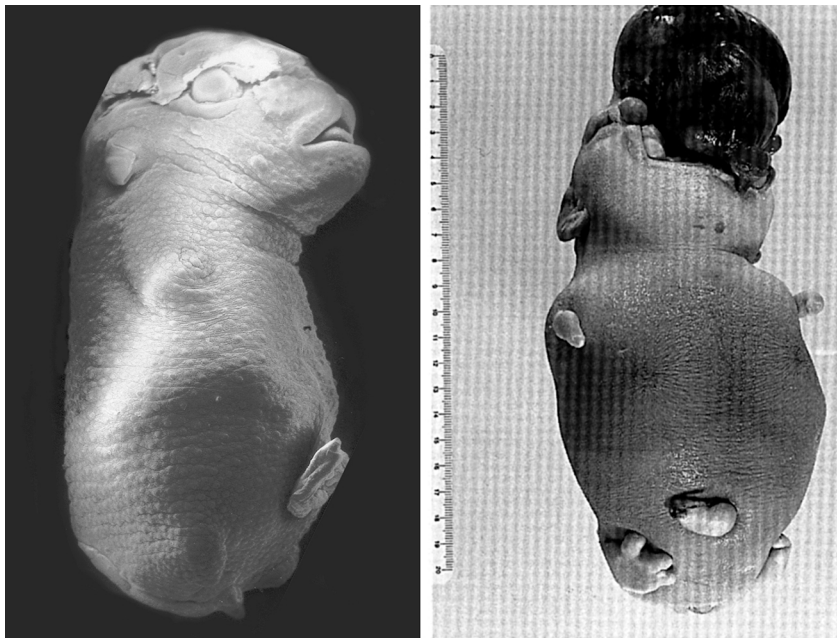


Abb.63: Vergleich der Knopfkopf-Mutanten mit einem vom Roberts Syndrom betroffenen Fötus. Links ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines 17,5 Tage alten Maus-Embryos dargestellt. Rechts zeigt das Foto eines in der 44sten Woche geborenen Fötus, der vom Roberts Syndrom betroffen ist. In beiden Fällen ist eine deutliche Reduktion der Extremitäten erkennbar. Es ist nicht bekannt, ob der humane Fötus eine verkürzte Wirbelsäule besitzt. Beide Mutationen führen zu einem Verlust des Gaumens und der Nase. Das Gehirn des menschlichen Fötus ist missgebildet und besteht im Wesentlichen aus einer flüssigkeitsgefüllten Zyste. Wie bei den Maus-Embryonen hat der humane Fötus trotz der schweren Missbildungen bis zur Geburt überlebt. Das Foto des humanen Fötus wurde Maserati E. et al. (1991) entnommen.

Zwischen diesen extremen Formen der sehr milden und der in Abbildung 63 dargestellten sehr schweren Ausprägung des Roberts Syndroms gibt es einen fließenden Übergang. Insbesondere bei den leichten Entwicklungsstörungen ist nicht davon auszugehen, dass diese durch eine Fehlfunktion des *Knopfkopf*-Gens verursacht wurden. Die schweren Formen ähneln jedoch in sehr vielen Aspekten

dem Maus-Phänotyp sehr stark und ein kausaler Zusammenhang erscheint nicht unwahrscheinlich.

Struktur / Phänotyp	Roberts Syndrom	Knopfkopf-Mutante	legless-Mutanten
Vorderbeine	reduziert, Oligodactylie	stark reduziert	reduziert
Hinterbeine	reduziert, Oligodactylie	stark reduziert	stark reduziert
lumbale & sacrale Wirbels.	normal?	fehlen	normal?
Zerebellum	?	fehlt	normal?
Telencephalon	Microzephalie	reduziert	Läsionen
Hydro-/Holoprosencephalus	Hydrozephalus	Holoprosenc.	Hydrozephalus
Rückenmark	normal?	thorakal: normal	disorganisiert
Kopfskelett	Encephalozele (Os ethmoidalis)	Os ethmoidalis, frontalis, parietalis & occipitalis fehlen	reduziertes Nasenseptum
Gaumen	?	fehlt	Kiefer-Gaumen-Sp.
<i>Situs inversus</i>	-	-	ja
präinatales Wachstum	verzögert	verzögert	verzögert

Abb.64: Phänotypischer Vergleich der Knopfkopf-Mutante mit dem Roberts Syndrom und der Legless-Mutante. Föten, die vom Roberts Syndrom betroffen sind, weisen in den meisten Strukturen, die bei der Knk-Mutante betroffen sind, phänotypische Veränderungen auf.

vorläufige Daten
belegen keinen
Zusammenhang des
Knk-Gens mit dem
Roberts Syndrom

Um diese Hypothese zu testen, müsste die genomische DNA von entsprechenden Fällen des Roberts Syndroms untersucht werden. In besonders schweren Fällen ist es möglich, dass das gesamte Gen deletiert ist, was z.B. über eine PCR leicht nachzuweisen wäre. Es ist jedoch davon auszugehen, dass zumindest bei den etwas leichteren Formen nur Punktmutationen vorliegen oder Mutationen der Enhancer-Elemente. In diesen Fällen müssten größere genomische Bereiche komplett sequenziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Untersuchungen nur teilweise durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Dr. Uta Francke, University of California at Stanford, wurde die DNA von zwei Patienten getestet, die vom Roberts-Syndrom betroffen sind. Eine erste PCR-Analyse zeigte, dass zumindest ein Allel vorhanden sein muss, das keine größere Deletion aufweist. Es ist jedoch nicht weiter geprüft worden, ob es heterozygote Defekte gibt oder kleinere Defekte wie Punktmutationen.

Ein möglicher molekularer Mechanismus, der für hypomorphe humane *Knk*-Allele verantwortlich sein könnte, wären Veränderungen in der DNA-bindenden Zink-Finger-Domäne oder in den aktivierenden Domänen, die vermutlich für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich sind. Ein Beispiel für ein hypomorphes Allel durch Mutationen in der aktivierenden Domäne ist der Synpolydactyly-Phänotyp. Es konnte gezeigt werden, dass dieser mit einer Verlängerung der Polyalanin-Region im *HOXD13*-Protein korreliert (Goodman FR. et al.; 1997). Da auch das *KNK*-Protein eine Polyalanin-Region aufweist wäre es möglich, dass ein ähnlicher Mechanismus für die verschiedenen Abstufungen des Phänotyps des Roberts-Syndroms verantwortlich ist.

Ebenfalls unbekannt ist der genaue Phänotyp der betroffenen Personen. Wie bereits zuvor dargestellt, umfasst das Roberts-Syndrom vermutlich schon allein wegen der sehr großen Breite an verschiedenen Phänotypen mehrere, nicht

unmittelbar korrelierte Defekte. Daher ist z.Z. nicht bekannt, ob bei den getesteten Proben überhaupt davon auszugehen ist, dass es sich tatsächlich um eine *Knk*-basierte Mutation handelt.

Knopfkopf spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Krebs

Die Entstehung von Krebs kann als fehlgeleitete Form der embryonalen Entwicklung auf der Ebene einzelner Zellen betrachtet werden. Viele Gene, die an der Steuerung der Embryogenese beteiligt sind, spielen gleichzeitig eine bedeutende Rolle bei der Tumorigenese. Bekannte Beispiele hierfür sind das Wilms Tumor-Gen *WT1* (Haber DA. et al.; 1992, Coppes MJ. et al.; 1993), *Wnt1* (Nusse R. et al.; 1984; Nusse R. et al.; 1991. McMahon AP. et al.; 1990) oder das Retinoblastoma Gen *Rb* (Friend SH. et al.; 1986. Jacks T. et al.; 1992).

Ein Vergleich der *KNK*-Protein-Sequenz mit der NCBI-Datenbank zeigte, dass zahlreiche ESTs aus malignen Tumoren vorliegen, die dem N-Terminus des humanen *Knk*-Gens entsprechen: AI095128 (gepoolte Glioblastomas) AI652426, AI962477, AI96838, AW59382, BF222742 (gepoolte Keimzell-Tumore) AW207154, AW297181 (gepoolte cDNAs verschiedener Tumore).

Auf Basis der humanen BAC-Klone AC005251 und AC079787 (NCBI) kann der genomische Aufbau des humanen *Knk*-Gens *in silico* ermittelt werden. Dieser weist hinsichtlich der Sequenz-Übereinstimmungen eine Ähnlichkeit von über 90% auf und zeigt eine identische Organisation von Exons und Introns (für die Organisation des Maus-Locus siehe Abbildung 42). Vergleicht man die oben genannten humanen ESTs mit der genomischen Organisation zeigt sich, dass sie, obwohl sie zumindest drei verschiedenen Präparationen entstammen, jeweils im Intron zwischen dem Zweiten und Dritten beginnen.

Die isolierten cDNAs deuten darauf hin, dass in den Tumorgeweben eine inkorrekte *Knk*-mRNA produziert wird. Obwohl der Verlust der ersten Exone ein Klonierungs-Artefakt sein könnte, ist es möglich, dass die fehlerhafte Transkription des Knopfkopf-Gens mitverantwortlich für die Entstehung der Tumore ist. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden keine weiteren Untersuchungen hierzu durchgeführt.

Wie beim Roberts Syndrom ist es möglich, dass für die Krebsentstehung hypomorphe Allele zuständig sind. Diese könnten entweder die Regulationssequenzen betreffen, so dass ektopische Expressionen entstehen bzw. gewebsspezifische Expressionen – z.B. in den Hoden – entfallen. Alternativ könnten einzelne Domänen mutiert sein, die z.B. für die Aktivierung verantwortlich sind. Ein Beispiel wäre wie beim Roberts Syndrom eine Verlängerung der Polyalanin-Region (Goodman FR. et al.; 1997).

die NCBI-Datenbank enthält humane *Knopfkopf*-ESTs, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden

die Tumor-ESTs weisen ein unterschiedliches *splicing* als die Maus-cDNA auf

erste Ergebnisse zeigen, dass heterozygote *Knk*-Mutanten oft Hodentumore besitzen

Ein weiterer Hinweis für eine Rolle des *Knopfkopf*-Gens im Zusammenhang mit der Entstehung von malignen Tumoren kommt aus Mausdaten. Vorläufige und bislang nicht weiter statistisch untermauerte Beobachtungen an drei männlichen, für den *Knk-Knock Out* heterozygoten Mäusen (ca. 7 Monate alt) haben gezeigt, dass sie Hodentumore besitzen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend dieser ersten Befunde könnte eine Langzeit-Beobachtung von weiteren Männchen zu statistisch aussagefähigen Ergebnissen führen.

Modell der Funktion des KNK-Proteins

die *Knk*-Mutation beeinflusst nicht die frühe Musterbildung

Das *Knock Out*-Experimente hat gezeigt, dass die homozygoten Mutanten einen gravierenden Phänotyp auf morphologischer Ebene aufweisen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die frühen molekularen Musterungsprozesse nicht durch die Mutation gestört werden.

Knk könnte in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren wirken

Ein hypothetischer Wirkungsmechanismus, der diese Beobachtungen erklären könnte, beruht auf einer ausschließlich kombinatorischen Wirkung von KNK mit anderen Transkriptionsfaktoren. Dies würde auch den beschriebenen *Drosophila*-Experimenten zur phänotypischen Suppression entsprechen, die gezeigt haben, dass das BTD-Protein allein keine Wirkung bei einer ektopischen Expression hat. Erst im Zusammenspiel mit anderen Faktoren wie *empty spiracles*, die wiederum ohne BTD keinen Effekt haben, ergibt sich eine phänotypische Veränderung in der Fliegenembryogenese.

Dies würde bedeuten, dass das *Knk*-Gen in einer parallelen Genkaskade zu den "klassischen" Transkriptionsfaktoren wie den PAX-Proteinen etc. einzuordnen wäre. Damit ergeben sich für den Organismus zusätzliche Regulationsmechanismen durch die Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen beteiligten Komponenten des Systems. Außerdem hat eine solche mehrstufige, kombinatorische Regulation der Embryogenese den Selektionsvorteil, dass leichte Verschiebungen im Expressionsmuster eines der Partner keine unmittelbaren negativen phänotypischen Veränderungen zu Folge hat. Damit vereinfachen sich die notwendigen Kontrollmechanismen für die Expressionskontrolle erheblich und das System wird insgesamt fehlertoleranter.

Bislang sind die Zielgene, die die Informationen der molekularen Musterbildungsprozesse in Strukturen umsetzen, nicht bekannt. Eine mögliche Gruppe sind hierbei die Zellzyklusgene. Fast alle morphologischen Prozesse, die durch die Wirkung von Pax-Genen oder anderen vergleichbaren Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden, beinhalten eine regulierte Zellteilung. Damit wären ihre Aktivierung oder Inaktivierung ein unmittelbarer Zugang zur Umsetzung der molekularen Informationen in morphologische Strukturen. Weitere mögliche Ziele umfassen die Gruppen der Zelladhäsionsgene, extrazellulären Matrix usw..

mögliche Mechanismen der KNK-Aktivität

Die biochemische Wirkung des KNK-Transkriptionsfaktors, ist nicht bekannt. Mögliche Mechanismen wären die Acetylierung von Histonen oder die Methy-

lierung der DNA, die für viele der anderen Mitglieder der Sp1-Proteine beschrieben wurden. Diese erfolgt jedoch nicht unmittelbar durch die Proteine der Sp1-Familie, sondern durch die Rekrutierung von Methylasen und Acetylasen. Um festzustellen, welcher dieser Mechanismen eine Rolle bei den genannten Prozessen spielt, könnte z.B. durch einen *two cell hybrid-Screen* nach physikalisch interagierenden Proteinen gesucht werden.

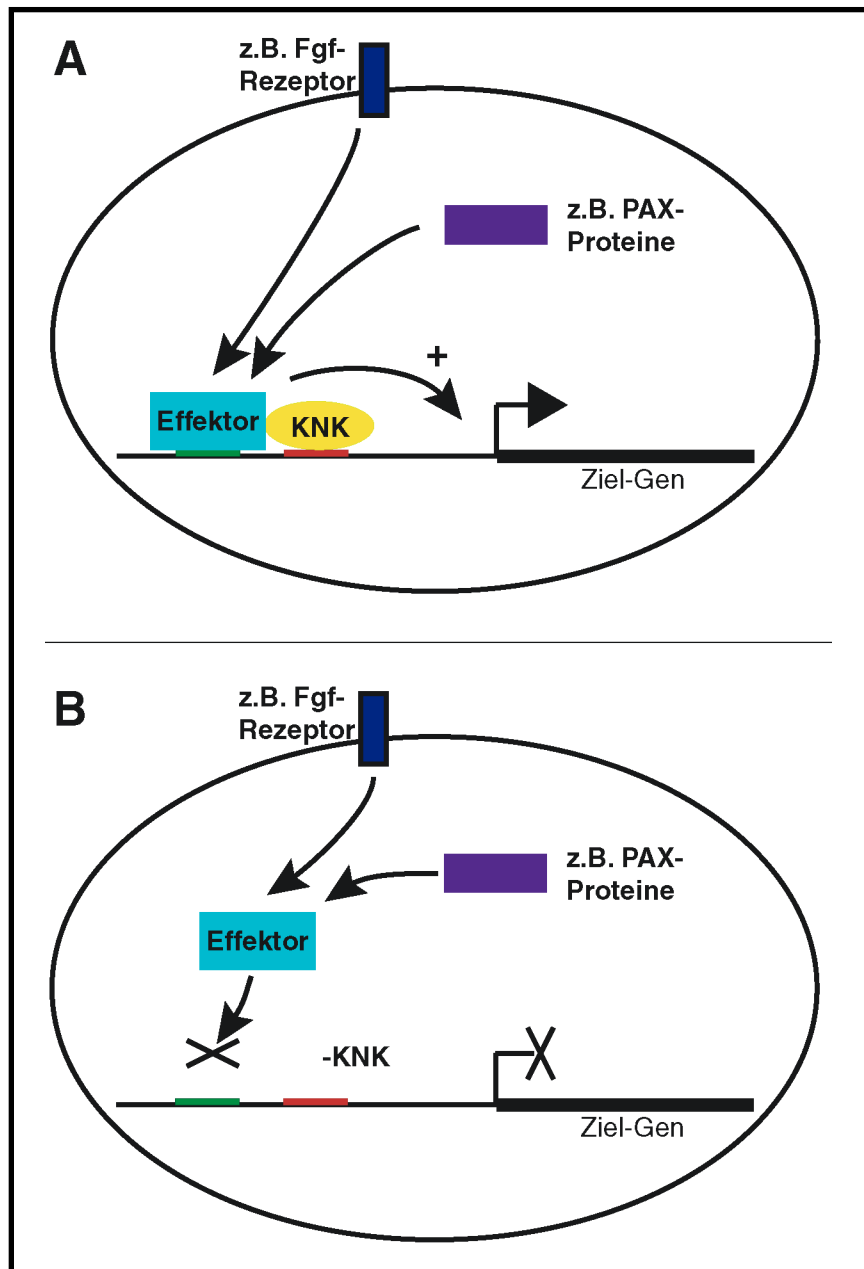


Abb.65: Schematisches Modell zur Wirkung von Knopfkopf bei der Regulation von Ziel-Genen. Im Zusammenspiel mit einem weiteren Transkriptionsfaktor oder Proteinkomplexen ergibt sich nach diesem Modell eine Aktivierung des Ziel-Gens. Ein solcher Effektor kann z.B. in der Signalkaskade *downstream* des FGF-Rezeptors liegen oder selbst ein PAX- oder EN-Protein sein. Ohne diese Partner hat das *Knk*-Gen keine Wirkung auf die Transkription des Zielgens. Wenn die KNK-Aktivität fehlt können die Effektormoleküle entweder nicht an die DNA binden oder deren Bindung an ihre Erkennungssequenz führt nicht zu einer Aktivierung des Zielgens.

die *Knk*-Mutante könnte dazu dienen, Zielgene von Regulatoren der Musterbildungsprozesse zu finden

Sollte dieses Modell zutreffen, würde die *Knk*-Mutante indirekt ein technisches Werkzeug darstellen, um die bislang unbekanntes Zielgene der *Pax*-Gene etc. zu identifizieren. Da die Anlagen für die später betroffenen morphologischen Strukturen zu Beginn angelegt werden, ergibt sich die Möglichkeit, diese mit den wildtypischen Anlagen zu vergleichen. Insbesondere für die Untersuchung der Entwicklung des Telencephalons ergibt sich damit die Möglichkeit die Moleküle zu identifizieren, die letztlich für die Ausbildung und Differenzierung z.B. des Cortex etc. verantwortlich sind.

Praktisch könnte ein solches Experiment so aussehen, dass telencephales Gewebe der Mutanten mit Gewebe von wildtypischen Embryonen verglichen wird. Da nicht bekannt ist, welche Gene letztlich betroffen sind, wäre ein möglichst breiter Vergleich sinnvoll. Dieser könnte erfolgen, indem die Expressionsprofile mit Hilfe von *high density*-DNA-Chips oder eines *differential displays* verglichen werden. Bei einem solchen Vergleich sollten alle mRNAs / cDNAs fehlen, die im wildtypischen Gewebe unter der Kontrolle von Partnern stehen und indirekt durch die zusätzliche Wirkung des KNK-Transkriptionsfaktors angeschaltet werden.

plcBS

Während der Klonierung der zuvor beschriebenen Gene hat sich gezeigt, dass ihre DNA sehr leicht rekombiniert und einen toxischen Effekt auf die Bakterien hat. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde ein neuer Vektor hergestellt, plcBS, der die Vorteile von pBluescriptIIKS+ beibehält, aber durch eine sehr niedrige Kopienzahl pro Zelle den toxischen Effekt und die Rekombination der DNA minimiert. (siehe Ergebnisse).

Gemessen an anderen Vektorsystemen besitzt plcBS zahlreiche praktische Vorteile, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind:

	pBlue-scriptII	pBR322	pACYC 177/184	pLG338 pLG339	pLG338-30 pLG339-SPORT	plcBS
Kopien pro Zelle (ca.)	300-500	20	12	5-6	5-6	5-6
Replikations-Ursprung	ColE1	pMB1 (ColE1)	p15A	pSC1010	pSC1010	pSC1010
Größe (kb)	3,0	4,4	3,9 / 4,2	7,3 / 6,2	5,0 / 5,7	4,0
MCS	JA	-	-	-	JA	JA
Anzahl 1×schneidenden "Standard"-Enzymen	31 (21 in MCS)	17 (- in MCS)	18 / 13 (- in MCS)	6 / 7 (- in MCS)	16 / 10 (12/9 in MCS)	30 (20 in MCS)
Blau-Weiss (BW)-Selektion	JA	-	-	-	-	JA
Enzyme mit BW-Selektion	21	9	10 / 8	4 / 4	0 / 0	20
Sequenzierung	21 Klonierungs-Stellen mit T3 / T7	8 Klonierungs-Stellen mit 16 Primern	-	-	?	21 Klonierungs-Stellen mit T3 / T7
Promotoren für RNA-Polymerasen	T3 / T7	-	-	-	-	T3 / T7
Amplifizierung mit Chloramphenicol	(JA)	JA	JA	-	-	-
ca. µg-Ausbeute aus 100ml LB-Kultur	300-500	20 (300 ampli.)	10 (300 ampli.)	5	5	5
Reduktion von toxischen Effekten und Rekombination	-	+ / -	+	++	++	++

Abb. 66: Vergleich von plcBS mit verschiedenen erhältlichen Vektoren. Der Vergleich zeigt, dass plsBS weitgehend wie Bluescript zu bearbeiten ist, aber gegenüber diesem eine starke Reduktion von toxischen Effekten und Rekombinationen aufweist.

Insgesamt erlaubt der Vektor eine einfache Handhabung und bietet deutlich mehr Klonierungsmöglichkeiten als ältere *low copy*-Vektoren wie pACAY oder pBR322. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit hat sich sein Einsatz als unverzichtbar erwiesen, da alle anderen getesteten Möglichkeiten nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt haben. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde der Vektor inzwischen von zahlreichen anderen Mitarbeitern (Dr. G. Bernier, Dr. F. Cecconi, Dr. G. Goudreau, Dr. T. Marquardt u.a.) erfolgreich eingesetzt, insbesondere bei der Herstellung von *Knock Out*-Konstrukten, die häufig aufgrund der langen genomischen Sequenzen zu Rekombinationen neigen.

Zusammenfassung

Ausgehend von Daten aus der Fruchtfliege wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nach Orthologen des *Drosophila-buttonhead*-Genes 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.

Referenzen

- Acampora D. Avantaggiato V. Tuorto F. Barone P. Reichert H. Finkelstein R. Simeone A.** Murine Otx1 and Drosophila otd genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development. *Development*. 125(9):1691-702, 1998
- Akarsu AN. Stoilov I. Yilmaz E. Sayli BS. Sarfarazi M.** Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families. *Human Molecular Genetics*. 5(7):945-52, 1996
- Allen ND. Cran DG. Barton SC. Hettle S. Reik W. Surani MA.** Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature*. 333(6176):852-5, 1988
- Alvarez-Bolado G. Cecconi F. Wehr R. Gruss P.** The fork head transcription factor Fkh5/Mf3 is a developmental marker gene for superior colliculus layers and derivatives of the hindbrain somatic afferent zone. *Brain Res Dev Brain Res*. 112(2):205-15, 1999
- Appleyard RK.** Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly isogenic strain derived from Escherichia coli K12. *Genetics* 39: 440, 1954
- Ausubel, FM. Moore DD. Smith, JA. Struhl K. Seidman J. Kingston, R. Brent, R.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Incorporated. New York. ISBN 0471625949, 1987-2001
- Bachiller D. Macias A. Duboule D. Morata G.** Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. *EMBO Journal*. 13(8):1930-41, 1994
- Banerjee AK.** 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiological Reviews*. 44(2):175-205, 1980
- Barth AI. Nathke IS. Nelson WJ.** Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 9(5):683-90, 1997
- Beck F. Erler T. Russell A. James R.** Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Developmental Dynamics*. 204(3):219-27, 1995
- Berg JM. Shi Y.** The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. 271(5252):1081-5, 1996
- Bishop KM. Goudreau G. O'Leary DD.** Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. *Science*. 288(5464):344-9, 2000
- Böck P.** Romeis Mikroskopische Technik. siebzehnte neubearbeitete Auflage. ISBN 3-541-11227-1.1989
- Boncinelli E. Gulisano M. Broccoli V.** Emx and Otx homeobox genes in the developing mouse brain. *Journal of Neurobiology*. 24(10):1356-66, 1993
- Brönner G. Chu-LaGraff Q. Doe CQ. Cohen B. Weigel D. Taubert H. Jäckle H.** Sp1/egr-like zinc-finger protein required for endoderm specification and germ-layer formation in Drosophila. *Nature*. 369(6482):664-8, 1994

- Bürglin TR.** Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research*. 25(21):4173-80, 1997
- Capecchi MR.** The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*. 5(3):70-6, 1989
- Capovilla M. Eldon ED. Pirrotta V.** The giant gene of *Drosophila* encodes a b-ZIP DNA-binding protein that regulates the expression of other segmentation gap genes. *Development*. 114(1):99-112, 1992
- Casanova J. Sanchez-Herrero E. Morata G.** Prothoracic transformation and functional structure of the Ultrabithorax gene of *Drosophila*. *Cell*. 42(2):663-9, 1985
- Chan JY. Kwong M. Lu R. Chang J. Wang B. Yen TS. Kan YW.** Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO Journal*. 17(6):1779-87, 1998
- Cheyette BN. Green PJ. Martin K. Garren H. Hartenstein V. Zipursky SL.** The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron*. 12(5):977-96, 1994
- Chowdhury K.** One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 19(10):2792, 1991
- Church GM. Gilbert W.** Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81(7):1991-5, 1984
- Churchward G. Linder P. Caro L.** The nucleotide sequence of replication and maintenance functions encoded by plasmid pSC101. *Nucleic Acids Research*. 11(16):5645-59, 1983
- Cohen SM. Jürgens G.** Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Nature*. 346(6283):482-5, 1990
- Coppes MJ. Campbell CE. Williams BR.** The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB Journal*. 7(10):886-95, 1993
- Cohen SN. Chang AC. Boyer HW. Helling RB.** Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(11):3240-4, 1973
- Cohn MJ. Tickle C.** Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends in Genetics*. 12(7):253-7, 1996
- Courey AJ. Tjian R.** Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. 55(5):887-98, 1988
- Cunningham TP. Montelaro RC. Rushlow KE.** Lentivirus envelope sequences and proviral genomes are stabilized in *Escherichia coli* when cloned in low-copy-number plasmid vectors. *Gene*. 124(1):93-8, 1993
- Dellacorte C.** Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue & Cell*. 26(4):613-9, 1994
- Del Sal G. Manfioletti G. Schneider C.** The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 7(5):514-20, 1989
- de Meeus A. Alonso S. Demaille J. Bouvagnet P.** A detailed linkage map of subtelomeric murine chromosome 12 region including the situs inversus mutation locus IV. *Mammalian Genome*. 3(11):637-43, 1992

- Deutsch J. Laval M. Lepasant JA. Maschat F. Pourrain F. Rat L.** Larval fat body-specific gene expression in *D. melanogaster*. *Developmental Genetics*. 10(3):220-31, 1989
- Donehower LA. Harvey M. Slagle BL. McArthur MJ. Montgomery CA Jr. Butel JS. Bradley A.** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 356(6366):215-21, 1992
- Doyle JJ Doyle JL.** A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15, 1987
- Echelard Y. Epstein DJ. St-Jacques B. Shen L. Mohler J. McMahon JA. McMahon AP.** Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 75(7):1417-30, 1993
- Edgar BA.** From small flies come big discoveries about size control. *Nature Cell Biology*. 1(8):E191-3, 1999
- el-Baradi T. Pieler T.** Zinc finger proteins: what we know and what we would like to know. *Mechanisms of Development*. 35(3):155-69, 1991
- Evans MJ. Scarpulla RC.** NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes & Development*. 4(6):1023-34, 1990
- Finkelstein R. Boncinelli E.** From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx. *Trends in Genetics*. 10(9):310-5, 1994
- Friend SH. Bernards R. Rogelj S. Weinberg RA. Rapaport JM. Albert DM. Dryja TP.** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 323(6089):643-6, 1986
- Gallitano-Mendel A. Finkelstein R.** Ectopic orthodenticle expression alters segment polarity gene expression but not head segment identity in the *Drosophila* embryo. *Developmental Biology*. 199(1):125-37, 1998
- Garcia-Bellido A.** Homeotic and atavic mutations in insects. *American Zoologist*. 17:613-630, 1977
- Garel S. Marin F. Mattei MG. Vesque C. Vincent A. Charnay P.** Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Developmental Dynamics*. 210(3):191-205, 1997
- Georgopoulos K. Moore DD. Derfler B.** Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*. 258(5083):808-12, 1992
- Gerwin N. La Rosee A. Sauer F. Halbritter HP. Neumann M. Jäckle H. Nauber U.** Functional and conserved domains of the *Drosophila* transcription factor encoded by the segmentation gene knirps. *Molecular & Cellular Biology*. 14(12):7899-908, 1994
- Gollner H. Bouwman P. Mangold M. Karis A. Braun H. Rohner I. Del Rey A. Besedovsky HO. Meinhardt A. van den Broek M. Cutforth T. Grosveld F. Philipsen S. Suske G.** Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells*. 6(8):689-97, 2001
- González-Gaitán M. Jäckle H.** in **Crampton, J. M. [Editor]. Beard, C. B. [Editor]. Louis, C. [Editor].** *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. Kluwer Academic Publishers. 1996:283
- Goodman CS. Coughlin BC.** Introduction. The evolution of evo-devo biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(9):4424-5, 2000
- Goodman FR. Mundlos S. Muragaki Y. Donnai D. Giovannucci-Uzielli ML. Lapi E. Majewski F. McGaughan J. McKeown C. Reardon W. Upton J. Winter RM. Olsen BR. Scambler PJ.**

- Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94(14):7458-63, 1997
- Greer JM. Puetz J. Thomas KR. Capecchi MR.** Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. Nature. 403(6770):661-5, 2000
- Haber DA. Housman DE.** Role of the WT1 gene in Wilms' tumour. Cancer Surveys. 12:105-17, 1992
- Halder G. Callaerts P. Gehring WJ.** Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. Science. 267(5205):1788-92, 1995
- Hafen E. Kuroiwa A. Gehring WJ.** Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene fushi tarazu during Drosophila embryonic development. Cell. 37(3):833-41, 1984
- Hanahan D. Jessee J. Bloom FR.** Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. Methods in Enzymology. 204:63-113, 1991
- Hanson IM. Seawright A. Hardman K. Hodgson S. Zaletayev D. Fekete G. van Heyningen V.** PAX6 mutations in aniridia. Human Molecular Genetics. 2(7):915-20, 1993
- Harrison SM. Houzelstein D. Dunwoodie SL. Beddington RSP.** Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. Developmental Biology. 227(2):358-372, 2000
- Hempstead PG. Regular SC. Ball IR.** A method for the preparation of high-molecular-weight DNA from marine and freshwater triclads (Platyhelminthes, Turbellaria). DNA & Cell Biology. 9(1):57-61, 1990
- Hogan B. Beddington R. Costantini F.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. zweite Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. ISBN 0879693843. 1994
- Holland P. Ingham P. Krauss S.** Development and evolution. Mice and flies head to head. Nature. 358(6388):627-8, 1992
- Ishikawa Y.** Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. Bioessays. 22(5):487-95, 2000
- Jacks T. Fazeli A. Schmitt EM. Bronson RT. Goodell MA. Weinberg RA.** Effects of an Rb mutation in the mouse. Nature. 359(6393):295-300, 1992
- Jones AS.** Use of alkyltrimethylammonium bromides for the isolation of ribo- and deoxyribo-nucleic acids. Nature. 199: 280-282, 1963
- Jürgens G. Hartenstein V.** The terminal regions of the body pattern. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. Editoren: Bate M. und Martinez Arias A. Cold Spring Harbor Laboratory Press:687-746, 1993
- Kaufman MH. Bard MH.** The anatomical basis of mouse development. Academic Press, 1999
- Kessel M. Gruss P.** Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. Cell. 67(1):89-104, 1991
- Kingsley C. Winoto A.** Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. Molecular & Cellular Biology. 12(10):4251-61, 1992
- Kalff-Suske M. Kunz J. Grzeschik KH. Suske G.** Human Sp4 transcription factor gene (SP4) maps to chromosome 7p15. Genomics. 26(3):631-3, 1995
- Knipple DC. Seifert E. Rosenberg UB. Preiss A. Jäckle H.** Spatial and temporal patterns of Kruppel gene expression in early Drosophila embryos. Nature. 317(6032):40-4, 1985

- Kornberg RD, Lorch Y.** Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 98(3):285-94, 1999
- Kozak M.** At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*. 196(4):947-50, 1987
- Kozak M.** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*. 266(30):19867-70, 1991
- Kozak M.** Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annual Review of Cell Biology*. 8:197-225, 1992
- Krauss S, Concordet JP, Ingham PW.** A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 75(7):1431-44, 1993
- Kuo CT, Veselits ML, Leiden JM.** LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science*. 277(5334):1986-90, 1997a
- Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM.** The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes and Development*. 11(22):2996-3006, 1997b
- LaBonne C, Bronner-Fraser M.** Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 15:81-112, 1999
- Lance-Jones C.** The somitic level of origin of embryonic chick hindlimb muscles. *Developmental Biology*. 126(2):394-407, 1988
- Lewis EB.** A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 276(5688):565-70, 1978
- Liang Z, Biggin MD.** *Eve* and *ftz* regulate a wide array of genes in blastoderm embryos: the selector homeoproteins directly or indirectly regulate most genes in *Drosophila* [published erratum appears in *Development* 1999 Feb;126(5): following table of contents]. *Development*. 125(22):4471-82, 1998
- Licht JD, Grossel MJ, Figge J, Hansen UM.** *Drosophila* Kruppel protein is a transcriptional repressor. *Nature*. 346(6279):76-9, 1990
- Lis JT, Schleif R.** Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*. 02(3):383-9, 1975
- Lis JT.** Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods in Enzymology*. 65(1):347-53, 1980
- Liu QA, Hengartner MO.** The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 887:92-104, 1999
- Macdonald PM, Ingham P, Struhl G.** Isolation, structure, and expression of even-skipped: a second pair-rule gene of *Drosophila* containing a homeo box. *Cell*. 47(5):721-34, 1986
- Mackay JP, Crossley M.** Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(1):1-4, 1998
- Manfioletti G, Schneider C.** A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research*. 16(7):2873-84, 1988
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P.** Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in *Pax7*^{-/-} mutant mice. *Development*. 122(3):831-8, 1996
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P.** Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. *Nature Genetics* 19(1):87-90, 1998

- Mansouri A, Gruss P.** Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mechanisms of Development.* 78(1-2):171-8,1998
- Mansouri A.** Gene targeting by homologous recombination in embryonic stem cells. In: *Cell Biology; a laboratory handbook*. zweite Auflage. Academic Press:478-486, 1998
- Mansouri A, Voss AK, Thomas T, Yokota Y, Gruss P.** Uncx4.1 is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of Pax9. *Development.* 127(11):2251-8, 2000
- Mansouri A, Pla P, Larue L, Gruss P.** Pax3 acts cell autonomously in the neural tube and somites by controlling cell surface properties. *Development.* 128(11):1995-2005, 2001
- Martin GR.** The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development.* 12(11):1571-86, 1998
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S.** Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* 89(4):619-28, 1997
- Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart RM.** Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron.* 6(6):971-81, 1991
- Maserati E, Pasquali F, Zuffardi O, Buttitta P, Cuoco C, Defant G, Gimelli G, Fraccaro M.** Roberts syndrome: phenotypic variation, cytogenetic definition and heterozygotic detection. *Annales de Genetique* 34: 239-246, 1991
- McMahon AP, Bradley A.** The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell.* 62(6):1073-85, 1990
- Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR.** HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes & Development.* 5(6):1042-56, 1991
- McNeish JD, Scott WJ Jr, Potter SS.** Legless, a novel mutation found in PHT1-1 transgenic mice. *Science.* 241(4867):837-9, 1988
- Meacock PA, Cohen SN.** Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell.* 20(2):529-42, 1980
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR.** An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics.* 18(2):136-41, 1998
- Miller CA, Tucker WT, Meacock PA, Gustafsson P, Cohen SN.** Nucleotide sequence of the partition locus of Escherichia coli plasmid pSC101. *Gene.* 24(2-3):309-15, 1983
- Mirzayans F, Pearce WG, MacDonald IM, Walter MA.** Mutation of the PAX6 gene in patients with autosomal dominant keratitis. *American Journal of Human Genetics.* 57(3):539-48, 1995
- Molnar A, Georgopoulos K.** The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Molecular & Cellular Biology.* 14(12):8292-303, 1994
- Monaghan AP, Bock D, Gass P, Schwager A, Wolfer DP, Lipp HP, Schütz G.** Defective limbic system in mice lacking the tailless gene. *Nature.* 390(6659):515-7, 1997
- Monaghan AP, Grau E, Bock D, Schütz G.** The mouse homolog of the orphan nuclear receptor tailless is expressed in the developing forebrain. *Development.* 121(3):839-53, 1995

- Murray MG. Thompson WF.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8(19):4321-5, 1980
- Nakagawa S. Takeichi M.** Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development*. 121(5):1321-32, 1995
- Nakano Y. Yoshida Y. Yamashita Y. Koga T.** Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. *Gene*. 162(1):157-8, 1995
- Nauber U. Pankratz MJ. Kienlin A. Seifert E. Klemm U. Jäckle H.** Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene *knirps*. *Nature*. 336(6198):489-92, 1988
- Neher E. Sakmann B.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 260(5554):799-802, 1976
- Nieto MA. Bennett MF. Sargent MG. Wilkinson DG.** Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* *snail* gene. *Development*. 116(1):227-37, 1992
- Noll M.** Evolution and role of Pax genes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 3(4):595-605, 1993
- Nusse R. van Ooyen A. Cox D. Fung YK. Varmus H.** Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (*int-1*) on mouse chromosome 15. *Nature*. 307(5947):131-6, 1984
- Nusse R. Brown A. Papkoff J. Scambler P. Shackelford G. McMahon A. Moon R. Varmus H.** A new nomenclature for *int-1* and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 64(2):231, 1991
- Ohuchi H. Noji S.** Fibroblast-growth-factor-induced additional limbs in the study of initiation of limb formation, limb identity, myogenesis, and innervation. *Cell & Tissue Research*. 296(1):45-56, 1999
- Oliver G. Loosli F. Koster R. Wittbrodt J. Gruss P.** Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene *Six3*. *Mechanisms of Development*. 60(2):233-9, 1996
- Olson EN. Arnold HH. Rigby PW. Wold BJ.** Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene *MRF4*. *Cell*. 85(1):1-4, 1996
- Osumi-Yamashita N. Ninomiya Y. Doi H. Eto K.** The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Developmental Biology*. 164(2):409-19, 1994
- Patel NH. Martin-Blanco E. Coleman KG. Poole SJ. Ellis MC. Kornberg TB. Goodman CS.** Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell*. 58(5):955-68, 1989
- Philipsen S. Suske G.** A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Research*. 27(15):2991-3000, 1999
- Pieler T. Bellefroid E.** Perspectives on zinc finger protein function and evolution--an update. *Molecular Biology Reports*. 20(1):1-8, 1994
- Preiss A. Rosenberg UB. Kienlin A. Seifert E. Jäckle H.** Molecular genetics of *Krüppel*, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Nature*. 313(5997):27-32, 1985
- Quiring R. Walldorf U. Kloter U. Gehring WJ.** Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science*. 265(5173):785-9, 1994
- Radtke F. Georgiev O. Muller HP. Brugnera E. Schaffner W.** Functional domains of the heavy metal-responsive transcription regulator MTF-1. *Nucleic Acids Research*. 23(12):2277-86, 1995

- Rivera-Pomar R. Jäckle H.** From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends in Genetics*. 12(11):478-83, 1996
- Roberts J. B.** A child with double cleft of lip and palate, protrusion of the intermaxillary portion of the upper jaw and imperfect development of the bones of the four extremities. *Annual Surgery* 70: 252-254, 1919
- Salminen M. Meyer B.I. Bober E. Gruss P.** Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 127(1):13-22. 2000
- Sambrook J. Fritsch EF. Maniatis T.** *Molecular cloning - a laboratory manual*. Zweite Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- Sanger F. Nicklen S. Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12):5463-7, 1977
- Sanyanusin P. Schimmenti LA. McNoe LA. Ward TA. Pierpont ME. Sullivan MJ. Dobyns WB. Eccles MR.** Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. [erratum appears in *Nat Genet* 1996 May;13(1):129]. *Nature Genetics*. 9(4):358-64, 1995
- Sasaki H. Hogan BL.** Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development*. 118(1):47-59, 1993
- Schedl A. Ross A. Lee M. Engelkamp D. Rashbass P. van Heyningen V. Hastie ND.** Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell*. 86(1):71-82, 1996
- Schmidt-Ott U. Gonzalez-Gaitan M. Jäckle H. Technau GM.** Number, identity, and sequence of the *Drosophila* head segments as revealed by neural elements and their deletion patterns in mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(18):8363-7, 1994
- Schöck F. Sauer F. Jäckle H. Purnell BA.** *Drosophila* head segmentation factor buttonhead interacts with the same TATA box-binding protein-associated factors and in vivo DNA targets as human Sp1 but executes a different biological program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(9):5061-5, 1999
- Schöck F. Purnell BA. Wimmer EA. Jackle H.** Common and diverged functions of the *Drosophila* gene pair D-Sp1 and buttonhead. *Mechanisms of Development*. 89(1-2):125-32, 1999
- Schreiner CM. Scott WJ Jr. Supp DM. Potter SS.** Correlation of forelimb malformation asymmetries with visceral organ situs in the transgenic mouse insertional mutation, legless. *Developmental Biology*. 158(2):560-2, 1993
- Schwarz M. Alvarez-Bolado G. Urbanek P. Busslinger M. Gruss P.** Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(26):14518-2, 1997
- Shahjahan RM. Hughes KJ. Leopold RA. DeVault JD.** Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques*. 19(3):332-4, 1995
- Sharman AC. Brand M.** Evolution and homology of the nervous system: cross-phylum rescues of otd/Otx genes. *Trends in Genetics*. 14(6):211-4, 1998
- Shields JM. Yang VW.** Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 272(29):18504-7, 1997
- Spemann H. Mangold H.** Über Induktion von Embryoanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Rouxs Archiv für Entwicklungsmechanik*. 100: 599-638, 1924

- Spradling AC. Rubin GM.** Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*. 218(4570):341-7, 1982
- St-Onge L. Sosa-Pineda B. Chowdhury K. Mansouri A. Gruss P.** Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*. 387(6631):406-9, 1997
- Stewart CN Jr. Via LE.** A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*. 14(5):748-50, 1993
- Stoker NG. Fairweather NF. Spratt BG.** Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene*. 18(3):335-41, 1982
- Stoykova A. Gruss P.** Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *Journal of Neuroscience*. 14(3 Pt 2):1395-412, 1994
- Stoykova A. Treichel D. Hallonet M. Gruss P.** Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Journal of Neuroscience*. 20(21):8042-50, 2000
- Subramanian V. Meyer BI. Gruss P.** Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell*. 83(4):641-53, 1995
- Supp DM. Witte DP. Branford WW. Smith EP. Potter SS.** Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Developmental Biology*. 176(2):284-99, 1996
- Supp DM. Brueckner M. Kuehn MR. Witte DP. Lowe LA. McGrath J. Corrales J. Potter SS.** Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development - Supplement*. 126(23):5495-504, 1999
- Tallafuß A. Wilm TP. Crozatier M. Pfeffer P. Wassef M Bally-Cuif L.** The zebrafish buttonhead-like factor *Bts1* is an early regulator of *pax2.1* expression during mid-hindbrain development. *Development* 128: 4021-4032, 2001
- Tao W. Lai E.** Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron*. 8(5):957-66, 1992
- Tassabehji M. Read AP. Newton VE. Patton M. Gruss P. Harris R. Strachan T.** Mutations in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nature Genetics*. 3(1):26-30, 1993
- Tewari R, Gillemans N, Wijgerde M, Nuez B, von Lindern M, Grosveld F, Philipsen S.** Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region. *EMBO Journal*. 17(8):2334-41, 1998
- Thirunavukkarasu K. Mahajan M. McLarren KW. Stifani S. Karsenty G.** Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1* contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with *Cbfbeta*. *Molecular & Cellular Biology*. 18(7):4197-208, 1998
- Toresson H. Martinez-Barbera JP. Bardsley A. Caubit X. Krauss S.** Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Development Genes & Evolution*. 208(8):431-9, 1998
- Treichel D. Becker MB. Gruss P.** The novel transcription factor gene *Sp5* exhibits a dynamic and highly restricted expression pattern during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*. 101(1-2):175-9, 2001
- Van Den Berg DJ. Francke U.** Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity. *American Journal of Medical Genetics*. 47(7):1104-23, 1993

- Verdu J. Buratovich MA. Wilder EL. Birnbaum MJ.** Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nature Cell Biology*. 1(8):500-6, 1999
- Vocke C. Bastia D.** Primary structure of the essential replicon of the plasmid pSC101. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80(21):6557-61, 1983
- Wani MA, Means RT Jr, Lingrel JB.** Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Research*. 7(4):229-38, 1998
- Walther C. Gruss P.** Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*. 113(4):1435-49, 1991
- Weatherbee SD. Carroll SB.** Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell*. 97(3):283-6, 1999
- Wehr R. Mansouri A. de Maeyer T. Gruss P.** Fkh5-deficient mice show dysgenesis in the caudal midbrain and hypothalamic mammillary body. *Development* 124(22):4447-56, 1997
- Weir MP. Kornberg T.** Patterns of engrailed and fushi tarazu transcripts reveal novel intermediate stages in *Drosophila* segmentation. *Nature*. 318(6045):433-9, 1985
- Wharton KA. Yedvobnick B. Finnerty VG. Artavanis-Tsakonas S.** opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell*. 40(1):55-62, 1985
- Wimmer EA. Jäckle H. Pfeifle C. Cohen SM.** A *Drosophila* homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature*. 366(6456):690-4, 1993
- Wimmer EA. Frommer G. Purnell BA. Jäckle H.** buttonhead and D-Sp1: a novel *Drosophila* gene pair. *Mechanisms of Development*. 59(1):53-62, 1996
- Wimmer EA. Cohen SM. Jackle H. Desplan C.** buttonhead does not contribute to a combinatorial code proposed for *Drosophila* head development. *Development*. 124(8):1509-17, 1997
- Zeller R. Duboule D.** Dorso-ventral limb polarity and origin of the ridge: on the fringe of independence?. *Bioessays*. 19(7):541-6, 1997
- Zhou X. Hollemann T. Pieler T. Gruss P.** Cloning and expression of xSix3, the *Xenopus* homologue of murine Six3. *Mechanisms of Development*. 91(1-2):327-30, 2000
- Zuber ME. Perron M. Philpott A. Bang A. Harris WA.** Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell*. 98(3):341-52, 1999
- Zurita M. Bolivar F. Soberon X.** Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327par, a completely sequenced, stable derivative of pBR327 containing the par locus of pSC101. *Gene*. 28(1):119-22, 1984