

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Entwicklungs-genetik
Neuherberg

***Pitx3* und seine Rolle in der Augen- und Gehirnentwicklung**

Doris Münster

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Jochen Graw
2. Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Die Dissertation wurde am 01.02.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.04.2005 angenommen.

Zusammenfassung

Die rezessive Mausmutante *aphakia* ist blind, da die Entwicklung der Augenlinse kurz nach der Bildung des Linsenbläschens abbricht und die Tiere ohne Linse geboren werden. Diese Mißbildung wird durch zwei Deletionen im *Pitx3* Promotor hervorgerufen, die die Expression von *Pitx3* verhindern.

Umfassende Genexpressionsanalysen der *aphakia* Maus, sowie Promotoranalysen und Kreuzungsversuche, fügen *Pitx3* in die Regulationsmechanismen sowohl der Augenentwicklung ein, als auch anderer Bereiche der Embryonalentwicklung. Dabei zeigte sich die gegenseitige Regulation von *Pitx3* und *Pax6*, sowie deren gemeinsamer Einfluß auf die *Ap2α* Expression:

Pax6 koordiniert die *Pitx3* Expression in der Linsenplakode im Embryonalstadium E 9.5. Dabei hat *Pax6* zum einen eine direkte, inhibierende Wirkung auf den *Pitx3* Promotor und zum anderen eine indirekte, über *Prox1* aktivierende Wirkung auf die *Pitx3* Expression. *Pitx3* wiederum beeinflußt die *Pax6* Expression ebenfalls. In den Embryonalstadien E 9.5 und E 10.5 wirkt *Pitx3* zumindest indirekt inhibierend auf *Pax6*. In den Stadien E 11.5 bis E 13.5 ist der Einfluß von *Pitx3* auf *Pax6* aktivierend. Dieser Wechsel zwischen aktivierender und inhibierender Wirkung von *Pitx3* spricht für die Beteiligung noch unbekannter Faktoren.

Das Zusammenspiel zwischen *Pitx3* und *Pax6* reguliert sowohl im Auge, als auch im entstehenden Mesencephalon, die Expression des Transkriptionsfaktors *Ap2α*. Dieser trägt im Auge zum Linsenwachstum bei. Die überlappenden Expressionsgebiete von *Pitx3* und *Ap2α* im Mesencephalon deuten auf eine gemeinsame Beteiligung an der Entstehung dopaminergener Neuronen hin, die für die Entwicklung des lokomotorischen Systems notwendig sind.

Überraschenderweise konnte in den Expressionsanalysen auch der Einfluß von *Pitx3* auf Gene gezeigt werden, deren Proteine zum Transport von Retinol (*Rbp4* und *Ttr*), Lipiden (*Apoa1*, *Apoa2* und *Apoc2*) und Eisen (*Tfr* und *Afp*) notwendig sind, sowie auf Gene, deren Proteine an der Blutgerinnung beteiligt sind (*Prothrombin* und *Fgb*).

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Augenentwicklung im Mausembryo	3
1.2	Die <i>aphakia</i> Maus: eine spontane <i>Pitx3</i> ^{-/-} Mutation	8
1.3	Ziel der Arbeit	10
2	Ergebnisse	12
2.1	Qualitative Genexpressionsanalyse	12
2.2	Quantitative Genexpressionsanalyse	22
2.3	Analyse von Expressionsmustern	24
2.3.1	<i>Rbp4</i> (MG-8-101o4)	25
2.3.2	<i>Ap2α</i> (MG-3-20k14)	27
2.3.3	<i>Pax6</i>	32
2.3.4	<i>Pitx3</i>	35
2.4	Promotoranalysen	36
2.4.1	Der <i>Pitx3</i> Promotor	36
2.4.2	Der <i>Ap2α</i> Promotor	41
2.5	Analyse von <i>Pitx3</i> / <i>Pax6</i> Doppelmutanten	46
3	Diskussion	51
3.1	Der Einfluß von <i>Pitx3</i> auf verschiedene Aspekte der Embryonalentwicklung . . .	51
3.2	Der Einfluß von <i>Pitx3</i> auf die Augen- und Gehirnentwicklung	54
3.2.1	Die Augenentwicklung bis zur <i>Pitx3</i> Expression	54
3.2.2	Die <i>Pitx3</i> Expression: Zur richtigen Zeit am richtigen Ort	57
3.2.3	Auswirkungen der <i>Pitx3</i> Expression auf die Augen-und Gehirnentwicklung	60
3.3	Ausblick	69
	Literaturverzeichnis	70
A	Material	78
A.1	Produkte	78
A.2	Medien und Lösungen	83
B	Methoden	90
B.1	Computer-unterstützte Sequenzanalyse	90
B.2	Allgemeine Molekulargenetische Methoden	90
B.3	Zellkultur und Promotoranalyse	94

B.4	Genexpressionsanalyse	96
B.4.1	DNA Microarrays	97
B.4.2	RealTime PCR	100
B.4.3	<i>In situ</i> Hybridisierung	103
B.5	Proteinchemische Methoden	104
B.6	Histologie	106
Abbildungsverzeichnis		108
Tabellenverzeichnis		109

— Kapitel 1 —

EINLEITUNG

Jedes Tier hat die Fähigkeit, bestimmte Reize seiner Umwelt wahrzunehmen und die so aufgenommenen Informationen zu verarbeiten. Dabei detektieren Rezeptoren Veränderungen der externen (oder internen) Umwelt, indem sie diese in Veränderungen des Membranpotentials umsetzen und an das Nervensystem weiterleiten. Rezeptoren sind modifizierte Neuronen oder Epithelzellen und sind auf einen bestimmten Reiz spezialisiert, wie Druck, chemische Reize, Wärme oder Licht. Rezeptoren können entweder einzeln vorkommen, oder mit anderen Zelltypen komplexe Sinnesorgane bilden, wie im folgenden Beispiel des Sinnesorgans “Auge” dargestellt wird (nach [6]).

Lichtrezeptoren reagieren auf die Reizenergie der elektromagnetischen Strahlung. Die einfachsten Photorezeptoren sind Zellansammlungen bei Invertebraten, wie der Pigmentbecherocellus bei Planarien. Dieser einfachste Augentyp nimmt nur Informationen über Intensität und Richtung des Lichts auf, bildet jedoch nicht die Umwelt ab. Ein anderer Invertebraten, der *Nautilus*, erhält dagegen mit seinem Lochkamera-Auge ein scharfes Bild seiner Umwelt, da dessen Photorezeptoren in einer Grube gebündelt sind und nur durch ein kleines Loch Licht erhalten.

Kompliziertere Augen zur Abbildung der Umwelt kommen sowohl bei Invertebraten, als auch bei Vertebraten vor. Sie bestehen aus einer Linse, die das einfallende Licht bündelt und der Photorezeptorschicht (Retina), die das Licht mithilfe von Sehpigmenten (z.B. Retinal, das an das Membranprotein Opsin gebunden ist) in elektrische Signale umwandelt und zur weiteren Verarbeitung an das Gehirn weiterleitet. Diese Augen können durch spezialisierte Photorezeptorzellen die Umwelt scharf und in Farbe abbilden. Die Evolution hat mindestens drei verschiedene Typen an komplizierten Augen hervorgebracht.

Erstens das Spiegelauge, das bei der Jakobsmuschel sowohl über eine Linse als auch einen reflek-

tierenden Parabolspiegel verfügt, die das Licht auf eine Retina projizieren. Das Bild wird durch den Hohlspiegel erzeugt, der hinter der Netzhaut liegt. Die direkt vor der Netzhaut liegende Linse dient der optischen Korrektur des stark verzerrten Spiegelbildes. Diese Form hat sich offenbar dort durchgesetzt, wo es weniger auf die Bildqualität und mehr auf die Lichtausbeute ankommt.

Zweitens das Facettenauge der Insekten und anderer Arthropoden, das aus zahlreichen Einzelaugen, den sogenannte Ommatidien, zusammengesetzt ist. Die Ommatidien bestehen jeweils aus einer Linse und einer Gruppe von Photorezeptorzellen. Jedes Ommatidium nimmt Licht aus einer bestimmten Richtung des Sehfeldes wahr. Die vielen Einzelinformationen werden zusammengefaßt und liefern ein rasterartiges Bild.

Der dritte Augentyp ist das Einzellinsenauge, bei dem eine Linse das einfallende Licht auf eine Retina projiziert. Dabei kann der Lichtfokus auf die Retina eingestellt werden, indem die Linse durch Muskeln vor und zurück bewegt wird. Dieser Augentyp kommt bei Vertebraten und im *Octopus*, vor, wobei Unterschiede im Detail bestehen. Der *Octopus* besitzt eine everse Retina, da die Netzhaut aus einer Einstülpung der embryonalen Epidermis entstanden ist. Die Photorezeptoren sind dem Licht zugewandt. Bei Wirbeltieren entsteht die Retina aus einer Ausstülpung des Gehirns. Die Photorezeptoren sind dem Licht abgewandt und man spricht von einer inversen Retina (nach [6]).

Auf molekulargenetischer Ebene treten Gemeinsamkeiten in der Augenentwicklung verschiedener Tiere jedoch ebenso deutlich hervor. Der Vergleich der Steuerungsmechanismen in der Augenentwicklung zwischen der Taufliege *Drosophila* (Facettenauge der Invertebraten) und der Hausmaus *Mus musculus* (Einzellinsenauge der Vertebraten) zeigte die speziesübergreifende Genfunktion von *Pax6* (*Paired-type homeobox 6*) bzw. dem homologen *eyeless* von *Drosophila*. Diesen Genen kommt bei der Entwicklung beider Augentypen die gleiche Schlüsselfunktion zu. Wird kein funktionsfähiges Protein transkribiert, so bilden sich weder bei *Drosophila* noch bei der Maus Augen aus. Werden diese Gene jedoch ektopisch exprimiert, so bewirken beide die Entwicklung von Augen [11, 29, 79]). Ein *Pax6* Homolog konnte auch im *Octopus* nachgewiesen werden konnte [79], was für eine weitere Verbreitung dieses Kontrollgenes spricht. Andere Gene, die an der Augenentwicklung beteiligt sind, kommen ebenfalls in homologen Formen sowohl in der Maus als auch in *Drosophila* vor (z.B. *Six3* und *sine oculis*) [79]. Diese Ähnlichkeiten setzen

sich auch auf Proteinebene fort: So wurden Photorezeptoren im Invertebratengehirn gefunden, die mit einem normalerweise für Vertebraten typischen Opsinmolekül ausgestattet sind [3].

Im folgenden wird nun genauer auf die Entwicklung des Einzellinsenauges im Mausembryo und die genetischen Hintergründe dieser Entwicklung eingegangen.

1.1 DIE AUGENENTWICKLUNG IM MAUSEMBRYO

Wie bereits erwähnt, entsteht die Photorezeptorschicht des Einzellinsenauges bei Vertebraten aus einer Ausstülpung des Gehirns. Somit ist das Vertebratenauge eine Komponente des Gehirns, wobei letzteres nicht nur der Ort der Reizverarbeitung ist, sondern zuallererst der Auslöser der Augenentwicklung, die dann parallel und in enger Verbindung mit dem Nervensystem stattfindet. Die Linse, als Lichtbündler entsteht aus ektodermalem Embryonalgewebe. Ihre Entwicklung ist Hauptbestandteil dieser Arbeit.

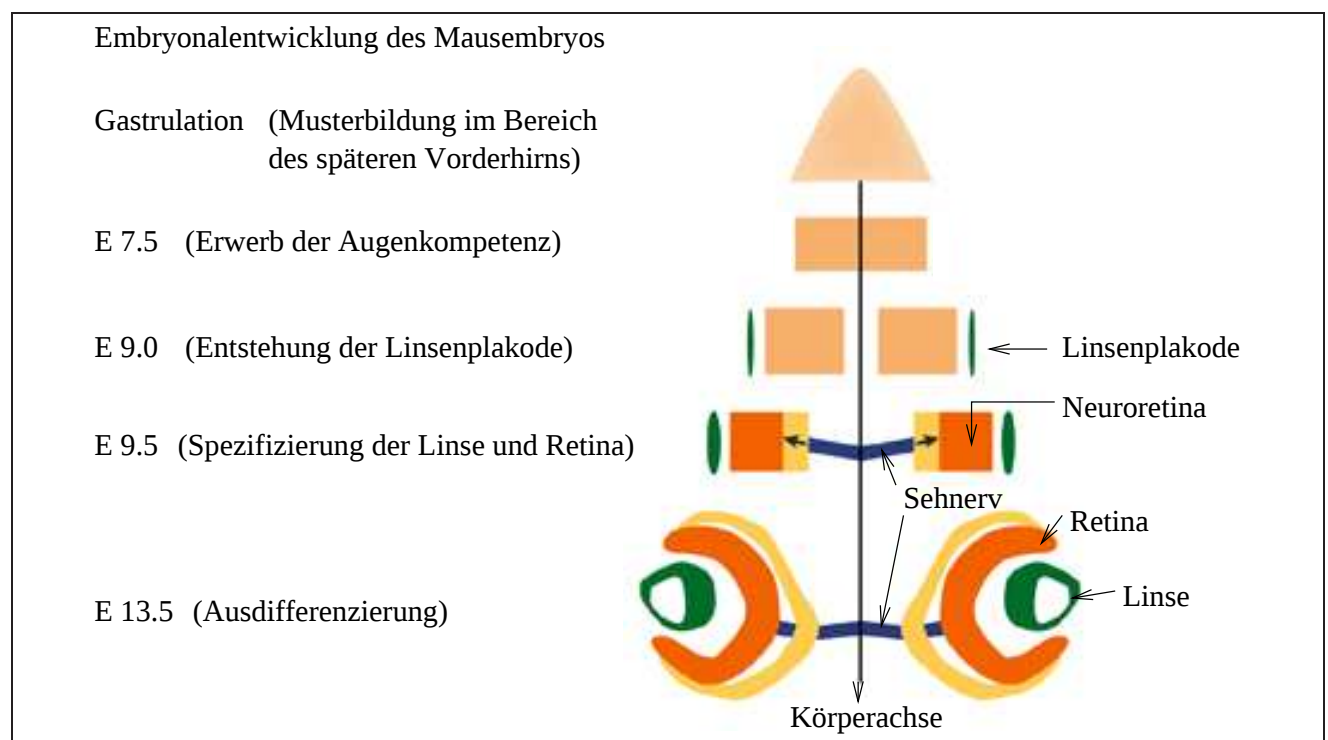


Abbildung 1.1: Entstehung der Augen aus dem Vorderhirn

Während der späten Gastrulation beginnen sich Zellen im Bereich des zukünftigen Vorderhirns zu Nervenzellen entwickeln. Diese Musterbildung führt schließlich zur Ausbildung des Augenfeldes im Vorderhirn. Die Zellen in diesem Bereich haben die Fähigkeit erhalten, sich später in Retinazellen (orange) umzuwandeln. Nachdem sich das Augenfeld geteilt hat, entwickeln sich die beiden Augenanlagen auf beiden Kopfseiten symmetrisch weiter. Die Ausstülpung der Augenbecher im Embryonalstadium E 9.0 löst im angrenzenden Oberflächengewebe zur Bildung der Linsenplakode (grün). Dieses Gewebe bildet die spätere Linse, während sich das Neuralgewebe zur Retina (orange) weiterentwickelt, das über den Sehnerv (blau) mit dem Gehirn verbunden ist (nach [97]).

Um die Steuerungsmechanismen zu verstehen, die der Augenentwicklung bei Vertebraten (in dieser Arbeit speziell der Maus) zugrundeliegen, werden zunächst die Entwicklungsprozesse, vor allem die der Linse beschrieben (alles nach [39]), bevor auf die genetischen Regulationsmechanismen näher eingegangen wird.

Das Auge als Ausstülpung des Vorderhirns

Bereits in der späten Gastrula entwickeln sich Zellen an verschiedenen Positionen unterschiedlich. Es bilden sich die ersten Entwicklungsmuster, die unter anderem zur Entwicklung des Neuralrohrs führen, das sich wiederum in Wirbelsäule und Gehirn differenziert. Der zukünftige Gehirnbereich teilt sich in Vorder-, Mittel-, und Hinterhirn auf. Zu dieser Zeit entsteht im Vorderhirn bei Säugetieren das sogenannte Augengefeld, ein Bereich mit Zellen, die nun die Fähigkeit haben, sich zur späteren Retina auszubilden (Augenkompetenz, s. Abbildung 1.1). Das Augengefeld teilt sich während des weiteren Wachstums des Vorderhirns und bildet seitlich zwei symmetrische Augenplakoden im Neuralektoderm des Vorderhirns (bei der Maus im Embryonalstadium E 7.5). Kurz danach bildet sich der optische Graben aus, der die Augenplakode mit der Region des Vorderhirns verbindet, die später das Diencephalon bildet. Am Treffpunkt der beiden Gräben entwickelt sich später der optische Knoten .

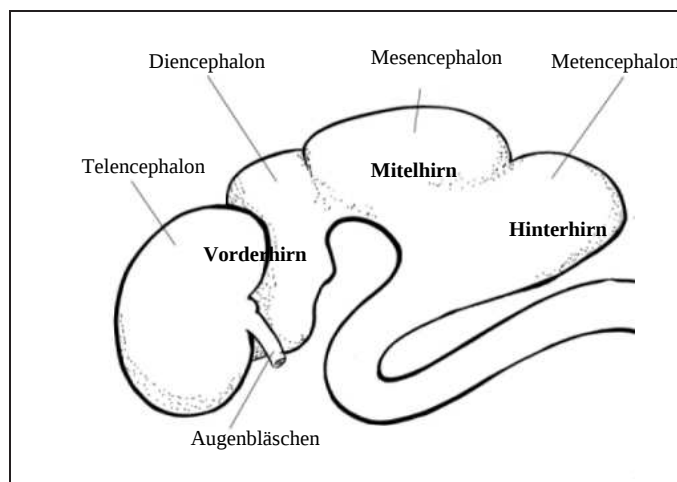


Abbildung 1.2: Position des Augenbläschens
Bei Säugetieren entwickeln sich die Augenbläschen an beiden Seiten des entstehenden Vorderhirns parallel und symmetrisch.

Die Augenplakode entwickelt sich weiter zum Augenbläschen, das in Richtung Oberflächenektoderm auswächst (bei der Maus E 8.5, s. Abbildung 1.2). Aus den Zellen des Augenbläschens entstehen später die lichtempfindlichen Schichten der Retina, das Pigmentepithelium und die Neuralschicht, die wiederum in verschiedene Schichten unterteilt wird. In diesem Sinne können die Augen (als Photosensoren) bei Säugetieren und Vögeln [99] als Ausstülpungen des Gehirns bezeichnet werden.

Sobald das Augenbläschen das Oberflächenektoderm berührt, erhält das dortige Gewebe die

Fähigkeit zur Entwicklung einer Linsenplakode ("Linsenkompetenz", bei der Maus zum Zeitpunkt E 9.5). Diese Verdickung des Oberflächengewebes schnürt sich ab und bildet so das Linsenbläschen (s. Abbildung 1.3 A bis C). Während das umliegende Oberflächenektoderm die entstandene Lücke schließt und im weiteren Verlauf die Hornhaut (Cornea) bildet, verlängern sich die Zellen im posterioren Teil des Linsenbläschens und füllen als primäre Linsenfasern den Hohlraum immer mehr aus (bei der Maus ist das Linsenbläschen im Embryonalstadium E 12.5 ausgefüllt). Die Zellkerne dieser Zellen wandern im Verlauf der Elongation vom Rand zur Zellmitte und verschwinden bis zur Geburt völlig. In der Äquatorialebene der Linse (zwischen anterioren und posterioren Bereich) bilden sich zusätzlich die sekundären Linsenfasern (bei

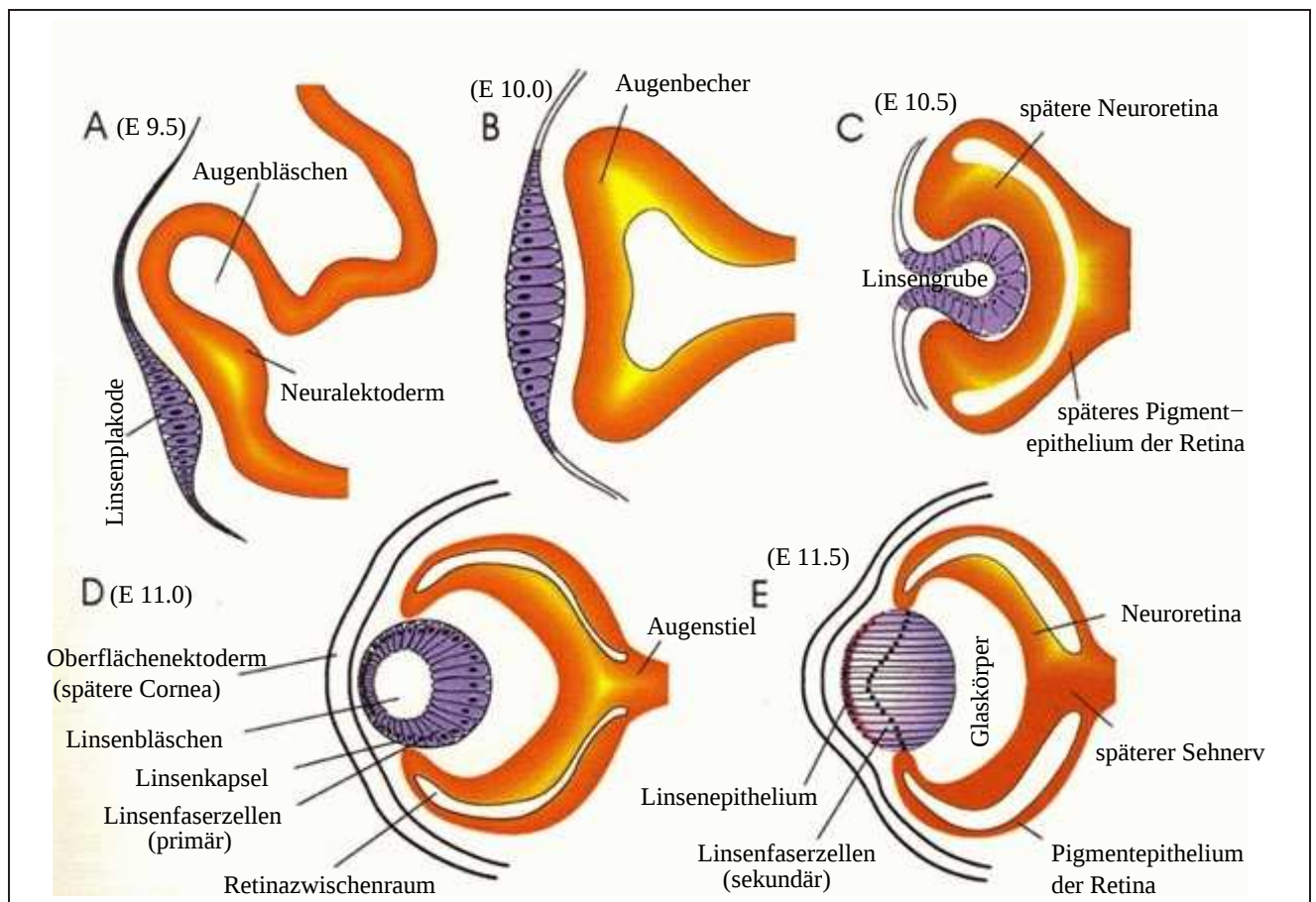


Abbildung 1.3: Entstehung der Augenlinse

Die sich entwickelnde Linse ist blau gekennzeichnet. A: Das Augenbläschen ist der ventralen Wand des Prosencephalons über dem Augenbecherstiel angelagert. Die Linsenplakode erscheint als verdickter Bereich des Oberflächenektoderms. B: Die Linsenplakode hat sich vergrößert. Das Augenbläschen bildet durch Invagination den Augenbecher. C: Der zentrale Teil der Linsenplakode stülpt sich ein zur Linsengrube. D: Die Linsengrube wird in das Linsenbläschen umgewandelt, das von einer Kapsel umgeben ist. Durch die Verlängerung der posterioren Zellen (primäre Linsenfasern) wird der Hohlraum aufgefüllt. E: Die Linse enthält anterior die kubischen Epithelzellen und posterior die sekundären Linsenfasern, die aus der Äquatorialebene der Linse einwandern. Die Schicht der neuronalen Retina hinter der Linse beginnt sich zu differenzieren und die Cornea entwickelt sich vor der Linse (nach [15]).

der Maus ab Stadium E 15.5), deren Wachstum zur Vergrößerung der Linse führt. Auch hier wandern die Zellkerne zur Zellmitte und werden nach und nach aufgelöst. Nach der Bildung von Kristallinen in allen Linsenfaserzellen, ist die Linse vollständig lichtdurchlässig.

Die Augenentwicklung in der Maus ist ca. zwei Wochen nach der Geburt abgeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt vergrößert sich das bereits voll funktionsfähige Auge nur noch, bis im Alter von ca. 11-12 Wochen das Größenwachstum der Maus beendet ist.

Steuerung der Augenentwicklung

Um eine so komplexe Struktur wie das Auge entstehen zu lassen, muß das Wachstum der verschiedenen Zellen genau an die Umgebung angepaßt sein. Die räumliche und zeitliche Kontrolle wird durch ein Netzwerk von sich gegenseitig regulierenden Transkriptionsfaktoren erreicht. Die daran teilhabenden Gene sind nur teilweise bekannt. Ihre Kenntnis verdanken wir oft dem Umstand, daß ihr Fehlen in der Kaskade zu einem Abbruch der Augenentwicklung führt. So verursacht der Ausfall von *Fgf8* (*Fibroblast growth factor 8*) und *Otx2* (*Orthodenticle homolog 2*) den Abbruch der Vorder- und Mittelhirnentwicklung [1, 9] (kein Augenfeld). Mangel an *Pitx3* Expression (*Pituitary homeobox gene 3*) stoppt die Entwicklung des Linsenbläschens [78]. Andere Gene wurden durch ihre Fähigkeit entdeckt, durch Expression in anderen Geweben die nachgeschalteten Schritte der Augenentwicklung auszulösen. *Pax6* (*Paired box gene 6*) ruft die Entwicklung eines ektopischen Auges hervor [11, 29]. Deswegen wird es auch als "Master Control Gene" der Augenentwicklung bezeichnet [29]. Auch die Anwesenheit von *Six3* (*Homolog of sine oculis homeobox 3*) führt zur Bildung einer ektopischen Linse und Retina [66, 50]. Damit stellt die Expression mancher Gene Fixpunkte der Entwicklung dar (s. Abbildung 1.4), die erreicht werden müssen, um ein zumindest rudimentär ausgebildetes Auge zu erhalten.

An der Feinregulierung der Augenentwicklung ist unter anderem *Shh* (*Sonic hedgehog*) beteiligt, das für die Teilung des Augenfeldes verantwortlich ist [87]. Das Zusammenspiel zwischen *Fgf8*, *Shh* und *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*) aktiviert die Expression von *Pax6*. Dieses aktiviert *Six3*, das antagonistisch mit *Gem* (*Gemini*) die weitere Entwicklung der Linse und Retina steuert. Bei letzterer spielen unter anderem *Rax* (*Retina and anterior neural fold gene*), *Six6* und *Dach* (*Homolog of Dachshund*) eine Rolle beim Wachstum der retinalen Vorläuferzellen [49, 56]. *Mitf* (*Microphthalmia-associated transcription factor*) trägt zur Ausbildung des

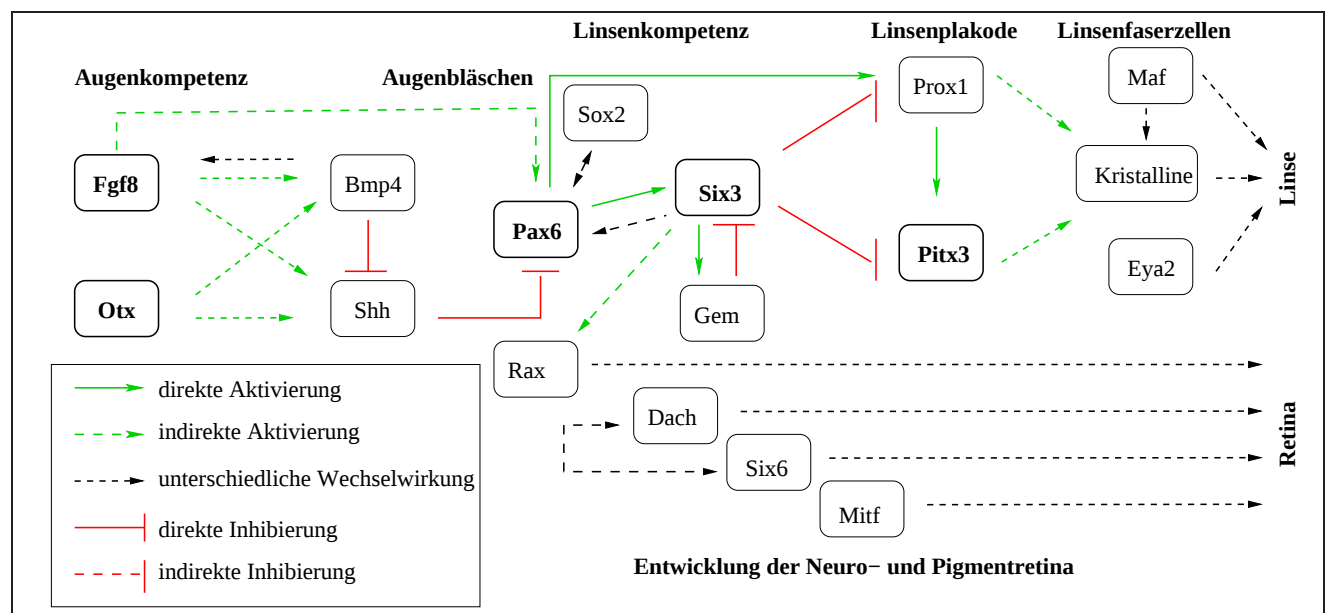


Abbildung 1.4: Ausschnitt aus der Regulationskaskade der Augenentwicklung

In diesem Ausschnitt sind einige Teilnehmer dargestellt, deren Anwesenheit bei der Augenentwicklung bisher bestätigt ist. Die mit Fettdruck hervorgehobenen Teilhaber stellen Fixpunkte dar, die auf dem Weg zu einem rudimentär funktionstüchtigen Auge unbedingt notwendig sind. Das genauere Zusammenspiel wird in Kapitel 3 ab Seite 51 erläutert.

Pigmentepitheliums bei [84].

Die Bildung der Linsenplakode wird durch *Pax6* und *Sox2* (*SRY Box 2*) gestartet, die einen Proteinkomplex bilden [37] und die Expression weiterer Gene, wie *Prox1* (*Prospero-related homeobox 1*) auslösen. Das Zusammenspiel von *Pax6*, *Six3* und *Prox1* aktiviert die *Pitx3* Expression (s. Kapitel 3.2.2), das wiederum zusammen mit *Prox1* die Expression der Kristalline *Crya*, *Cryb* und *Cryg* steuert [26, 95]. Währenddessen tragen *Maf* (*Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) und *Eya2* (*Eyes absent 2*) zur weiteren Ausbildung der Linsenfasern bei [17, 41]. *Fgf2* (*Fibroblast growth factor 2*) trägt zum Wachstum der Linsenfasern bei [83].

Nach bisherigem Wissenstand ist die *Pitx3* Expression in der Maus der letzte Fixpunkt, dessen Ausfall die Bildung einer Linse verhindert. Deswegen steht das *Pitx3* Gen im Mittelpunkt dieser Arbeit, die die Auswirkungen des *Pitx3* Mangels in der Mausmutante *aphakia* untersucht.

1.2 DIE *aphakia* MAUS: EINE SPONTANE *Pitx3*^{-/-} MUTATION

Ende der sechziger Jahre entdeckten Varnum & Stevens eine spontane Mausmutante, die ohne Augenlinse und mit einem verkümmerten Augapfel geboren wurde [88].

Phänotyp

Die rezessive, als *aphakia* ("linsenlos") bezeichnete, Mutantenlinie, zeigt eine normale Augenentwicklung bis zur Einstülpung der Linsenplakode zur Linsengrube (s. Abbildung 1.5). Von diesem Zeitpunkt an kann eine fortschreitende Anhäufung von Zellen beobachtet werden, die sich aus dem Linsenepithel abschnüren [78]. Das wird eventuell durch eine gestörte Anordnung des Mitoseapparates der Linsenzellen [106], zusammen mit Veränderungen der extrazellulären Matrix [107] verursacht, die die korrekte Anlagerung der Zellen aneinander verhindern. Dies führt zu einer vollständigen Zerstörung des Lumens, so daß sich das entstehende Linsenbläschen nicht vom Ektoderm ablösen kann. Im Embryonalstadium E 11.5 sind die Linsenfaserzellen deswegen nicht ausgebildet [78]. Die für die Linse spezifischen α -Kristalline werden verspätet und in geringerem Umfang gebildet, während die β - und γ -Kristalline überhaupt nicht exprimiert werden [52]. Als Folge dieser Fehlentwicklung bleibt das Auge kleiner als gewöhnlich, und eine normale Ausdifferenzierung der Retina und Iris findet nicht statt [78]. Auch die Anordnung des Mitoseapparates [106] und des extrazellulären Matrixgewebes [107] sind in *aphakia* verändert.

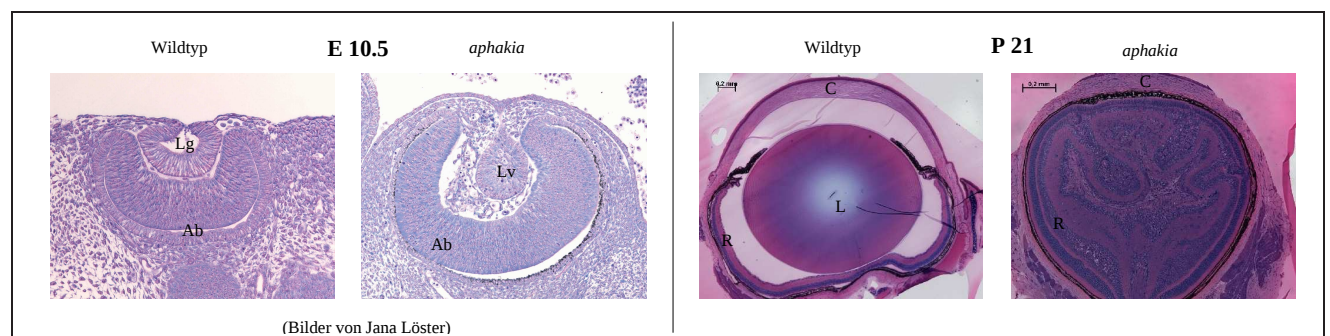


Abbildung 1.5: Phänotyp der *aphakia* Maus

Bis zur Bildung des Linsenbläschens an E 10.5 verläuft die Augenentwicklung in *aphakia* normal. Während sich die Linse im Wildtyp normal weiter entwickelt, bleibt sie in der Mutante auf dem Stand von E 10.5, so daß sie drei Wochen nach der Geburt (P 21) nicht mehr zu sehen ist. Der Platz, den die Linse einnehmen sollte wird durch eine ungeordnet gewachsene Retina gefüllt.

Ab: Augenbecher, C: Cornea, L: Linse, Lv: Linsenbläschen, Lg: Linsengrube, R: Retina

Drei Wochen nach der Geburt (P 21) ist das Auge der Mutante deutlich kleiner als der Wildtyp. Die Überreste der Linse sind nicht sichtbar und die Anordnung der Retina ist chaotisch.

Genotyp

Lokalisiert wurde *aphakia* bereits im Jahr 1975 [89] auf dem Chromosom 19 der Maus. Die Feinkartierung ergab einen Genlokus 0.6 ± 0.3 cM proximal zum Mikrosatelliten Marker D19Mit10 und 0.7 ± 0.4 cM distal zu den Markern D19Mit4 und D19Mit91 [26]. Dieser Genort befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum *Pitx3* Gen [77], das damit in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit rückte. *In situ* Hybridisierungen zeigten, daß *Pitx3* zwar in der Linse des Wildtyps exprimiert wurde, aber nicht in *aphakia* [78]. Da in der codierenden Region des *Pitx3* Gens selbst keine Mutationen entdeckt werden konnten [24], wurde der Promotor näher untersucht. Hier wurden zuerst eine kleine Deletion 1600 bp distal vom Transkriptionsstart [78] entdeckt und später noch eine zweite, größere Deletion [71], die den Transkriptionsstart, das erste Exon und Teile des ersten Introns enthält (s. Abbildung 1.6).

Das *Pitx3* Gen

Das *Pitx3* Gen gehört zur Familie der Pituitary-homeobox Gene [77], die drei Mitglieder hat: *Pitx1*, *Pitx2* und *Pitx3*. Diese Gene haben eine *bicoid* Homöobox-Domäne und eine hochkonservierte OAR-Region am C-Terminus gemeinsam [22], die bei *paired-type* Homöobox Genen wie *Otp*, *Aristaless* und *Rax* vorkommt [21].

Die Expressionsmuster der verschiedenen Mitglieder der *Pitx*-Familie können in zwei Gruppen unterteilt werden. In der einen Gruppe finden sich *Pitx1* und *Pitx2*, deren Expression ab E 6,5 meßbar ist, an E 8,5 ihr höchstes Niveau erreicht und ab dann unverändert bleibt. *Pitx1* und *Pitx2* unterscheiden sich auch nur geringfügig im Ort ihrer Expression. Beide werden in der Hypophyse (der pituitären Drüse, daher der Name der Genfamilie), im Mesenchym der hinteren Gliedmaßen, den Zähnen und den Kiemenbögen exprimiert. *Pitx2* kann zusätzlich noch im Vorder- und Mittelhirn, im Herz, dem Mesenchym der vorderen Gliedmaßen und in der neuralen Retina nachgewiesen werden. In der anderen Gruppe steht das *Pitx3* Gen alleine, das erst ab E 10 in der Linsenplakode exprimiert wird. In der sich entwickelnden Linse ist *Pitx3* weiterhin vorhanden, ab E 14 kommen noch die Kopfmuskeln, die Zunge, das Mittelhirn und

das Mesenchym hinzu [22, 78].

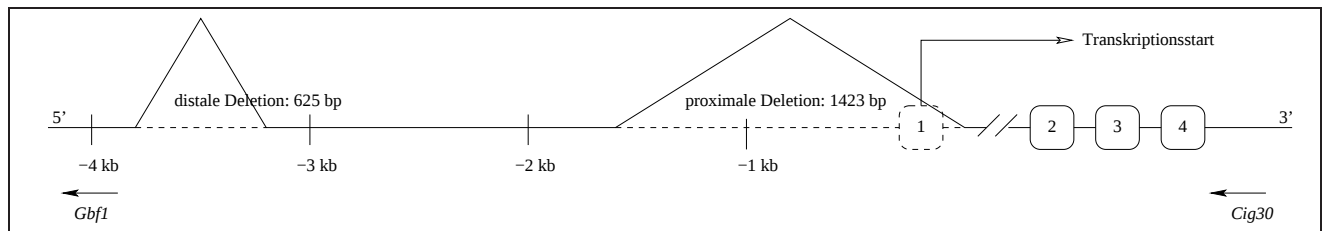


Abbildung 1.6: Das *Pitx3* Gen

Das *Pitx3* Gen (nach [71]) liegt in der unmittelbaren Nachbarschaft zum *Gbfr1* und *Cig30* Gen, die in umgekehrter Orientierung (“antisense”) zum *Pitx3* Gen exprimiert werden. Die kodierenden Regionen von *Gbfr1* und *Cig30* überlappen nicht mit den Exons von *Pitx3*. Dessen Promotor, der hier mit den bei *aphakia* vorhandenen Deletionen dargestellt ist, umfaßt 4,2 kb. Das *Pitx3* Gen selbst umfaßt 12,6 kb und besteht aus vier Exons und drei Introns.

Das *Pitx3* Gen (s. Abbildung 1.6) umfaßt 12,6 kb und besteht aus vier Exons (125, 129, 210 und 927 bp; Exon 1 bis 4), und drei Introns (10729, 196 und 379 bp; Intron 1 bis 3). Zwei andere Gene wurden in der nächsten Nachbarschaft zu *Pitx3* entdeckt. Das *Gbfr1* Gen liegt in der 5' Region von *Pitx3* [78] und das *Cig30* Gen in der 3' Region [85]. Bei beiden Genen überlappen die kodierenden Regionen nicht mit denen von *Pitx3*. Sowohl *Gbfr1* als auch *Cig30* werden in entgegengesetzter Richtung (“antisense”) zu *Pitx3* transkribiert [78, 85]. Ihre Expression wird durch die *aphakia* Deletionen nicht beeinflußt [71].

Als Mutation im *Pitx3* Gen der Maus ist bis jetzt nur *aphakia* bekannt [78]. Beim Mensch wird durch Mutationen im *PITX3* Gen eine Form von ASMD (Anteriore Segmentale Mesenchymale Dysgenie) hervorgerufen [76]. Bei betroffenen Patienten zeigt die Linse eine Vesikelanhäufung in den äußeren Faserzellen zusammen mit einer starken epithelialen Atropie.

1.3 ZIEL DER ARBEIT

Die *aphakia* Maus bietet die Möglichkeit, die durch den Ausfall von *Pitx3* unterbrochene Signalkaskade in der Embryonalentwicklung mit der lückenlosen Kaskade des Wildtyps zu vergleichen. Die Untersuchung des *Pitx3* Promotors ermöglicht die Identifizierung von Genen, die der *Pitx3* Expression vorangeschaltet sind. Durch Genexpressionsanalysen sollen Zielsequenzen, die der *Pitx3* Expression nachgeschaltet sind ausfindig gemacht und durch quantitative und qualitative Methoden überprüft werden. Beide Ansätze sollen Aufschluß über die Einbindung von *Pitx3* in

die Signalkaskade der Embryonalentwicklung geben.

— Kapitel 2 —

ERGEBNISSE

Die nicht stattfindende Expression von *Pitx3* in der *aphakia* Maus führt zu einem Abbruch der Linsenentwicklung. Zwischen diesen beiden Ereignissen klafft eine große Lücke, da nur unzureichend bekannt ist, welche Veränderungen sich auf genomischer Ebene durch den Ausfall des *Pitx3* Proteins ergeben, und welche Auswirkungen dies auf die Augenentwicklung hat. So begann diese Arbeit mit einer umfassenden Genexpressionsanalyse der *aphakia* Maus. Es wurden 10.000 Sequenzen mithilfe von Microarrays in Hinblick auf ihre eventuellen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp analysiert. Die Sequenzen, die eine stärkere oder schwächere Expression in der Mutante zeigten, wurden anschließend näher auf die quantitativen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante (RealTime PCR), auf unterschiedliche Expressionsorte (*in situ* Hybridisierungen) und auf ihre direkte Interaktion mit *Pitx3* (Promotoranalysen) hin untersucht.

2.1 QUALITATIVE GENEXPRESSIONSANALYSE (DNA Microarrays)

Als Untersuchungszeitraum wurden die Embryonalstadien E 9.5 bis E 13.5 gewählt. Innerhalb dieser Zeitspanne spielt sich die eigentliche Linsenentwicklung ab, danach findet die Kristallisierung und das Größenwachstum der Linse statt. Aufgrund der Schwierigkeit, genügend RNA zur Durchführung der DNA-Microarrays zu erhalten, wurden die Gewebe mehrerer Embryonen (gleichen Alters) zur Präparation vereinigt (s. auch Tabelle B.1), was bei der Auswertung berücksichtigt werden mußte. Wie im folgenden noch im Detail gezeigt wird, ergaben sich 37 Kandidatensequenzen, deren unterschiedliche Expressionsstärke in *aphakia* und Wildtyp innerhalb eines 99,9 % Vertrauensintervalls lagen, das Abweichungen gegenüber der mittleren Expressionstärke unveränderter Sequenzen anzeigt. Die Kandidaten wurden anschließend in

Hinblick auf den Zeitpunkt der veränderten Expression und die mögliche Funktion näher betrachtet.

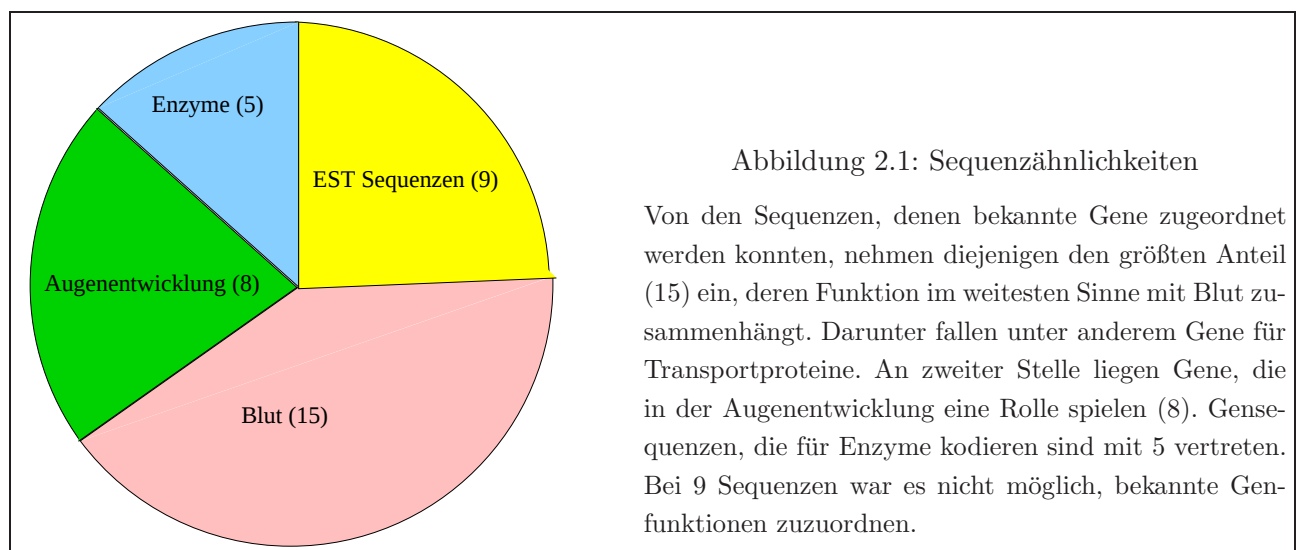
Kriterien für Kandidatensequenzen

Bei den DNA-Microarrays ist die Menge an exprimierter Sequenz direkt proportional zur relativen Lichtintensität, die diese Sequenz nach der Hybridisierung auf einem Microarray-Objektträger zeigt. Bei der Auswertung der Microarrays wurden nur diejenigen Sequenzen in Betracht gezogen, deren relative Lichtintensität sich deutlich vom Mittelwert unterschieden. Die Grenze wurde für die hierbei verwendeten Microarray-Objektträger bei einer relativen Lichtintensität von 5 RLU (relative Lichteinheit) gezogen, da ab dieser Grenze eine Unterscheidung einzelner Spots vom breiten Mittelfeld unveränderter Expressionen möglich war, die mit einer statistischen Sicherheit von 99,9 % signifikant ist (durch Testreihen bestätigt). Damit ergaben sich pro Embryonalstadium eine Anzahl von 36 bis 93 Sequenzen mit veränderter Expression. Das andere Auswahlkriterium berücksichtigt die interne Kontrolle durch den "colour-flip" (Farbkontrolle, s. Seite 100). Dabei werden nur jene Sequenzen für weitere Auswertungen und Experimente herangezogen, deren veränderte Expression sich unabhängig von der Markierung der jeweiligen DNA zeigt. Dieser Schritt reduziert die Kandidaten von insgesamt 149 auf 37.

Funktion der veränderten Sequenzen

Der interessanteste Aspekt lag in den möglichen Funktionen der Sequenzen mit veränderter Expression. Dazu wurden diese durch Datenbankrecherche (s. Seite 90) mit bereits bekannten Gensequenzen verglichen. Die so erhaltenen Informationen über Gennamen und -funktionen wurden in Abbildung 2.1 und Tabelle 2.1 zusammengefaßt.

Die Funktion der meisten Sequenzen (15) hängt im weitesten Sinne mit Blut zusammen, wie der Transport von verschiedenen Stoffen. Darunter fallen mehrere Mitglieder der Apolipoproteingene (MG-3-58h10, MG-8-97i13 und MG-78-2a14), drei Sequenzen (MG-8-37e9, MG-8-35j22 und MG-8-25l10), die alle innerhalb des Gens für das α -Fetoprotein liegen und das Gen für das Retinol-bindende Protein (MG-8-101o4). Zwei Mitglieder der Serin-Protease-Inhibitoren-gene (MG-8-26p14 und MG-8-33p4) sind im weitesten Sinne Komponenten des Blutkreislaufes, ebenso wie das Gen für den intrinsischen Cobalamin-Rezeptor Cubilin (MG12-158p10), ein



Glucagon-ähnlicher Rezeptor (MG-12-133k4).

8 Sequenzen zeigten Homologien zu Genen, die an der Augenentwicklung beteiligt sind. Die Mehrheit innerhalb dieser Gruppe nehmen die Sequenzen MG-60-1c4, MG-60-1p11, MG-60-1e21, MG-13-83e21, MG-8-22h22 und MG-60-1j5 ein, die alle verschiedenen Mitgliedern der Kristallingene zugeordnet werden können. Außerdem konnten der Sequenz MG-14-23o21 das Gen für Aggrecan zugewiesen und die Sequenz MG-3-20k14 innerhalb des Gens für das Aktivierende Protein 2 lokalisiert werden.

5 Sequenzen zeigten Übereinstimmungen mit verschiedenen Enzymen. Es handelt sich hier um eine Ribosomale Protein S6 Kinase (MG-6-15i10), Calpain (MG-16-176k15), ein Phosphoprotein (MG-12-271j8), einen Coagulationsfaktor (MG-8-33e2) und eine Phospholipase (MG-8-24f20).

Bei 9 Sequenzen war eine Zuordnung zu bereits bekannten Genen nicht möglich. Zum Zeitpunkt des letzten Vergleichs mit den Datenbanken von NCBI (21.10.2004) zeigten drei Sequenzen Homologie zu RIKEN Klonen (MG-6-43b23, MG-6-80i12 und MG-3-13p22) und fünf zu RP-23 Klone (Klonbibliothek des Roswell-Park Cancer Institutes) (MG-6-60f22, MG-14-26f22, MG-3-140e13, MG-3-12i14 und MG-3-70n15). Die letzte Sequenz (MG-3-70n15) wurde dem Image-Klon 6773915 zugeordnet. Dem läßt sich nur wenig hinzufügen, da diese ESTs aus Embryonalgewebe kloniert wurden.

Tabelle 2.1: Funktion der veränderten Sequenzen

Gruppe	LION Nr.		Sequenz (Homologie in %)		PubMed Nr.
Blut	MG-3-98o21	<i>Ccl28</i>	Chemokin Ligand 28	(99 %)	NM_020279
	MG-3-58h10	<i>Apoa2</i>	Apolipoprotein A-II	(100 %)	BC031786
	MG-8-97i13	<i>Apoc2</i>	Apolipoprotein C-II	(99 %)	Z15090
	MG-78-2a14	<i>Apoa1</i>	Apolipoprotein A-I	(98 %)	L04149
	MG-8-37e9	<i>Afp</i>	α -Fetoprotein	(99 %)	NM_007423
	MG-8-35j22	<i>Afp</i>	α -Fetoprotein	(100 %)	V00743
	MG-8-25l10	<i>Afp</i>	α -Fetoprotein	(100 %)	V00743
	MG-11-1e9	<i>Ttr</i>	Transthyretin	(99 %)	NM_013697
	MG-8-101o4	<i>Rbp4</i>	Retinol binding protein 4	(99 %)	NM_011255
	MG-12-158p10	<i>Cub</i>	Cubilin	(97 %)	BC026593
	MG-19-1k7	<i>Trf</i>	Transferrin	(94 %)	BC058218
	MG-8-28d11	<i>Spi1-4</i>	Serin Protease Inhibitor 1-4	(98 %)	NM_009246
	MG-8-26p14	<i>Spi1-1</i>	Serin Protease Inhibitor 1-1	(98 %)	NM_009243
	MG-8-72n2	<i>Fgb</i>	Fibrinogen, B β Polypeptid	(96 %)	AK011118
	MG-12-133k4	<i>Glp1r</i>	Glucagon-ähnlicher Rezeptor	(100 %)	Ensembl
Enzyme	MG-6-15i10	<i>Rps6ka4</i>	Ribosomale Protein S6 kinase	(99 %)	NM_019924
	MG-8-24f20	<i>Spla2</i>	Secreted phospholipase A2 XIIB	(99 %)	NM_023530
	MG-16-176k15	<i>Capn3</i>	Calpain	(100 %)	AK049994
	MG-12-271j8	<i>Spp24</i>	Secreted Phosphoprotein 24	(99 %)	NM_029269
	MG-8-33e2	<i>Cf2</i>	Prothrombin	(100 %)	NM_010168
Augenentwicklung	MG-14-23o21	<i>Agc1</i>	Aggrecan 1	(99 %)	NM_007424
	MG-3-20k14	<i>Ap2</i>	Aktivierendes Protein 2	(99 %)	NM_011547
	MG-60-1j5	<i>Cryaa</i>	Kristallin, α A	(96 %)	J00376
	MG-60-1p11	<i>Cryba2</i>	Kristallin, β A2	(99 %)	BC052746
	MG-60-1e21	<i>Cryba3/a1</i>	Kristallin, β A3/A1	(99 %)	J00378
	MG-13-83e21	<i>Cryba4</i>	Kristallin, β A4	(98 %)	BC056444
	MG-8-22h22	<i>Crygb</i>	Kristallin, γ B	(99 %)	NM_144761
	MG-60-1c4	<i>Crygc</i>	Kristallin, γ C	(99 %)	BC056454
EST Sequenzen	MG-14-26f22		RP23-247H18 Chrom. X	(97 %)	BX294196
	MG-6-60f22		RP23-322G17 Chrom. 4	(100 %)	AL732614
	MG-6-43b23		RIKEN cDNA 1810043H04	(96 %)	AK007756
	MG-3-140e13		RP23-411B7 Chrom. 4	(100 %)	AL772334
	MG-3-44a23		RP24-87G15 Chrom. 2	(100 %)	BX649512
	MG-6-80i12		RIKEN cDNA E130007O11	(97 %)	AK087403
	MG-3-13p22		RIKEN cDNA 4930578I06	(95 %)	NM_026359
	MG-3-12i14		RP23-17K9 Chrom.12	(100 %)	AC099934
	MG-3-70n15		Klon 6773915	(96 %)	BC048666

Zeitpunkt der Expressionsänderung

Ein anderer Aspekt der ermittelten Sequenzen ist die Einteilung anhand der verschiedenen Zeitpunkte der veränderten Expression. Wie in Tabelle 2.2 zusammengestellt, zeigen die meisten

Sequenzen zwischen E 10.5 und E 12.5 eine veränderte Expression. Nur zwei Sequenzen zeigen eine veränderte Expression während des gesamten untersuchten Zeitraums, RP23-247H18 (MG-14-26f22) und *Glp1r* (MG-12-133k4). Die Sequenzen, die an vier untersuchten Embryonalstadien (E 10.5 bis E 13.5) auffielen, liegen alle innerhalb des Gens für das α -Fetoprotein (MG-8-37e9, MG-8-35j22 und MG-8-25l10). Nur eine Sequenz, *Rpb4* (MG-8-101o4) zeigte an drei Stadien (E 10.5 bis E 12.5) Veränderungen der Expression.

Bei 15 Sequenzen konnte an zwei Stadien eine Expressionsveränderung festgestellt werden. Dabei handelt es sich unter anderem um *Ccl28* (MG-3-98o21), *Fgb* (MG-8-72n2) und *Spp24* (MG-12-271j8) in den Stadien E 9.5 und E 10.5. An den Tagen E 9.5 und E 13.5 zeigen *Agc1* (MG-14-23021) und drei unbekannte Sequenzen (MG-3-140e13, MG-3-44a23 und MG-6-80i12) veränderte Expression. *Spla2* (MG-8-24f20) und *Cub* (MG-12-158p10) fallen in den Stadien E 10.5 und E 11.5 auf, während eine unbekannte Sequenz (MG-3-13p22) und *Spi1-4* (MG-8-28d11) in den Stadien E 11.5 und E 12.5 Veränderungen zeigen. Die Kristallingene *Cryaa* (MG-60-1j5) und *Crygb* (MG-8-22h22) fallen zusammen mit den unbekannten Sequenzen MG-3-12i14 und MG-3-70n15 in den Stadien E 12.5 und E 13.5 auf.

14 der 37 Sequenzen zeigten an einem einzigen Tag der Embryonalentwicklung eine veränderte Expression. Darunter fallen drei Gene der Apolipoproteinfamilie *Apoa1* (MG-78-2a14), *Apoa2* (MG-3-58h10) und *Apoc2* (MG-8-97i13), die zusammen mit *Ttr* (MG-11-1e9), *Trf* (MG-19-1k7), *Rps6ka4* (MG-6-15i10), und zwei EST Sequenzen (MG-6-60f22 und MG-6-43b23) am Tag E 10.5 auffallen. Im Stadium E 11.5 treten das Gen des Coagulationsfaktors Prothrombin *Cf2* (MG-8-33e2), *Spi1-1* (MG-8-26p14) und *Ap2* (MG-3-20k14) in Erscheinung. Die Kristallingene *Cryba2* (MG-60-1p11), *Cryba3/a1* (MG-60-1e21), *Cryba4* (MG-13-83e21) und *Crygc* (MG-60-1c4) zeigen zusammen mit *Capn3* (MG-16-176k15) am Tag E 13.5 eine veränderte Expression.

Art der Expressionsveränderung

Als nächstes wurden die Sequenzen nach der Art ihrer Expressionsveränderung eingeteilt. Alle Ergebnisse wurden relativ zur *aphakia* Maus bewertet, das heißt alle Sequenzen, die in der Mutante eine erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp zeigen, sind positiv dargestellt, während diejenigen mit einer erniedrigten Expression ein negatives Vorzeichen tragen. Da es sich hier um einzelne Meßwerte handelt, kann hier nicht mit statistischen Fehlerbalken gearbeitet werden.

Tabelle 2.2: Zeitpunkt der Expressionsveränderung

E 9.5 ^a	E 10.5 ^a	E 11.5 ^b	E 12.5 ^b	E 13.5 ^c
<i>Agc1</i>				<i>Agc1</i>
EST (MG-3-140e13)				EST (MG-3-140e13)
EST (MG-3-44a23)				EST (MG-3-44a23)
EST (MG-6-80i12)				EST (MG-6-80i12)
<i>Ccl28</i>				
<i>Fgb</i>				
<i>Spp24</i>				
	<i>Ttr</i>			
	<i>Apoa2</i>			
	<i>Apoc2</i>			
	<i>Apoa1</i>			
	<i>Trf</i>			
	<i>Rps6ka4</i>			
	EST (MG-6-60f22)			
	EST (MG-6-43b23)			
	<i>Spla2</i>			
	<i>Cub</i>			
	<i>Rbp4</i>			
	<i>Afp</i> (MG-8-37e9)			
	<i>Afp</i> (MG-8-35j22)			
	<i>Afp</i> (MG-8-25l10)			
	<i>Cf2</i>			
	<i>Spi1-1</i>			
	<i>Ap2</i>			
	<i>Spi1-4</i>			
	EST (MG-3-13p22)			
			<i>Crygb</i>	
			<i>Cryaa</i>	
			EST (MG-3-12i14)	
			EST (MG-3-70n15)	
			<i>Crygc</i>	
			<i>Cryba2</i>	
			<i>Cryba3/a1</i>	
			<i>Capn3</i>	
			<i>Cryba4</i>	
	<i>Glp1r</i>			
	EST (MG-14-26f22)			

RNA Präparation aus folgenden Geweben: ^aganzer Embryo, ^bKopf, ^cAuge;

Die Farben beziehen sich auf Tabelle 2.1

Die Stärke der relativen Expression wird nur tendenziell bewertet und in dieser Hinsicht sind die Daten repräsentativ. Die eigentlich quantitative Expressionsveränderung wird später durch RealTime PCR genauer untersucht.

Die Tabelle 2.2 zeigt einen Überblick über die Verteilung der Expressionsveränderungen. Bis auf die Stadien E 9.5 und E 13.5 liegt das Verhältnis von gesteigerter zu erniedrigter Expression in *aphakia* bei ca. 50%.

Für eine genauere Darstellung wurden die Sequenzen nach Anzahl der Stadien, an denen sie Veränderungen zeigen, in den nun folgenden Abbildungen zusammengefaßt.

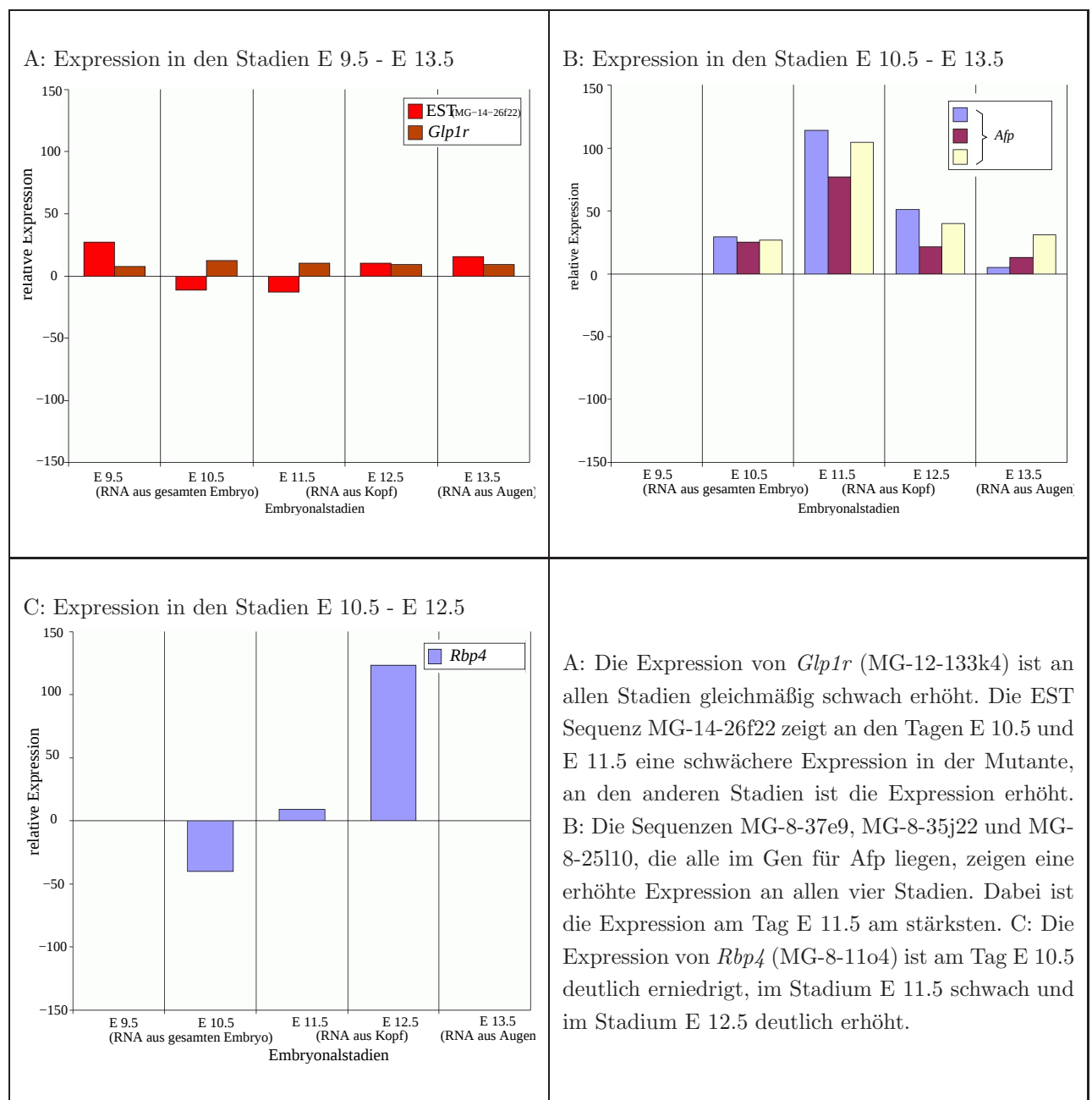
	erhöht		erniedrigt	
E 9.5	7	(78 %)	2	(22 %)
E 10.5	11	(58 %)	8	(42 %)
E 11.5	7	(54 %)	6	(46 %)
E 12.5	6	(50 %)	6	(50 %)
E 13.5	11	(61 %)	7	(39 %)

Tabelle 2.3: Expressionsveränderungen

In Abbildung 2.2 A werden die Sequenzen gezeigt, die in allen untersuchten Embryonalstadien veränderte Expressionen zeigten. Es handelt sich hierbei um *Glp1r* (MG-12-133k4) und die EST Sequenz MG-14-26f22. Dabei konnte bei *Glp1r* eine gleichbleibend schwache Erhöhung der Expression in *aphakia* an allen Stadien festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde der EST (MG-14-26f22) im Stadium E 9.5 in *aphakia* stärker exprimiert, in den Stadien E 10.5 und E 11.5 geht die Expression zurück, bis sie schwächer ist als im Wildtyp. An den Tagen E 12.5 und E 13.5 ist der EST wieder stärker in der Mutante exprimiert. Dabei ist die Expression sowohl in die eine als auch in die andere Richtung gleichmäßig schwach verändert.

In vier der fünf untersuchten Stadien, E 10.5 bis E 13.5 zeigen die drei Sequenzen MG-8-37e9, MG-8-35j22 und MG-8-25l10 eine Veränderung in ihrer Expression. Alle drei Sequenzen liegen im Gen *Afp*, was dadurch bestätigt wird, daß ihre ermittelten Expressionsänderungen die gleiche Tendenz zeigen. Die Abbildung 2.2 B zeigt die Expressionsveränderungen des *Afp* Gens. Einer schwachen Expressionserhöhung in *aphakia* im Stadium E 10.5 folgt eine deutlich stärkere Erhöhung im Stadium E 11.5. Am Tag E 12.5 geht die verstärkte Expression wieder zurück und am Tag E 13.5 ist die Erhöhung gegenüber dem Wildtyp nur noch schwach.

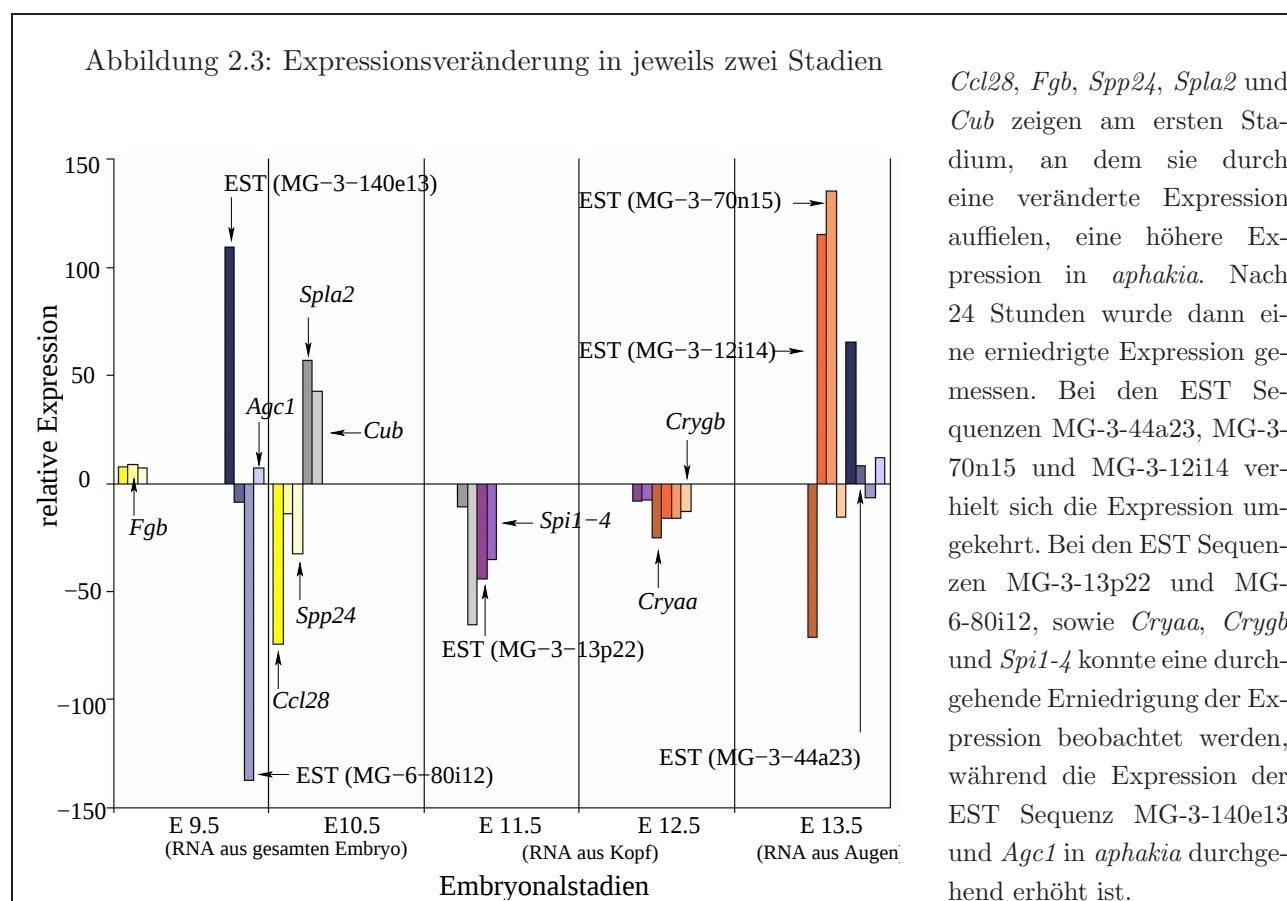
Die Abbildung 2.2 C zeigt die Veränderungen der Expression von *Rbp4* (MG-8-101o4), der einzigen Sequenz, die in drei der fünf untersuchten Stadien, E 10.5 bis E 13.5, auffiel. Die Expressionsunterschiede beginnen am Tag E 10.5 mit einer niedrigeren Expression in *aphakia*. 24 Stunden später ist die Expression dagegen stärker in der Mutante, was sich im Stadium E 12.5

Abbildung 2.2: Expressionsveränderungen von *Glplr*, EST (MG-14-26f22), *Afp* und *Rbp4*

fortgesetzt. Am Tag E 13.5 sind keinerlei Veränderungen mehr zu beobachten. Die Expression wird von einer deutlichen Erniedrigung über eine schwache Erhöhung zu einer deutlichen Erhöhung in *aphakia* immer stärker.

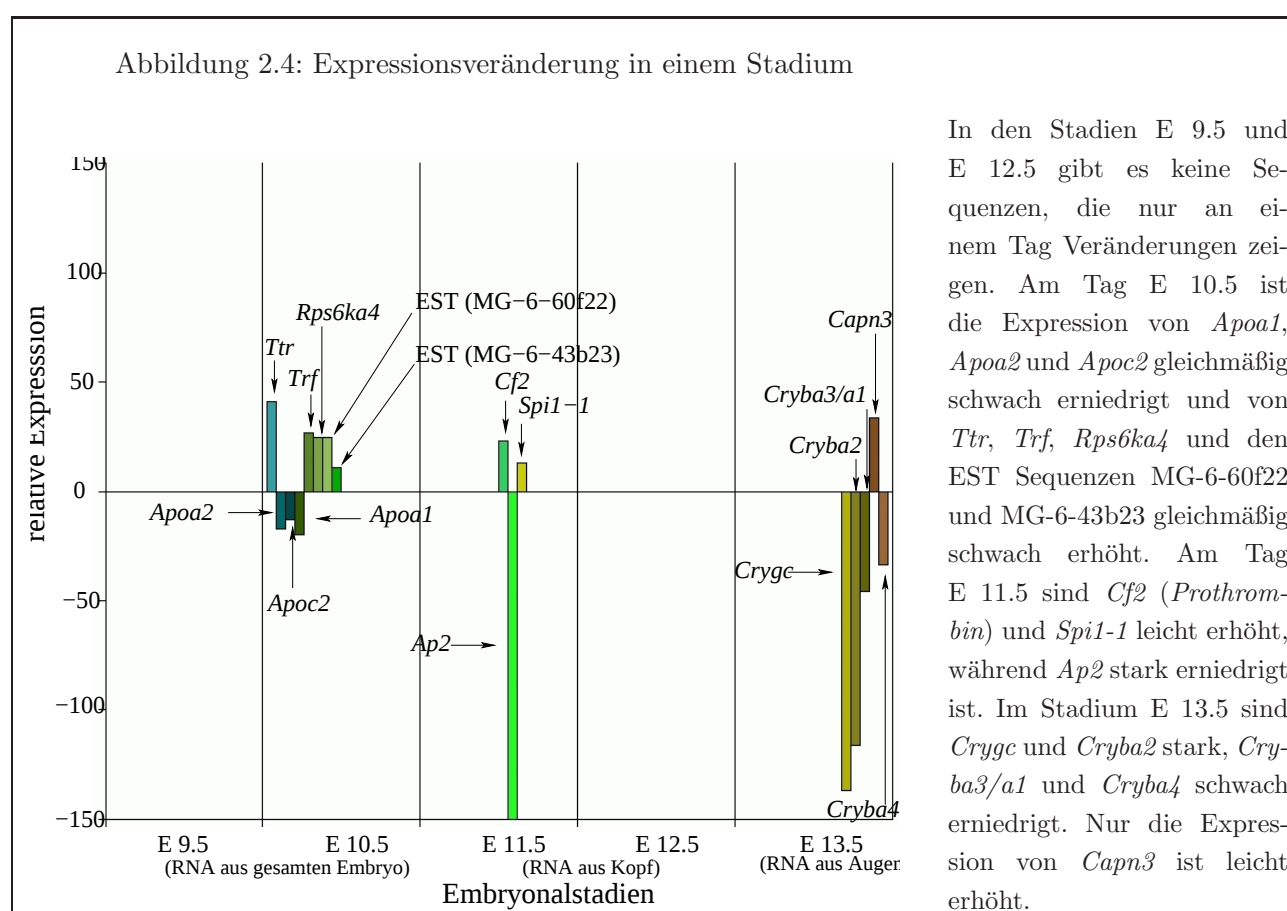
In Abbildung 2.3 wurden alle Sequenzen zusammengefaßt, die an zwei Embryonalstadien eine veränderte Expression zeigen. So sind bei *Ccl28* (MG-3-98o21), *Fgb* (MG-8-72n2) und *Spp24* (MG-12-271j8) in den Stadien E 9.5 und E 10.5 Veränderungen in *aphakia* zu beobachten. Bei

allen drei Genen trat am Tag E 9.5 eine schwache Erhöhung der Expression auf, während im Stadium E 10.5 eine Erniedrigung gemessen wurde. Diese fiel bei *Ccl28* sehr deutlich aus, bei *Fgb* und *Spp24* geringer. Beim EST (MG-3-140e13) und *Agc1* (MG-14-23o21) ist in den beiden Stadien E 9.5 und E 13.5 die Expression in der Mutante erhöht. Dabei zeigt der EST immer eine deutlichere Erhöhung als *Agc1*.



An denselben Stadien zeigen auch die EST Sequenzen MG-3-44a23 und MG-6-80i12 Veränderungen. Bei MG-6-80i12 ist die Expression an beiden Stadien erniedrigt, wobei die Erniedrigung am Tag E 9.5 sehr viel deutlicher ist als im Stadium E 13.5. Bei MG-3-44a23 konnte eine jeweils schwache Veränderung beobachtet werden, die im Stadium E 9.5 erniedrigt und am Tag E 13.5 erhöht ist. In den Stadien E 10.5 und E 11.5 fielen zwei Gene auf, *Spla2* (MG-8-24f20) und *Cub* (MG-12-158p10). Beide zeigen eine deutliche stärkere Expression im Stadium E 10.5 in der Mutante. Nach 24 Stunden fällt die Expression jedoch ab und ist dann nur noch leicht erniedrigt bei *Spla2*, beziehungsweise stärker erniedrigt bei *Cub*. Eine EST Sequenz (MG-3-13p22) und

Spi1-4 (MG-8-28d11) zeigen eine erniedrigte Expression in den Stadien E 11.5 und E 12.5, wobei die Erniedrigung im Stadium E 11.5 deutlicher ist als am Tag E 12.5. *Crygb* (MG-8-22h22), *Cryaa* (MG-60-1j5) und die EST Sequenzen MG-3-12i14 und MG-3-70n15 zeigen alle an den Tagen E 12.5 und E 13.5 Veränderungen. Bei letzteren ist die Expression an E 12.5 schwach erniedrigt, jedoch im Stadium E 13.5 stark erhöht. Bei *Crygb* und *Cryaa* ist die Expression in beiden Stadien erniedrigt. Dabei zeigt ersteres Gen nur eine schwache Erniedrigung, während die *Cryaa* Expression im Stadium E 12.5 nur leicht, aber im Stadium E 13.5 deutlich niedriger ist.



In der Abbildung 2.4 sind nun die restlichen Sequenzen zusammengefaßt, die nur in jeweils einem Embryonalstadium auffielen. Dabei ist erwähnenswert, daß in den Stadien E 9.5 und E 12.5 keine Kandidaten nur an diesen Stadien Veränderungen zeigten. Im Stadium E 10.5 wurden bei acht Sequenzen Veränderungen der Expression beobachtet. Alle liegen etwa in derselben Größenordnung, wobei die EST Sequenz MG-6-43b23 am geringsten verändert ist und *Ttr*

(MG-11-1e9) am stärksten. Die Expression von *Apoa2* (MG-3-58h10), *Apoc2* (MG-8-97i13) und *Apoa1* (MG-78-2a14) ist in *aphakia* erniedrigt, während *Ttr*, *Trf* (MG-19-1k7), *Rps6ka4* (MG-6-15i10) und die EST Sequenzen MG-6-60f22 und MG-6-43b23 eine erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp zeigen. 24 Stunden später, am Tag E 11.5 zeigten nur drei Gene eine veränderte Expression. Bei *Cf2* (*Prothrombin*) (MG-8-33e2) und *Spi1-1* (MG-8-26p14) konnte eine leichte Expressionserhöhung in der Mutante beobachtet werden. Die auffallendste Veränderung zeigte *Ap2* (MG-3-20k14), dessen Expression in der Mutante stark erniedrigt ist. Im Stadium E 13.5 werden vier der fünf Gene in *aphakia* geringer exprimiert. Davon sind *Crygc* (MG-60-1c4) und *Cryba2* (MG-60-1p11) stark erniedrigt, *Cryba3/a1* (MG-60-1e21) und *Cryba4* (MG-13-83e21) nur schwach. Als einziges Gen zeigt *Capn3* (MG-16-176k15) eine leichte Erhöhung gegenüber dem Wildtyp.

2.2 QUANTITATIVE GENEXPRESSIONSANALYSE (RealTime PCR)

Zur quantitativen Bestätigung der in den Microarrays beobachteten Tendenzen wurden ausgewählte Sequenzen mittels RealTime PCR überprüft. Die Auswahl richtete sich in erster Linie nach der Funktion und dann nach dem Zeitpunkt der Expressionsänderung. So wurden Primer für *Ap2α* und *Agc1* erstellt, da die beiden Gene an der Augenentwicklung beteiligt sind: Die Klonsequenz MG-3-20k14 läßt sich der konservierten DNA-Bindungsdomäne der Ap2 Genfamilie zuordnen. Zur näheren Untersuchung wurde das Familienmitglied *Ap2α* ausgewählt, da nur dieses von den vier bekannten Mitgliedern an der Augenentwicklung (vor allem die der Linse) [93, 94] beteiligt ist. Das Proteoglycan *Agc1* wird in der Retina und dem Sehnerv exprimiert und spielt eine Rolle in der neuronalen Zelladhäsion [69]. Die Kristallingene wurden bei keiner weiteren Untersuchung beachtet, da ihre fehlende Expression in *aphakia* bereits früher experimentell nachgewiesen wurde [26]. Aus der großen Gruppe der Gene, die im weitesten Sinne mit Blut zu tun haben, wurde *Apoa2* (MG-3-58h10) willkürlich als Stellvertreter für die anderen Mitglieder dieser Genfamilie ausgesucht. Für die Sequenzen MG-8-37e9, MG-8-35j22 und MG-8-25l10 wurde eine konservierte Domäne aus dem *Afp* Gen als Primervorlage bestimmt. Außerdem wurden aus dieser Gruppe noch *Trf* (MG-19-1k7), *Fgb* (MG-8-72n2), *Ccl28* (MG-3-98o21), *Glp1r* (MG-12-133k4) und *Rbp4* (MG-8-101o4) ausgesucht. Die Gruppe der Enzyme

vertreten *Spla2* (MG-8-24f20), *Capn3* (MG-16-176k15) und *Spp24* (MG-12-271j8). Die Sequenz MG-3-44a23 wurde stellvertretend für den Anteil der ESTs ausgewählt, denen noch keine bekannte Genfunktion zugeordnet werden konnte.

Damit die so erhaltenen Ergebnisse vergleichbar mit denen der DNA Microarrays waren, wurde dieselbe RNA, die schon bei den Microarrays als Ausgangsmaterial diente, zum Umschreiben in die Template-DNA für die RealTime PCR benutzt. Die Primer, die in Tabelle A.7 aufgelistet sind, wurden nach den LION Klonsequenzen gewählt. In manchen Fällen konnten damit allerdings keine eindeutigen Fragmente amplifiziert werden, so daß hier neue Primer nach denjenigen Gensequenzen gewählt wurden, die bei der Datenbankrecherche die größte Ähnlichkeit mit den Klonsequenzen zeigten (s. Tabelle 2.1).

Die Tabelle 2.4 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus DNA Microarrays und der RealTime PCR. Wie in Kapitel B.4.2 beschrieben, so zeigen die Zahlen im Bereich von 0 bis 0,7 eine verringerte Expression in *aphakia* an. Die Zahlen größer als 1,3 stehen für eine erhöhte Expression in der Mutante. Im Intervall von 0,8 und 1,2 konnte keine signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zwischen Wildtyp und *aphakia* beobachtet werden.

Bei *Ap2 α* und *Agc1* bestätigten sich die in den DNA Microarrays gezeigten Tendenzen. Bei *Ap2 α* ergab die RealTime PCR eine ebenso niedrige Expression im Stadium E 11.5, die der Tendenz der Microarrays folgt. Allerdings zeigt sich am Tag E 12.5 ebenfalls eine Erniedrigung, die in den vorherigen Expressionsanalysen nicht beobachtet wurde.

Bei fünf Genen, die am Bluttransport beteiligt sind, konnten die Ergebnisse der Microarrays quantitativ bestätigt werden. Dabei handelt es sich um die drei Sequenzen MG-8-37e9, MG-8-35j22 und MG-8-25l10, die für das Gen *Afp* stehen, sowie um *Rbp4*, *Tfr*, *Ccl28* und *Glp1r*. Bei *Apoa2* konnte zwar die erhöhte Expression im Stadium E 10.5 ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings trat hier auch eine niedrigere Expression im Stadium E 9.5 und eine höhere Expression im Stadium E 12.5 auf, die in den Microarrays nicht aufgefallen war. Bei *Fbg* stimmt nur die erniedrigte Expression am Tag E 10.5 bei beiden Methoden überein. Die erhöhte Expression im Stadium E 9.5 konnte durch die RealTime PCR nicht bestätigt werden, andererseits zeigte sich hier eine leichte Expressionserniedrigung im Stadium E 11.5, die bei den Microarrays nicht beobachtet wurde.

Bei den Genen, die für Enzyme kodieren, zeigte sich bei *Spla2*, *Spp24* und *Capn3* nur teilweise

Tabelle 2.4: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus DNA Microarrays und RealTime PCR

LION Klon	Gen	E 9.5		E 10.5		E 11.5		E 12.5		E 13.5	
		RT	MA	RT	MA	RT	MA	RT	MA	RT	MA
MG-3-20k14 ^a	<i>Ap2α</i>	0,9	1,0	1,1	1,0	0,1	0,1	0,6	1,0	0,8	1,0
MG-14-23o21 ^a	<i>Agc1</i>	1,6	12	1,0	1,0	0,7	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0
MG-3-98o21	<i>Ccl28</i>	1,5	7,5	0,3	0,1	1,1	1,0	1,1	1,0	0,9	1,0
MG-8-101o4	<i>Rbp4</i>	0,8	1,0	0,2	0,1	3,6	9,1	2,3	155	0,8	1,0
MG-8-72n2	<i>Fbg</i>	1,1	8,8	0,3	0,1	0,8	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0
MG-19-1k7	<i>Tfr</i>	1,0	1,0	1,3	27	0,8	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0
MG-3-58h10 ^a	<i>Apoa2</i>	0,5	1,0	2,0	38	2,8	1,0	1,1	1,0	0,8	1,0
MG-8-37e9 ^a	<i>Afp</i>	0,7	1,0	1,5	29	1,8	114	2,0	51	0,7	1,0
MG-8-35j22 ^a	<i>Afp</i>	0,7	1,0	1,5	25	1,8	77	2,0	21	0,7	1,0
MG-8-25l10 ^a	<i>Afp</i>	0,7	1,0	1,5	27	1,8	104	2,0	39	0,7	1,0
MG-8-24f20	<i>Spla2</i>	3,5	1,0	3,8	57	0,4	0,1	4,6	1,0	0,9	1,0
MG-16-176k15	<i>Capn3</i>	1,7	1,0	7,8	1,0	8,8	1,0	9,5	1,0	15	32
MG-12-271j8	<i>Ssp24</i>	1,3	7,3	0,2	0,1	0,9	1,0	1,4	5,5	1,0	1,0
MG-12-133k4	<i>Glp1r</i>	1,7	7,8	7,6	12	1,8	10	2,5	9,2	1,6	9,5
MG-3-44a23	EST	0,6	0,1	0,8	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,2	8,5

RT: Ergebnisse der RealTime PCR

MA: Ergebnisse der DNA Microarrays

Farbkode: erhöhte Expression in *aphakia*, erniedrigte Expression in *aphakia*,
keine Veränderung der Expression, unterschiedliche Ergebnisse RT/MA

^aIn diesen Fällen wurden die Primer nicht nach LION Klonen, sondern nach Gensequenzen gewählt.

Übereinstimmung bei den Ergebnissen. Die Expressionsveränderungen dieser Gene, die sich aus den Microarrays ergaben, wurden zwar bestätigt, zusätzlich ergab die RealTime PCR aber noch andere Veränderungen, die vorher nicht aufgefallen waren.

Die erniedrigte Expression der EST Sequenz MG-3-44a23 im Stadium E 9.5 konnte durch die RealTime PCR bestätigt werden, nicht jedoch die erhöhte Expression im Stadium E 13.5.

Zusammenfassend konnte die veränderte Expression folgender Gene in *aphakia* gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden: *Glp1r*, *Afp*, *Tfr*, *Ccl28*, *Rbp4*, *Agc1*, *Ap2α* und der EST Sequenz MG-3-44a23.

2.3 ANALYSE VON EXPRESSIONSMUSTERN

Zur näheren Untersuchung des Ortes der räumlichen Expressionsmuster wurden Sonden für konservierte Bereiche der Gene *Rbp4* und *Ap2α* erstellt. *Rbp4* ist durch seine Beteiligung am

Vitamin A Metabolismus essentiell für die pränatale Retinaentwicklung und für die Erhaltung der Normalsicht nach der Geburt [70]. Zu diesem Zweck interagiert *Rbp4* unter anderem mit Transthyretin [103], dessen Gen *Ttr* ebenfalls eine veränderte Expression in *aphakia* zeigt. Bei *Ap2α* wurde bereits auf dessen Beteiligung an der Linsenentwicklung hingewiesen [93, 94].

2.3.1 *Rbp4* (MG-8-101o4)

Die Abbildung 2.5 zeigt die Expressionsmuster des *Rbp4* Gens auf ganzen Embryonen der Stadien E 9.5 und E 10.5.

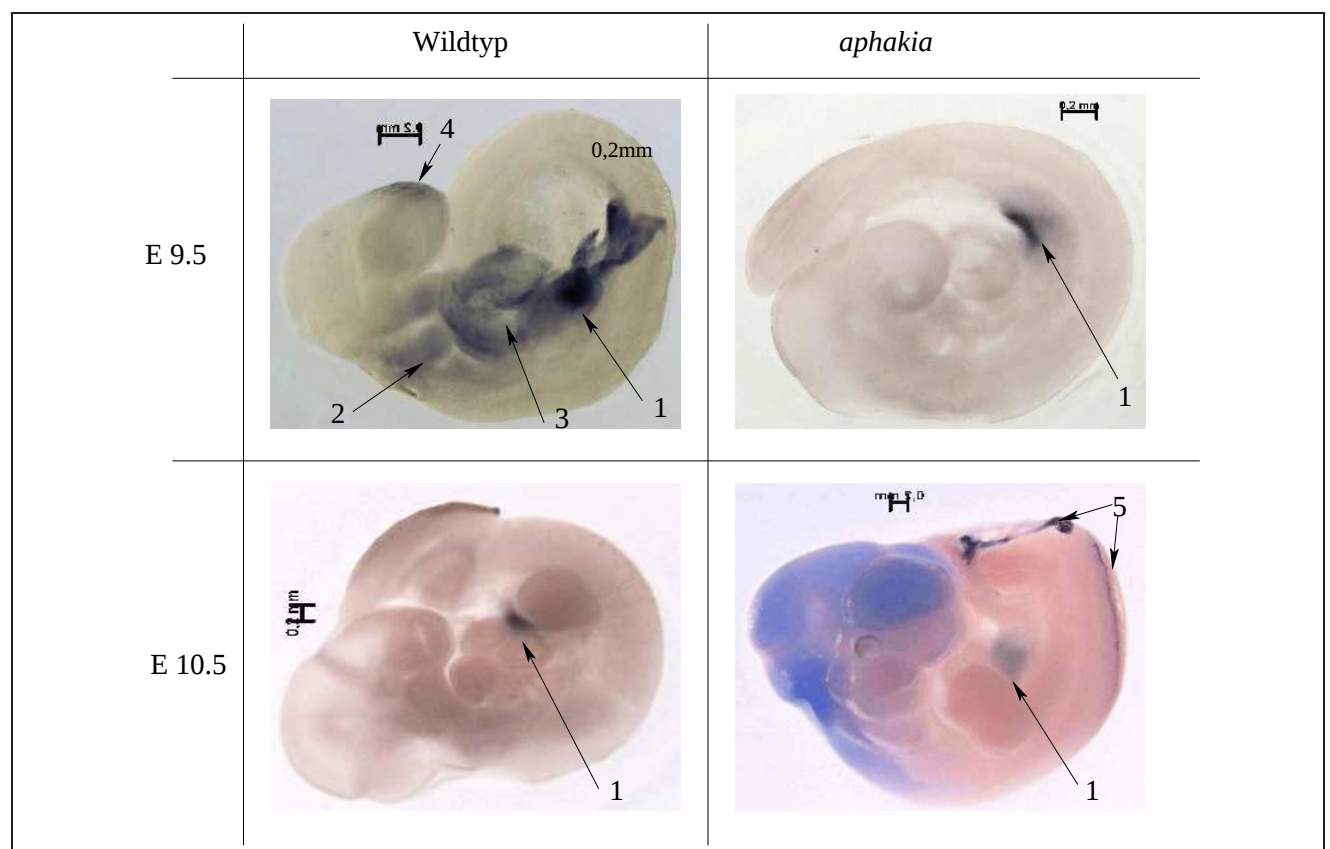


Abbildung 2.5: *Rbp4* Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5

Der Wildtyp zeigt am Tag E 9.5 Färbungen in Bereich des Vorderhirns (4), der beiden Kiemenbögen (2), des Herzbeutels (3) und des Nabelbereichs (1). Im Vergleich dazu ist in *ak* nur im Nabelbereich eine Färbung zu beobachten. Am Tag E 10.5 zeigt die Mutante eine unspezifische Blaufärbung des gesamten Kopfes (siehe Text). Eine spezifische Färbung und Expression liegt dagegen im Nabel- (1) und im Schwanzbereich (5) vor, wobei letztere auf Überreste der Plazenta zurückzuführen sind. Der Wildtyp weist nur eine Färbung im Nabelbereich (1) auf. Die anderen, im Stadium E 9.5 noch gefärbten Segmente sind farblos.

Am Tag E 9.5 zeigt der Wildtyp eine deutliche Färbung im Bereich des Vorderhirns, der beiden

Kiemenbögen, des Herzbeutels und des Nabelbereichs. Im Vergleich dazu ist die Mutante nur schwach gefärbt und nur im Bereich des Nabels. In den anderen Bereichen ist keine Färbung und damit keine Expression vorhanden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der RealTime PCR überein, bei der im Stadium E 9.5 eine deutlich reduzierte Expression in *aphakia* beobachtet wurde. Im Stadium E 10.5 zeigt der Wildtyp nur noch eine Färbung im Bereich des Nabels. Die anderen Bereiche, die am vorherigen Stadium noch auffielen, sind farblos. Bei der Mutante fällt zunächst die Blaufärbung des gesamten Kopfes auf, die jedoch verschwindet, wenn der Bereich mit einer Nadel geöffnet und gespült wird. Somit deutet die Färbung nicht auf eine Expression hin, sondern wird durch Anlagerung des Farbstoffes an Embryoregionen hervorgerufen, die während der Hybridisierung nicht genügend gewaschen werden konnten. Eine tatsächliche Färbung zeigt sich erneut im Nabelbereich, allerdings recht schwach gegenüber dem Wildtyp. Bei der im Bereich der Wirbelsäule und des Schwanzbereichs zu erkennende Färbung handelt es sich um Plazentagewebe, in dem *Rbp4* ebenfalls exprimiert ist. Der *aphakia* Embryo zeigt damit eine geringfügig schwächere Expression der MG-8-101o4 Sonde und entspricht so den Ergebnissen der RealTime PCR und der Microarrays, in denen eine reduzierte Expression in der Mutante auftrat. An den folgenden Stadien trat eine Färbung, die *Rbp4* Expression anzeigt, nur im Bereich der Leber auf.

In Abbildung 2.6 sind die Ausschnitte der ISH aus dem Augenbereich zusammengefaßt. Wie bereits bei den ISH auf ganzen Embryos, so konnte in keinem Stadium eine Färbung beobachtet werden. Die blauen Flecken am Tag E 11.5 bei *aphakia* sind auf Hintergrundfärbung zurückzuführen. Diese trat auf, da die Schnitte ungewöhnlich lang mit der Färbelösung inkubiert wurden, um eventuell schwache Färbungen zu erkennen. Dabei besteht das Problem, daß die Färbelösung anzutrocknen beginnt, was zu Flecken führt. Der Unterschied zu einer echten Färbung besteht in der unregelmäßigen Anordnung der gefärbten Bereiche, die sich von Schnitt zu Schnitt unterscheiden, aber auch in der Kontrolle zu sehen sind. Hier sollte keinerlei Färbung auftreten, da hier mit der in “antisense” Richtung transkribierten Sonde hybridisiert wurde.

Die *Rbp4* Expression ist nur am Tag E 9.5 im Kopfbereich, den Kiemenbögen, im Herzbeutel und Nabel zu sehen ist. Die an diesem Stadium nur im Wildtyp vorhandene Expression geht an den folgenden Stadien auf den Bereich der Leber zurück. Ein Unterschied zwischen *aphakia* und Wildtyp ist in den Stadien E 10.5 bis E 13.5 nicht mehr zu sehen.

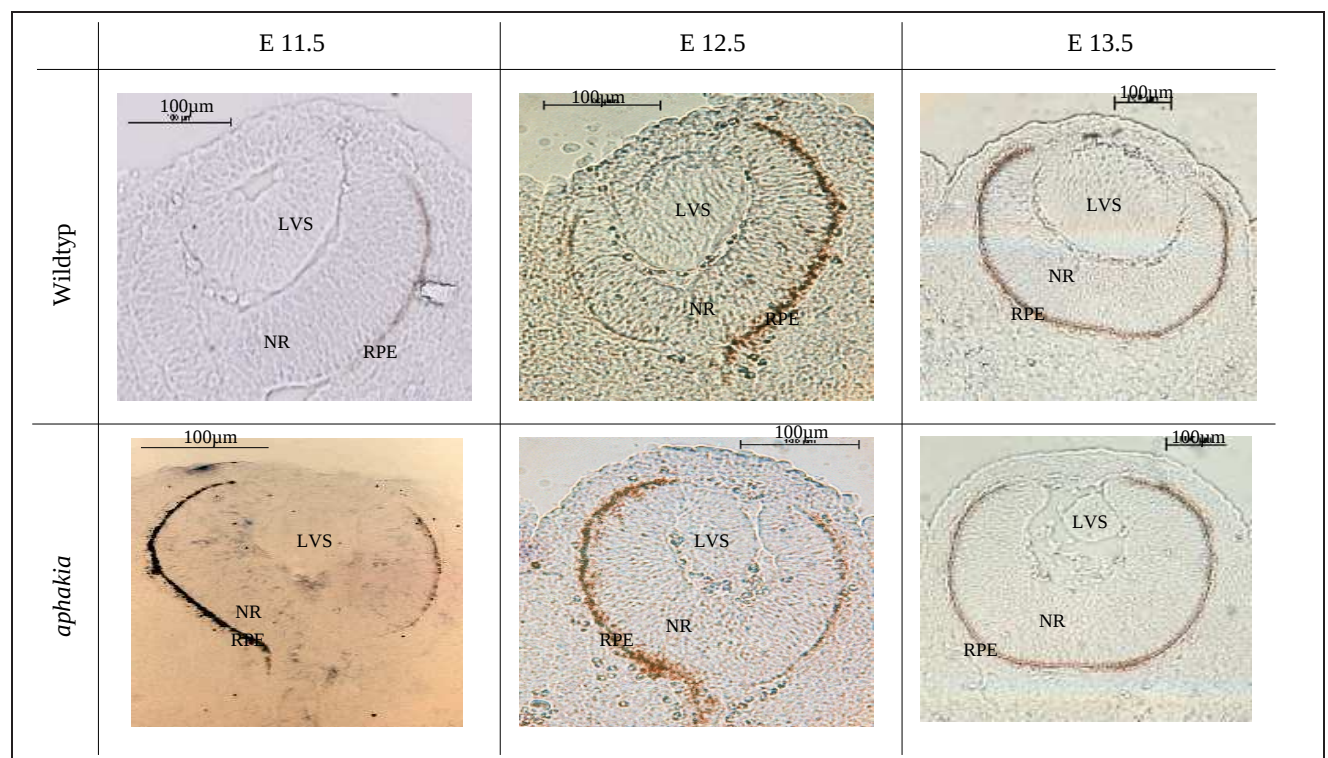


Abbildung 2.6: *Rbp4* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)

An allen Stadien ist keine Färbung im Augenbereich zu sehen. Die blauen Flecken bei *ak* am Tag E 11.5 sind auf Hintergrundfärbung zurückzuführen. *Rbp4* wird an diesen Stadien nicht im Auge exprimiert. LVS: Linsenvesikel; NR: Neuroretina; RPE: Pigmentepithelium der Retina;

2.3.2 *Ap2α* (MG-3-20k14)

Die Abbildung 2.7 zeigt das *Ap2α* Expressionsmuster in ganzen Embryonen der Stadien E 9.5 und E 10.5. Am Tag E 9.5 ist der *aphakia* Embryo im Bereich der beiden Kiemenbögen und des sich entwickelnden Auges stärker gefärbt als der Wildtyp. Dieser weist ebenfalls eine Färbung in den Kiemenbögen auf, die aber auf einen kleineren Bereich beschränkt ist. Im Augenbläschen konnte keine Expression beobachtet werden. Die stärkere Expression in der Mutante entsprach nicht den Erwartungen, da weder Microarrays noch RealTime PCR eine Expressionsänderung an diesem Stadium zeigten. Da in diesem Stadium die RNA für die beiden Experimente aus dem gesamten Embryo gewonnen wurde, konnte der Unterschied unter Umständen nicht angezeigt werden, da zuviel Gewebe an der Präparation beteiligt war, das kein *Ap2α* exprimierte. Am Tag E 10.5 zeigen beide Embryonen die gleiche Hintergrundfärbung im gesamten Kopfbereich, die bereits bei der *Rbp4* Sonde aufgefallen ist. Wie dort verschwand die blaue Farbe, nachdem der Hinterkopf mit einer Nadel angestochen und gespült wurde. Somit handelt es sich

hier um eine unspezifische Färbung, die aus denselben Gründen wie bei *Rbp4* auftritt. Zurück blieben bei beiden Embryonen deutliche Färbungen der *Ap2α* Sonde im Bereich des sich entwickelnden Telencephalons und des Linsenvesikels. Außerdem zeigte sich bei beiden Embryonen Färbungen der Somiten und den sich entwickelnden vorderen und hinteren Gliedmaßen. Der einzige Unterschied besteht in einer Färbung des Mittelhirns, die nur bei *aphakia* auftrat. Diese in der Mutante nur geringfügig stärkere Expression fiel weder bei den Microarrays noch der RealTime PCR auf, da bei der Präparation von RNA aus ganzen Embryonen der Unterschied zwischen der Menge an *Ap2α* in Wildtyp und Mutante zu gering war.

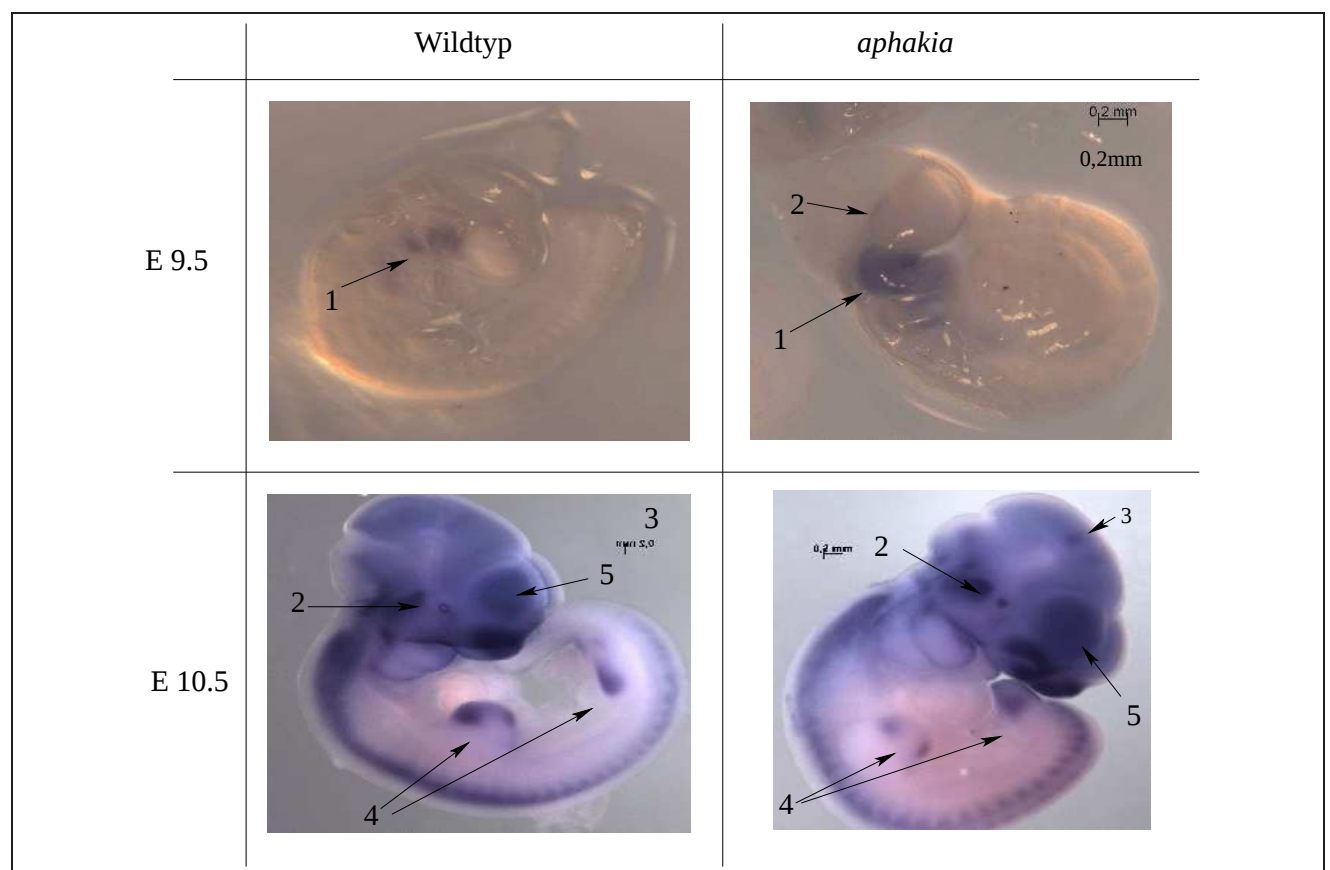


Abbildung 2.7: *Ap2α* Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5

Am Tag E 9.5 zeigt *aphakia* eine deutliche Färbung in den beiden Kiemenbögen (1), die im Wildtyp nur im kleineren Umfang auftritt. Die Färbung des Augenbläschens (2) ist nur in der Mutante und hier auch nur schwach vorhanden. Am Tag E 10.5 zeigen beide Embryonen eine starke, jedoch unspezifische Hintergrundfärbung im Kopfbereich (siehe Text). Spezifische Färbungen bleiben im Bereich des sich entwickelnden Telencephalons (5), des Linsenvesikels (2), der sich entwickelnden Gliedmassen (4) und der Somiten im Bereich der Wirbelsäule. Diese Expressionsbereiche sind in beiden Embryonen vorhanden, im Gegensatz zur Expression im Bereich des Mittelhirns (3), der nur bei der Mutante auftritt.

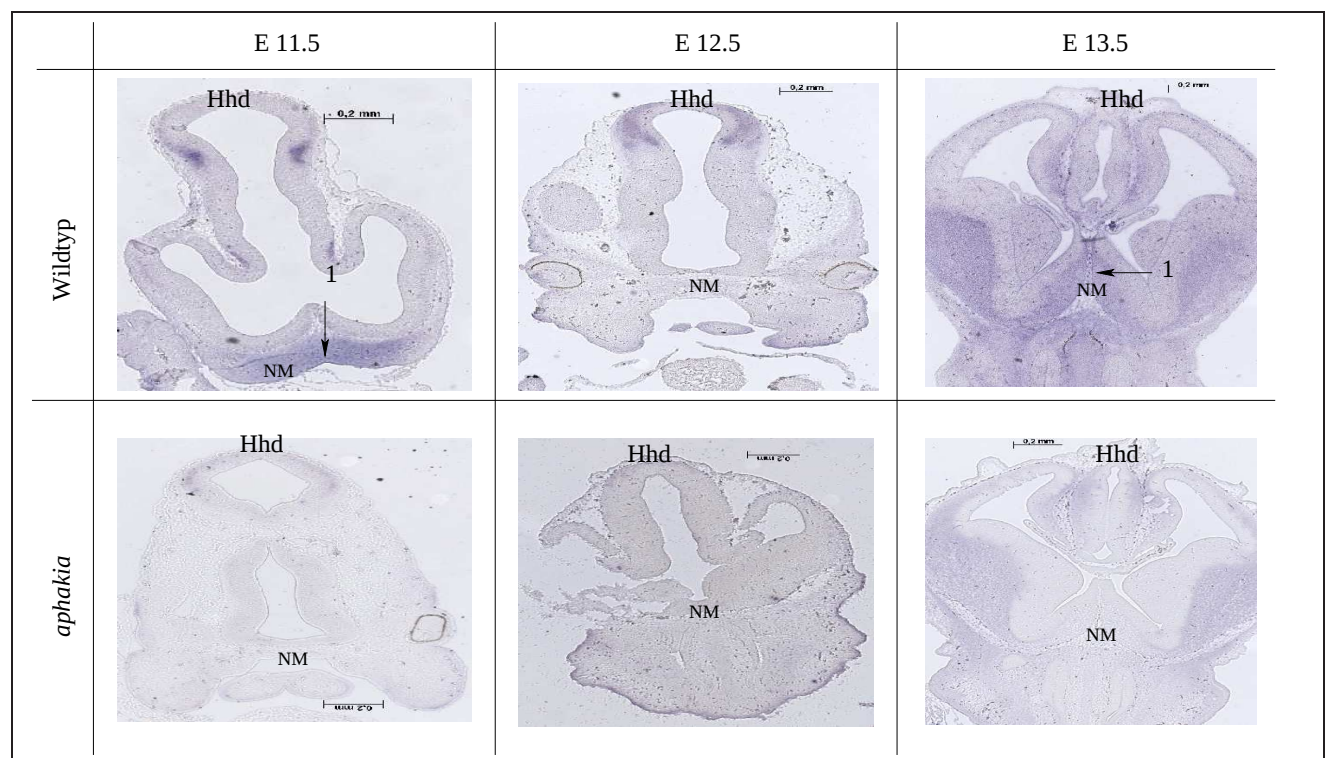


Abbildung 2.8: *Ap2α* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Mittelhirn)

Im Wildtyp ist die *Ap2α* Expression in den Stadien E 11.5 und E 13.5 deutlich im Bereich des Mittelhirns (1) zu sehen, in dem später dopaminerge Neuronen gebildet werden, die zur motorischen Steuerung der Muskeln notwendig sind. Am Tag E 12.5 kann keine *Ap2α* Expression nachgewiesen werden, genau wie in *aphakia*, bei der in keinem Stadium eine Expression in dieser Region zu beobachten ist.

Hhd: Hinterhirndach; NM: Neuronenfeld des Mittelhirns;

Im Mittelhirn (Abbildung 2.8) zeigt der Wildtyp im Stadium E 11.5 eine deutliche Färbung im Bereich des sich entwickelnden dopaminergen Neuronenfeldes, die auf eine *Ap2α* Expression zurückgeht. In diesem Gewebe findet die Bildung jener Neuronen statt, die zur später unter anderem am lokomotorischen System beteiligt sind, das Bewegungsabläufen steuert. Am Tag E 12.5 konnte die Expression nicht nachgewiesen werden, erst am Tag E 13.5 zeigt sich wieder eine deutlich Färbung. In *aphakia* konnte an keinem der untersuchten Stadien eine *Ap2α* Expression an diesen Stellen bemerkt werden.

Im Hinterhirn (Abbildung 2.9) konnte im Bereich des Epithalamus ebenfalls eine *Ap2α* Expression beobachtet werden. Am Tag E 11.5 ist die Expression im Wildtyp im anterioren Bereich des Epithalamus, in der Mutante aber im posterioren Bereich. Erst im Stadium E 12.5 ist die Expression im Wildtyp ebenfalls in den posterioren Bereich gelangt. Zudem ist sie hier deutlich stärker als in *aphakia*. In der Mutante ist die Expression generell etwas schwächer als im Wild-

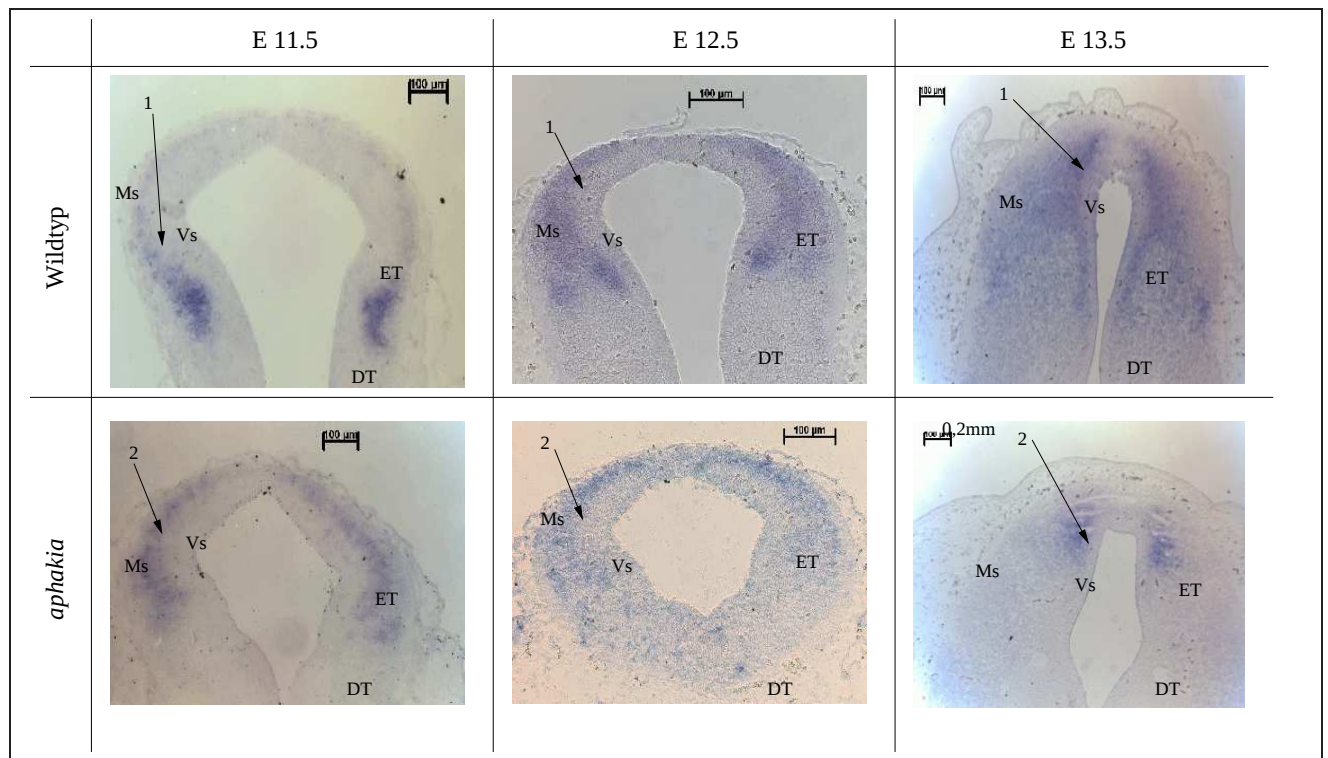


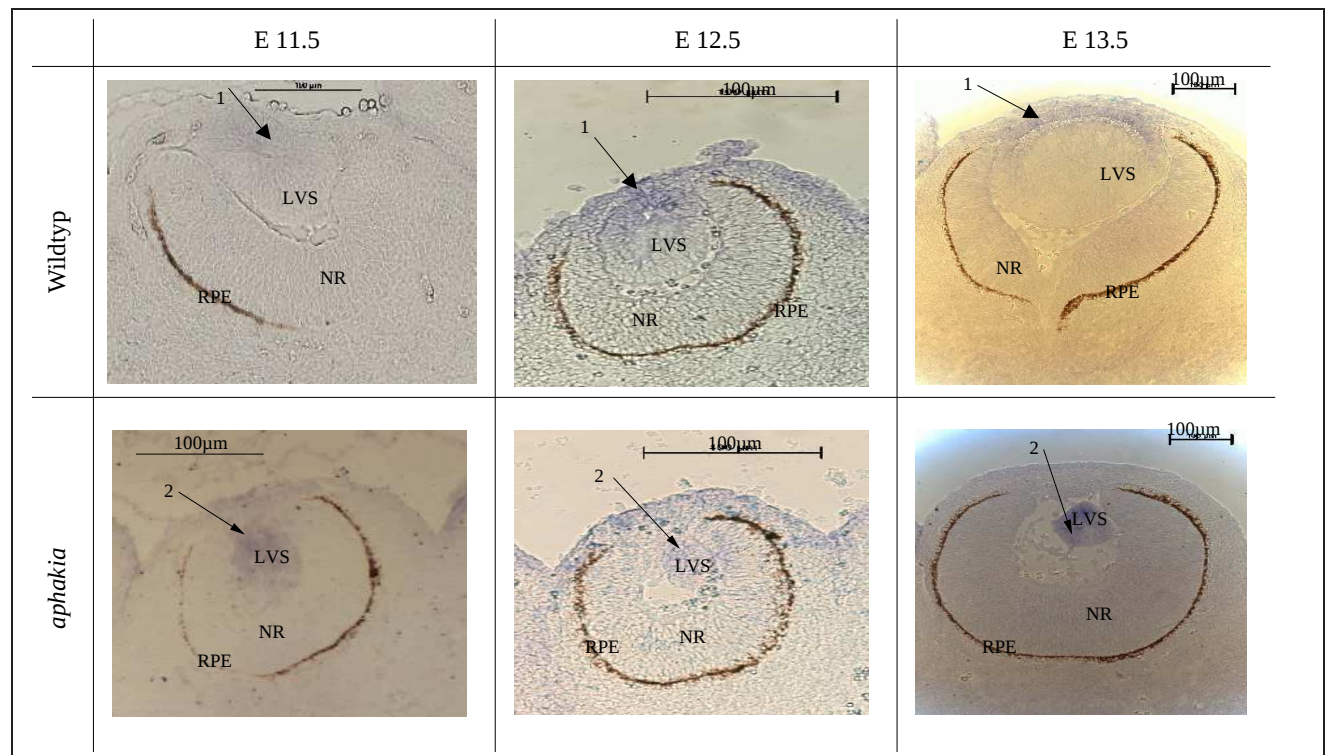
Abbildung 2.9: *Ap2α* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Hinterhirn)

Im Wildtyp und *aphakia* ist die Expression in allen Stadien auf den Epithalamus beschränkt. Am Tag E 11.5 zeigt sich die Färbung im Wildtyp im posterioren Bereich des Epithalamus, an den anderen beiden Stadien verlagert sie sich in den anterioren Bereich. Dabei zeigt sich eine klare Abgrenzung der Expression auf die Matrikularschicht (1). In *aphakia* ist die Färbung an allen Stadien schwächer als im Wildtyp. Außerdem zeigen sich keine klaren Grenzen zwischen Epi- und Dorsalthalamus und Matrikular- und Ventrikularschicht (2).

ET: Epithalamus; DT: Dorsalthalamus; Ms: Matrikularschicht; Vs: Ventrikularschicht;

typ, was sich vor allem am Tag E 13.5 bemerkbar macht. Die Expression ist an allen Stadien im Wildtyp deutlich auf die Matrikularschicht begrenzt, während sich in *aphakia* der Expressionsbereich zwischen Epi- und Dorsalthalamus und Matrikular- und Ventrikularschicht nicht so klar abgrenzen läßt.

Die Expression von *Ap2α* an E 11.5 bis E 13.5 im Auge beschränkt sich sowohl bei *aphakia* als auch im Wildtyp auf das sich entwickelnde Linsenvesikel (Abbildung 2.10). Am Tag E 11.5 ist die Expression in beiden Embryonen noch gleichmäßig auf das gesamte Linsenvesikel verteilt. An den folgenden Stadien verlagert sie sich im Wildtyp immer mehr in den anterioren Teil des Linsenvesikels. Im Gegensatz dazu bleibt in der Mutante die Expression an den Tagen E 12.5 und E 13.5 immer noch auf das gesamte Linsenvesikel verteilt. Dieses wächst nicht auf die gleiche Größe wie im Wildtyp heran, sondern bleibt auf dem Stand vom Tag E 11.5.

Abbildung 2.10: *Ap2α* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)

Am Tag E 11.5 ist die Expression in beiden Embryonen gleichmäßig auf das gesamte Linsenvesikel verteilt. In den folgenden Stadien reduziert sich die Expression im Wildtyp auf den anterioren Teil des Linsenvesikels (1), während in *aphakia* die Blaufärbung des gesamten Linsenvesikels keine Verlagerung der Expression zeigt (2).

LVS: Linsenvesikel; NR: Neuroretina; RPE: Pigmentepithelium der Retina;

Die *Ap2α* Expression verändert sich innerhalb der untersuchten Stadien in räumlichen Muster und in der Stärke. Es konnten klare Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp beobachtet werden: Am Tag E 9.5 zeigt *aphakia* eine deutlich stärkere Expression (in den Kiemenbögen) als der Wildtyp. 24 Stunden später ist dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. An den folgenden Stadien ist die *Ap2α* Expression im Wildtyp stärker ausgeprägt. Außerdem änderten sich hier wiederum die Expressionbereiche (Hinterhirn und Linsenvesikel), die sich in Details zwischen Mutante und Wildtyp unterscheiden. Dies entspricht in den Stadien E 9.5, E 11.5 und E 12.5 den Ergebnissen der Microarrays und der RealTime PCR, bei denen sich ebenfalls eine schwächere Expression in *aphakia* zeigte. Die in *aphakia* nur geringfügig stärkere Expression am Tag E 10.5 fiel weder bei den Microarrays noch der RealTime PCR auf, da bei der Präparation von RNA aus ganzen Embryonen der Unterschied zwischen der Menge an *Ap2α* in Wildtyp und Mutante zu gering war. Im Stadium E 13.5 zeigten die beiden Methoden (Microarrays und RealTime PCR)

nicht die veränderte Expression, die bei der ISH auffiel. Der Vergleich ist bei diesem Stadium insofern nicht ganz korrekt, da bei den Microarrays und der RealTime PCR die Expression ausschließlich im Auge überprüft wurde (s. Tabelle B.1), während die ISH Expressionsmuster im gesamten Kopfbereich zeigt.

2.3.3 *Pax6*

Die Microarray Analysen lassen keine Rückschlüsse auf die eventuell veränderte Expression von *Pax6* in *aphakia* zu, da sich keine entsprechenden Sequenzen im Experimentansatz finden. Aufgrund der wichtigen Stellung von *Pax6* als das "Master Control Gene" der Augenentwicklung [29] wurden dessen Expressionsmuster dennoch untersucht. Dabei zeigten sich interessante

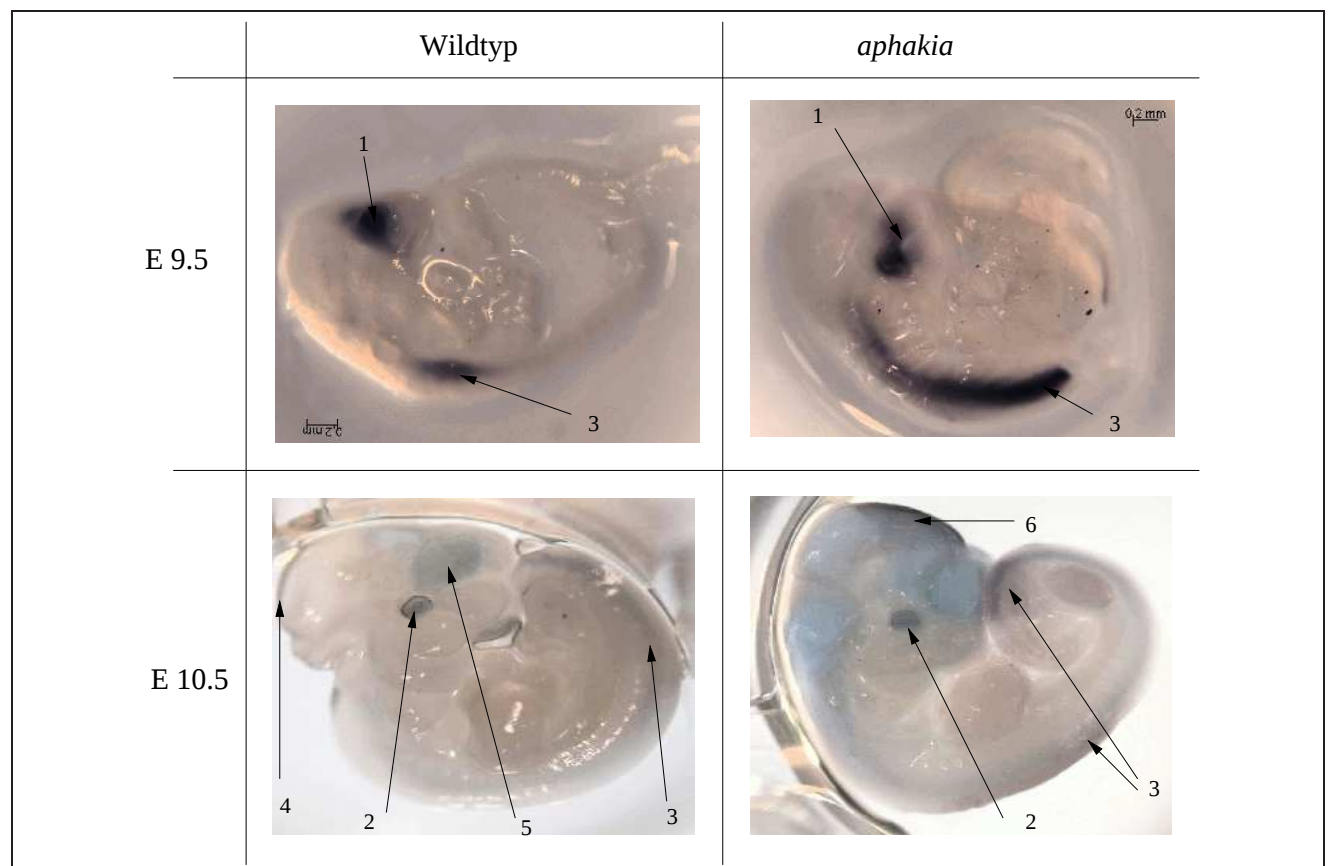


Abbildung 2.11: *Pax6* Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5

Am Tag E 9.5 wird *Pax6* in Wildtyp und *ak* im Augenbereich exprimiert (1). In *aphakia* zeigt sich eine Expression zusätzlich im gesamten Bereich der Somiten von Kopf bis zur Schwanzspitze (3). Im Wildtyp ist eine Expression in den Somiten nur auf Höhe des Herzbeutels vorhanden. Am Tag E 10.5 ist die Expression in beiden Embryonen hauptsächlich im Linsenvesikel zu sehen (2). Eine schwache Expression findet sich in den Somiten (3) und im Wildtyp am Rand des Met- und Rhombencephalons (4) und im Bläschen, aus dem später das Telencephalon hervorgeht (5). Bei *aphakia* tritt in diesen Bereichen keine Expression auf. Hier zeigt sich *Pax6* im Mittelhirn (6), was im Wildtyp nicht zu sehen ist.

Unterschiede der *Pax6* Expression in *aphakia* gegenüber dem Wildtyp.

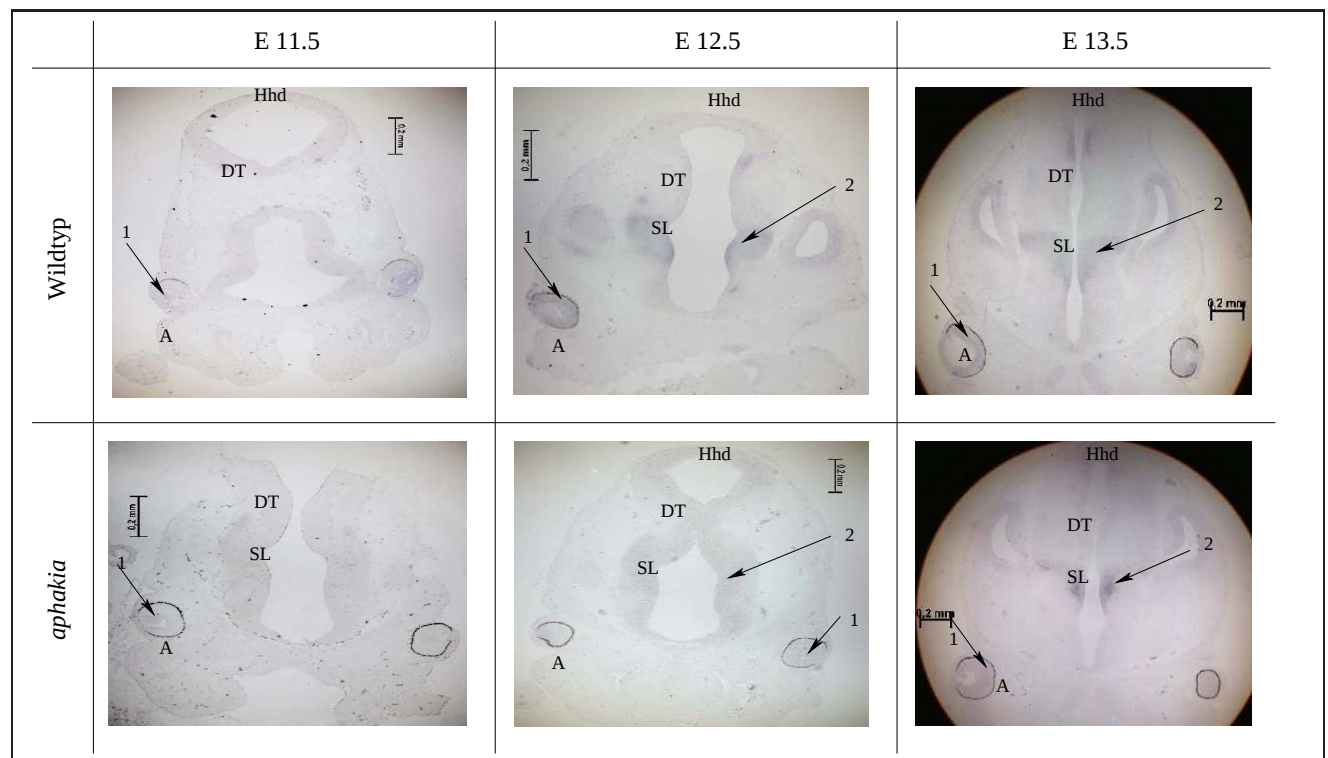


Abbildung 2.12: *Pax6* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (gesamter Kopf)

Am Tag E 11.5 wird *Pax6* in beiden Embryonen im sich entwickelnden Auge (1) exprimiert. An den nächsten beiden Stadien ist die Expression in diesem Bereich beim Wildtyp deutlich stärker als in *aphakia*. Ab Tag E 12.5 zeigt sich im Wildtyp außerdem eine Expression im Bereich des Mittelhirns, genauer am *Sulcus limitans* (2). Hier tritt eine Expression in der Mutante erst im Stadium E 13.5 auf und ist dabei auf einen kleineren Bereich beschränkt.

A: Auge; DT: Dorsalthamlamus; SL: Sulcus limitans; Hhd: Hinterhirndach;

Im Stadium E 9.5 (Abbildung 2.11) entspricht die Stärke der *Pax6* Expression im Augenbereich des Wildtyps der der Mutante, wobei sich hier die Färbung deutlicher auf das Augenbläschen konzentriert. In *aphakia* ist die Expression im gesamten Bereich der sich entwickelnden Wirbelsäule (Somiten) zu finden, während im Wildtyp nur ein kleiner Teil in Höhe des Herzbeutels gefärbt ist. Am Tag E 10.5 ist die Expression in beiden Embryonen schwächer als am Tag zuvor. In *aphakia* ist nur noch das Mittelhirn gefärbt. Dieses Expressionssignal ist im Wildtyp nicht zu sehen. Dafür ist hier eine Expression im Bläschen sichtbar, aus dem später das Telencephalon hervorgeht. Außerdem ist ein zweiter Expressionsbereich am Rand des Met- und Rhombencephalon vorhanden. Beide Expressionssorte von *Pax6* erscheinen nicht in der Mutante. In beiden Embryonen ist eine gleichmäßige Färbung im sich entwickelnden Linsenvesikel sichtbar. Die

Färbung im Bereich der Somiten ist ebenfalls bei beiden Embryonen im Vergleich zu Stadium E 9.5 zurückgegangen.

An den Tagen E 11.5 bis E 13.5 wird *Pax6* im Auge und Mittelhirn (*Sulcus limitans*) exprimiert (s. Abbildung 2.12). Dabei sind im Stadium E 11.5 beide Embryonen nur im Bereich des Auges gefärbt. Diese Expression wird an den nächsten beiden Stadien im Wildtyp deutlicher, während sie in der Mutante gleichbleibend schwach ausfällt. Die Expression im Mittelhirn tritt erst ab Stadium E 12.5 auf und ist zunächst nur im Wildtyp zu sehen. Erst am Tag E 13.5 zeigen beide Embryonen eine Färbung in diesem Bereich. Dabei zeigt sich die Färbung im Wildtyp auf einem größeren Bereich um den *Sulcus limitans* als in *aphakia*.

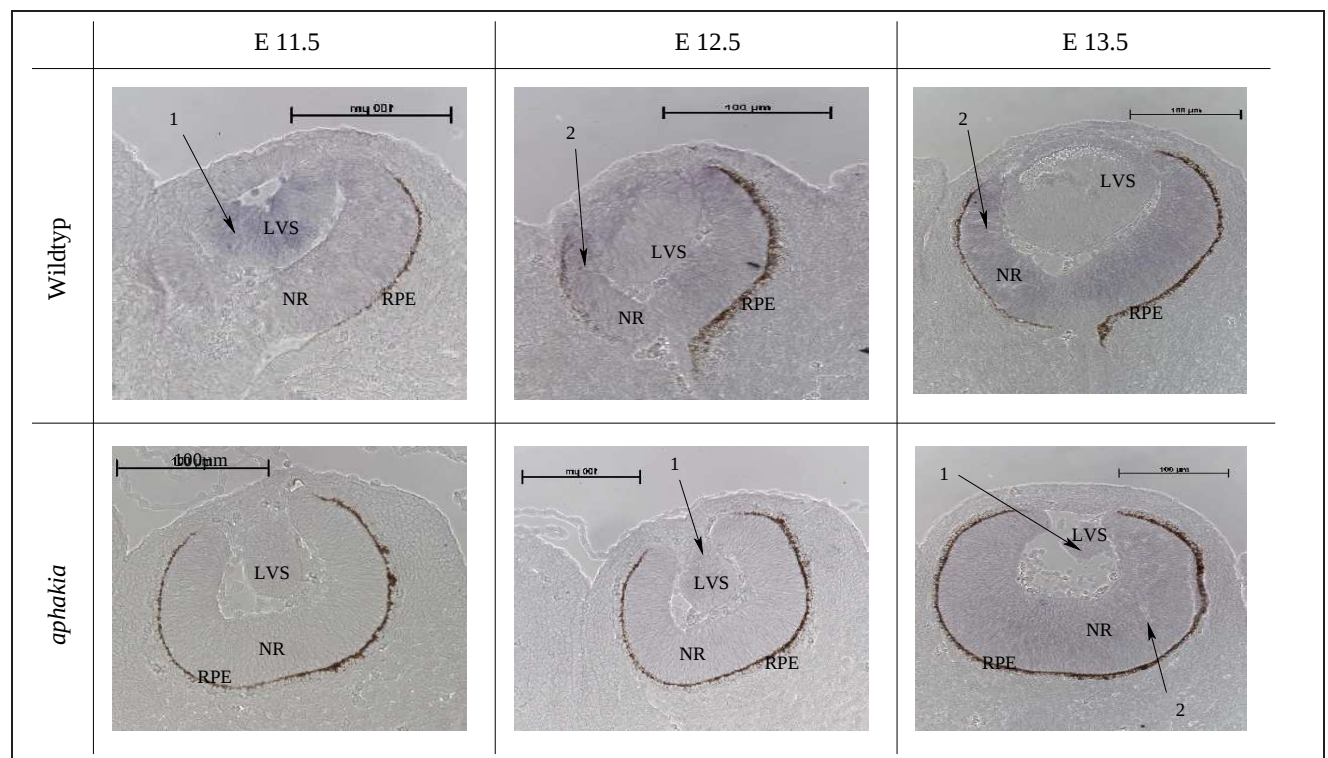


Abbildung 2.13: *Pax6* Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)

Am Tag E 11.5 zeigt sich eine Expression im Linsenvesikel des Wildtyps (1), die nicht in *aphakia* zu beobachten ist. Hier tritt *Pax6* erst am Tag E 12.5 auf. In diesem Stadium hat sich im Wildtyp die *Pax6* Expression schon in die Neuroretina verlagert (2), in der die Mutante im Stadium E 12.5 keine Expression vorweist. Erst am Tag E 13.5 lässt sich in der *aphakia* Neuroretina eine Expression beobachten. Im Gegensatz zum Wildtyp findet sich *Pax6* hier auch im Linsenvesikel.

LVS: Linsenvesikel; NR: Neuroretina; RPE: Pigmentepithelium der Retina;

Im Auge lässt sich beim Wildtyp eine durchgehende *Pax6* Expression beobachten (s. Abbildung 2.13), die sich vom Linsenvesikel (E 11.5) zur Neuroretina (E 12.5 und E 13.5) verlagert.

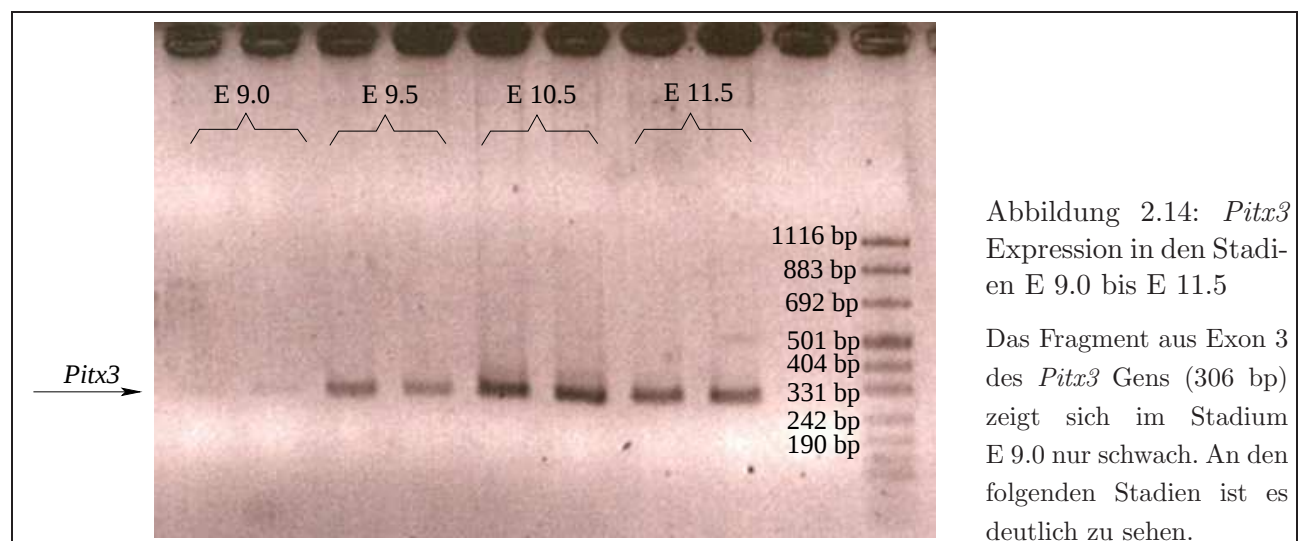
Im Gegensatz dazu zeigt sich bei *aphakia* keine Expression im Stadium E 11.5, weder im Linsenvesikel noch in der Neuroretina. Erst am Tag E 12.5 zeigt sich *Pax6* im Linsenvesikels, aber nicht in der Neuroretina wie im Wildtyp. Am Tag E 13.5 ist die Expression sowohl im Linsenvesikel als auch in der Neuroretina deutlich zu erkennen.

Pax6 zeigt hier ein Expressionsmuster, das sich innerhalb von jeweils 24 Stunden stark verändert. So geht die deutliche Expression in den Somiten am Tag E 9.5 innerhalb des nächsten Tages fast völlig zurück. Im Gehirn findet sich *Pax6* erst ab Stadium E 12.5. Im Auge findet sich die Expression im Stadium E 11.5 im Linsenvesikel, greift dann am nächsten Tag auf die Neuroretina über, in der sie am Tag E 13.5 ausschließlich zu finden ist.

2.3.4 *Pitx3*

Die hier näher untersuchten Genexpressionsmuster zeigen alle bereits ab Stadium E 9.5 deutliche Unterschiede zwischen ihrer Expression in *aphakia* und Wildtyp. Die *Pitx3* Expression in der Linse und im Mittelhirn wurde erst ab Stadium E 11.5 dokumentiert [71, 77, 80]. Damit würde eine Auswirkung von *Pitx3* auf die Genexpression an früheren Stadien wegfallen.

Um eine *Pitx3* Expression an den Tagen E 9.5 und E 10.5 nachzuweisen, wurde ein Genfragment in Exon 3 aus cDNA der fraglichen Stadien aus cDNA amplifiziert (Primer s. Kapitel A.6), die aus ganzen Wildtyp-Embryonen der Stadien E 9.0, E 9.5 und E 10.5 gewonnen wurde. Das 306 bp große Fragment aus dem *Pitx3* Gen zeigte sich in den untersuchten Stadien E 9.0 bis E 11.5 (Abbildung 2.14). Die anschließende Sequenzierung bestätigte diese Ergebnisse.



Somit wird *Pitx3* ab Tag E 9.0 im Embryo exprimiert und kann ab dieser Entwicklungsstufe die Expression der in den Microarrays und RealTime PCR beobachteten Gensequenzen beeinflussen.

2.4 PROMOTORANALYSEN

Im Gegensatz zu den Expressionsanalysen, die Informationen über die Expression von Genen liefern, die *Pitx3* nachgeschaltet sind, geben Promotoranalysen Auskunft über den Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die *Pitx3* Expression. Dazu wurde die Aktivität des isolierten *Pitx3* Promotors in Zellkultur mit der Aktivität in Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren verglichen. Außerdem wurde der *Ap2α* Promotors mit derselben Methode untersucht, um mögliche Wechselwirkungen mit anderen Teilnehmern der Augenentwicklung zu sehen.

2.4.1 Der *Pitx3* Promotor

Der *Pitx3* Promotor aktiviert die Gentranskription in hohem Maße. Inwieweit Transkriptionsfaktoren wie *Ap2α* und *Pax6* dazu beitragen wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Abbildung 2.15 zeigt den Promotor mit den möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen bei -548 bp und -586 bp für *Ap2α* und bei -181 bp für *Pax6*. Diese fallen durch die beiden Deletionen in der *aphakia* Maus weg, zusammen mit dem Transkriptionsstart.

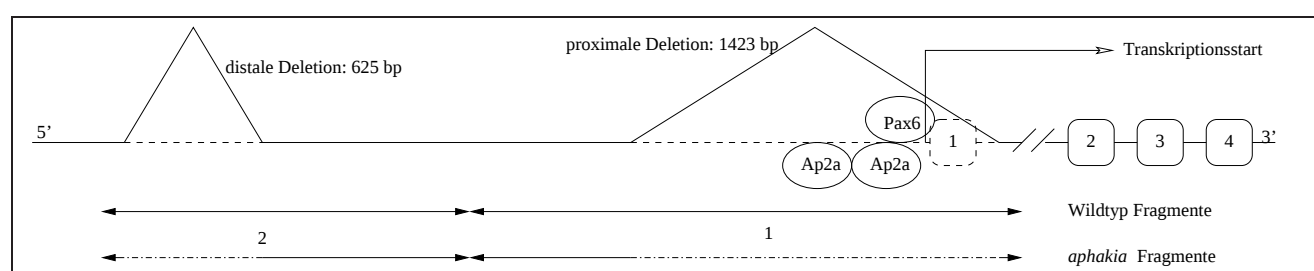


Abbildung 2.15: Der *Pitx3* Promotor

Der *Pitx3* Promotor umfaßt ca. 4 kb. Davon fehlen in der Mutante 625 bp durch die distale und 1,4 kb durch die proximale Deletion. Letztere entfernt nicht nur den Transkriptionsstart in Exon 1, sondern auch mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *Ap2α* und *Pax6*. Zur Transfektion wurden die bereits im Luziferase-Reportervektor vorliegenden Promotorfragmente verwendet. Die hier gezeigten Fragmente 1 und 2 umschließen jeweils die große und kleine Deletion. Aus diesem Grund sind die Promotorfragmente des Wildtyps um die entsprechende Anzahl von Basenpaaren größer als bei *aphakia*.

Pax6 lag bereits im Expressionsvektor pcDNA3.1 vor [47], *Ap2α* wurde im Verlauf dieser Arbeit in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Beide Transkriptionsfaktoren wurden zusammen mit den gezeigten *Pitx3* Promotorfragmenten in die Zelllinie HEK293 transfiziert.

Klonierung des *Ap2α* Gens in den pcDNA3.1 Vektor

Die *Ap2α* cDNA umfaßt 1450 bp. Um zu gewährleisten, daß Transkriptionsstart und -ende nicht fehlen, wurden die Primer AP2 f und r (s. Seite 81) so gelegt, daß jeweils 25 bp zusätzlich der 5'- bzw. der 3'-UTR in der PCR mit amplifiziert wurden. Die PCR ergab neben der erwünschten Bande von 1500 bp noch andere, kleinere Banden (s. Abbildung 2.16). Die 1500 bp Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt, bevor das Fragment in den pCR.II-TOPO Vektor einkloniert wurde.

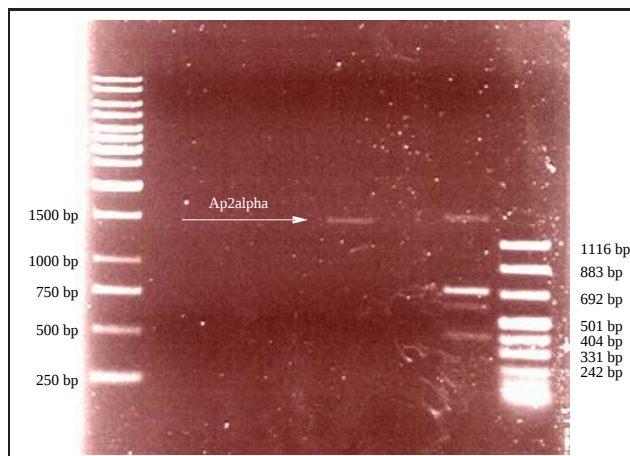


Abbildung 2.16: Amplifizierung des *Ap2α* Gens

Die *Ap2α* cDNA umfaßt 1500 bp und wurde mit dem Primerpaar AP2 amplifiziert. Da Mehrfachbanden auftraten, wurde die Bande der richtigen Größe (Pfeil) ausgeschnitten und aufgereinigt.

Bevor das Insert in den Expressionsvektor umkloniert werden konnte, mußte zunächst die Orientierung im pCR.II-TOPO Vektor überprüft werden, um einen korrekten Einbau zu ermöglichen. Dazu wurden die Klone, die positiv auf das enthaltene Insert getestet wurden, mit dem Enzym *SpeI* verdaut. Lag *Ap2α* in 5'→3' Richtung vor, so ergab sich (neben der Vektorbande von ca. 4,5 kb) ein 980 bp großes Fragment. Dies ist bei Klon 1 und 3 (s. Abbildung 2.17) der Fall. Bei einer Orientierung in 3'→5' Richtung zeigte sich eine Fragmentgröße von 595 bp und eine Vektorbande von ca. 5 kb, wie bei Klon 4 zu sehen. Die Fragmente von 4,8 kb und 750 bp bei Klon 2 sprechen gegen ein korrektes Einklonieren des gewünschten Inserts.

Klon 1 aus Abbildung 2.17 wurde als erstes mit *HindIII* und *XhoI* geschnitten. Das dabei frei-

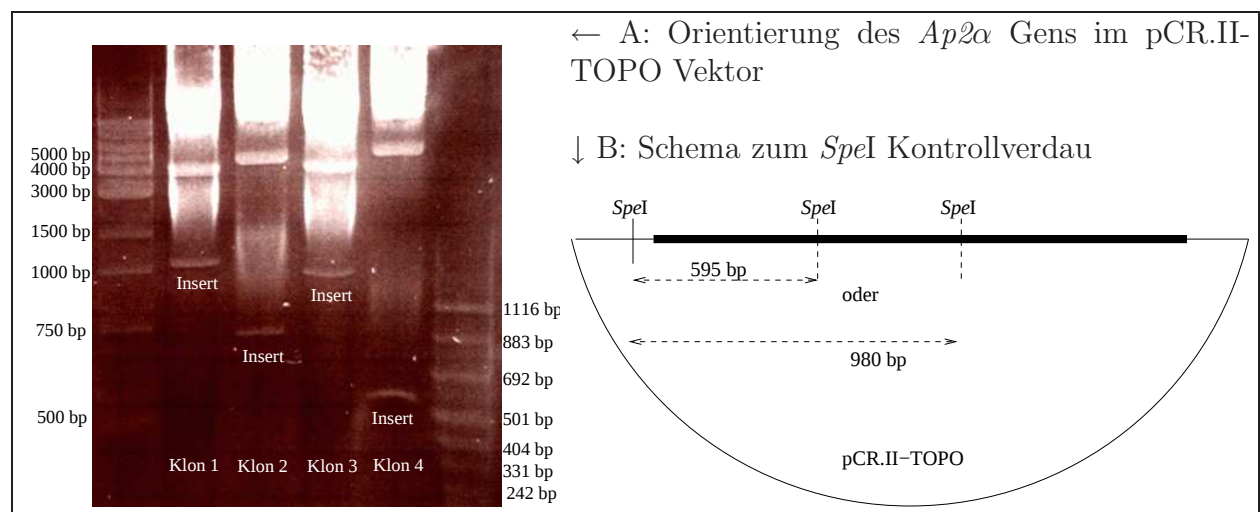
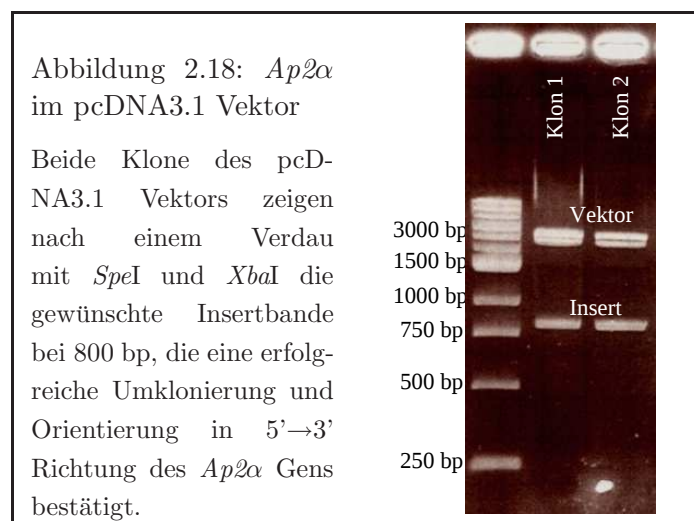


Abbildung 2.17: Orientierung des *Ap2α* Gens im pCR.II-TOPO Vektor

Bei der Überprüfung der Orientierung des *Ap2α* Gens im pCR.II-TOPO Vektor zeigen Klon 1 und 3 bei einem Verdau mit *SpeI* Banden der Größe 4,5 kb und 980 bp. Diese zeigen eine Insertorientierung in 5'→3' Richtung. Bei Klon 4 liegt das Insert in 3'→5' Richtung vor, da hier der Verdau Fragmente der Größe 5 kb und 595 bp ergibt. Die Fragmente von 4,8 kb und 750 bp bei Klon 2 sprechen gegen einen korrekten Einbau des gewünschten Inserts.

werdende *Ap2α* Insert wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Gleichzeitig wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ebenfalls mit *HindIII* und *XhoI* geschnitten und danach dephosphoryliert, um eine eventuelle Religation des Vektors zu vermeiden. Insert und Vektor wurden anschließend in einem Verhältnis von 7:1 im Anwesenheit von T4 Ligase vereinigt.



Zur Überprüfung der Klonierung und der erhaltenen Orientierung wurden die so erhaltenen Klone mit *SpeI* und *XbaI* kontrolliert. Im Falle einer positiven Umklonierung mit der gewünschten Orientierung in 5' → 3' Richtung sind nach diesem Verdau Banden bei ca. 3,5 kb (Vektor) und 800 bp (Insert) zu sehen. Abbildung 2.18 zeigt das positive Ergebnis zweier pcDNA3.1 Klone, die nach der oben beschriebenen Umklo-

nung beide die erwünschten Banden bei 3,5 kb und bei 800 bp produzieren. Beide Klone scheinen eine Doppelbande des Vektors zu zeigen. Dies ist jedoch eine Täuschung, die auf den

schräg eingesetzten Kamm beim Gießen des Gels zurückzuführen ist. Für die folgenden Transfektionen wurde Klon 1 verwendet.

Nachweis des Transkriptionsfaktors *Ap2 α* in Zellkultur

Die erfolgreiche Transkription von *Ap2 α* wurde einmal auf cDNA- und einmal auf Proteinebene bestätigt. Dazu wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1 in einem Doppelansatz in die Zelllinie HEK293 transfiziert. In der einen Hälfte war der Vektor mit *Ap2 α* bestückt, in der anderen Hälfte enthielt er kein Gen (Nullkontrolle). Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen geerntet und anschließend die RNA bzw. die Proteine extrahiert.

Die so gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben, um daraus *Ap2 α* amplifizieren zu können. Wie in Abbildung 2.19 A zu sehen, konnte nur aus der cDNA von Zellen, die mit *Ap2 α* transfiziert wurden, *Ap2 α* mit den Primern, die bereits zur Klonierung verwendet wurden, amplifiziert werden. In der cDNA, die aus der Nullkontrolle stammte, konnte *Ap2 α* nicht nachgewiesen werden.

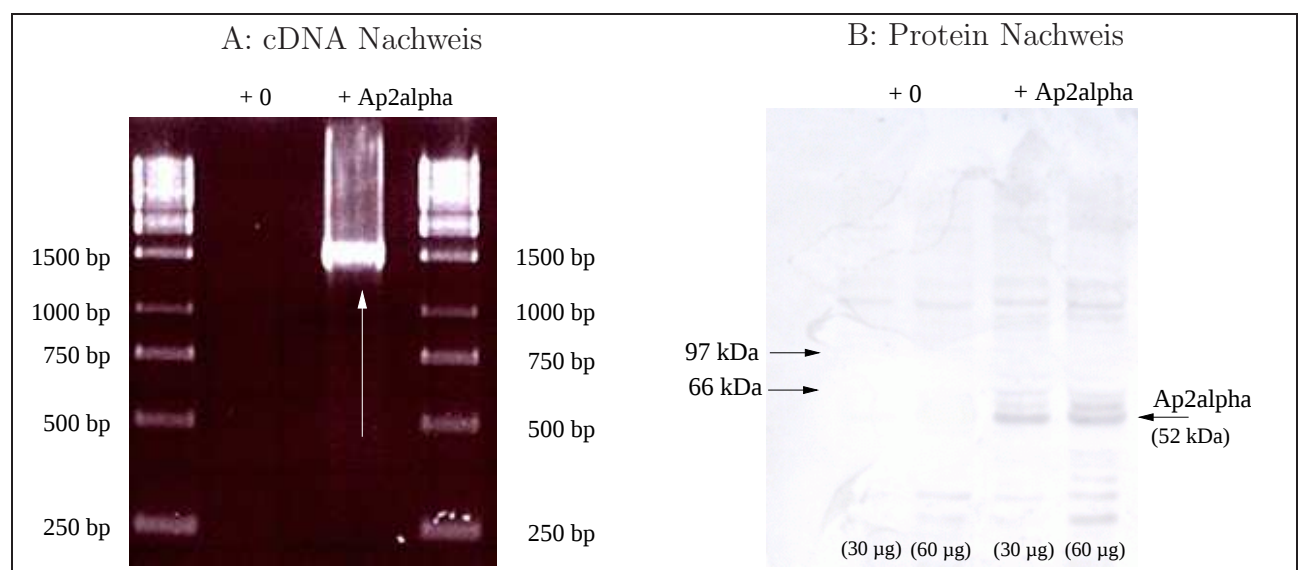


Abbildung 2.19: *Ap2 α* Nachweis in Zellkultur

A: *Ap2 α* konnte nur in der cDNA jener Zellen nachgewiesen werden, die vorher mit dem *Ap2 α* enthaltendem Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert wurden (+ *Ap2 α*). In den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (+ 0) trat die 1500 bp Bande von *Ap2 α* nicht auf.

B: *Ap2 α* konnte nur im Proteinextrakt jener Zellen nachgewiesen werden, die vorher mit dem *Ap2 α* enthaltendem Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert wurden (+ *Ap2 α*). In den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (+ 0) trat die *Ap2 α* Bande (Pfeil) nicht auf. Von beiden Proteinextrakten wurden je einmal 30 µg und 60 µg aufgetragen.

Die aus den transfizierten Zellen erhaltenen Proteinextrakte wurden in zwei Konzentrationen

(30 μg und 60 μg) auf ein 12,5 % PAA-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Membran übertragen. Diese wurde mit einem auf Ap2 α spezifischen Antikörper behandelt. Eine für Ap2 α charakteristische Bande trat nur beim Proteinextrakt aus Zellen auf, die zuvor mit dem Ap2 α enthaltendem Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert wurden (s. Abbildung 2.19 B). Bei der Nullkontrolle fehlt diese Bande. Die anderen Banden, die ober- und unterhalb der Ap2 α Bande zu sehen sind, handelt es sich um unspezifischen Hintergrund, da sowohl das Proteinextrakte der Nullkontrolle, als auch das der mit Ap2 α cotransfizierten Zellen dasselbe Muster aufweisen.

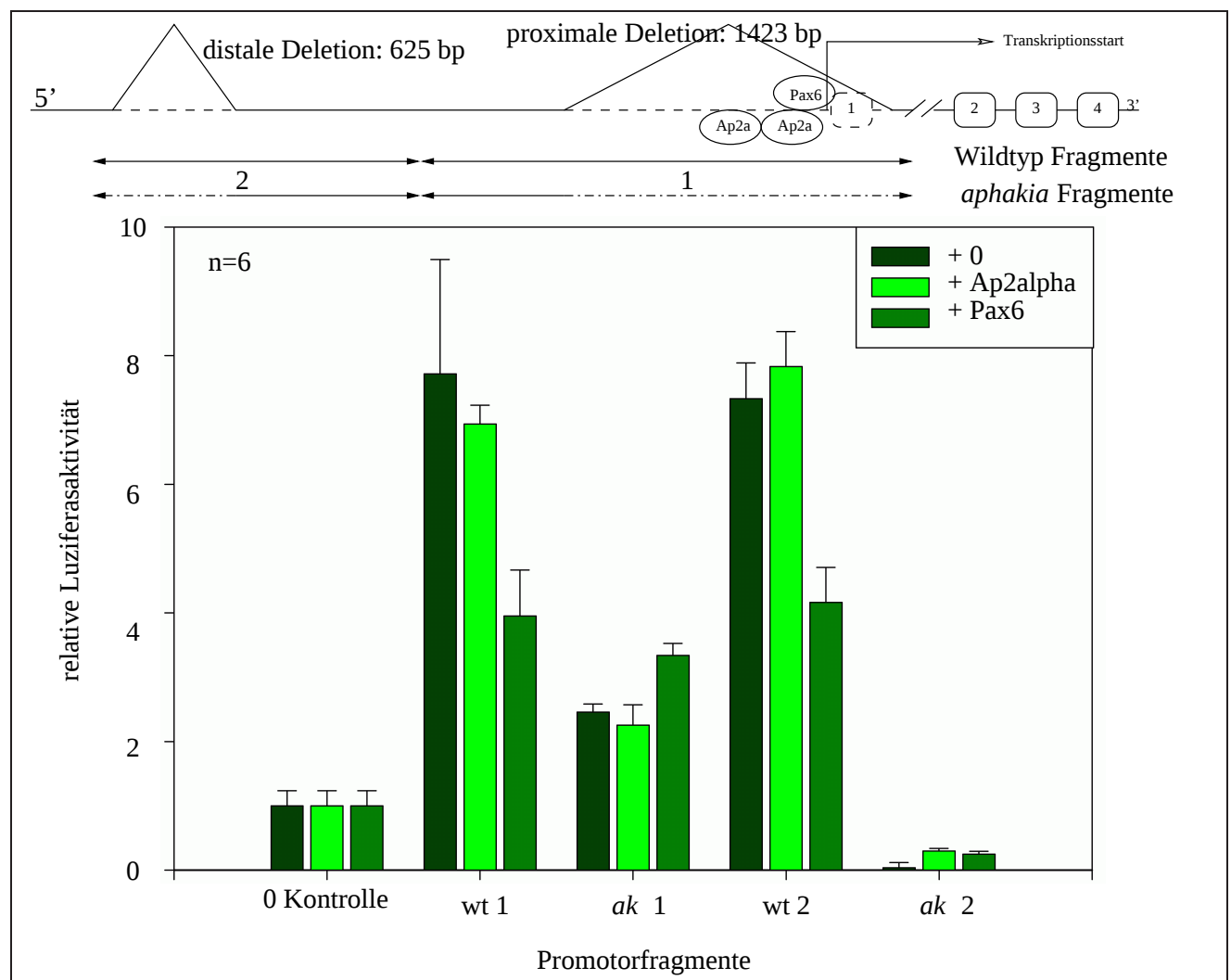
Pitx3 Promotoraktivität in Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren Ap2 α und Pax6

Ap2 α und Pax6 wurden jeweils zusammen mit den in Abbildung 2.15 beschriebenen *Pitx3* Promotorfragmenten in die HEK293 Zelllinie transfiziert. Diese Fragmente lagen bereits im Luziferase-Reportervektor pLLucII vor und erstrecken sich über die beiden Deletionen des Promotors. Zur Kontrolle wurden die Fragmente einmal mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1 und einmal mit dem Ap2 α oder Pax6 enthaltenden Vektor cotransfiziert.

Die Ergebnisse der Cotransfektion sind in Abbildung 2.20 zu sehen. Die Promotorfragmente des Wildtyps zeigen zwar eine stärkere Aktivität als die Fragmente der Mutante, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Cotransfektionen mit Ap2 α und dem leeren Expressionsvektor festgestellt werden. Bei Fragment 1 wurde weder im Wildtyp noch in der Mutante ein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität gemessen. Bei Fragment 2 gilt dasselbe für den Wildtyppromotor. Nur bei der Mutante zeigt sich hier eine schwache Aktivierung im Beisein von Ap2 α gegenüber dem Fragment 2 ohne zusätzlichen Transkriptionsfaktor. Allerdings lag die Aktivität dieses Promotorfragments weit unter der des leeren Reportervektors.

Pax6 hat einen deutlich inhibierenden Einfluß auf die Aktivität der *Pitx3* (Wildtyp-) Promotorfragmente. Die Aktivität des deletierten Fragments 1 der Mutante wird dagegen erhöht, da hier die inhibierende Wirkung der Pax6 Bindungsstelle durch die Deletion verschwindet. Die Aktivität von Fragment 2 der Mutante bleibt unverändert.

Somit kann die *Pitx3* Expression von Pax6 inhibiert werden, während Ap2 α keinen direkten Einfluß auf *Pitx3* hat.

Abbildung 2.20: Cotransfektion des *Pitx3* Promotors

Ap2α zeigt kaum Einwirkung auf die Aktivität der *Pitx3* Promotorfragmente. Bei den Fragmenten 1 von Wildtyp (wt) und Mutante (*ak*) fällt kein signifikanter Unterschied zwischen den Transfektionen mit und ohne *Ap2α* auf. Auch bei Fragment 2 des Wildtyps liegen die Ergebnisse der beiden Transfektionen nicht signifikant auseinander. Bei Fragment 2 der Mutante ist die Verringerung der *Pitx3* Promotoraktivität im Beisein von *Ap2α* geringer als die starke Hemmung des mit dem leeren Expressionsvektor cotransfizierten Promotorfragment.

Pax6 verringert die Aktivität der beiden *Pitx3* Promotorfragmente des Wildtyps. Die Aktivität des deletierten Fragments 1 ist erhöht, während die des Fragment 2 der Mutante unverändert bleibt.

2.4.2 Der *Ap2α* Promotor

Wie die Genexpressionsanalysen zeigten, wird die *Ap2α* Expression direkt oder indirekt von *Pitx3* beeinflusst. Beide Transkriptionsfaktoren können ab Stadium E 9.5 in Bereich des Auges nachgewiesen werden und haben so die Möglichkeit bei der Entwicklung dieses Bereiches

zu interagieren. Die Beteiligung von *Ap2α* an der Augenentwicklung wirft die Frage nach der Wechselwirkung des *Ap2α* Promotors mit anderen Transkriptionsfaktoren auf, die ebenfalls an diesem Entwicklungsprozeß mitwirken.

In dieser Arbeit wurden knapp 1000 bp oberhalb des Transkriptionsstarts in Exon 1 von *Ap2α* näher untersucht. Innerhalb dieses Bereichs wurden durch MatInspector drei mögliche Bindungsstellen vorhergesagt, einmal für Pax6 (-126 bp) und zweimal für *Ap2α* (-755 bp und -124 bp) selbst (s. Abbildung 2.21).

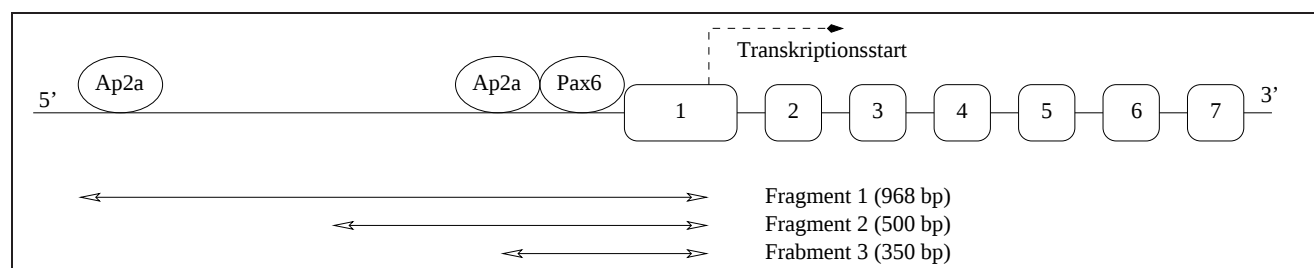


Abbildung 2.21: Der *Ap2α* Promotor

Der hier untersuchte *Ap2α* Promotor umfaßt 968 bp und enthält drei mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren: Pax6 (-126 bp) und *Ap2α* (-755 bp und -124 bp). Zur Transfektion wurden die unterschiedlich großen Promotorfragmente 1 bis 3 in den Luziferase-Reportervektor einkloniert.

Zur genaueren Analyse der Promotoraktivität wurden drei unterschiedlich große Fragmente vor ein *Luziferase* Gen im Reportervektor pLLucII kloniert und danach einzeln oder zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Pax6 und *Ap2α* in die Zelllinie HEK293 transfiziert.

Klonierung des *Ap2* Promotors in den pLLucII Vektor

Zur Amplifikation der Promotorfragmente wurden die Primer Ap2Pf1-3 (s. Seite 81) so gelegt, daß sich die Größen von 968 bp, 500 bp und 350 bp ergaben. Bevor die Fragmente in den pLLucII Reportervektor weiterkloniert werden konnten, mußte deren Orientierung im pCR.II-TOPO Vektor überprüft werden. Dazu wurde Fragment 1 mit *SacI* geschnitten. Bei einer Orientierung des Inserts in 5'→3' Richtung wird eine Bande von 125 bp erwartet. Im umgekehrten Fall ergäbe sich eine Bande von 960 bp. Wie in Abbildung 2.22 A zu sehen, liegt das Insert in 3'→5' Richtung vor.

Das zweite Fragment wurde mit *DraI/XbaI* geschnitten. Da *DraI* den pCR.II-TOPO Vektor mehrmals schneidet (s. Abbildung 2.22 B), tritt nicht nur eine Vektorbande auf, sondern mehre

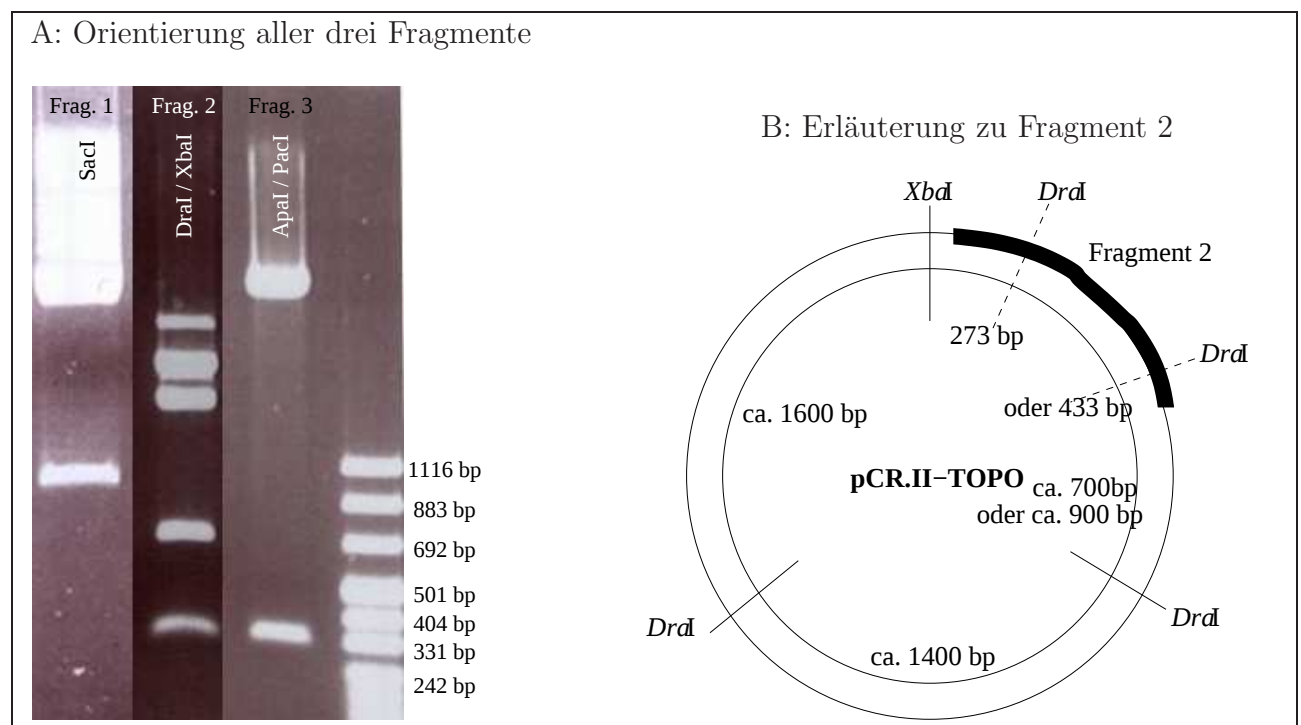


Abbildung 2.22: Orientierung der *Ap2α* Promotorfragmente in pCR.II-TOPO Vektor

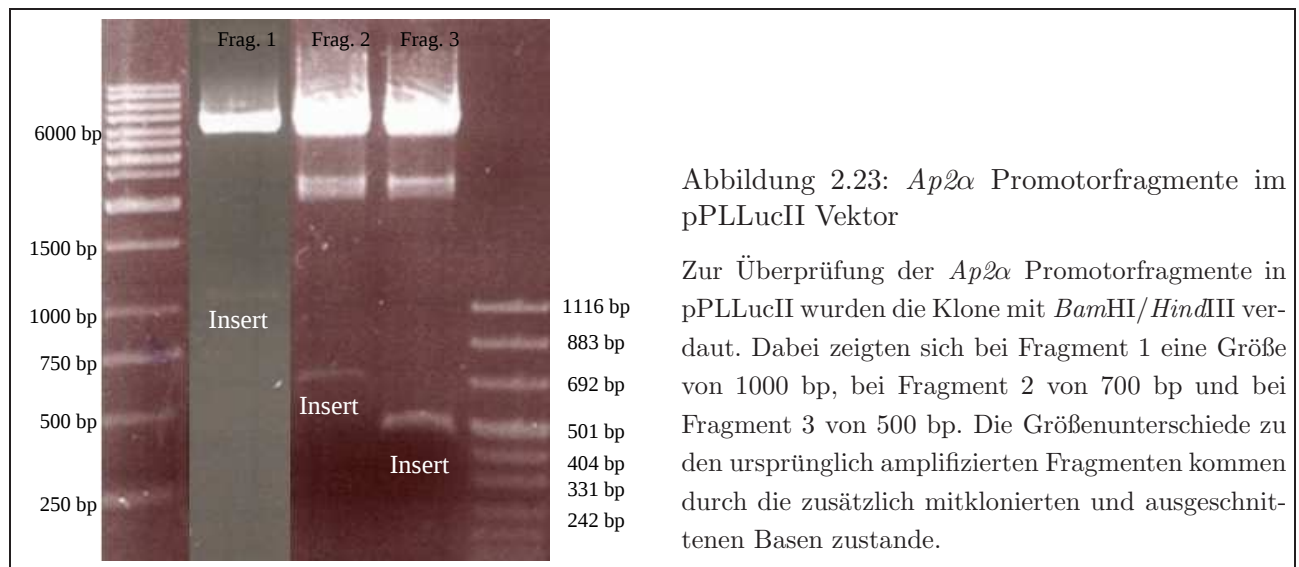
A: Zur Überprüfung der *Ap2α* Fragmentorientierung wurden Kontrollverdau mit *SacI* (Fragment 1), *DraI/XbaI* (Fragment 2) und *ApaI/PacI* (Fragment 3) durchgeführt. Das erste Fragment zeigt eine Bande von 960 bp und liegt damit in 3'→5' Orientierung vor. Bei Fragment 2 hat die kleinste Bande eine Größe von 433 bp und liegt somit in 5'→3' Richtung vor. Das dritte Fragment weist eine Bande von 320 bp auf, was eine Orientierung in 3'→5' Richtung anzeigt.

B: Bei Fragment 2 schneidet *DraI* mehrmals im pCR.II-TOPO Vektor. Diese ergibt Banden in der hier eingezeichneten Größe. Von Interesse ist nur die kleinste der Banden, die je nach Orientierung eine Größe von 273 bp oder 433 bp hat.

Banden. Für die Bestimmung der Orientierung ist nur die kleinste Bande von Bedeutung. Zeigt diese eine Größe von 433 bp, so liegt das Insert in 5'→3' Richtung vor. Liegt es in der anderen Orientierung vor, so sollte die kleinste Bande eine Größe von 273 bp aufweisen. Abbildung 2.22 A zeigt diese Bande mit 433 bp. Somit hat das Insert eine Orientierung in in 5'→3' Richtung.

Fragment 3 wurde mit *ApaI/PacI* geschnitten. Zeigt sich dabei eine Bande von 155 bp, liegt das Insert in 5'→3' Richtung vor. Im umgekehrten Fall wird eine Bande von 320 bp erwartet. In Abbildung 2.22 A ist letztere Größe zu sehen, somit liegt Fragment 3 in 3'→5' Orientierung vor.

Die Einklonierungsstrategie in den pPLLucII Vektor ist von der Insertorientierung abhängig. Bei einer Orientierung in 5'→3' Richtung (Fragment 2) wird das Insert in einem *BamHI/XhoI* Verdau ausgeschnitten und in den mit *BamHI/SalI* vorgeschnittenen und dephosphorylierten

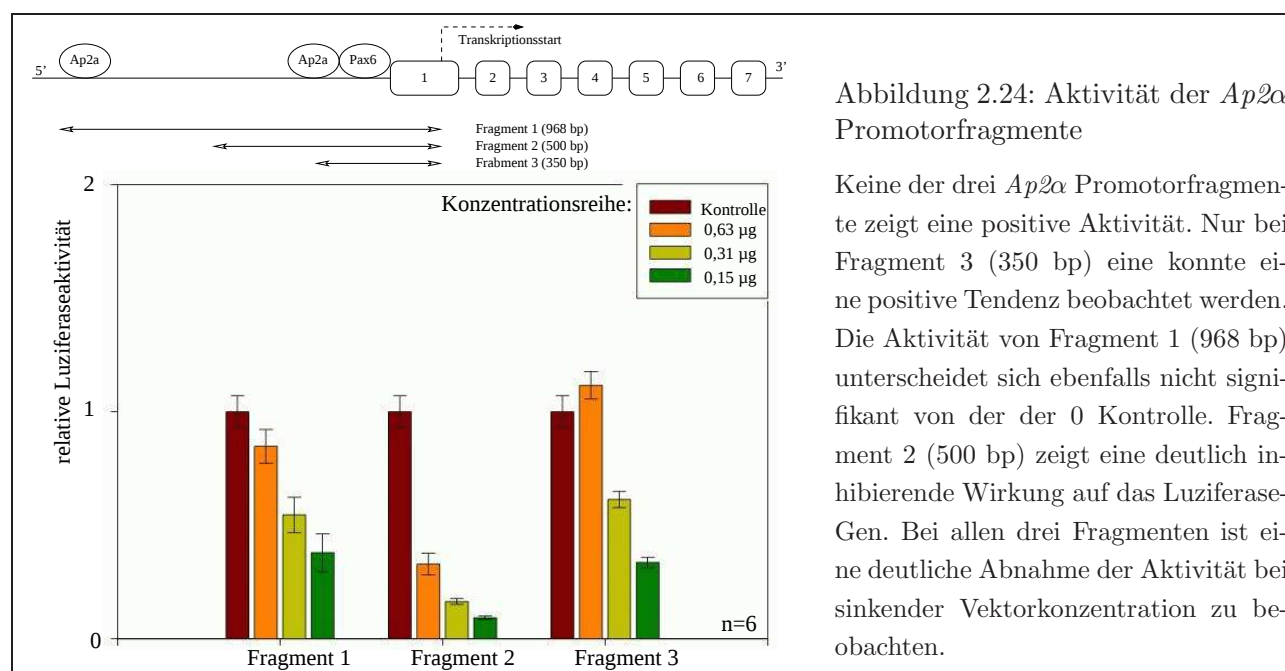


pPLucII Vektor einkloniert. Da die Schnittstellen der Enzyme *Xho*I und *Sal*I kompatibel sind, kann das Insert richtungsgezielt einkloniert werden. Liegt das Insert in 3'→5' Richtung vor (Fragmente 1 und 3), wird der pPLucII Vektor mit *Hind*III/*Sal*I vorgeschritten und dephosphoryliert, während das Insert mit *Hind*III/*Xho*I ausgeschnitten wird. Nach der Klonierung kann das Insert durch einen Verdau mit *Bam*HI/*Hind*III überprüft werden, wie in Abbildung 2.23 zu sehen ist.

Aktivität des *Ap2* Promotors

Die drei *Ap2α* Promotorfragmente wurden in je drei verschiedenen Konzentrationen in die Zelllinie HEK293 transfiziert und die jeweilige Luziferaseaktivität gemessen. Dabei konnte bei allen Fragmenten eine Abnahme der Promotoraktivität beobachtet werden, die mit der Konzentrationsabnahme korreliert (s. Abbildung 2.24). Allerdings stellte sich ebenfalls heraus, daß kein Fragment eine positive Aktivität besitzt. Nur Fragment 3 eine zeigt eine positive Tendenz. Bei Fragment 2 konnte sogar eine negative, inhibierende Wirkung festgestellt werden. Bei Fragment 1 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur Nullkontrolle (Transfektion mit leerem Reportervektor) festgestellt werden. Hier ließ sich nur eine eher negative Tendenz beobachten.

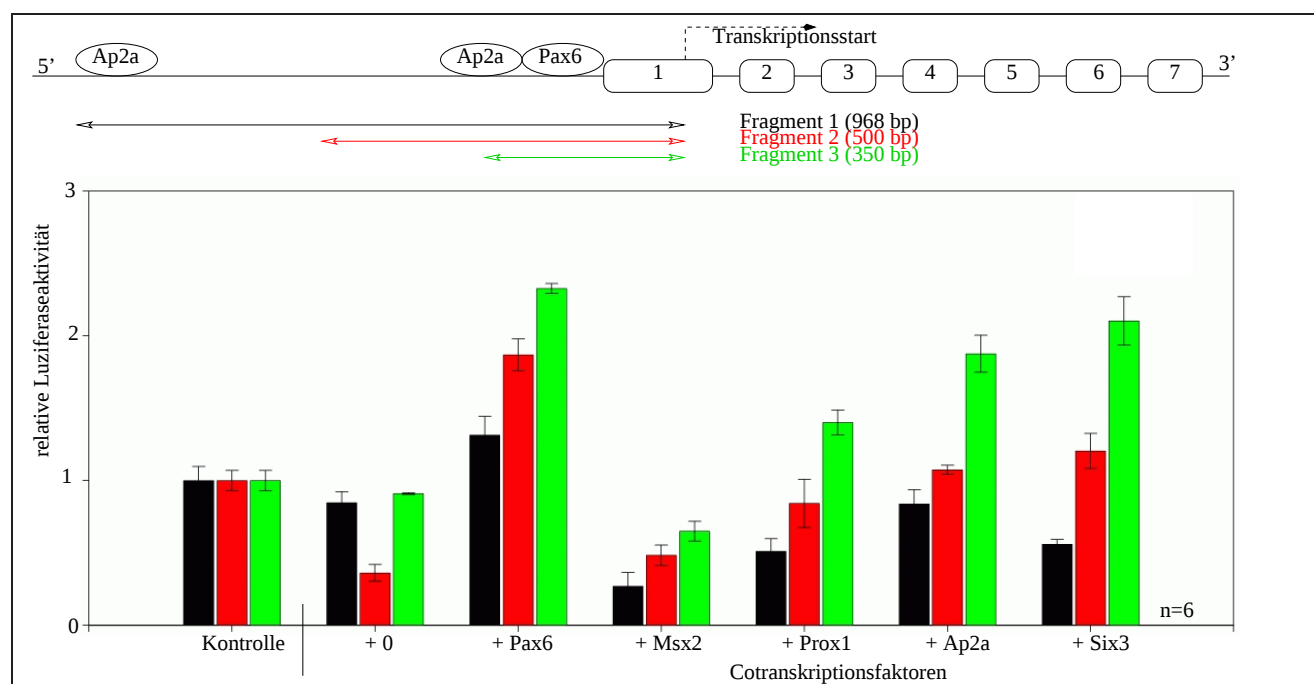
Da für die untersuchte Promotorsequenz mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren von MatInspector vorhergesagt worden sind, wurden die Promotorfragmente mit dem Expressi-



onsvektor pcDNA3.1 cotransfiziert. In diesem Vektor lagen *Pax6*, *Msx2*, *Prox1* und *Six3* bereits vor [47]. Auch *Ap2α*, das auf Seite 37 beschrieben ist, wurde cotransfiziert.

Das Ergebnis der Transfektionen ist in Abbildung 2.25 zu sehen. Gegenüber der Nullkontrolle zeigen die drei Promotorfragmente wieder die bereits bekannte negative Aktivität von Fragment 2 und die unveränderte Aktivität von Fragment 1 und 3. Bei der Zugabe von *Pax6* zeigen alle drei eine signifikante Aktivitätserhöhung. Die Zugabe von *Msx2* inhibiert die Fragmente 1 und 3, während sich bei Fragment 2 keine Veränderungen zeigen. *Prox1* hat gemischte Auswirkungen: Während Fragment 1 deutlich inhibiert wird, zeigen Fragment 2 und 3 eine Erhöhung ihrer Aktivität. Dasselbe Verhalten wird auch bei der Zugabe von *Six3* bemerkbar. *Ap2α* hat eine aktivierende Wirkung auf seine Promotorfragmente 2 und 3. Die Aktivität von Fragment 1 bleibt trotz Zugabe unverändert.

Der *Ap2α* Promotor trägt allein anscheinend nicht viel zur Expression des *Ap2α* Gens bei. Dabei liegt der aktivste Bereich in der Nähe (0 bis -350 bp) des Transkriptionsstarts. Die Anwesenheit von *Msx2* reduziert die kaum vorhandene Promotoraktivität noch einmal. Erst bei Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren wie *Pax6*, *Six3*, *Prox1* oder *Ap2α* selbst zeigt sich eine Aktivität des Promotors.

Abbildung 2.25: Cotransfektionen der *Ap2α* Promotorfragmente

Bei der Cotransfektion von Fragment 1 zeigte sich nur bei Pax6 ein positiver Einfluß. Msx2, Prox1 und Six3 inhibierten die Promotoraktivität, während Ap2α keinen Einfluß auf dieses Fragment zeigte. Die negative Aktivität von Fragment 2 wurde von Pax6, Prox1, Ap2α und Six3 kompensiert. Diese Transkriptionsfaktoren hatten alle einen aktivierenden Einfluß. Nur bei der Zugabe von Msx2 blieb die Promotoraktivität unverändert niedrig. Bei Fragment 3 zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier aktivieren Pax6, Prox1, Ap2α und Six3, während Msx2 inhibiert.

2.5 ANALYSE VON PITX3/PAX6 DOPPELMUTANTEN

Die Frage nach der gegenseitigen Regulierung von Pitx3 und Pax6 stellte sich nach den Ergebnissen der *in situ* Hybridisierungen mit *Pax6* und den Promotoranalysen von *Pitx3*. In ersteren deutet sich im Stadium E 9.5 eine Einbindung von Pitx3 in einen negativen Regulationskreis hinsichtlich der Pax6 Expression an. Umgekehrt konnte ein negativer Einfluß von Pax6 auf den *Pitx3* Promotor beobachtet werden. Diese gegenseitig negative Einflußnahme läßt keine Aussage über die zeitliche Koordinierung zwischen den Beiden zu. Es stellt sich die Frage, welcher der beiden Transkriptionsfaktoren zuerst auf den anderen einwirkt. Die Antwort darauf ergab sich aus den hetero- und homozygoten Nachkommen einer Kreuzung aus *aphakia* Mäuse (*Pitx3*^{-/-}) mit *AEY11* Mäusen (*Pax6*^{+/-}), die auf die unterschiedlichen Phänotypen hin untersucht wurden.

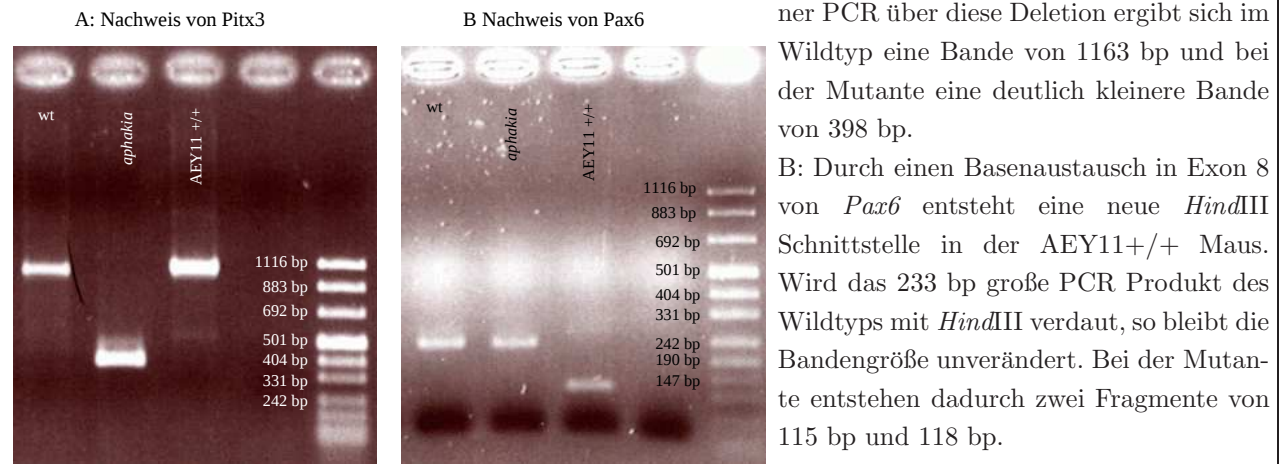
Die *AEY11* Mutanten ("*abnormalty of the eye*") zeigen im heterozygoten Phänotyp kleine Augen, deren Cornea getrübt und mit der Linse verbunden ist. Bei homozygoten Tieren fehlen die Augen komplett. Sie sind außerhalb des Mutterleibs nicht lebensfähig, da sie zusätzlich Verwachsungen im Kopf- und Nasenbereich aufweisen, die die eigenständige Atmung verhindern [32]. Dieser Phänotyp wird durch einen Basenaustausch C→T in Exon 8 von *Pax6* verursacht [25]. Das so entstandene Stopcodon beendet die Translation vor der Homeodomäne, womit das Pax6 Protein nicht mehr funktionsfähig ist. Diese Mutation wird durch den Nachweis einer zusätzlichen *HindIII* Schnittstelle in den hetero- und homozygoten Tieren bestätigt.

Die Nachkommen aus dieser *Pitx3*^{-/-} / *Pax6*^{+/-} Kreuzung waren phänotypisch nicht sicher dem hetero- oder homozygoten Typ zuzuordnen. Deswegen wurden alle Mäuse genotypisiert: Genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen präpariert und diese auf das Vorhandensein der *Pax6* Mutation bzw. des vollständigen *Pitx3* Promotors kontrolliert. Für den Nachweis von *Pitx3* wurde der distale Teil des Promotors mit den Primern PitPsd (siehe Seite 81) amplifiziert. Der vollständige Promotor umfaßt an dieser Stelle 1163 bp, während in der Mutante durch die bereits erwähnte Deletion (s. Seite 36) 625 bp fehlen. Somit wird hier nur eine Bande von 398 bp beobachtet (s. Abbildung 2.26 A). Für *Pax6* wurden 233 bp des Exon 8 mit den Primern Pax6-Exon-8 (s. Seite 81) amplifiziert und anschließend mit *HindIII* verdaut. Im Wildtyp änderte sich die Bandengröße nicht, während in der Mutante zwei Fragmente von 115 bp und 118 bp entstehen (s. Abbildung 2.26 B).

Abbildung 2.27 zeigt einen Überblick der erhaltenen Phänotypen. Liegen *Pitx3* und *Pax6* im Embryo (E 17.5) heterozygot vor, so ist das Auge zwar kleiner als im Wildtyp, der restliche Kopf ist aber äußerlich normal entwickelt. Ist Pax6 nur in der verstümmelten Form vorhanden und fehlt Pitx3 komplett, so fehlen die Augen und die Nasenregion ist deformiert. Diese Tiere sterben, sobald sie nach der Geburt von der Mutter getrennt sind.

Zur genaueren Untersuchung des Phänotyps wurden die Augen entnommen lebend geborener Mäuse (P 21) entnommen und in Plastik eingebettet. Die daraus gewonnenen Schnitte sind in Abbildung 2.28 gezeigt. Der *aphakia* Phänotyp setzt sich nur durch, wenn *Pitx3* komplett ausfällt (-/-) und *Pax6* als Wildtyp (+/+) oder heterozygot vorhanden ist. Liegt *Pitx3* als Wildtyp oder im heterozygoten Zustand vor, und ist *Pax6* ebenfalls als Wildtyp vorhanden, so ist die Linse normal entwickelt. Liegt *Pax6* in diesen Fällen heterozygot vor, so zeigt sich

Abbildung 2.26: Genotypisierung der *Pitx3/Pax6* Doppelmutanten



der *AEY11* Phänotyp: Hier liegt die Linse an der Cornea an. Wird kein funktionsfähiges Pax6 Protein gebildet, so entwickeln die Embryonen keine Augen. Die Unterschiede zwischen der Retinadicke der einzelnen Tiere beruhen auf der Kreuzung zwischen den Mauslinien C57BL6 (*ak*) und C3H (*AEY11*), deren retinale Degeneration bekannt ist [40, 62, 68].

Die Histologieschnitte von Embryoköpfen (E 17.5) in Abbildung 2.29 bestätigen, daß keine Augenanlagen gebildet wurden, wenn nur die mutierte Pax6-Form vorhanden ist. Dies ist völlig unabhängig davon, ob *Pitx3* als Wildtyp, im heterozygoten oder homozygoten Zustand vorliegt.

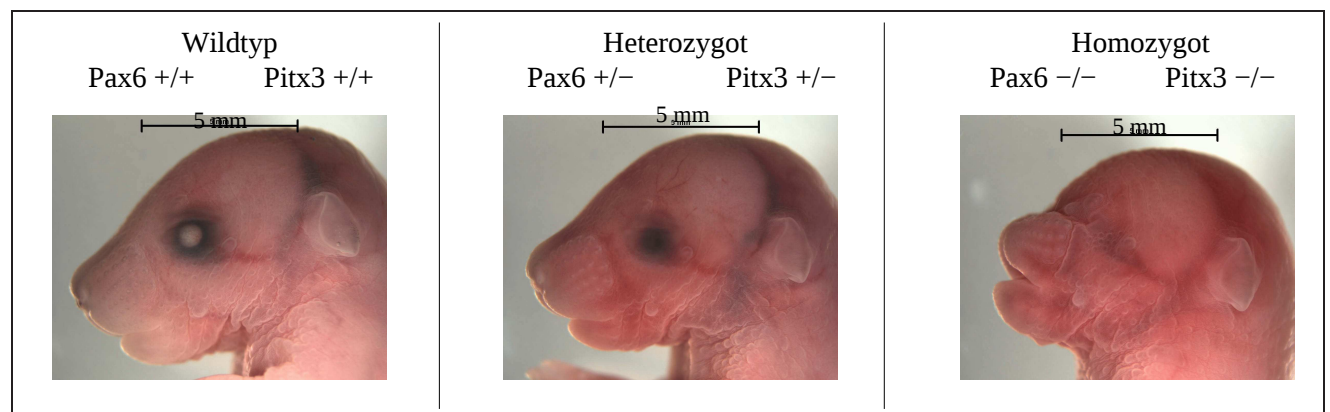


Abbildung 2.27: Embryonen der *Pitx3/Pax6* Doppelmutanten (E17.5)

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen die doppelt heterozygoten Embryonen kleinere Augen. Bei den doppelt homozygoten Tieren sind die Augen überhaupt nicht sichtbar und die Nasenregion deformiert.

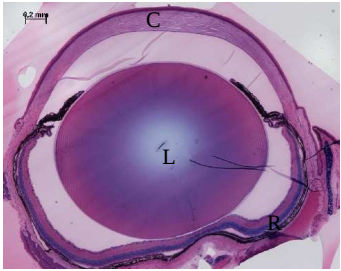
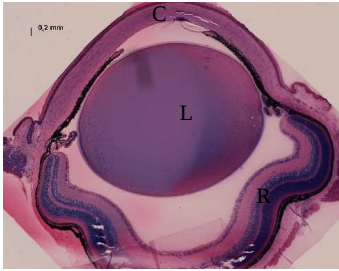
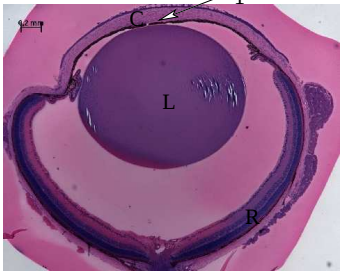
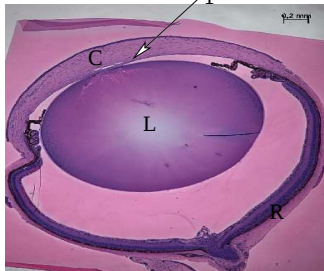
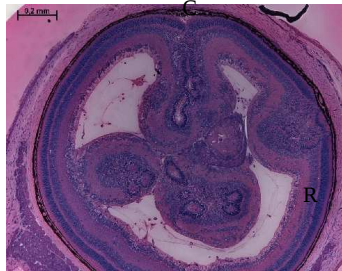
	Pitx3 +/+	Pitx3 +/-	Pitx3 -/-
Pax6 +/+			
Pax6 +/-			
Pax6 -/-	keine Augen sichtbar, Mäuse sterben kurz nach der Geburt		

Abbildung 2.28: Augen der *Pitx3/Pax6* Doppelmutanten (P 21)

Liegt *Pax6* heterozygot (+/-) vor, so zeigt sich der *AEY11* Phänotyp (Linse liegt an der Cornea an, 1), solange *Pitx3* als Wildtyp oder heterozygot (+/-) vorliegt. Fällt *Pitx3* komplett aus, so setzt sich der *aphakia* Phänotyp durch (keine Linse), solange *Pax6* als Wildtyp oder heterozygot (+/-) vorhanden ist. Fehlt *Pax6* komplett, so bilden die Embryonen keine Augen aus, unabhängig ob und in welcher Ausprägung *Pitx3* vorhanden ist.

C: Cornea; L: Linse; R: Retina

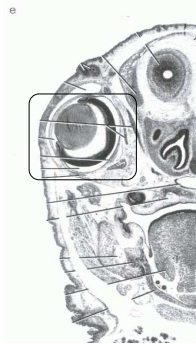
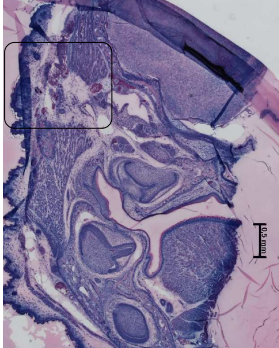
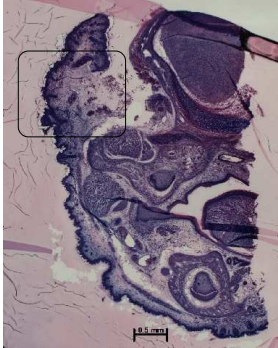
Wildtyp	Pitx3 +/+	Pitx3 +/-	Pitx3 -/-
			

Abbildung 2.29: Köpfe der *Pitx3/Pax6* Doppelmutanten (E17.5)

Fehlt *Pax6* vollständig, so sind keine Augenanlagen sichtbar (Kasten). Dieser Phänotyp entspricht der *AEY11* Mutante und ist unabhängig von der Menge an vorhandenem *Pitx3*.

Dies entspricht dem *AEY11* Phänotyp.

Pitx3 kann die durch funktionsuntüchtiges Pax6 Protein entstandenen Fehler in der Augenentwicklung nicht ausgleichen. Erst wenn *Pax6* die Entwicklung gestartet hat, liegt es an *Pitx3* eine Linse auszubilden. Damit muß *Pax6* zeitlich vor *Pitx3* exprimiert sein und den Beginn der Wechselwirkungen zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren auslösen.

— Kapitel 3 —

DISKUSSION

Die *aphakia* Maus bietet die Möglichkeit, den Einfluß von *Pitx3* auf die Embryonalentwicklung zu untersuchen, da bekannt ist, daß ein Defizit an exprimiertem *Pitx3* im Embryo zu einer fehlenden Augenlinse im erwachsenen Tier führt. Dagegen sind uns die Ereignisse, die zur *Pitx3* Expression führen und die Gene, deren Expression durch den Transkriptionsfaktor Pitx3 beeinflußt werden, zum großen Teil noch fremd. Diese Arbeit näherte sich *Pitx3* aus beiden Richtungen, um den Standort, den *Pitx3* in der Regulationskaskade der Embryonalentwicklung einnimmt genauer definieren zu können. Dabei konnten zum einen parallele Entwicklungen in der Augen- und Gehirnentwicklung festgestellt werden, und zum anderen gezeigt werden, daß Pitx3 auch Auswirkungen auf Genexpressionen hat, die mit anderen Bereichen der Embryonalentwicklung in Zusammenhang stehen.

3.1 DER EINFLUSS VON PITX3 AUF VERSCHIEDENE ASPEKTE DER EMBRYONALENTWICKLUNG

Der Vergleich der *aphakia* Maus mit einer Wildtyp-Maus hinsichtlich der Genexpression zeigte interessante Unterschiede. Überraschenderweise fielen nicht nur Gene durch eine veränderte Expression in *aphakia* auf, die eindeutig der Augenentwicklung zugeordnet werden konnten. Ein hoher Prozentsatz (40 %) ist auf Proteinebene unter anderem an Transportsystemen durch den Blutkreislauf, am Immunsystem und der Blutgerinnung beteiligt (Abbildung 2.1 auf S. 14). Ein Zusammenhang zwischen Pitx3 und diesen Systemen konnte bisher nicht festgestellt werden: Zum einen wurde die *aphakia* Maus nicht auf Veränderungen der Blutwerte hin untersucht, zum anderen ist die *Pitx3* Expression auf Augenlinse und Mesencephalon beschränkt. Wie Tabelle

3.1 zeigt, decken sich die Gebiete der *Pitx3* Expression nicht mit allen Genen, deren Expression von *Pitx3* abhängig ist (nach MGI: <http://www.informatics.jax.org/>).

Tabelle 3.1: Expression und mögliche Funktion der Kandidatengene

Gen	Expression nach MGI Alter	Ort	Proteinfunktion
<i>Ccl28</i>	adult	Leukozyten, Niere, Brustdrüse	Beteiligung an Entzündungsreaktionen [43, 91], Regulation der IgA Konzentration [96]
<i>Spla2</i>	E 11.0 - adult	Embryo (E 7.0), Retina, Brustdrüse, Lymphozyten	Beteiligung an Entzündungsreaktionen [33], Beteiligung am Lipidmetabolismus und der Blutgerinnung [57]
<i>Cf2</i>	E 12.0 - adult	Leber, Muskel, Gehirn	Kontrolle der Blutgerinnung und Fibrinolyse (Prothrombin) [57], Regulation des Neuritenwachstums [82]
<i>Fgb</i>	E 7.0 - adult	Embryo, Leber	Bildung von Wundverschluß [57]
<i>Apoa1</i>	E 19.0 - adult	Leber, Knochenmark	Stabilisierung von Prostaglandinen [102], Einfluß auf den Blutdruck [73], Beteiligung am Lipidmetabolismus [57]
<i>Glp1r</i>	E 17.5 - adult	Leber, Gehirn	Einfluß auf Blutdruck [28]
<i>Rbp4</i>	E 14.5 - adult	Auge [98], Leber	Transport von Retinol (mit Ttr) [57]
<i>Ttr</i>	E 9.5	Gehirn, Leber	Transport von Retinol (mit Rbp4) [57], Ausbildung des Choroid Plexus [30, 31]
<i>Tfr</i>	adult	Gehirn	Fe ²⁺ Transport [57], Wachstumsfaktor [92]
<i>Afp</i>	E 9.5 - adult	Embryo, Leber	Bindung an Fe ²⁺ [57], Beteiligung an Erythrozytenproduktion [5]
<i>Apoa2</i>	E 12.5 - adult	Embryo, Leber	Beteiligung am Lipidmetabolismus [57]
<i>Apoc2</i>	E 12.0 - adult	Gehirn, Leber	Beteiligung am Lipidmetabolismus [57]

Rbp4 und *Ttr* könnten einen Beitrag zur Augenentwicklung leisten, indem sie die Verfügbarkeit von Retinol während der Retinaentwicklung sicherstellen: Vitamin A wird durch Retinol-bindende Proteine (*Rbp4*) im Verbund mit Transthyretin (*Ttr*) [19] zu den Zielgeweben transportiert. In den Zielgeweben wird Retinol in Retinsäure umgewandelt, die als Regulator der Gentranskription auf Hormone-Response-Elemente der DNA einwirkt. Dabei wirkt Retinsäure konzentrationsabhängig [18] und trägt so als Morphogen zum Wachstum und Differenzierung verschiedener Organe in der Embryonalentwicklung bei. *Pitx3* wird nicht in der Retina exprimiert, sondern scheint eher indirekt die Produktion von *Rbp4* in der Linse zu unterdrücken. Nur die Expression von *Pitx3* im Gehirn könnte einen positiven Einfluß auf *Ttr* haben und

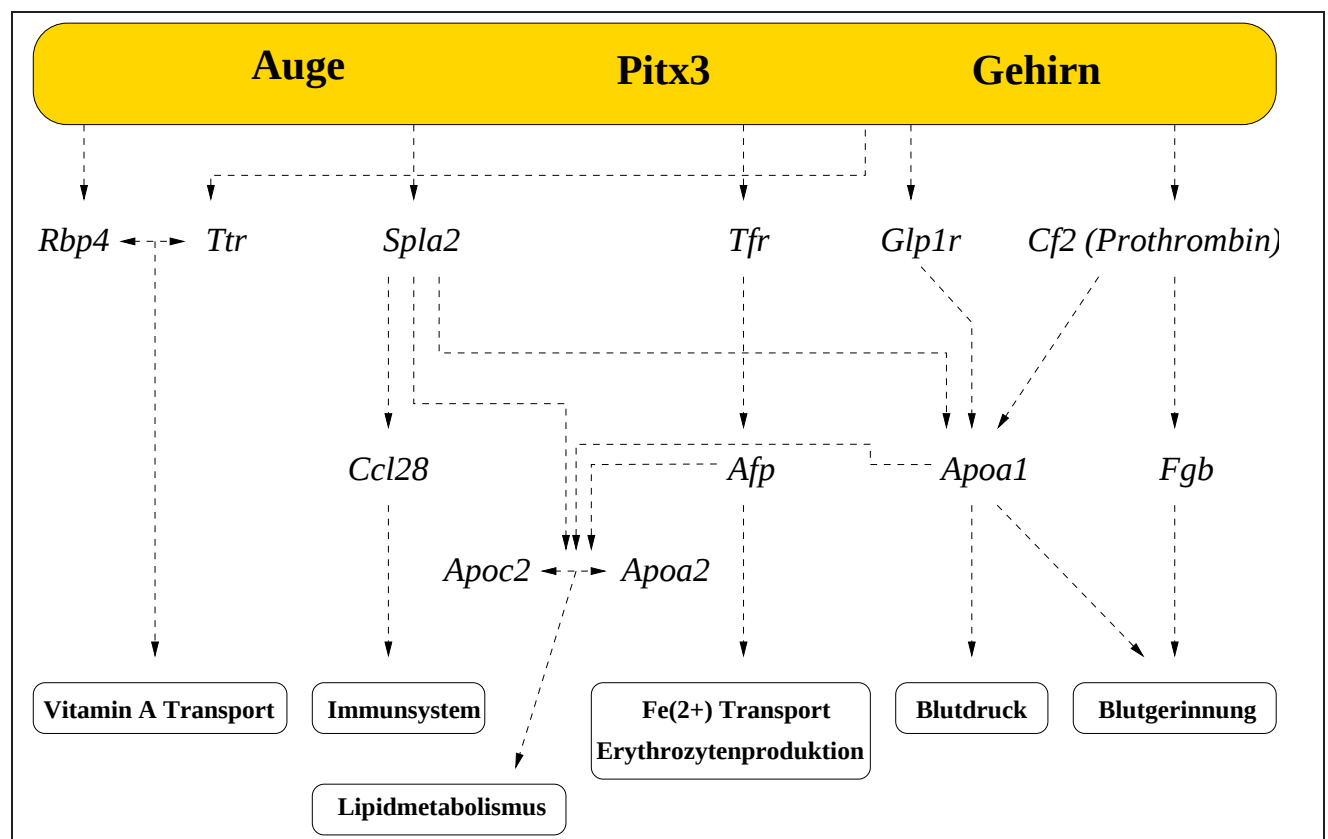


Abbildung 3.1: Die möglichen Auswirkungen von Pitx3

Pitx3 könnte die Expression von *Rbp4*, *Ttr*, *Spla2*, *Tfr*, *Glp1r* und *Cf2* in Auge und Gehirn beeinflussen. Unter der Annahme, daß sich Faktoren, die an denselben Vorgängen beteiligt sind, sich gegenseitig in der Expression regulieren, könnte dadurch Pitx3 indirekt die Expression von *Ccl28*, *Afp*, *Apoa1*, *Fgb*, *Apoa2* und *Apoc2* beeinflussen.

damit indirekt zur Retinaentwicklung beitragen.

Spla2, *Tfr*, *Glp1r* und *Cf2* (*Prothrombin*) werden im Gehirn exprimiert und könnten hier von Pitx3 negativ beeinflusst werden. Solange Pitx3 die Expression dieser Gene verhindert, würden diese Faktoren zur Aktivierung anderer Gene (wie z.B. *Ccl28*, *Afp*, *Apoa1*, *Fgb*, *Apoa2* und *Apoc2*) nicht zur Verfügung stehen. Damit würden diese Gene ebenfalls indirekt von Pitx3 inhibiert. Durch diese indirekte Weise könnte Pitx3 an Kontrollsystemen beteiligt sein, die die Anwesenheit von Komponenten des Immunsystems (*Ccl28* [43, 91, 96]), des Transports von Eisen (*Afp* [5]) und Lipiden (*Apoa2* und *Apoc2* [57]) und der Regulation des Blutdrucks (*Apoa1* [73]) und der Blutgerinnung (*Fgb* [57]) solange verhindern, bis die Entwicklung dieser Systeme weit genug fortgeschritten ist. In diesen späteren Stadien können positive Signale anderer Faktoren deren Expression aktivieren und den Einfluß von Pitx3 überlagern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern hier die ersten Indizien, daß *Pitx3* auch die Expression von Genen beeinflußt, deren Proteine an Transportsystemen für Retinol, Eisen und Lipiden beteiligt sind, sowie Komponenten der Blutgerinnung und des Immunsystems darstellen. Die genaueren Zusammenhänge zwischen *Pitx3* und den genannten Systemen wurden bisher noch nicht untersucht. Die *Pitx3* Expression scheint aber für die gesamte Embryonalentwicklung (nicht nur für die Augenentwicklung) wichtiger zu sein, als bisher angenommen.

3.2 DER EINFLUSS VON *Pitx3* AUF DIE AUGEN- UND GEHIRNENTWICKLUNG

Neben diesen überraschenden Hinweisen auf die *Pitx3* Funktion in anderen Bereichen der Embryonalentwicklung, liegt das Augenmerk dieser Arbeit auf der Rolle, die *Pitx3* in der Augen- und Gehirnentwicklung spielt. Deren Entstehung ist eng miteinander verbunden und verläuft nach der Abtrennung der Augenbläschen vom Vorderhirn weiter parallel zueinander.

3.2.1 Die Augenentwicklung bis zur *Pitx3* Expression

Um *Pitx3* in die Regulationskaskade der Augenentwicklung einzubinden, werden zunächst ein paar Schlaglichter auf Gene geworfen, deren Expression der Bildung des eigentlichen Auges (Linse, Retina und Sehnerv) vorausgehen muß.

Die Expression von *Fgf8* und *Otx2*: *Fgf8* (*Fibroblast growth factor 8*) und *Otx2* (*Orthodenticle homolog 2*) sind bereits früh an der Entwicklung des Vorder- und Mittelhirns beteiligt. Wie der Name andeutet, steuert *Fgf8* lokal das Wachstum und legt so einen Grundstein zur Ausbildung von weiteren Expressionsmustern späterer Entwicklungsfaktoren [13]. Die Produktion von *Fgf8* und *Otx2* trägt zur Weiterentwicklung des Mittelhirns zum Mesencephalon und zu dessen Abgrenzung gegenüber dem Hinterhirn bei [1, 13]. Im Vorderhirn entsteht durch die Mitwirkung beider Faktoren das Augenfeld. Entfällt die Produktion von *Fgf8* oder *Otx2*, so entwickeln sich Vorder- und Mittelhirn nicht weiter. Im verkümmerten Gehirn finden sich keine Ansätze zur Augenentwicklung mehr [1, 9]. Die Expression von *Fgf8* und *Otx2* führt zur Musterbildung des Gehirns, ohne die die später einsetzende Augenentwicklung nicht möglich ist.

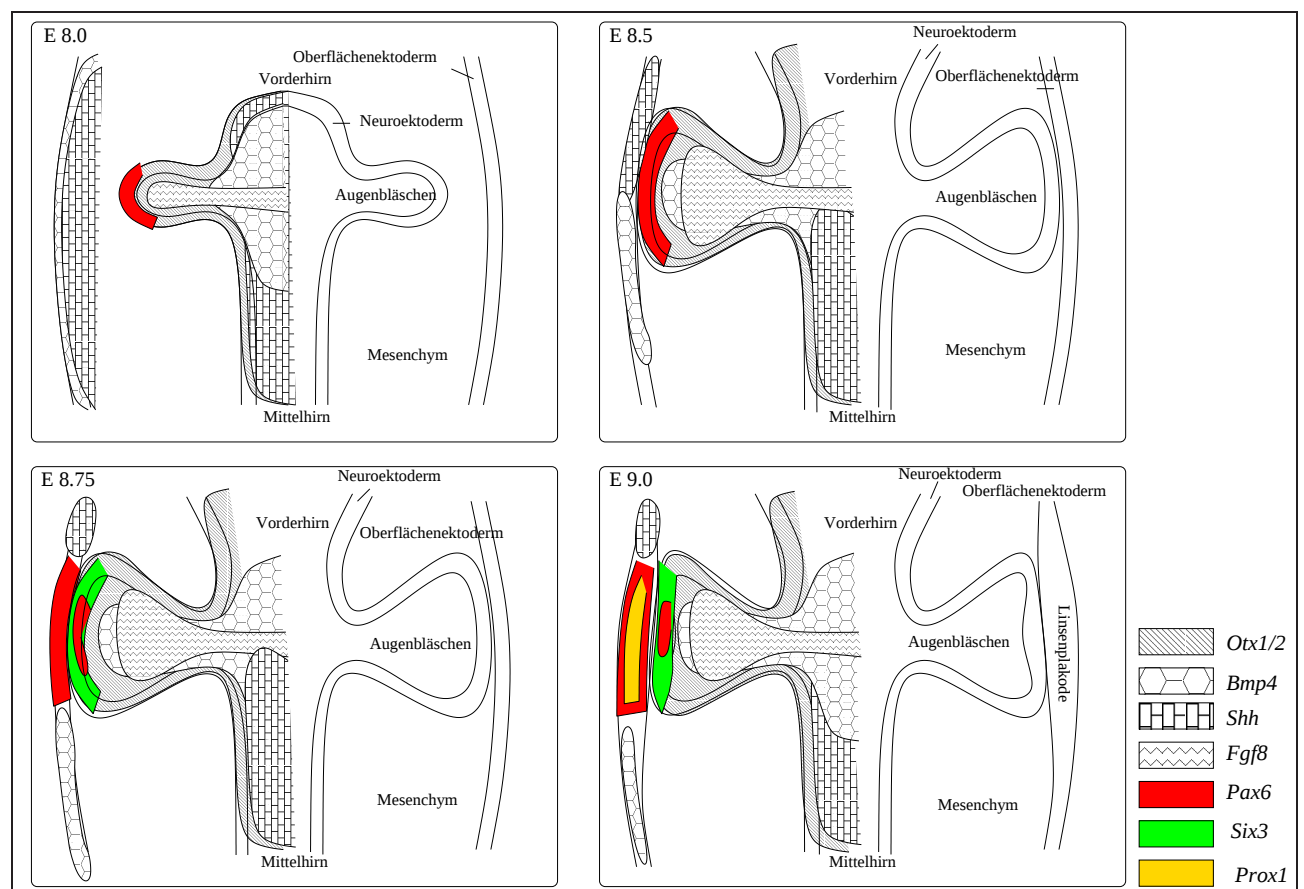


Abbildung 3.2: Augen- und Gehirnentwicklung in den Stadien E 8.0 - E 9.0

Alle hier gezeigten Expressionsmuster treten in beiden Gehirnhälften auf. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in der rechten Hälfte die entsprechenden Bezeichnungen und nur in der linken Hälfte die Expressionsmuster aufgeführt.

Durch die koordinierte Expression von *Shh*, *Fgf8*, *Bmp4* und *Otx2* [14, 55] bildet sich im zukünftigen Vorderhirn das Augenfeld heraus, das sich am Tag E 8.0 zum Augenbläschen weiterentwickelt hat. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die *Shh*-abhängige Expression von *Pax6* im Neuroektoderm des Vorderhirns [27], der zur weiteren Ausstülpung des Augenbläschen führt. Dieses Wachstum wird erst bei der Berührung des Oberflächenektoderms gestoppt (E 8.5). Nun beginnt die durch *Pax6* aktivierte Expression von *Six3* im Neuroektoderm. *Six3* inhibiert in diesem Stadium die *Pax6* Expression. Daraufhin geht die Konzentration an *Pax6* im Neuroektoderm zurück [27], während die Konzentration an *Six3* steigt. Durch einen Rückgang an *Shh* im Oberflächenektoderm wird *Pax6* im Stadium E 8.75 auch hier exprimiert [27]. Das führt zur Bildung der Linsenplakode aus dem Oberflächenektoderm und zur Expression von *Prox1* [95] (E 9.0)

Das Augenfeld hat die Fähigkeit, auf die Präsenz anderer Faktoren reagieren zu können, unter anderem *Shh* (*Sonic Hedgehog*), *Bmp4* (*Bone morphogenetic protein 4*) und *Otx2* [14, 55]. Die Produktion von *Shh* in der Mitte des Vorderhirns führt über einen Konzentrationsgradienten zur Migration von diencephalischen Vorläuferzellen, die das Augenfeld symmetrisch teilen [87]. Wird *Shh* nicht exprimiert, so sind zwar schwere Mißbildungen die Folge (Zyklopenauge [10]), der Sehapparat wird jedoch teilweise noch ausgebildet.

Nach der Teilung des Augenfeldes ist die Präsenz von *Otx2* für die Ausstülpung des Augenbläschens aus dem Neuroektoderm weiterhin notwendig (s. Abbildung 3.2 (E 8.0)). In diesem Stadium reguliert *Shh* die räumliche Aufteilung zwischen *Pax6* und *Pax2* (beides *Paired Homeobox* Gene), deren getrennte Expressionsmuster den distalen (spätere Retina und Linse) vom proximalen (späterer Augensiel und Sehnerv) Teil des optischen Systems abgrenzt [53].

Die Expression von *Pax6*: Voraussetzung für die Expression von *Pax6* ist die Abwesenheit von *Shh* im Augenbläschen, da *Shh* die *Pax6* Expression inhibiert [53]. Ausgelöst wird die *Pax6* Expression wahrscheinlich durch eine Signalkaskade, die auf *Fgf8* zurückgeht [20]. Steht kein funktionstüchtiges *Pax6* zur Verfügung, so entwickelt sich das Augenbläschen nicht weiter, wie mehrere *Pax6*^{-/-} Mausmutanten zeigen [25]. Bei Anwesenheit von *Pax6* wächst das Augenbläschen weiter, bis das Neuroektoderm in Kontakt mit dem Oberflächenektoderm tritt [4]. An dieser Stelle stoppt das Wachstum des Augenbläschens. Die Expression von *Shh* und *Bmp4* im Oberflächenektoderm verhindert in diesem Stadium eine *Pax6* Expression in diesem Gewebe und begrenzt zunächst die Produktion von *Pax6* auf das Neuroektoderm (s. Abbildung 3.2 (E 8.0, E 8.5)). Durch den Einfluß anderer Faktoren wie *Six3* (s. nächsten Abschnitt) geht die Konzentration an *Shh* im Oberflächenektoderm in den nächsten Stunden zurück und ermöglicht auch hier die Expression von *Pax6* (s. Abbildung 3.2 (E 8.75)). Die Anwesenheit von *Pax6* führt nun zur Bildung der Linsenplakode (Verdickung des Oberflächenektoderms) [4] (s. Abbildung 3.2 (E 9.0)).

Die Expression von *Six3* und *Prox1*: *Pax6* löst die Expression von *Six3* (*Homolog of sine oculis homeobox 3, Drosophila*) im Neuroektoderm aus [23]. Im Stadium E 8.75 inhibiert *Six3* zunächst die weitere *Pax6* Expression, so daß dessen Konzentration im Neuroektoderm des Augenbläschens sinkt [27]. Im weiteren Verlauf der Augenentwicklung ändert sich die Art der Wechselwirkung zwischen *Six3* und *Pax6* (positiv oder negativ) mehrfach [23]. Dies ist abhängig von zusätzlichen Faktoren, wie Groucho-Proteinen [51], *Bmp4* [2] und *Otx2* [55]. Durch dieses Zusammenspiel entwickelt sich das Neuroektoderm des Augenbläschens weiter zur zukünftigen Retina.

Die Expression von *Six3* ist für die Entwicklung von Linse und Retina von großer Bedeutung: Während ein Verlust der *Six3* Produktion zu einem Abbruch der Entwicklung des Prosencephalons führt [7, 45], so kann eine Überexpression von *Six3* die Bildung einer ektopischen Linse

bei Fischen herbeiführen [66].

Die *Six3* Expression kontrolliert während der Augenentwicklung eine Vielzahl von Prozessen, wogegen die Wirkung von *Prox1* (*Prospero-related homeobox 1*) hauptsächlich auf die Entstehung der Linse beschränkt ist. Die Anwesenheit von Pax6 in der Linsenplakode aktiviert die Expression von *Prox1* am Tag E 9.0 [4]. Fehlt die *Prox1* Expression in diesem Stadium, so beginnt die Linsenentwicklung zuerst normal, die weitere Differenzierung der Linsenfaserzellen findet jedoch nicht statt [95].

3.2.2 Die *Pitx3* Expression: Zur richtigen Zeit am richtigen Ort

Die Expression der bis jetzt beschriebenen Gene sorgten für die Ausstülpung des Augenbläschens aus dem Vorderhirn und die Vorbereitung des aufliegenden Oberflächenektoderms für die nun folgende Differenzierung von Linse, Retina und Sehnerv. Da es in dieser Arbeit um die Bedingungen geht, unter denen *Pitx3* exprimiert werden kann und den Einfluß, den die Expression von *Pitx3* auf die Linsenentwicklung hat, wird im folgenden besonders auf die Entwicklung der Linse eingegangen.

Zunächst wird der mögliche Einfluß verschiedener Transkriptionsfaktoren (vor allem die in dieser Arbeit näher untersuchten Ap2 α und Pax6) auf die *Pitx3* Expression beschrieben.

Ap2 α und die *Pitx3* Expression Für den *Pitx3* Promotor wurden zwei mögliche Bindungsstellen für Ap2 α vorhergesagt, die in der proximalen Promotorhälfte liegen (-548 bp und -586 bp, s. S. 36). Die möglichen Bindungsstellen wurden von der DNA-Bindungsdomäne abgeleitet, die allen Angehörigen der Ap2-Familie gemein ist [12]. Im sich entwickelnden Embryo sind beide Transkriptionsfaktoren ab E 9.5 nachweisbar ([94] und Abbildung 2.14 auf S. 35), damit werden *Pitx3* und Ap2 α zeitlich zusammen exprimiert, wobei unklar ist, welcher der beiden Transkriptionsfaktoren zuerst exprimiert wird. Abbildung 2.14 (S. 35) bestätigt eine *Pitx3* Expression bereits an E 9.0, jedoch ist unbekannt, ob Ap2 α ebenfalls in diesem Stadium exprimiert wird. Bekannt ist, daß Ap2 α ab E 9.5 in der Linse exprimiert wird (Abbildung 2.7 auf S. 28). So hat Ap2 α die Möglichkeit, ab E 9.5 auf den *Pitx3* Promotor in der Linse einzuwirken.

Die durchgeführte Analyse der proximalen *Pitx3* Promotorhälfte zeigt keine signifikante Aktivierung oder Inhibierung dieses Abschnitts, weder im Wildtyp noch in *aphakia*. Da die Kontrollen

zur Ap2 α Expression in den co-transfizierten Zellen positiv sind, führt die Bindung von Ap2 α zu keiner Auswirkung auf die *Pitx3* Promotoraktivität (S. 41).

Bei der zweiten, distalen Promotorhälfte von *Pitx3* zeigt sich beim Wildtyp ebenfalls keine Veränderung der Aktivität. Dies entspricht den Erwartungen, da hier keine Bindungsstellen liegen sollten. Die Hemmung des (deletierten) Promotorfragments der Mutante wird durch die Anwesenheit von Ap2 α nur geringer, Ap2 α kann aber keine Aktivierung auslösen. An dieser Stelle des *Pitx3* Promotors ergibt sich durch die Deletion eine neue Sequenz [71], die der Ap2 α DNA-Bindungsdomäne zu 33% entspricht (Abbildung 3.3). Die Bindungsstärke scheint auszureichen, um eine signifikant geringere Hemmung dieses *Pitx3* Promotorabschnitts zu bewirken.



Abbildung 3.3: Bindung von Ap2 α an den *Pitx3* Promotor

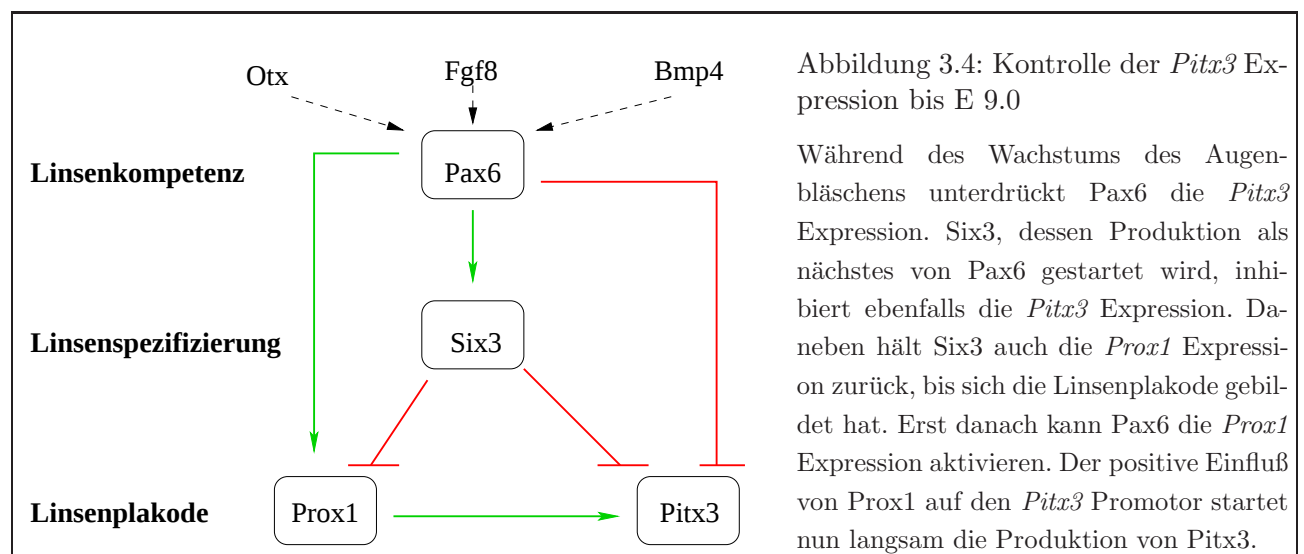
Die kleine Deletion im *Pitx3* Promotor führt zur oberen Sequenz, in der die Bruchstellen der Deletion überstrichen sind (nach [71]). Hier könnte Ap2 α an den fettgedruckten Basen binden.

Pax6 und die *Pitx3* Expression In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Pax6 eine inhibierende Wirkung auf den *Pitx3* Promotor hat (Abbildung 2.20 auf S. 41). Der Transkriptionsfaktor Pax6 hat in der Augenentwicklung sowohl einen aktivierenden (z.B. gegenüber *Six3*, *Prox1* [4] und *Cryab* [100]) als auch inhibierenden Einfluß auf die Expression von Genen. So trägt gerade die gegenseitige Repression zwischen Pax2 und Pax6 zur Ausbildung der Unterschiede zwischen proximalen und distalen Augenkomponenten bei [75]. Auch die Expression von *Crygf* wird durch die inhibierende Wirkung von Pax6 mitreguliert [100]. Die negative Wirkung auf den *Pitx3* Promotor könnte die *Pitx3* Expression in den Stadien E 8.0 bis E 9.5 unterdrücken, da zu dieser Zeit die Initiierung der Linsenentwicklung noch nicht stattgefunden hat, an der *Pitx3* beteiligt ist.

Expressionsanalysen von *Pax6* deuteten aber auch auf einen Einfluß von *Pitx3* auf die *Pax6* Expression hin (s. Kapitel 2.5 ab S. 33). Um die Frage zu klären, welcher der beiden Transkriptionsfaktoren in der Augenentwicklung zuerst auftritt und wie die Hierarchie zwischen ihnen

beschaffen ist, wurden *Pitx3*^{-/-} Mäuse (*ak*) mit *Pax6*^{+/-} (*AEY11*) gekreuzt und deren hetero- und homozygote Nachkommen phänotypisch untersucht. Der *aphakia* Phänotyp kann sich nur durchsetzen, wenn *Pitx3* komplett fehlt und *Pax6* zumindest heterozygot vorhanden ist. Wird *Pax6* nicht exprimiert, so bildet sich das Auge und damit auch die Linse nicht aus. Dieser Phänotyp entspricht demjenigen der *AEY11* Mäuse und ist unabhängig von der *Pitx3* Expression. Damit wird die Unabhängigkeit der frühen Augenentwicklung (bis zur Entstehung der Linsenplakode) von *Pitx3* bestätigt. Erst nachdem die Vorbereitungen zur Linsenentwicklung abgeschlossen sind, wird die *Pitx3* Expression gestartet und nimmt nun ihrerseits Einfluß auf die Transkription von *Pax6*.

Die zeitliche und räumliche Kontrolle der *Pitx3* Expression Die Ergebnisse zeigen, daß *Pax6* in der Regulationskaskade der Augenentwicklung über *Pitx3* steht. Außerdem wurde die Bedeutung der *Pax6* Expression in der sich differenzierenden Linsenplakode [4, 8] für die *Pitx3* Expression herausgearbeitet.



Die sich überlappenden Expressionsmuster von *Pax6* und *Pitx3* [4, 77, 90] geben *Pax6* die Möglichkeit, die *Pitx3* Expression während des Wachstums des Augenbläschens und der Initiierung der Linsenplakode zu unterdrücken. Die inhibierende Wirkung von *Pax6* auf *Pitx3* (Abbildung 2.20 auf S. 41) hält dessen Expression solange zurück, bis die Voraussetzungen der Linsenentwicklung durch die Wechselwirkung von *Pax6*, *Six3* und *Prox1* abgeschlossen sind

(s. Abbildung 3.4). Auch *Six3*, das ca. 24 Stunden vor *Pitx3* zum ersten Mal im Neuroektoderm nachzuweisen ist, verhindert die *Pitx3* Expression zu diesem Zeitpunkt [61]. Erst durch die Produktion von *Prox1* in der Linsenplakode wird der *Pitx3* Promotor aktiviert [61]. Da *Six3* und *Prox1* ebenfalls von Pax6 aktiviert werden [4], wird sichergestellt, daß *Pitx3* zur richtigen Zeit am richtigen Ort exprimiert wird. Die *Pitx3* Expression ist also direkt und indirekt von Pax6 abhängig, wobei die Menge an vorhandenem Pax6 keine Rolle spielt (s. Kapitel 2.5 ab S. 46), sondern vielmehr die Tatsache, ob Pax6 die Augenentwicklung bis zum Beginn der Linsenentwicklung vorantreibt. Der Transkriptionsfaktor *Ap2α* ist an der Kontrolle der *Pitx3* Expression nicht beteiligt (Abbildung 2.20 auf S. 41).

3.2.3 Auswirkungen der *Pitx3* Expression auf die Augen-und Gehirnentwicklung

Wie bereits mehrfach beschrieben, verläuft die Entwicklung von Auge und Gehirn parallel, sobald sich das Augenbläschen vom Vorderhirn abgegrenzt hat. Da sich in dieser Arbeit gezeigt hat, daß die *Pitx3* Expression sowohl Auswirkungen auf die Entwicklung des Auges, als auch des Mesencephalons hat, wird zunächst auf die weitere Augenentwicklung eingegangen. Im Anschluß daran werden die Ereignisse im Mesencephalon näher beschrieben.

Auswirkungen der *Pitx3* Expression auf die Augenentwicklung

Die mit der *Pitx3* Produktion beginnenden Schritte der Augenentwicklung sind in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt. Die Erläuterungen zu den einzelnen Bildern wären als Bildunterschriften zu umfangreich und sind deswegen in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

Embryonalstadium E 9.5 Mit der Expression von *Pitx3* beginnt die eigentliche Linsenentwicklung. Wahrscheinlich ist *Pitx3* in diesem Stadium auf die Linsenplakode beschränkt, da die Anwesenheit von *Six3* in den angrenzenden Geweben (Neuroektoderm) negativ auf den *Pitx3* Promotor wirkt [61]. Aufgrund der inhibierenden Wirkung von Pax6 wird *Pitx3* zunächst nur schwach exprimiert (Abbildung 2.14 auf S. 35). Der in diesem Stadium beobachtete, negative Einfluß von *Pitx3* auf die *Pax6* Expression (s. Abbildung 2.11 auf S. 32) verringert die Pax6 Konzentration als zumindest indirekte Folge der beginnenden *Pitx3* Expression. Damit stehen

weniger inhibierende Pax6 Proteine zur Verfügung und die *Pitx3* Expression wird stärker. Durch diesen Regulationskreislauf aktiviert sich Pitx3 indirekt selbst.

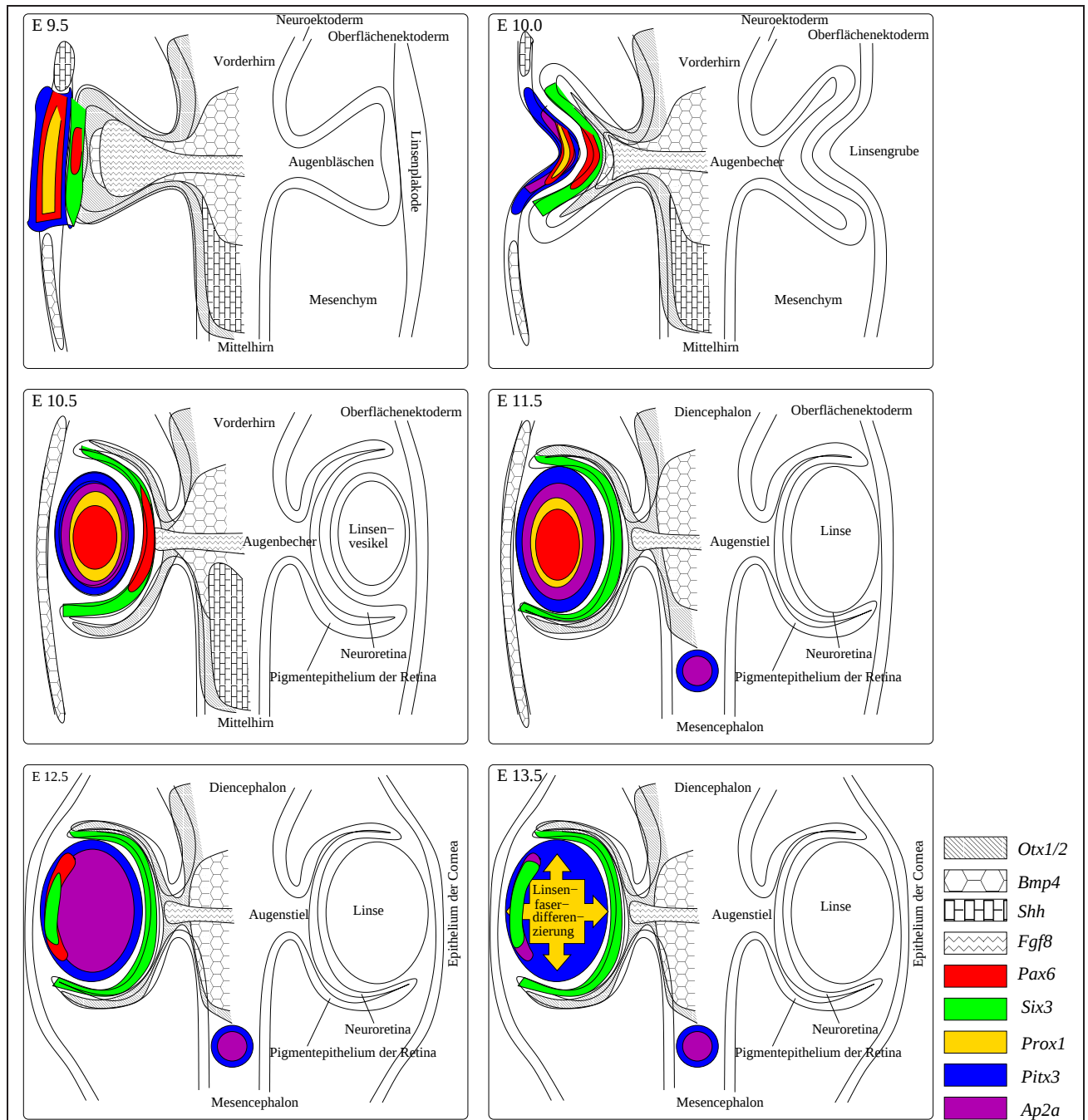


Abbildung 3.5: Augen- und Gehirnentwicklung in den Stadien E 9.5 - E 13.5

Alle hier gezeigten Expressionsmuster treten in beiden Gehirnhälften auf. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in der rechten Hälfte die entsprechenden Bezeichnungen und nur in der linken Hälfte die Expressionsmuster aufgeführt. Die Expressionsmuster und Wechselwirkungen der verschiedenen Teilnehmern werden ausführlich von Seite 60 an beschrieben.

Die Produktion von Pitx3 hat auch eine negative Wirkung auf *Ap2α* (s S. 27). Der Transkriptionsfaktor *Ap2α* ist allgemein an der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt [74, 104]. Speziell in der Augenentwicklung wirkt *Ap2α* später als negativer Regulator in der Entwicklung der Linsenfaserzellen [93]. Diese Eigenschaft ist am Tag E 9.5 verfrüht, da sich das Zielgewebe noch nicht ausgebildet hat. So könnte Pitx3 im Stadium E 9.5 die *Ap2α* Expression bis zur Bildung der Linsenfaserzellen unterdrücken und so an der zeitlichen Koordination der *Ap2α* Expression beteiligt sein.

Fehlt die *Pitx3* Expression im Stadium E 9.5, so zeigt sich eine erhöhte Expression von *Agc1*. Das Proteoglycan *Agc1* ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Cornea und ist hier an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Die Cornea entwickelt sich allerdings erst in späteren Embryonalstadien, so daß Pitx3 hier eine verfrühte *Agc1* Expression verhindern könnte. Die Expression von *Agc1* in der Retina von Rattenembryos [69] deutet auf die Teilnahme von extrazellulären Glycoproteinen in der Morphogenese [44] in der sich entwickelnden Retina hin. So könnte Pitx3 die Expression von *Agc1* unterdrücken, um eine Fehldifferenzierung zu Retinagewebe zu verhindern.

Embryonalstadium E 10.0 Die Anwesenheit von Pax6 führt in diesem Stadium zur Einstülpung der Linsenplakode und zur Bildung der Linsengrube [4]. Weder Prox1 noch Pitx3 scheinen daran beteiligt zu sein, da sowohl in der *Pitx3*^{-/-} (*aphakia*) Maus [26], als auch in der *Prox1*^{-/-} Mutante [95] dieser Schritt stattfindet. Um diesen Zeitpunkt herum beginnt sich die Wechselwirkung zwischen Pitx3 und *Pax6* bzw. *Ap2α* zu verändern. Der bis jetzt negative Einfluß von Pitx3 auf die *Pax6* bzw. *Ap2α* Expression schwächt sich langsam ab und wird durch eine aktivierende Wirkung von Pitx3 auf die beiden Gene abgelöst, wie sie am Tag E 10.5 zu sehen ist (s S. 33 und S. 27). Das führt zu einem Anstieg der Pax6 Konzentration in der Linsenplakode und zu einer Expression von *Ap2α* in diesem Gewebe [94]. Mögliche Gründe für diesen Wechsel der Pitx3 Wirkung auf *Pax6* bzw. *Ap2α* werden in Kapitel 3.2.3 diskutiert.

Embryonalstadium E 10.5 Die Expressionsgebiete von *Otx*, *Bmp4* und *Fgf8* beschränken sich nun zunehmend auf den proximalen Teil des Augenbechers und tragen hier im Zusammenspiel mit Six3 und Pax6 zur Ausbildung der Neuroretina, des Pigmentepitheliums der Retina und später zur Entstehung des Augenstiels und des Sehnervs bei [54].

Die sich einstülpende Linsenplakode bildet bereits kurze Zeit später das Linsenvesikel, über das sich das Oberflächenektoderm wieder schließt. Im Oberflächenektoderm sorgt unter anderem *Bmp4* zur Ausbildung des späteren Cornea-Epitheliums [42]. Wie der Name andeutet, ist das Linsenbläschen in diesem Stadium noch nicht mit Gewebe gefüllt. Durch die Einwirkung von Pitx3, Pax6, Prox1 und Ap2 α füllen die Zellen der ehemaligen Linsenplakode das Innere des Bläschens auf, bis das Lumen an E 13.5 verschwunden ist. Entsprechend vergrößern sich auch die Produktionsareale der vier Proteine vom Rand des Linsenvesikels auf die gesamte Linse [78, 90, 95] (s. S. 31). Ab diesem Stadium trägt auch Maf zum Wachstum der posterioren Linsenzellen bei [65], die später die primären Linsenfaserzellen bilden.

Embryonalstadium E 11.5 Nachdem die Bildung der Linse nun abgeschlossen ist, dehnen sich die Zellen der posterioren Linsenwand immer weiter aus und bilden so in den nächsten Tagen die primären Linsenfaserzellen. An dieser Entwicklung sind hauptsächlich Ap2 α , Maf, Pax6, Pitx3 und Prox1 beteiligt [15, 26, 65, 93, 95].

Die aktivierende Wirkung von Pitx3 auf die Ap2 α Expression macht sich in diesem Stadium auch im sich entwickelnden Mittelhirn bemerkbar. Hier ist *Pitx3* im Bereich der sich entwickelnden *Substantia nigra* nachweisbar [64, 80, 81], wo es zur Bildung der dopaminergen Neuronen beiträgt [34, 60]. Die Neuronen dieses Bereiches sind ein wesentlicher Bestandteil des lokomotorischen Systems, mit dem Bewegungen koordiniert werden. In diesem Bereich konnte auch Ap2 α nachgewiesen werden (s. S. 30), womit die Möglichkeit besteht, daß Ap2 α ebenfalls an der Entwicklung dieses Gehirnteils beteiligt ist. Fehlt Ap2 α in Mäusen, so zeigen diese bei der Geburt Deformationen des Schädels und des Gesichts (Exencephalie, Anophthalmie) [74, 94, 104]. Fehlt *dAP2* in *Drosophila* (hier ist nur ein Vertreter der Familie bekannt), so zeigen die Mutanten unter anderem Störungen im protocerebralen Zentralkomplex, der für die Koordination der Bewegung zuständig ist [58]. Ein anderer Hinweis ist die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors Ap2 α , an den Promotor des *Th* Gens (*Tyrosin-Hydroxylase*) zu binden [63]. Dieses Enzym ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der dopaminergen Neuronen, und ist in seiner Expression von Pitx3 abhängig [46]. Somit könnte die Einwirkung von Ap2 α auf die Bildung der Tyrosin-Hydroxylase ebenfalls einen positiven Einfluß auf die Bildung des lokomotorischen Systems nehmen.

Embryonalstadien E 12.5 und E 13.5 Zu Beginn dieser Zeitspanne verlagert sich die Expression von *Pax6* in den anterioren Teil der Linse. Hier aktiviert *Pax6* die *Six3* Expression, die wiederum die Produktion von $Ap2\alpha$ in diesen Teil zieht. Durch dieses Zusammenspiel beginnt die Ausbildung der sekundären Linsenfaserzellen am Linsenäquator, die die Linse weiter wachsen lassen. Die Zellkerne der Linsenfaser wandern zur Zellmitte und lösen sich während der letzten Tage der Linsenentwicklung auf (E 17.5 bis zur Geburt). Die Linse wird immer durchsichtiger, was durch die Bildung von Kristallinproteinen verursacht wird [15]. Die Expression der γ -Kristallingene beginnt an E 12.5 in der Linse und wird durch das Zusammenspiel von *Six3*, *Prox1*, $Ap2\alpha$ und *Pitx3* gesteuert: *Six3* unterdrückt die Bildung der γ -Kristalline bis zur Bildung des Linsenvesikels [48]. Hier wird *Six3* von $Ap2\alpha$ abgelöst, das ebenfalls als negativer Transkriptionsfaktor wirkt [93]. Durch die Verlagerung der *Six3* und $Ap2\alpha$ Expression in den anterioren Linsenteil ([75] und S. 31) fällt diese Inhibierung im posterioren Teil weg. Die Anwesenheit von *Prox1* und *Pitx3* führt nun zur Expression der Kristallingene: *Prox1* wirkt aktivierend, zumindest auf den γ -Kristallinpromotor [48], und bei Abwesenheit von *Pitx3* fehlen die γ -Kristalline ebenfalls [26].

Der Einfluß von *Pitx3* auf die weitere Augenentwicklung *Pitx3* ist in eine komplizierte Kontrollkaskade eingebunden. In Abbildung 3.6 sind die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen *Pitx3* und anderen Entwicklungsfaktoren ab Embryonalstadium E 9.5 zusammengefaßt.

Aufgrund des negativen Einflusses von *Pax6* (S. 41) und *Six3* [61] beginnt die *Pitx3* Expression im Embryonalstadium E 9.5 nur langsam. Die geringe *Pitx3* Konzentration nimmt innerhalb der nächsten Stunden schnell zu, da sich *Pitx3* indirekt selbst aktiviert, indem es (zumindest indirekt) negativ auf die *Pax6* Expression wirkt (S. 32) und so die Konzentration der inhibierenden *Pax6* Proteine reduziert. Zu diesem Zeitpunkt unterdrückt *Pitx3* auch die $Ap2\alpha$ Expression (S. 28). Der negative Einfluß von *Pitx3* auf *Pax6* und $Ap2\alpha$ geht innerhalb der nächsten 24 Stunden in einen Aktivierenden über (S. 34 und S. 31), die zu einem Anstieg der *Pax6* Konzentration und zu einer Expression von $Ap2\alpha$ in der Linsenplakode führt [94]. Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen zeigen eine Veränderung der Expressionsgebiete, lassen aber keine Aussagen über direkte Interaktionen auf molekularer Ebene zu. Die Umkehrung der Wirkungsart könnte so durch eine, zumindest teilweise, indirekte Einflußnahme von *Pitx3* erklärt werden.

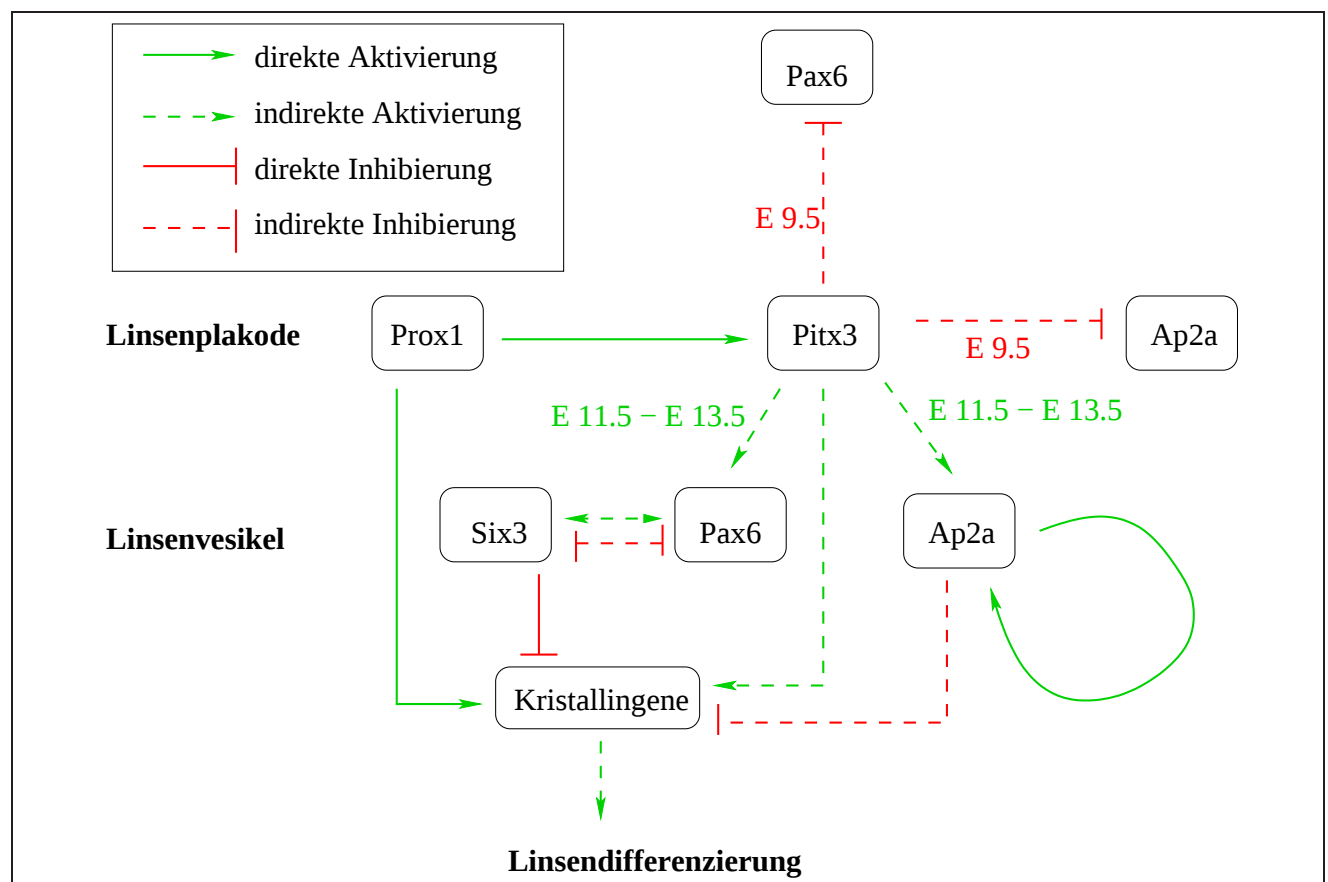


Abbildung 3.6: Pitx3 in der Augenentwicklung ab Stadium E 9.5

Sobald Pitx3 in der Linsenplakode produziert wird, wirkt es zunächst negativ auf die *Pax6* Expression ein und aktiviert sich so selbst (s. Abbildung 3.4). Zu diesem Zeitpunkt unterdrückt Pitx3 auch die *Ap2α* Expression. Dieser negative Einfluß geht innerhalb der nächsten 24 Stunden in eine Aktivierung von *Pax6* und *Ap2α* über. Deren Expression ist ab Tag E 11.5 für die Produktion der Kristalline und die weitere Linsendifferenzierung wichtig.

Dazu lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

- Eine ausschließlich direkte Interaktion zwischen Pitx3, *Pax6* und *Ap2α* kann ausgeschlossen werden. In diesem Fall muß der Einfluß von Pitx3 immer das gleiche Vorzeichen tragen (positiv oder negativ). Eine Veränderung ohne äußeren Einfluß ist nicht möglich.
- Wenn Pitx3 direkt negativ auf die Transkription von *Pax6* bzw. *Ap2α* wirken würde, so kann dieser Effekt durch den Einfluß anderer Faktoren geschwächt werden, deren Expression selbst von Pitx3 abhängt.
 - So könnte die Aktivierung von *Pax6* bzw. *Ap2α* durch kompetitive Hemmung des Pitx3 Proteins an den entsprechenden Promotorabschnitten oder durch einen unter-

schiedlich starken Einfluß von Pitx3 und dem anderen Faktor erreicht werden.

- Eine andere Möglichkeit besteht in der Möglichkeit einer allosterischen Veränderung der DNA-Bindungsdomäne von Pitx3. In diesem Fall müßte immer genügend unverändertes Pitx3 zur Aktivierung weiterer Expressionsmuster zur Verfügung stehen.
- Wenn Pitx3 indirekt negativ auf die Transkription von *Pax6* bzw. *Ap2α* wirken würde, so könnte eine direkte Aktivierung von *Pax6* bzw. *Ap2α* durch Pitx3 die Einwirkung anderer Faktoren auf die Promotoren verdrängen. Ist dieser Effekt abhängig von der Pitx3 Konzentration, so würde dies eine gewisse Zeit dauern, bis die Aktivierung voll zum Tragen käme. Damit ließe sich der Übergang zwischen der Inhibierung am Tag E 9.5 und der Aktivierung in Stadium E 11.5, mit dem stark abgeschwächten Einfluß von Pitx3 in Stadium E 10.5 (s. S. 28 und S. 32) erklären. Ein ähnliches Szenario wird bei der gegenseitigen Regulation von *Pax6* und *Six3* vermutet [23].
- Wenn Pitx3 sowohl indirekt negativ als auch indirekt positiv auf die *Pax6* bzw. *Ap2α* Expression wirken würde, so ließe sich der Wechsel zwischen Inhibierung und Aktivierung am einfachsten erklären. Die OAR Region des Pitx3 Proteins könnte an einer Protein-Protein- Interaktion beteiligt sein [21], so daß der Ausfall eines Kofaktors genügen würde, um die beschriebenen Veränderung hervorzurufen. Der Ausfall könnte durch die Einwirkung weiterer Kofaktoren ausgelöst werden. Bei den Kofaktoren könnte es sich z.B. um Sox2 (*SRY-box containing gene 2*) handeln [38], das in diesem Stadium in der Linsenplakode exprimiert wird [20]. Auch Six3 könnte daran beteiligt sein, da dieser Transkriptionsfaktor einen positiven Einfluß auf den *Ap2α* Promotor hat (S. 46).

Wird *Ap2α* einmal exprimiert, so erhöht es die eigene Produktion selbst (S. 46) und steht so für die weitere Linsendifferenzierung zur Verfügung.

Die *Pitx3* Expression wirkt also zum einen auf *Pax6* zurück, die in der Regulationskaskade der Augenentwicklung über *Pitx3* stehen und reguliert so dessen Expressionsmuster. Zum anderen nimmt *Pitx3* Einfluß auf *Ap2α*, und ist unter anderem dadurch an der weiteren Entwicklung der Augenlinse beteiligt.

Auswirkungen der *Pitx3* Expression auf die Gehirnentwicklung

Wie in den letzten Jahren immer klarer wurde, ist die *Pitx3* Expression für die Bildung der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* unerlässlich [64, 80]. Diese Untergruppe der dopaminergen Neuronen entsteht, zusammen mit denen des ventralen-tegmentalen Neuronenfeldes und des *Nucleus ruber* aus dem dopaminergen Neuronenfeld des Mesencephalons. Gemeinsam bilden die drei Gruppen das mesencephalitische System, das das Gefühls- und Motivationsverhalten (ventrales-tegmentales Neuronenfeld und *Nucleus ruber*), sowie die Bewegungsinitiation (*Substantia nigra*) kontrolliert.

Ungeklärt ist, wie die *Pitx3* Expression im Mesencephalon gesteuert wird. Bei der Entwicklung dieses Gehirnbereiches stimulieren *Shh* und *Fgf8* Vorläuferzellen, aus denen sich später dopaminerge Neuronen entwickeln [101]. Diese beiden Gene führen in der Augenentwicklung zur Expression von *Pax6*. *Pax6* wird im Gehirn auch exprimiert und zwar im entstehenden Mesencephalon im Stadium E 10.5 (Abbildung 2.11 auf S. 32). Hypothetisch könnte *Pax6*, analog zur Augenentwicklung, eine *Pitx3* Expression im Hinterhirn bewirken. Durch Migration *Pitx3* exprimierender Zellen in diesem Stadium (wie sie ab E 11.5 im Mesencephalon geschieht [80]) könnte *Pitx3* in den Bereich des Mesencephalons gelangen, in dem sich die dopaminergen Neuronen bilden.

Fest steht, daß erst die *Pitx3* Expression die Entstehung der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* ermöglicht [64, 80]. Die anderen Neuronenfelder des Mesencephalons werden dagegen auch in Abwesenheit von *Pitx3* gebildet [64]. Somit muß *Pitx3* spezielle Faktoren in der sich bildenden *Substantia nigra* aktivieren. Einer dieser Faktoren könnte *Ap2α* sein, da sich die beiden Expressionsgebiete von *Pitx3* und *Ap2α* im dopaminergen Neuronenfeld des Mesencephalons ab Stadium E 11.5 überlappen ([81] und S. 29). Die Genexpressionsanalysen bestätigen außerdem den (zumindest indirekt) aktivierenden Einfluß von *Pitx3* auf die *Ap2α* Expression (S. 24). Beide Transkriptionsfaktoren können an den Promotor der *Th* (*Tyrosinhydroxylase*) binden und so eventuell deren Expression beeinflussen. Die Tyrosinhydroxylase katalysiert den initialisierenden und limitierenden Schritt bei der Synthese der Catecholamine, zu denen auch Dopamin gehört. Findet die Aktivierung von *Th* in der Maus nicht statt, so sterben die Embryonen zwischen den Stadien E 11.5 und E 15.5 [105]. Es besteht die Möglichkeit, daß die *Pitx3* Expression zusammen mit der oder über die Expression von *Ap2α* Auswirkungen auf die

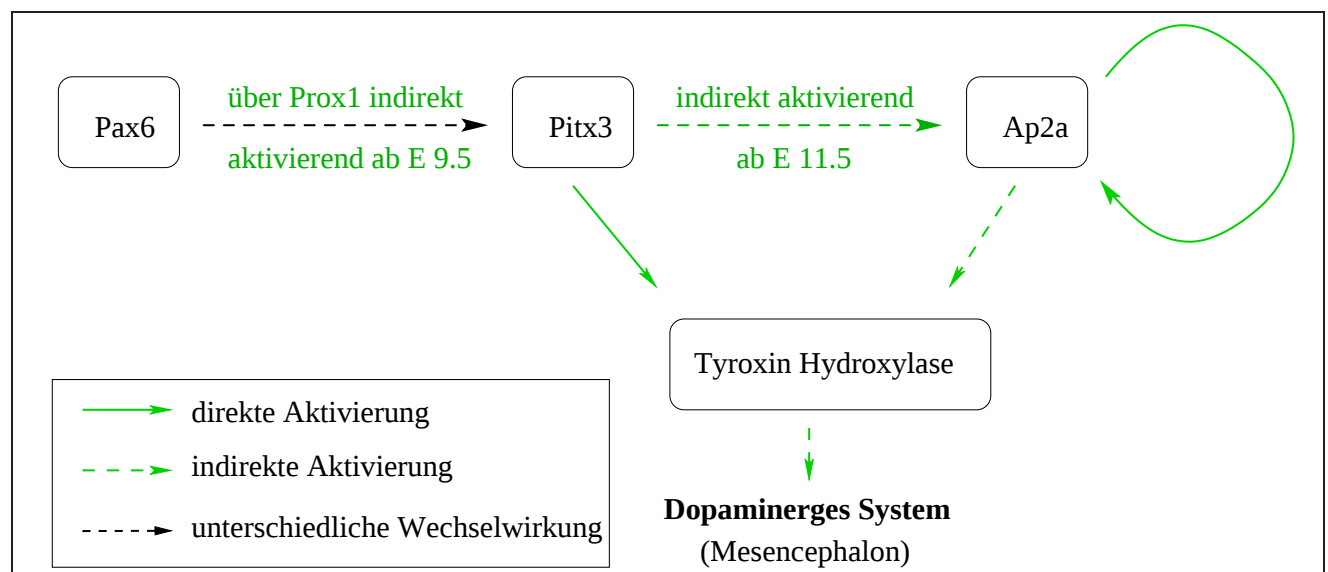


Abbildung 3.7: Der Einfluß von Pax6 und Pitx3 auf die *Ap2α* Expression

In der Augenentwicklung reguliert Pax6 die *Pitx3* Expression direkt über Wechselwirkung mit dem *Pitx3* Promotor und indirekt über andere Transkriptionsfaktoren wie Prox1. Pitx3 wiederum aktiviert die *Ap2α* Expression ab dem Stadium E 11.5. Somit beeinflusst Pax6 indirekt über Pitx3 die *Ap2α* Expression. Diese Regulationskaskade könnte auch in der Entwicklung des Mittelhirns eine Rolle spielen. Hier sind Pitx3 und Ap2α an der Produktion der Tyrosin-Hydroxylase beteiligt. Dieses Enzym ist für die Bildung dopaminergener Neuronen notwendig. Damit tragen Pitx3 und Ap2α zur Bildung des lokomotorischen Systems im Mesencephalon bei.

Expression der *Th* hat (s. Abbildung 3.7).

Eine andere mögliche Auswirkung der *Pitx3* Expression auf die Entwicklung der *Substantia nigra* ist die Aktivierung von *Tfr*, dessen Protein am Transport von Eisen über die Blut-Hirn-Schranke des Gehirns beteiligt ist [35, 59]. Eisen ist ein wichtiger Kofaktor bei der Myelinisierung und der Synthese von Neurotransmittern (wie Dopamin) und ist im Gehirn in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden, die vom Alter abhängt. Eine der höchsten Eisenkonzentrationen, die vom Alter relativ unabhängig ist, findet sich in der *Substantia nigra* [72]. Es besteht die Möglichkeit, daß Pitx3 indirekt über die Expression von *Tfr* die Eisenaufnahme in die entstehende *Substantia nigra* positiv beeinflusst und auch auf diese Weise die Funktion der dopaminergen Neuronen unterstützt.

3.3 AUSBLICK

Diese Arbeit hat einige Querverbindungen im weiten Netz der Regulationskaskade der Augenentwicklung aufgedeckt. Interessanterweise stellte sich aber auch heraus, daß Gene wie *Pax6*, *Pitx3* und *Ap2α* nicht nur in der Augenentwicklung eine Rolle spielen. Gerade der mögliche Einfluß von *Pax6* und *Ap2α* auf die Gehirnentwicklung wirft ein neues Licht auf den Aufgabenbereich dieser Gene. Hier bieten sich einige Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen:

- So stellt sich die Frage, welche Faktoren die *Pitx3* Expression im Mesencephalon auslösen. Wenn wirklich Pax6 daran beteiligt sein sollte, ist dessen Einbindung in Regulationskreisläufe neu zu überdenken.
- Auch der Zusammenhang zwischen *Pitx3* und *Ap2α* und deren Beteiligung an der Entwicklung des mesencephalitischen Systems bedarf noch weiterer Aufklärung.
- Außerdem dürfte die Überprüfung der in dieser Arbeit nur oberflächlich gestreiften Zusammenhänge zwischen *Pitx3* und ebenfalls im Gehirn exprimierten Genen wie *Tfr*, *Ttr*, *Spla* und *Glp1r* interessante Einblicke in deren Funktion geben.

Eine andere Richtung, der diese Arbeit Grundlage zu weiteren Forschungen bietet, ist die genauere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Pitx3 und anderen Systemen, wie der Transport von Lipiden oder der Blutgerinnung.

“ ES BLEIBT ALSO SPANNEND! “

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Acampora, D.; Mazan, S.; Lallemand, Y.; Avantaggiato, V.; Maury, M.; Simeone, A.; Brulet, P.: Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 1995 : 3279–3290
- [2] Adler, R.; Belecky-Adams, T.: The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. *Development* 129, 2002 : 3161–3171
- [3] Arendt, D.; Tessmar-Raible, K.; Snyman, H.; Dorresteyn, A.; Wittbrodt, J.: Ciliary Photoreceptors with a Vertebrate-Type Opsin in an Invertebrate Brain. *Science* 306, 2004 : 869–871
- [4] Ashery-Padan, R.; Marquardt, T.; Zhou, X.; Gruss, P.: Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 14, 2000 : 2701–2711
- [5] Bartha, J.; Comino-Delgado, R.; Arce, F.; Alba, P.; Brouillon, J.; Barahona, M.: Relationship between α -fetoprotein and fetal erythropoiesis. *J Reprod Med* 44, 1999 : 689–697
- [6] Kapitel VII, 45. In: Campbell, N.: *Biologie*. Spektrum, Akad. Verl., 1998
- [7] Carl, M.; Loosli, F.; Wittbrodt, J.: Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* 129, 2002 : 4057–4063
- [8] Chauhan, B.; Reed, N.; Zhang, W.; Duncan, M.; Kilimann, M.; Cvekl, A.: Identification of Genes Downstream of *Pax6* in the Mouse Lens Using cDNA Microarrays. *J Biol Chem* 277, 2002 : 11539–11548
- [9] Chi, C.; Martinez, S.; Wurst, W.; Martin, G.: The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2003 : 2633–2644
- [10] Chiang, C.; Litingtung, Y.; Lee, E.; Young, K.; Corden, J.; Westphal, H.; P, B.: Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 1996 : 407–413
- [11] Chow, R.; Altmann, C.; Lang, R.; Hemmati-Brivanlou, A.: Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 1999 : 4213–4222

- [12] Creaser, P.; D'Argenio, D.; Williams, T.: Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity. *Nucl Acids Res* 24, 1996 : 2597–2605
- [13] Crossley, P.; Martin, G.: The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121, 1995 : 439–451
- [14] Crossley, P.; Martinez, S.; Ohkubo, Y.; Rubenstein, J.: Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 108, 2001 : 183–206
- [15] Cvekl, A.; Piatigorsky, J.: Lens development and crystallin gene expression: many roles for *Pax-6*. *Bioessays* 18, 1996 : 621–630
- [16] Duggan, D.; Bittner, M.; Chen, Y.; Meltzer, P.; Trent, J.: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21, 1999 : 10–14
- [17] Duncan, M.; Kos, L.; Jenkins, N.; Gilbert, D.; Copeland, N.; Tomarev, S.: Eyes absent: a gene family found in several metazoan phyla. *Mamm Genome* 8, 1997 : 479–485
- [18] Dupe, V.; Lumsden, A.: Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* 128, 2001 : 2199–2208
- [19] Episkopou, V.; Maeda, S.; Nishiguchi, S.; Shimada, K.; Gaitanaris, G.; Gottesman, M.; Robertson, E.: Disruption of the Transthyretin Gene Results in Mice with Depressed Levels of Plasma Retinol and Thyroid Hormone. *PNAS* 90, 1993 : 2375–2379
- [20] Faber, S.; Dimanlig, P.; Makarenkova, H.; Shirke, S.; Ko, K.; Lang, R.: Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128, 2001 : 4425–4438
- [21] Furukawa, T.; Kozak, C.; Cepko, C.: *Rax*, a novel paired-type homoeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Nat Acad Sci USA* 94, 1997 : 3088–3093
- [22] Gage, P.; Suh, H.: The bicoid-related *Pitx* gene family in development. *Mamm Genome* 10, 1999 : 197–200
- [23] Goudreau, G.; Petrou, P.; Reneker, L.; Graw, J.; Löster, J.; Gruss, P.: Mutually regulated expression of Pax6 and Six3 and its implications for the Pax6 haploinsufficient lens phenotype. *PNAS* 99(13), 2002 : 8719–8724
- [24] Graw, J.: Mouse models of congenital cataract. *Eye* 13, 1999 : 438–444
- [25] Graw, J.; Löster, J.; Puk, O.; Münster, D.; Soewarto, D.; Fuchs, H.; Meyer, B.; Nürnberg, P.; Pretsch, W.; Selby, P.; Favor, J.: Three novel *Pax6* alleles in the mouse leading to the same small-eye phenotype due to different consequences at target promoters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* , 2004. – submitted

- [26] Grimm, C.; Chatterjee, B.; Favor, J.; Immervoll, T.; Löster, J.; Klopp, N.; Sandulache, R.; Graw, J.: Aphakia (ak), a mouse mutation affecting early eye development: fine mapping, consideration of candidate genes and altered *Pax6* and *Six3* gene expression pattern. *Dev Genet* 23, 1998 : 299–316
- [27] Grindley, J.; Davidson, D.; Hill, R.: The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121, 1995 : 1433–1442
- [28] Gros, R.; You, X.; Baggio, L.; Kabir, G.; Sadi, M.; Mungrue, I.; Parker, T.; Huang, Q.; Drucker, D.; Husain, M.: Cardiac Function in Mice Lacking the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. *Endocrinology* 144, 2003 : 2242–2252
- [29] Halder, G.; Callaerts, P.; Gehring, W.: Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1995 : 1788–1792
- [30] Hebert, J.; Hayhurst, M.; Marks, M.; Kulesa, H.; Hogan, B.; McConnell, S.: BMP ligands act redundantly to pattern the dorsal telencephalic midline. *Genesis* 35, 2003 : 214–219
- [31] Hebert, J.; Mishina, Y.; McConnell, S.: BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* 35, 2002 : 1029–1041
- [32] Hill, R.; Favor, J.; Hogan, B.; Ton, C.; Saunders, G.; Hanson, I.; Prosser, J.; Jordan, T.; Hastie, N.; van Heyningen, V.: Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox containing gene. *Nature* 354, 1991 : 522–525
- [33] Ho, I.-C.; Arm, J.; Bingham, C.; Choi, A.; Austen, F.; Glimcher, L.: A Novel Group of Phospholipase A2s Preferentially Expressed in Type 2 Helper T Cells. *J Biol Chem* 276, 2001 : 18321–18326
- [34] Hwang, D.-Y.; Ardayfio, P.; Kang, U. J.; Semina, E.; Kim, K.-S.: Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of *Pitx3*-deficient aphakia mice. *Mol Brain Res* 114, 2003 : 123–131
- [35] Jong, G. de; Dijk, J. van; Eijk, H. van: The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 190, 1990 : 1–46
- [36] Kamachi, Y.; Kondoh, H.: Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens- specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol* 13, 1993 : 5206–5215
- [37] Kamachi, Y.; Uchikawa, M.; Tanouchi, A.; Sekido, R.; Kondoh, H.: Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.* 15, 2001 : 1272–1286
- [38] Kamachi, Y.; Uchikawa, M.; Tanouchi, A.; Sekido, R.; Kondoh, H.: Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15, 2001 : 1272–1286
- [39] Kaufman, M.; Bard, J.: *The anatomical basis of mouse development*. Academic Press, 1999

- [40] Keeler, C.: Retinal degeneration in the mouse is rodless retina. *J Hered* 57, 1966 : 47–50
- [41] Kim, J.; Li, T.; Ho, C.; Grusby, M.; Glimcher, L.: Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *PNAS* 96, 1999 : 3781–3785
- [42] Kim, W.; Mohan, R.; Mohan, R.; Wilson, S.: Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1999 : 1364–1372
- [43] Kunkel, E.; Butcher, E.: Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16, 2002 : 1–4
- [44] Kwiatkowska, D.; Kwiatkowska-Korczak, J.: [Adhesive glycoproteins of the extracellular matrix]. *Postepy Hig Med Dosw* 53, 1999 : 55–74
- [45] Lagutin, O.; Zhu, C.; Kobayashi, D.; Topczewski, J.; Shimamura, K.; Puelles, L.; Russell, H.; McKinnon, P.; Solnica-Krezel, L.; Oliver, G.: Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 2003 : 368–379
- [46] Lebel, M.; Gauthier, Y.; Moreau, A.; Drouin, J.: Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a highaffinity binding site. *J Neurochem* 77, 2001 : 558–558
- [47] Lengler, J.; Graw, J.: Regulation of the Human SIX3 Gene Promoter. *Biochem Biophys Res Comm* 287, 2001 : 372–376
- [48] Lengler, J.; Krausz, E.; Tomarev, S.; Prescott, A.; Quinlan, R. A.; Graw, J.: Antagonistic action of Six3 and Prox1 at the gamma-crystallin promoter. *Nucl Acids Res* 29, 2001 : 515–526
- [49] Li, X.; Perissi, V.; Liu, F.; Rose, D.; Rosenfeld, M.: Tissue-Specific Regulation of Retinal and Pituitary Precursor Cell Proliferation. *Science* 297, 2002 : 1180–1183
- [50] Loosli, F.; Winkler, S.; Wittbrodt, J.: Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13, 1999 : 649–654
- [51] Lopez-Rios, J.; Tessmar, K.; Loosli, F.; Wittbrodt, J.; Bovolenta, P.: Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family. *Development* 130, 2003 : 185–195
- [52] Malinina, N.; Konyukhov, B.: A study of the effect of mutant genes on crystallin synthesis in the developing mouse lens. III. Gene aphakia. *Ontogenez* 12, 1981 : 589–595
- [53] Marti, E.; Bovolenta, P.: Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25, 2002 : 89–96
- [54] Martinez-Morales, J.; Rodrigo, I.; Bovolenta, P.: Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays* 26, 2004 : 766–777

- [55] Martinez-Morales, J.; Signore, M.; Acampora, D.; Simeone, A.; Bovolenta, P.: Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128(11), 2001 : 2019–2030
- [56] Mathers, P.; Grinberg, A.; Mahon, K.; Jamrich, M.: The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 1997 : 603–607
- [57] Michal, G. (Hrsg.): *Biochemical Pathways, Biochemie-Atlas*. Heidelberg : Spektrum, Akad. Verl., 1999. – ISBN 3-86025-239-9
- [58] Monge, I.; Krishnamurthy, R.; Sims, D.; Hirth, F.; Spengler, M.; Kammermeier, L.; Reichert, H.; Mitchell, P.: Drosophila transcription factor AP-2 in proboscis, leg and brain central complex development. *Development* 128, 2001 : 1239–1252
- [59] Moos, T.; Morgan, E.: Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol* 20, 2000 : 77–95
- [60] Munckhof, P. van d.; Luk, K.; Ste-Marie, L.; Montgomery, J.; Blanchet, P.; Sadikot, A.; Drouin, J.: Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2003 : 2535–2542
- [61] Münster, D.: *Untersuchung des Pitx3 Promotors*, TU München, Diplomarbeit, 2001
- [62] Nagy, Z.; Misanin, J.: Visual perception in the retinal degenerate C3H mouse. *J Comp Physiol Psychol* 72, 1970 : 306–310
- [63] Norris, M.; Millhorn, D.: Hypoxia-induced Protein Binding to O(2)-responsive Sequences on the Tyrosine Hydroxylase Gene. *J Biol Chem* 270, 1995 : 23774–23779
- [64] Nunes, I.; Tovmasian, L.; Silva, R.; Burke, R.; Goff, S.: Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS* 100, 2003 : 4245–4250
- [65] Ogino, H.; Yasuda, K.: Induction of Lens Differentiation by Activation of a bZIP Transcription Factor, L-Maf. *Science* 280, 1998 : 115–118
- [66] Oliver, G.; Loosli, F.; Koster, R.; Wittbrodt, J.; Gruss, P.: Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mch Dev* 60, 1996 : 233–239
- [67] Pfaffl, M.; Horgan, G.; Dempfle, L.: Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* 30, 2002 : e36
- [68] Pittler, S.; Baehr, W.: Identification of a Nonsense Mutation in the Rod Photoreceptor cGMP Phosphodiesterase beta-Subunit Gene of the rd Mouse. *PNAS* 88, 1991 : 8322–8326
- [69] Popp, S.; Maurel, P.; Andersen, J.; Margolis, R.: Developmental changes of aggrecan, versican and neurocan in the retina and optic nerve. *Exp Eye Res* 79, 2004 : 351–356

- [70] Quadro, L.; Hamberger, L.; Colantuoni, V.; Gottesman, M.; Blaner, W.: Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Asp Med* 24, 2003 : 421–430
- [71] Rieger, D.; Reichenberger, E.; McLean, W.; Sidow, A.; Olsen, B.: A double-deletion mutation in the *Pitx3* gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* 72, 2001 : 61–72
- [72] Roskams, A.; Connor, J.: Iron, Transferrin, and Ferritin in the Rat Brain During Development and Aging. *J Neurochem* 63, 1994 : 709–709
- [73] Sadaf, A.; Siddiqui, S.; Lestringant, G.; Frossard, P.: Apolipoprotein AI promoter variant in blood pressure determination. *Clin Genet* 61, 2002 : 314–316
- [74] Schorle, H.; Meier, P.; Buchert, M.; Jaenisch, R.; Mitchell, P.: Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381, 1996 : 235–238
- [75] Schwarz, M.; Cecconi, F.; Bernier, G.; Andrejewski, N.; Kammandel, B.; Wagner, M.; Gruss, P.: Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127, 2000 : 4325–4334
- [76] Semina, E.; Ferrell, R.; Mintz-Hittner, H.; Bitoun, P.; Alward, W.; Reiter, R.; Funkhauser, C.; Daack-Hirsch, S.; Murray, J.: A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* 19, 1998 : 167–170
- [77] Semina, E.; Reiter, R.; Murray, J.: Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 6, 1997 : 2109–2116
- [78] Semina, E.; Murray, J.; Reiter, R.; Hrstka, R.; Graw, J.: Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* 9, 2000 : 1575–1585
- [79] Kapitel 33. In: Seyffert, W. (Hrsg.): *Lehrbuch der Genetik*. G. Fischer, 1998
- [80] Smidt, M.; Smits, S.; Burbach, J.: Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318, 2004 : 35–43
- [81] Smidt, M.; Schaick, H. van; Lanctot, C.; Tremblay, J.; Cox, J.; Kleij, A. van d.; Wolterink, G.; Drouin, J.; Burbach, P.: A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *PNAS* 94, 1997 : 13305–13310
- [82] Soifer, S.; Peters, K.; O’Keefe, J.; S, C.: Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol* 144, 1994 : 60–69
- [83] Stolen, C.; Jackson, M.; Griep, A.: Overexpression of FGF-2 modulates fiber cell differentiation and survival in the mouse lens. *Development* 124, 1997 : 4009–4017

- [84] Tachibana, M.; Takeda, K.; Nobukuni, Y.; Urabe, K.; Long, J.; Meyers, K.; Aaronson, S.; Miki, T.: Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet* 14, 1996 : 50–54
- [85] Tvrdik, P.; Asadi, A.; Kozak, L.; Nuglozeh, E.; Parente, F.; Nedergaard, J.; Jacobsson, A.: *Cig30* and *Pitx3* genes are arranged in a partially overlapping tail-to-tail array resulting in complementary transcripts. *J Biol Chem* 274, 1999 : 26387–26392
- [86] Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F.: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, 2002 : research0034.1–research0034.11
- [87] Varga, Z.; Wegner, J.; Westerfield, M.: Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* 126, 1999 : 5533–5546
- [88] Varnum, D.; Stevens, L.: Aphakia, a new mutation in the mouse. *J Hered* 59, 1968 : 147–150
- [89] Varnum, D.; Stevens, L.: Report from the Jackson Lab. *Mouse News Lett* 53, 1975 : 35
- [90] Walther, C.; Gruss, P.: Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1991 : 1435–1449
- [91] Wang, W.; Soto, H.; Oldham, E.; Buchanan, M.; Homey, B.; Catron, D.; Jenkins, N.; Copeland, N.; Gilbert, D.; Nguyen, N.; Abrams, J.; Kershenovich, D.; Smith, K.; McClanahan, T.; Vicari, A.; Zlotnik, A.: Identification of a Novel Chemokine (CCL28), which Binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 275, 2000 : 22313–22323
- [92] Weinzimer, S.; Gibson, T.; Collett-Solberg, P.; Khare, A.; Liu, B.; Cohen, P.: Transferrin Is an Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Binding Protein. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2001 : 1806–1813
- [93] West-Mays, J.; Coyle, B.; Piatigorsky, J.; Papagiotas, S.; Libby, D.: Ectopic expression of AP-2 α transcription factor in the lens disrupts fiber cell differentiation. *Dev Biol* 245, 2002 : 13–27
- [94] West-Mays, J.; Zhang, J.; Nottoli, T.; Hagopian-Donaldson, S.; Libby, D.; Strissel, K.; Williams, T.: AP-2 α transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle. *Dev Biol* 206, 1999 : 46–62
- [95] Wigle, J.; Chowdhury, K.; Gruss, P.; Oliver, G.: Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Development* 121, 1999 : 318–322
- [96] Wilson, E.; Butcher, E.: CCL28 Controls Immunoglobulin (Ig)A Plasma Cell Accumulation in the Lactating Mammary Gland and IgA Antibody Transfer to the Neonate. *J Exp Med* 200, 2004 : 805–809

- [97] Wittbrodt, J.; Shima, A.; Schartl, M.: Medaka—a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* 3, 2002 : 53–64
- [98] Wride, M.; Mansergh, F.; Adams, S.; Everitt, R.; Minnema, S.; Rancourt, D.; Evans, M.: Expression profiling and gene discovery in the mouse lens. *Mol Vis* 9, 2003 : 360–396
- [99] Yan, W.; Lorke, D.; Laia, H.; Waia, S.; Kunga, L.; Chana, W.; Yew, D.: Critical Periods of Eye Development in Vertebrates with Special Reference to Humans. *Neuroembryology* 2, 2003 : 1–8
- [100] Yang, Y.; Chauhan, B.; Cveklova, K.; Cvekl, A.: Transcriptional Regulation of Mouse α B- and γ F-Crystallin Genes in Lens: Opposite Promoter-specific Interactions Between Pax6 and Large Maf Transcription Factors. *J Mol Biol* 344, 2004 : 351–368
- [101] Ye, W.; Shimamura, K.; Rubenstein, J.; Hynes, M.; Rosenthal, A.: FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 1998 : 755–766
- [102] Yui, Y.; Aoyama, T.; Morishita, H.; Takahashi, M.; Takatsu, Y.; Kawai, C.: Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I. *J Clin Invest* 82, 1988 : 803–807
- [103] Zanotti, G.; Berni, R.: Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 69, 2004 : 271–295
- [104] Zhang, J.; Hagopian-Donaldson, S.; Serbedzija, G.; Elsemore, J.; Plehn-Dujowich, D.; McMahon, A.; Flavell, R.; Williams, T.: Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381, 1996 : 238–241
- [105] Zhou, Q.; Quaife, C.; Palmiter, R.: Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374, 1995 : 640–643
- [106] Zwaan, J.; Kirkland, B.: Malorientation of mitotic figures in the early lens rudiment of aphakia mouse embryos. *Anat Rec* 182, 1975 : 345–354
- [107] Zwaan, J.; Webster, E.: Histochemical analysis of extracellular matrix material during embryonic mouse lens morphogenesis in an aphakic strain of mice. *Dev Biol* 104, 1984 : 380–389

— Anhang A —

MATERIAL

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Geräte und Chemikalien verwendet.

A.1 PRODUKTE

Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme sind beide Abkömmlinge des Laborstammes *E. coli* K12. Ihre genetische Ausstattung zusammen mit den verwendeten Plasmiden wird in Tabelle A.1 dargestellt.

Tabelle A.1: Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	genetische Ausstattung
DH5 α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZY A-$ <i>argFV169), $\Phi 80\delta lacZ\Delta M15$; (Stratagene).</i>
TopF10'	F'(<i>lacI^q</i> , Tn 10(<i>tet^r</i>)), <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrCB)$ $\Phi 80 lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7696$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL(Str^r)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> ; (Invitrogen).

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pCR.II-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pRL-SV40	Promega, Mannheim
pPLLucII	Y. Kamachi [36]

Chemikalien und Geräte

Die in Laboren üblicherweise vorhanden Chemikalien, wie SDS, NaCl, usw. wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und ROTH (Karlsruhe) bestellt. Die sonstigen Chemikalien wurden bei den in Tabelle A.2 angegebenen Firmen bestellt.

Tabelle A.2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
aa-dUTP	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Biozym, Hess.Oldendorf
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Blocking Reagent	Boehringer, Ingelheim
BM Purple AP substrate	Boehringer, Ingelheim
Cy3 / Cy5 mono-Reactive Dye Pack	Amersham, Freiburg
Denhardt's Solution	Sigma, Deisenhofen
DEPC	ROTH, Karlsruhe
DIG Ab coupled to AP	Boehringer, Ingelheim
DIG RNA Labelling Mix	Roche, Mannheim
DMSO (99,9 %)	Sigma, Deisenhofen
DNA Molekulargewichtsstandard 3 und 8	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Ladder 1 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Set	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dual-Luciferase TM Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Ethidiumbromid (20 mg/ml)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
FastRed TCR/ Naphthal Mix	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	GIBCO BRL, Karlsruhe
Fluorescein RNA Labelling Mix	Roche, Mannheim
Fluorescein Ab coupled to AP	Roche, Mannheim
Formamid (deionisiert)	ROTH, Karlsruhe
Glycogen	Roche, Mannheim
Heparin	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
JB-4 Embedding Kit	Polysciences, Eppelheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
NucleoSpinKit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	ROTH, Karlsruhe
Poly-dA	Sigma, Deisenhofen
Profection Mammalian Transfection Systems	Promega, Mannheim
Qiagen DNA Quick Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QUANTUM 333	PAA Laboratories, Cölbe
Rapid Ligation Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Salmon Testis Sperm	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10×), flüssig	GIBCO BRL, Karlsruhe
X-Gal	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Tabelle A.3: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	GIBCO BRL, Karlsruhe
Bakterienbrutschrank	WT-Binder, Bottmingen, Schweiz
Bakterienschüttler	Infors, München
Electrophoresis Power Supply (ST 304)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Feinwaage	Bay. Waagenbau Werkstätte, Utting
Forschungsmikroskop (Axioplan2)	Zeiss, Oberkochen
Glasmesserbrecher (EM KMR2)	Leica, Bensheim
Heizblock (Thermostat 5320)	Eppendorf, Hamburg
Kryotom (Jung Frigocut 2800N)	Leica, Bensheim
Kühltischzentrifuge(Universal 16R)	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B)	Sorvall, Bad Homburg
Lichtmikroskop (Axiovert 35)	Zeiss, Oberkochen
Real-Time PCR Gerär (LightCycler)	Roche, Mannheim
Luminometer (Autolumat LB953)	Berthold, Bundoora, Australien
Microarray-Scanner (GenePix)	Axon Instr., Union City, USA
Mikrotom (2055 Autocut)	Leica, Bensheim
Mikrotom (2065 Supercut)	Leica, Bensheim
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 40 Combo)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
PCR-Gerät (DNA Engine Tetrad PTC-225)	Biozym, Oldendorf
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Stereomikroskop (StemSV11)	Zeiss, Oberkochen
Thermoschüttler (Thermomixer 5436)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus, Hanau
Vacuum Manfold (Vac-Man TM)	Promega, Mannheim
Vakuumpzentrifuge	H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen
Vortexer (VortexGenie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zellkultur Brutschrank	Heraeus, Hanau
Zellkultur Sterilbank	Gelaire, Opera, Italien

Zellkultur

Bei allen Zellkulturexperimenten wurde die HEK-293 Nieren-Fibroblasten Zelllinie verwendet. Ausserdem kamen folgende Materialien aus Tabelle A.4 zur Anwendung.

Tabelle A.4: Zellkulturmaterial

Zellkulturmaterial	Hersteller
8 mm Zellkulturplatten (96 wells)	Nunc, Wiesbaden
250 ml Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
15 ml Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
50 ml Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
2 ml Reaktionsgefässe	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefässe	Eppendorf, Hamburg

Enzyme

Tabelle A.5: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Shrimp-Phosphatase	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protease E	ROTH, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease H	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Polymerasen (T3 / T7 / Sp6)	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Deisenhofen
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
SuperScript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	GIBCO BRL, Karlsruhe

Oligonucleotide

Die als Primer verwendeten Oligonucleotide wurden zum Teil von U. Linzner (AG BioDV, Institut für Experimentelle Genetik, GSF) hergestellt und zum Teil bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

Tabelle A.6: Oligonucleotide für PCR

Name		T	Nr.	Sequenz										Fragment	
Nachweis von Pitx3/Pax6 Doppelmutanten															
PitPsd	F	60°C	45076	TTC	GGT	GCG	GAG	AGT	AAG	G					1163 bp (wt)
	R		45077	TTG	GAT	TTG	GCT	CTG	ATG	GT					398 bp (<i>ak</i>)
Pax6 Ex8	F	55°C	MWG	GCC	GTT	CCG	ATT	TCT	CTT	ATT	GTC				233 bp
	R		MWG	AGG	TTT	CTC	TGC	TTT	GGA	AAT	TTC	CC			
Transkriptionsfaktoren															
Pitx3 Ex3	F	58°C	MWG	AAC	CTT	AGC	CCC	TGC	CA						306 bp
	R		MWG	GGG	TGA	GCC	AAG	GGT	GA						
AP2	F	62°C	MWG	CGC	AGA	GGG	GCA	AAT	CC						1500 bp
	R		MWG	TGA	GGC	AAG	GCG	CTG	AGT	A					
Ap2Pf1	F	60°C	54212	CGG	GCC	TAC	AGG	TCA	TAG	GGC					968 bp
	R		54215	CTC	CAT	GCG	GTG	TCG	TAC	ATG	C				
Ap2Pf2	F	59°C	54213	CAA	ACA	CTT	GGA	TTT	GCC	GAT	GTC				500 bp
	R		54215	CTC	CAT	GCG	GTG	TCG	TAC	ATG	C				
Ap2Pf3	F	56°C	54214	CCA	GAG	AAA	TCC	CTC	TAT	ATC	AGA	GTG	TCA	C	350 bp
	R		54215	CTC	CAT	GCG	GTG	TCG	TAC	ATG	C				

Tabelle A.7: Oligonucleotide für RealTime PCR

Name		T	Nummer	Sequenz								Fragmentlänge
HPRT	F	60°C	MWG	GTT	GGA	TAC	AGG	CCA	GAC	TTT	GT	311 bp
	R	60°C	MWG	CAC	AGG	ACT	AGA	ACA	CCT	GC		
AP2	F	54°C	MWG	ACA	TGC	TAT	CCT	GAA	GCC			258 bp
	R	55°C	MWG	CCC	TTT	ATC	TGA	CGA	CTC	C		
Apoa2	F	55°C	MWG	GTA	GAC	GGG	AAG	GAC	TG			201 bp
	R	53°C	MWG	ATC	TCT	GAG	GTC	TTG	GC			
Afp	F	57°C	MWG	AGC	AAA	CAT	GTC	TGG	ACC	TC		197 bp
	R	53°C	MWG	CAG	CAA	CAA	ATG	GGC	ACT			
3-98o21	F	44°C	MWG	CGT	GCC	TGT	GTG	TTC	C			199 bp
	R	45°C	MWG	GCT	GCT	GTC	ATC	CTT	CAT			
8-72n2	F	45°C	MWG	GGG	ACT	ATT	GCT	GTG	GG			195 bp
	R	44°C	MWG	GTG	GTG	GCT	GGT	GGT	A			
8-24f20	F	42°C	MWG	ACT	TGT	AGC	GGT	CCT	TC			179 bp
	R	41°C	MWG	AGA	GAG	CCG	TCC	TTT	C			
12-133k4	F	40°C	MWG	GGA	CCC	TTG	AGA	CAT	TAT			221 bp
	R	40°C	MWG	CTA	CCT	CCC	AAG	CAA	A			
8-101o4	F	43°C	MWG	AAT	CCC	AAG	CCT	CAA	A			233 bp
	R	42°C	MWG	GCC	CTC	CAG	AAA	CAG	T			
16-176k15	F	49°C	MWG	CCC	AGA	ATA	GAC	CCA	CCC			241 bp
	R	48°C	MWG	TGC	ATC	TCC	ACC	AAA	CCT	A		
14-23o21	F	40°C	MWG	TTC	TCT	TCC	AAT	GTC	TTT			231 bp
	R	40°C	MWG	GAA	GAG	AAG	GCA	GAG	C			
3-44a23	F	48°C	MWG	GCA	CAG	ACC	AGC	ACG	G			201 bp
	R	47°C	MWG	ATG	CGG	CTG	TCT	CTG	G			
12-271j8	F	45°C	MWG	CTT	GCT	CTG	CGA	TGG	A			243 bp
	R	46°C	MWG	CAA	GGG	ACA	GGT	AAA	GGA	T		
8-26p14	F	40°C	MWG	GAG	TGT	GTT	CTT	CAA	ATA			185 bp
	R	41°C	MWG	GGA	ATC	ACA	GAG	GAA	A			
19-1k7	F	47°C	MWG	TGG	TAA	GGC	ACA	GCA	GC			210 bp
	R	46°C	MWG	GCC	AAT	CTG	TCG	GTC	AA			

Für die *In situ* Hybridisierungs-Sonden auf die Gene *AP2* und *Rbp4* wurden die Oligonucleotide AP2 F+R, beziehungsweise 8-101o4 F+R, aus der Tabelle A.7 als Primer verwendet.

A.2 MEDIEN UND LÖSUNGEN

Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterienstämmen

Tabelle A.8: Kultivierung von Bakterien

Medium/Stammlösung	Konzentration	Inhaltsstoffe
LB-Medium (Luria-Bertani)	1%	Bacto-Tryton
	0,5%	Bacto-Hefeextract
	1%	NaCl
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren	
LB Agar		LB-Medium
	15 g/l	Difco-Agar, autoklavieren
SOC-Medium	2%	Bacto-Trypton
	0,5%	Bacto-Hefeextract
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren	
	20 mM	Glucose steril filtrieren
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosidase)	20 mg/ml	X-Gal in Formamid
	lichtgeschützt bei -20°C lagern.	
IPTG (Isopropylthio- β -D-Galactoside)	200 mg/ml	IPTG in Wasser lösen, steril filtrieren bei -20°C lagern
Ampicillin	10 mg/ml	in Wasser

Zur Selektion mit Antibiotika wird den Selektionsmedien 100 μ g/ml Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Zur blau/weiß-Selektion wird zusätzlich noch 40 μ l X-Gal- und 4 μ l IPTG-Stammlösung zu den LB-Agarplatten (d=75 mm) gegeben.

Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

Tabelle A.9: Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

Lösung	Konzentration	Inhaltsstoffe
6× DNA-Ladepuffer	30%	Glycerol
	0,2%	Bromphenolblau
	0,2%	Xylencyanol
	in Tris/HCl (pH 7,5)	
5× TBE (Tris-Borat-Puffer)	0,45 M	Tris
	0,45 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer lösen lichtgeschützt bei 4 °C lagern.	

Lösungen für *In situ* Hybridisierungen (ISH)

Alle Puffer und Lösungen, die vor und während der Hybridisierung mit RNA-Sonden benutzt werden, müssen unbedingt RNase-frei sein. Deswegen wird beim Ansetzen MilliQ-H₂O verwendet und die eventuell enthaltenen RNasen durch die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert. Da DEPC stark krebserregend ist, muss es vor Gebrauch der Lösungen durch dreimaliges Autoklavieren wieder zerstört werden. Die Tabellen A.10 und A.12 enthalten alle Puffer, die für die Hybridisierungen sowohl auf Paraffinschnitten als auch auf ganzen Embryonen RNase-frei sein müssen.

Tabelle A.10: Lösungen für ISH (Paraffinschnitte 1)

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
DEPC-H ₂ O	0,01% DEPC Inkubation über Nacht bei RT 3 × 20 Min autoklavieren	(100 µl auf 1 l)
DEPC-PBS	30 ml NaCl 15 ml NaPO ₄ Puffer add 1 l DEPC-H ₂ O	(5 M) (1 M; pH 7.3)
DEPC-PBT	DEPC-PBS 0,1% Tween20	
4% PFA/PBS	4 g PFA 100 ml DEPC-PBS 3 Tropfen NaOH bei 55°C rühren, bis PFA aufgelöst auf Eis kühlen und pH 6-7 mit HCl einstellen	(10 N)
tRNA	10 $\frac{\mu g}{\mu l}$ in DEPC-H ₂ O 2 × phenolisieren, Aliquots bei -20°C lagern	
Proteinase K	2 $\frac{\mu g}{ml}$ in Proteinase K Puffer	
Proteinase K Puffer	10 ml Tris 1 ml EDTA add 0,5 l DEPC-H ₂ O	(1 M; pH 7) (0,5 M)
Tris/Glycin	12,1 g Tris Base 7,5 g Glycin add 1 l DEPC-H ₂ O; Puffer sollte immer frisch angesetzt werden	
20 × SSC	17,53 g NaCl 8,82 g NaCitrat in 80 ml DEPC-H ₂ O auflösen pH einstellen auf 7,0 mit HCl add 100 ml DEPC-H ₂ O	
Heparin	10 g Heparin 100 ml 4 × SSC	
Zitronensäure	1 M	in DEPC-H ₂ O

Die nun folgenden Lösungen in Tabelle A.11 werden für die Schritte nach der Hybridisierung

verwendet und können deswegen mit unbehandeltem MilliQ-Wasser angesetzt werden.

Tabelle A.11: Lösungen für ISH (Paraffinschnitte 2)

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
10 × TBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 25 ml Tris/HCl add 100 ml H ₂ O	(1 M; pH 7,5)
TBS-T	1 × TBS 0,1% Tween 20	
RNase A	10 µg/µl in 0,01 M NaOAc (pH 5,2) aufheizen auf 100°C für 15 Min, danach langsames Abkühlen auf Raumtemperatur; auf pH 7,4 einstellen mit 1 M Tris/HCl Lagerung bei -20°C	
MAB	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl add 800 ml H ₂ O auf pH 7,5 mit festem NaOH einstellen add 1 L H ₂ O	(0,1 M/L) (0,15 M/L)
MAB-T	MAB 0,1% Tween 20	
NTE	100 ml 5 M NaCl 10 ml 1 M Tris/HCl (pH 7,0) 10 ml 0,5 M EDTA add 1 L H ₂ O	(0,5 M NaCl) (10 mM Tris) (5 mM EDTA)
NTMT	20 ml 5 M NaCl 100 ml 1 M Tris/HCl (pH 9,5) 50 ml 1 M MgCl ₂ 0,1% Tween 20 add 1 L H ₂ O	(100 mM NaCl) (100 mM Tris) (50 mM MgCl ₂)
<i>Blocking solution</i>	10 g Blocking Pulver 0,1% Tween 20 1 L MAB	
Färbelösung	1 ml Boehringer BM purple AP substrate 1 µl Levamisol 10 µl Tween20 7 Min bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugieren	

Für *In situ* Hybridisierungen auf ganzen Embryonen werden die RNase-freien Puffer aus Tabelle A.10 ebenfalls benötigt. Ein geringfügig andere Vorgehensweise verlangt zusätzlich die RNase-freien Puffer in Tabelle A.12. Nach der Hybridisierung werden noch die Puffer in Tabelle A.13 gebraucht.

Tabelle A.12: Lösungen für ISH (*whole mounts* 1)

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
PBT/Glycin	DEPC-PBT Glycin	(2 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)
RIPA	2,5 ml SDS 15 ml NaCl 5 ml NP ₄₀ 25 ml Deoxycholate 1 ml EDTA 25 ml Tris add 0,5 l DEPC-H ₂ O, nicht autoklavieren	(10%) (5 M) (10%) (0,5 M) (1 M; pH 8)
4%PFA/0,2% Glutaraldehyd in PBT	4% PFA/PBT add 400 μl Glutaraldehyd pH auf 6-7 einstellen mit HCl add 50 ml PBT	(pH 6-7) (25%)
Hybridisation buffer	5 ml deionisiertes Formamid 2,5 ml 20 $\times$ SSC 5 μl Heparin 10 μl Tween20 2,5 ml DEPC-H ₂ O pH auf 6 einstellen mit 1 M Zitronensäure	50 % 5 $\times$ 2 mg/ml 0,1 %

Tabelle A.13: Lösungen für ISH (*whole mounts* 2)

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
RNase Lösung	1 ml NaCl 100 μl Tris/HCl 10 μl Tween20 8,89 ml H ₂ O	(5 M) (1 M; pH 7,5)
SSC/Formamid/Tween	5 ml 20 $\times$ SSC 25 ml Formamid 50 μl Tween20 add 50 ml H ₂ O	(20 ml)
Alkaline Phosphatase Puffer	1 ml NaCl 2,5 ml MgCl ₂ 50 μl Tween20 5 ml Tris add 50 ml H ₂ O	(5 M) (1 M) (1M; pH 9.5)

Puffer und Lösungen für Microarrays

Zunächst müssen die auf Objektträger übertragenen DNA Sequenzen rehydratisiert werden. Dazu werden die Lösungen aus Tabelle A.14 benötigt.

Zur eigentlichen Hybridisierung werden die Puffer aus Tabelle A.15 benutzt.

Tabelle A.14: Lösungen zur Rehydratisierung

Puffer	Konzentration	Inhaltsstoffe
Glycerinmischung	3:1 bis 2:1	in H ₂ O
Waschlösung	0,1 bis 0,12 g	Sodium Borohydrid
	30 ml	1 × PBS
	10 ml	100 % Ethanol

Tabelle A.15: Lösungen zur Microarray Hybridisierung

Puffer	Konzentration	Inhaltsstoffe
1 M KPO ₄ (pH 8,5)	1 M	K ₂ HPO ₄
	1 M	KH ₂ PO ₄
Waschpuffer	5 mM	KPO ₄
	mit 95 % EtOH auf 50 ml auffüllen	
Elutionspuffer	4 mM	KPO ₄
	mit MilliQ-H ₂ O	
Prä-Hybridisierungspuffer	6 × SSC	
	0,5 % SDS	
	1 % BSA	
	mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen	
Hybridisierungspuffer	25 % Formamid	
	6 × SSC	
	0,5 % SDS	
	5 × Denhardts Solution	
	mit H ₂ O auf 1 ml auffüllen	

Lösungen für proteinchemische Methoden

Die folgenden Lösungen werden zur Anfärbung von Proteingelen, sowie zum spezifischen Proteinnachweis mittels Antikörpern benötigt.

Tabelle A.16: Lösungen für die Coomassie-Färbung

Lösung	Inhaltsstoffe	
Coomassie-Lösung	MethOH	40 %
	HOAc	10 %
	H ₂ O	50 %
	Serva-Blau Nr. 250	0,1 %
Entfärbe-Lösung	MethOH	40 %
	HOAc	10 %
	H ₂ O	50 %

Tabelle A.17: Lösungen und Antikörper für WesternBlot

Lösung	Inhaltsstoffe	Antikörper	Hersteller
Transferpuffer	50 ml NuPAGE Transferbuffer 20 × 1 ml Antioxidant 100 ml MetOH 849 ml H ₂ O	Anti-AP-2α, clone 8G8/5 (# 05-634)	Biomol, Hamburg
Färbelsg	7,5 ml 5 × Puffer 30 ml H ₂ O 150 µl CoCl ₂ 1 Ssp DBA 15 µl H ₂ O ₂	Goat Anti-Mouse IgG, HRP-conjugate (# 12-349)	Biomol, Hamburg

Lösungen für Histologie

Tabelle A.18: Lösungen für Histologie

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
Davidson Lösung	30 ml EtOH 20 ml Formaldehyd 10 ml Eisessig 30 ml H ₂ O	95 % 37 %
JB-4 catalysiert	100 ml Lösung A 1,25 g Catalysator C mit Magnetrührer lösen	
Polymerisierungslösung	25 ml JB-4 catalysiert 1 ml Lösung B auf Eis stellen	
Färbelösung	36 ml Methylenblau 48 ml bas. Fuchsinlg 60 ml PBS 36 ml EthOH alles filtrieren	0,13 % in H ₂ O 0,13 % in H ₂ O 0,2 M, pH 7,6 95 %

Sonstige Puffer

Die hier aufgeführten Puffer werden für verschiedene Protokolle benötigt.

Tabelle A.19: Sonstige Puffer

Puffer	Konzentration	Inhaltsstoffe
PCR Puffer	100 mM 15 bzw. 17,5 bzw. 20 mM 500 mM optional 0,1%	Tris/HCl pH 8,3 MgCl ₂ KCl Glycerin
TEN Puffer	10 mM 1 mM 0,1 N	Tris/HCl pH 7,5 EDTA NaOH
1% SDS	1%(w/v)	in Wasser lösen
1 M Tris/HCl	1 M	121,14 g/l
5 M NaCl	5 M	292,2 g/l
0,5 M EDTA	0,5 M	186,15 g/l
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA add 1 l H ₂ O	(1 M; pH 8,0) (0,5 M)
PBS-Puffer	8 g 1,44 g 0,24 g add 1 l mit HCl auf pH 7,3 einstellen	NaCl Na ₂ HPO ₄ Na ₂ H ₂ PO ₄ Wasser

— Anhang B —

METHODEN

B.1 COMPUTER-UNTERSTÜTZTE SEQUENZANALYSE

Die Grundlage der meisten molekulargenetischen Arbeiten ist neben guter Laborpraxis eine gründliche Analyse der betreffenden Sequenzen. Diese wurde mithilfe der folgenden Programme am Computer durchgeführt. Hier ist von Bedeutung, daß die Basenabfolgen in FASTA-Format gespeichert sind, da dieses Datenformat am ehesten von verschiedenen Programmen lesbar ist.

- Um mögliche Protein- oder DNA-Bindungsstellen in einer Sequenz identifizieren zu können, wurde der MatInspektor (<http://www.genomatix.de/>) verwendet.
- Vector NTI wurde zur Bestimmung von Primern und Restriktionsschnittstellen benutzt. Außerdem wurden Sequenzen aus Datenbanken untereinander und mit eigenen Sequenzen verglichen.
- Zur Datenbankrecherche wurde auf die öffentlich zugänglichen Daten des NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zurückgegriffen. Dort finden sich DNA-Sequenzen unterschiedlicher Spezies und Suchmaschinen zur Literaturrecherche.
- Eine weitere wichtige Quelle für Sequenzen war der Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>).
- Ergänzende Informationen enthielten die Protein-Datenbanken Expasy (<http://www.expasy.org>) und SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>).
- Expressionsdaten wurden der MGI Datenbank (<http://www.informatics.jax.org/>) entnommen.

B.2 ALLGEMEINE MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

Das Ziel der molekulargenetischen Arbeit ist die Analyse von DNA und RNA. Dafür werden Nucleinsäuren aus Zellen präpariert, Sequenzen durch PCR amplifiziert und in Bakterien vervielfältigt. Alle Schritte werden, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur ausgeführt.

Präparation von Nucleinsäuren

Präparation von RNA aus Gewebe Im Labor präparierte RNA ist in aller Regel einzelsträngig und daher prinzipiell anfälliger für Abbauprozesse als doppelsträngige DNA. Zusätzlich gefährden die vor allem an menschlichen Fingerspitzen vorkommenden RNasen den Erfolg einer RNA Präparation. Es empfiehlt sich daher den Laborarbeitsplatz vor Arbeitsbeginn mit 70% EtOH zu säubern, frische Handschuhe zu tragen und Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße zu benutzen, die ebenfalls nur mit Handschuhe angefaßt wurden.

Für 40 μg RNA (bzw. $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Konzentration) benötigt man in etwa die in Tabelle B.1 angegebenen Gewebemengen. Zur Vorbereitung wird das Gewebe in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 350 μl RLT-Puffer, dem β -Mercaptoethanol (10 μl / 1 ml RLT-Puffer) zugesetzt wurde, gründlich homogenisiert. Hierbei kommen entweder autoklavierte Plastikmörser oder Spritzenkanülen zum Einsatz.

Nach Zugabe von 350 μl ($\simeq 1$ Volumen) 70% Ethanol wird die Probe auf die Säule geladen und für 1 min bei 13 000 U/min (Tischzentrifuge, Heraeus) abzentrifugiert. Eventuell vorhandene Verunreinigungen mit DNA werden im Anschluß an den ersten Waschschrift mit 350 μl RW1-Puffer, durch einen 15-minütigen Verdau mit DNase I (10 μl DNase I + 70 μl RDD-Puffer) und einem zweiten Waschschrift mit 350 μl RW1-Puffer beseitigt. Durch einen dritten Waschschrift mit 500 μl RPE-Puffer und das anschließende Trocknen wird die Säule auf die Elution vorbereitet. Durch mehrere Anreicherungs-schritte kann die Ausbeute an RNA bei der Elution deutlich erhöht werden.

Menge	Gewebe
≥ 8 Stück	ganzer Embryo (E 9.5)
3 Stück	ganzer Embryo (E 10.5)
2 Stück	Embryokopf (E 11.5)
$\frac{1}{2}$ Stück	Embryokopf (E 12.5)
≥ 16 Stück	Augen (E 13.5)
1 Platte	HEK293 Zellen

Tabelle B.1: Gewebemengen zur RNA Präparation

Präparation genomischer DNA aus Schwanzspitzen Nach der Abnahme der Schwanzspitzen werden diese möglichst sofort weiterbearbeitet oder bei -80°C eingefroren. Etwa 0,4 cm Schwanzspitze wird in 500 μl TEN Puffer, 50 μl 1% SDS, 30 μl Proteinase E und 10 μl Proteinase K gelöst und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Bakterienschüttler, Infors). Die festen Überreste werden abzentrifugiert (Kühlzentrifuge, Sorvall), um den Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführen zu können. Durch Zugabe von 500 μl Phenol/Chloroform Lösung, intensives Mischen und anschließendes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 14000 U/min wird die DNA in die wäßrige Phase überführt. Nach Aufreinigung des Überstandes mit Ethanol (s. Seite 92), wird die DNA in 300 μl TEN Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien Die Bakterien werden über Nacht in einem Selektivmedium (LB-Medium mit Ampicillin) bei 37°C herangezogen (Bakterienschüttler, Infors). Dann werden 2×2 ml in einem sterilen Reaktionsgefäß 1 Minute bei 13000 U/min abzentrifugiert (Tischzentrifuge, Heraeus). Die DNA wird nun mit dem NucleoSpin Plasmid Kit nach Anleitung aus den Zellen isoliert. Dazu werden diese in 250 μl A1 Puffer gelöst und mit 250 μl Lysispuffer versetzt. Die Lyse erfolgt während der folgenden fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluß werden 300 μl A3 Puffer zugegeben, die Proben durch vorsichtiges Schwenken gemischt und für 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Suspension wird

danach für 10 Minuten bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert (Kühlischzentrifuge, Hettich) und der Überstand auf eine NucleoSpin Säule geladen. Die DNA wird durch Zugabe von 600 µl A4 Puffer gewaschen und anschließend mit 30 - 50 µl Wasser oder TE-Puffer eluiert.

Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren Für die Quantifizierung der Konzentration von Nucleinsäuren wird die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen (Photometer, Pharmacia). Die Messung bei 260 nm erlaubt die Berechnung der Konzentration in der Probe. Eine OD von 1 entspricht näherungsweise 50 µg/µl Doppelstrang-DNA, beziehungsweise 40 µg/µl Einzelstrang-DNA oder RNA. Bei 280 nm wird die Proteinkonzentration gemessen. Das Verhältnis aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ($\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$) erlaubt eine Abschätzung der Reinheit der Nucleinsäure-Präparation. Präparationen, die für die weitere Arbeit geeignet sind, weisen einen $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ Wert zwischen 1,6 und 2,0 auf. Im Falle einer zu hohen Proteinkontamination ist das Verhältnis signifikant kleiner als die angegebenen Werte.

Reinigung von Nucleinsäuren

Ethanol-fällung Es werden 3 × Volumen 100% Ethanol, 1/10 × Volumen 7,5 M NH₄OAc für RNA bzw. 3 M NaAc und 1 µl Glykogen für DNA zu den Nucleinsäuren gegeben. Nach 30 Minuten bei -80°C wird die Probe 20 Minuten bei 15000 U/min und 4°C abzentrifugiert (Kühlischzentrifuge, Hettich). Der Überstand wird verworfen. Zum Pellet werden 300 µl 70% Ethanol zugegeben, gemischt und erneut 20 Minuten bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet getrocknet. Die Aufnahme des Pellets erfolgt in 10 - 20 µl TE-Puffer oder Wasser.

Reinigung von DNA aus dem PCR Ansatz Die Reinigung erfolgt mittels des Qiagen PCR Quick Purification Kits. Dabei wird die DNA aus dem PCR-Ansatz nach Zugabe des fünffachen Probenvolumens PB Puffer auf eine Reinigungssäule geladen und mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Eluiert wird mit 30 - 50 µl Wasser oder TE-Puffer. Abschließend werden durch eine Ethanol-fällung (s. Seite 92) eventuelle Verunreinigungen beseitigt.

Reinigung von DNA aus einem Agarosegel Die gewünschten Banden werden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in sterile Reaktionsgefäße gegeben und gewogen. Durch Zugabe des dreifachen Gelvolumens NT1 Puffers des Qiagen NucleoBond Kits wird die DNA während 10 minütiger Inkubation bei 50°C unter Hochsalzbedingungen aus dem Gel herausgelöst. Im Anschluß daran wird die Suspension auf eine Säule geladen und 1 Minute bei 1300 U/min abzentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die DNA mit 500 µl NT2 Puffer, 600 µl und 200 µl NT3 Puffer gewaschen. Danach wird die DNA mit 30 - 50 µl Wasser oder TE-Puffer eluiert. Zur vollständigen Entfernung von Agaroseresten kann eine Ethanol-fällung (s. Seite 92) angeschlossen werden.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können DNA Stränge vervielfältigt werden. Dazu notwendig sind entsprechende Primer, die sich an die DNA anlagern und als Startpunkt der DNA-Polymerase dienen. Sie wurden mittels Computerprogramm (s. Kapitel B.1) bestimmt.

Die Amplifizierung geschieht durch zyklische Wiederholung der folgenden Reaktionen (PCR-Gerät, Biozym): Hitzedenaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (Annealing) und der Synthese des komplementären Doppelstranges (Polymerisation).

Ein Ansatz enthält folgende Komponenten: 50-100 ng DNA, 0,1 μ M Primer, 0,2 mM dNTP, 15 - 20 mM $MgCl_2$, 10 $\times$ Taq-Puffer, 2 U Taq-Polymerase in einem Volumen von 20 μ l. Optional wurden auch Zusätze wie 20% DMSO oder Q-Solution von Qiagen eingesetzt, um deutlichere Ergebnisse zu erhalten.

Die als Primer verwendeten Oligonucleotide wurden zum Teil von U. Linzner (AG BioDV, Institut für Experimentelle Genetik, GSF) hergestellt und zum Teil bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt. Zur Amplifizierung wurden die Protokolle in Tabelle B.2 verwendet.

Tabelle B.2: PCR-Protokolle

Zyklus	Reaktion	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
1	Denaturierung	1 - 2 min	95°C	1 $\times$
2	Denaturierung	0,5 - 1 min	95°C	35 - 40 $\times$
	Annealing	0,5 - 1 min	45°C - 60°C	
	Polymerisation	0,5 - 2 min	72°C	
3	Polymerisation	10 - 15 min	72°C	1 $\times$

Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente werden durch Agarosegele aufgetrennt. Je nach erwarteten Fragmentlängen wird die Konzentration des Agarosegels zwischen 0,8% und 1,5% in TBE Puffer ausgewählt. Die DNA-Fragmente werden mit Probenauftragspuffer versetzt, um das Einsinken in die Gelta-schen zu ermöglichen und durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V für ein bis zwei Stunden im Agarosegel getrennt (Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur, GIBCO, BRL). Die DNA-Banden werden durch Anfärben mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar. Die Bestimmung der Fragmentgrößen wird durch einen Vergleich mit einem aufgetragenen Größenstandard möglich.

Klonierung

Ligation Zur Ligation wurden die Plasmide aus Tabelle A.1 verwendet. Als Vorbereitung werden Vektor-DNA und Insert-DNA mit der entsprechenden Restriktionsendonuclease geschnitten (s. Kapitel B.2) und über ein Agarosegel aufgereinigt. Danach werden die überhängenden ("sticky-end") bzw. glatt endenden ("blunt-end") DNA Überhänge des aufgeschnittenen Vektors mit alkalischer Shrimp-Phosphatase 10 Minuten bei 37°C dephosphoryliert (Bakterienbrutschrank, WT-Binder). Durch anschließendes Erhitzen auf 65°C (Heizblock, Eppendorf) für 15 Minuten wird das Enzym inaktiviert. Insert-DNA und Vektor-DNA werden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 zusammengegeben und mit T4-Ligase entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15°C (Heizblock, Eppendorf) inkubiert.

Transformation Die verwendeten Bakterienstämme sind beide Abkömmlinge des Laborstammes *E. coli* K12. Ihre genetische Ausstattung ist in Tabelle A.1 dargestellt.

3 μ l bis 5 μ l des Ligationsansatzes werden zu 50 μ l hitzekompetenten Zellen einer Bakterienkultur (TOP F'10 oder DH5 α , Invitrogen) gegeben und 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 45 Sekunden bis 2 Minuten bei 42°C (Heizblock, Eppendorf) wird die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen. Dieser Prozeß wird durch Kühlung auf Eis abgebrochen. Nach Zugabe von 250 μ l LB-Medium werden die Bakterien für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt (Bakterienschüttler, Infors) und danach auf Selektiv-LB-Agar ausplattiert.

Die Selektion erfolgt bei Einbau in den pCR.II-TOPO Vektor durch eine Blau/Weiß-Selektion mit Ampicillin, X-Gal und IPTG. Bei Einbau in den pLLucII Vektor erfolgt die Selektion nur durch die Ampicillin-Resistenz. Zur Selektion mit Antibiotika werden 100 μ g/ml Ampicillin pro LB-Agarplatte (d=75mm) zugesetzt. Zur blau/weiß-Selektion wird zusätzlich noch 40 μ l X-Gal- und 4 μ l IPTG-Stammlösung zugegeben.

Überprüfung durch PCR-Screen Von den positiven Klonen werden Kolonien gepickt, in 100 μ l LB-Medium überführt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Bakterienbrutschrank, WT-Binder). Im Anschluß wird das Insert durch einen PCR-Screen überprüft (s. Kapitel B.2). Von den positiven Klonen werden Übernachtskulturen in 5 ml LB-Medium + Ampicillin mit 20 μ l Bakteriensuspension angesetzt (Bakterienschüttler, Infors).

Restriktionsverdau

Die Restriktionsenzyme (DNA-Endonucleasen, MBI Fermentas) werden mit dem vom Hersteller mitgelieferten 10 $\times$ Reaktionspuffern verwendet. Pro 1 μ g DNA werden 1 U bis 3 U der Enzyme zugegeben und für 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Bakterienbrutschrank, WT-Binder). Danach wird der Verdau durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgt durch Gelelektrophorese (siehe Seite 93).

B.3 ZELLKULTUR UND PROMOTORANALYSE

Für die verwendete HEK293 Zelllinie wird das L-Glutaminhaltige Komplettmedium Quantum 333 (PAA) benutzt. Alle Arbeiten werden an einer Sterilbank (Zellkultur Sterilbank, Hereaus) durchgeführt.

Kultivieren von Zellen

Die Zelllinie aus dem Stickstofftank wird in einem Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und mit 12 ml Komplettmedium versetzt. Durch Zentrifugation für 4 Minuten bei 2000 U/min (Tischzentrifuge, Heraeus) wird die Kultur von DMSO-haltigem Medium befreit. Die Zellen werden in Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (250 ml, Nunc) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Zellkultur Brutschrank, Hereaus) kultiviert.

Sobald die Zellen bei der Überprüfung (Lichtmikroskop, Zeiss) eine Konfluenz von mehr als 95% aufweisen, werden sie mit PBS-Puffer gewaschen und möglichst schonend durch Zugabe von 1 ml 10 $\times$ Trypsin/EDTA (GIBCO, BRL) abgelöst und auf drei neue Platten verteilt. Die Zeit zwischen den Passagen beträgt drei bis vier Tage.

Zum Konservieren von Zellen wird die Zellsuspension in Komplettmedium, dem 10% DMSO zugesetzt wurde, in einem mit Isopropanol gefüllten und auf 4°C vorgekühlten Gefäß (Nalgene) auf -80°C gekühlt. Dieses Verfahren gewährleistet einen Temperaturabfall von etwa 1°C pro Minute. Anschließend können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Transfektion von Zellen

Die Fibroblastenzellen wurden mit dem PolyFect Reagenz (Qiagen) transfiziert.

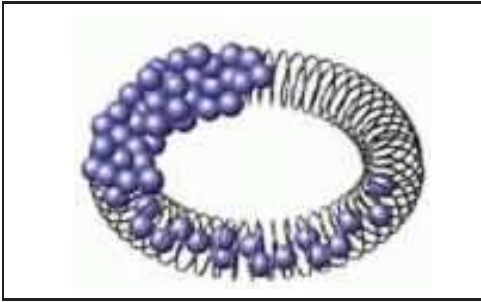


Abbildung B.1: PolyFect/DNA Interaktion

Das PolyFect Transfektionsreagenz (blaue Kugeln) bildet mit der Plasmid-DNA (schwarz) eine kompakte Struktur.

Beim Mischen der Plasmid-DNA mit dem Reagenz bildet sich eine ringförmige Struktur aus (s. Abbildung B.1), die an die Zelloberfläche bindet. Durch unspezifische Endocytose wird die DNA ins Zellinnere transportiert. Ein bis zwei Tage nach der Aussaat haben die Zellen eine Konfluenz von 40 - 50% erreicht. Das Medium wird gewechselt und die Transfektionsansätze vorbereitet, indem DNA und PolyFect gemischt werden. Die daraus resultierende Lösung wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit Medium versetzt und auf die Zellen geträufelt wird. Die Zugabe von Komplettmedium stoppt die Interaktion zwischen DNA und PolyFect ab. Die Zellen werden nun wieder bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und können nach 48 Stunden geerntet werden.

Promotoranalyse

Bei der Promotoranalyse wird die Aktivität von Promotoren durch ein nachgeschaltetes Reportergen überprüft. Bei einer Promotoraktivität muß das exprimierte Reporter-Protein sofort nachweisbar sein. Es darf keine post-translationalen Modifikationen benötigen, um seine Funktionalität zu erreichen.

Zur Analyse eines Promotors im Zellsystem wird ihm ein *Firefly* Luziferase Gen auf einem Reportervektor nachgeschaltet. Als interne Kontrolle dient eine *Renilla* Luziferase unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Beide Enzyme sind ohne post-translationalen Modifikationen funktionsfähig. Der Unterschied besteht in den umgesetzten Substraten und den Reaktionsbedingungen (s. Abbildung B.2).

Abbildung B.2: Biolumineszenz-Reaktionen

Die *Firefly* Luziferase, ein 61 kDa Monomer katalysiert die Umsetzung von D-Luziferin zu Oxyluziferin unter Freisetzung von Licht. Die Reaktion läuft über ein Luziferyl-AMP-Zwischenprodukt und benötigt die Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und Sauerstoff. Zur sensitiveren Messung wird die Reaktion im Meßansatz noch mit CoenzymA verstärkt.

Die *Renilla* Luziferase, ein 36 kDa Monomer katalysiert die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid. Die Reaktion setzt ebenfalls Licht frei, benötigt aber nur die Anwesenheit von Sauerstoff.

Transfiziert man nun beide Konstrukte in eine Zelllinie, wird die *Firefly* Luziferase (*Photinus pyralis*) und die CMV kontrollierte *Renilla* Luziferase (*Renilla reniformis*) exprimiert. Zuerst

wird D-Luziferin, ATP und Mg^{2+} zugegeben (Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System, Promega) und die Lichtemission der *Firefly* Luziferase gemessen (Luminometer, Berthold). Das umgesetzte D-Luziferin ist direkt proportional zur Promotoraktivität, das emittierte Licht ist aber auch abhängig von der von der Zelle aufgenommenen Menge an Reportervektor. Um diese bestimmen zu können, wird die Aktivität der *Renilla* Luziferase gemessen, indem deren Substrat Coelenterazin zugegeben wird. Zusätzlich zum Coelenterazin wird ein Inhibitor der *Firefly* Luziferase zugesetzt, um nur die Aktivität der *Renilla* Luziferase zu messen. Da davon ausgegangen werden kann, daß keiner der Vektoren bei der Transfektion bevorzugt von den Zellen aufgenommen wird, ist die gemessene *Renilla* Luziferase Aktivität direkt proportional zur aufgenommenen Vektormenge.

Zur Reportergenanalyse werden in den beschriebenen Experimenten Kulturschalen benutzt (96-wells, Nunc). Insgesamt wurden pro Transfektionsansatz bis zu $0,7 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt. Davon sind bis zu $0,61 \mu\text{g}$ Reporterplasmid, $0,03 \mu\text{g}$ pRL-SV40 Kontrollplasmid und $0,06 \mu\text{g}$ pcDNA3.1 Vektor. Die Zellen werden in $20 \mu\text{l}$ PLB-Puffer lysiert, die im Luminometer (Berthold) unter Zugabe der Substrate gemessen werden. Zusätzlich wird eine äquivalente Menge nicht-transfizierter Zellen als Kontrolle der Prozedur unterzogen. Aus dem Quotienten der Aktivität der *Firefly* und der *Renilla* Luziferasen wird die relative Luziferase Aktivität (rLA) bestimmt.

$$\text{relative Luziferase Aktivität} = \frac{\text{Firefly (Luziferaseaktivität - Kontrollaktivität)}}{\text{Renilla (Luziferaseaktivität - Kontrollaktivität)}}$$

Drei bis sechs Messungen gleicher Transfektionsbedingungen (= Stichproben) werden zu einem Mittelwert $\bar{x}$ mit Standardabweichung σ verrechnet. Aufgrund der geringen Stichprobenmenge sind die hier nach der Normalverteilung berechneten Werte mit einer gewissen Unsicherheit belastet. Mit einem t-Test kann die Signifikanz berechnet werden, mit der ein Mittelwert $\bar{x}$ (bei bekannter Standardabweichung σ und Stichprobenmenge n) vom eigentlichen Mittelwert μ der zugrundeliegenden Normalverteilung abweicht. Alle Ergebnisse erfüllen den t-Test in einem 1% Intervall, falls nicht anders erwähnt.

B.4 GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Genexpressionsanalyse ermöglicht den Vergleich verschieden exprimierter Gene in verschiedenen Proben. Dabei sollen neue Erkenntnisse in Hinblick auf Regulationsmechanismen und Genfunktionen gewonnen werden.

Tabelle B.3: Methodenvergleich der Genexpressionsanalyse

Aspekt	Methode		
	Microarray	RealTime	<i>In situ</i> Hybridisierung
Sensitivität	mäßig	hoch	hoch
Spezifität	hoch	hoch	hoch
Durchsatz (Gene)	hoch (10 000)	mäßig (24)	mäßig (10)
Dauer	5 Tage	4 Stunden	5 Tage
Quantität	mäßig	hoch	gering
Ortsanalyse	nicht möglich	nicht möglich	sehr aussagekräftig

In dieser Doktorarbeit wurde die Genexpression der *aphakia* Maus mit der einer Wildtyp-Maus zuerst mithilfe von DNA Microarrays verglichen. Damit fand eine Vorselektion statt, bei der aus 10 000 Genen einige zu näheren Untersuchung ausgewählt wurden. Deren Expressionsveränderungen wurden anschließend mittels RealTime PCR genauer quantifiziert, bevor in *In situ* Hybridisierungen genauere Informationen über Expressionsorte gewonnen wurden. Die verwendeten Methoden ergänzen sich dahingehend (s. Tabelle B.3), daß die Informationen der DNA Microarrays über eine große Anzahl an Genen durch die genauere Bestimmung hinsichtlich der Expressionstärke mittels RealTime PCR und Expressionsorte mittels *In situ* Hybridisierungen gleichzeitig ergänzt und bestätigt werden.

B.4.1 DNA Microarrays

Das zugrundeliegende Prinzip der DNA Microarrays ist die Anlagerung zweier einzelsträngigen, zueinander komplementären DNA-Fragmenten aneinander, wovon eine auf einer Oberfläche immobilisiert wurde. Die Abbildung B.3 zeigt einen Überblick über die Vorgehensweise bei Microarrays (nach [16]). Das bei dieser Arbeit verwendete Protokoll wurde den TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org/tdb/microarray/protocolsTIGR.shtml>) Protokollen entlehnt.

Vorbereitung der Microarrays Die in dieser Arbeit verwendeten Microarrays bestehen aus Oligonucleotiden, die von den 10 000 Klonen der LION (<http://www.lionbioscience.com/>) Bibliothek von mehreren Instituten der GSF amplifiziert und gereinigt wurden. Die AG Beckers am Institut für Experimentelle Genetik übernahm die robotergesteuerte Positionierung auf Aldehyd-beschichteten Objektträgern.

Die Oligonucleotide werden auf der Aldehyd-Matrix verankert, indem sie in einer Mischung aus 0,1 g Natrium Borohydrid, 30 ml PBS Puffer und 10 ml 100% Ethanol gewaschen werden. Nach einem weiteren Waschschrift in kochendem Milli-Q-H₂O und einem in 100% Ethanol, können die Objektträger bis zur Prä-Hybridisierung gelagert werden. Zur Prä-Hybridisierung werden die Objektträger und die benötigten Deckgläschen in Prä-Hybridisierungspuffer 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Danach folgen zwei Waschschrift mit Milli-Q-H₂O und einer mit 100% Ethanol, bevor die luftgetrockneten Objektträger und Deckgläschen bereit für die Hybridisierung sind.

Vorbereitung der Proben Die aus Gewebe präparierte RNA (s. Seite 91) von Wildtyp und Mutante, wird zunächst in cDNA umgeschrieben. Dazu werden je 20 µg RNA mit 25 pmol Primern (dT₂₅VN) in einem Endvolumen von 25 µl für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Damit die hier stattgefunden Denaturierung erhalten bleibt, wird der Ansatz danach sofort auf Eis gestellt, bevor 5 × 1st strand labelling Puffer, 10 × DTT, 10 × 4 dNTP (aa dUTP/dTTP 2:1) und 500 U Superscript II zugegeben werden. Das Endvolumen wird mit DEPC-H₂O auf 50 µl eingestellt, und der Ansatz für 3 Stunden oder über Nacht bei 42°C inkubiert. Das Umschreiben wird mit einer erneuten Denaturierung von 5 Minuten bei 70°C beendet.

Die Markierung der cDNA mit Cyanin-Farbstoffen ist empfindlich gegenüber Störfaktoren, wie RNA oder Enzymen. Deshalb wird nun ein RNase I Verdau von 15 Minuten bei 37°C angehängt. Danach werden Enzyme und Primer entfernt. Der Ansatz wird mit 250 µl PB-Puffer (PCR Purification Kit, Qiagen) versetzt und auf eine Säule geladen. Da die weiteren, im Kit

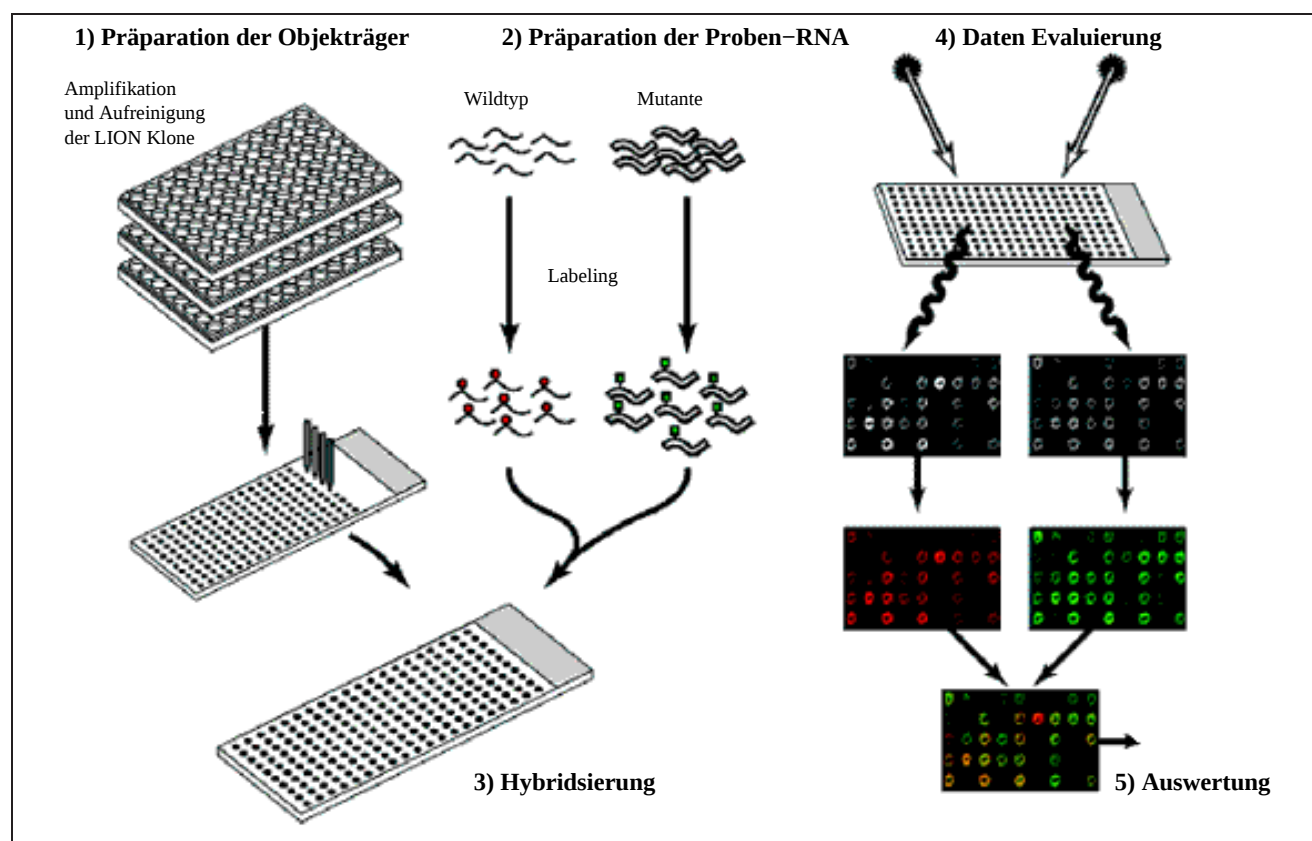


Abbildung B.3: Überblick über die DNA Microarray-Technik

Die Genexpressionsanalyse durch DNA Microarrays besteht aus vier Schritten (nach [16]): Zuerst werden die Zielsequenzen amplifiziert, aufgereinigt und auf Objekträger übertragen (Schritt 1). Dann wird RNA aus den in Frage kommenden Geweben präpariert, in cDNA umgeschrieben und dabei entsprechend markiert (Schritt 2) und mit den Zielsequenzen hybridisiert (Schritt 3). Ob eine Hybridisierung stattgefunden hat, die Proben also mit den Zielsequenzen übereinstimmen, wird mittels Laser herausgefunden (Schritt 4). Durch spezifische Wellenlängen werden die Markierungen angeregt. Auf diese Weise erhält der angeschlossene Computer zwei Bilder, ein grünes und ein rotes, die kombiniert werden. Zeigen die Zielsequenzen eine gelbe Farbe, so werden sie in den zu vergleichenden Geweben in gleicher Stärke abgelesen. Zeigen die Sequenzen eine grüne oder rote Farbe, so wird in einem der Gewebe die Sequenz nicht abgelesen, hier tritt eine Veränderung der Sequenzaktivität auf. Weitere Eigenschaften der so angezeigten Sequenzen werden anschließend durch Computerrecherche ermittelt (Schritt 5).

enthaltenen Puffer, die Markierungsreaktion stören, werden diese durch Phosphat Wasch- und Elutionspuffer ersetzt. Die Säule wird nun mit 750 μl Phosphat-Waschpuffer gewaschen, bevor die cDNA mit 30 μl Phosphat-Elutionspuffer heruntergewaschen wird. Nun wird ein weiterer Reinigungsschritt angehängt, indem eine DNA-Fällung (s. Seite 92) durchgeführt wird.

Für die Markierung der cDNA mit Cyanin-Farbstoffen werden diese zuerst in 45 μl DMSO gelöst, 10 μl der Farblösung zur gereinigten cDNA zugegeben und eine Stunde inkubiert. Die Markierung erfolgt durch das Anhängen eines Cyanin-Farbstoffes (Cy3 oder Cy5, der Unterschied liegt in einer zusätzlichen $-\text{C}=\text{C}-$ Gruppe und in folglich anderen Anregungsfrequenz) an den Aminorest eines Aminoallyl-dUTPs (s. Abbildung B.4). Es ist prinzipiell egal, ob die Wildtyp-cDNA mit Cy3 und die cDNA der Mutante mit Cy5 markiert wird oder umgekehrt, zur internen Kontrolle werden immer beide Möglichkeiten im sogenannten "colour flip" gleich-

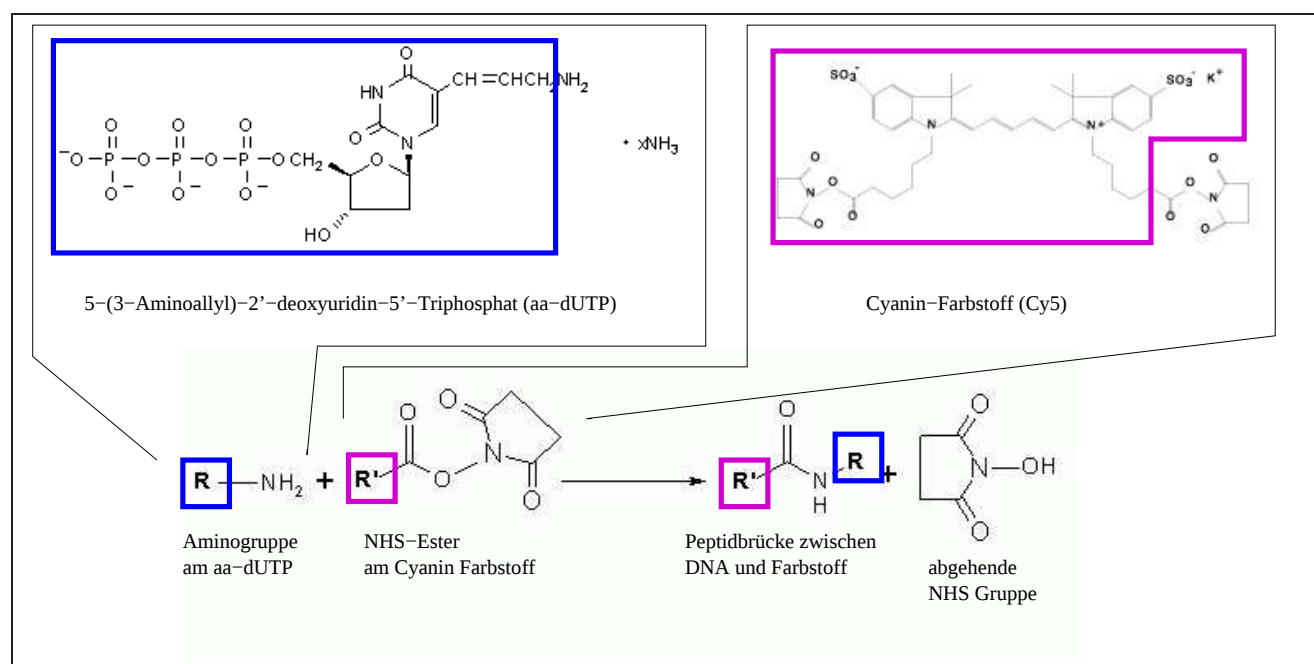


Abbildung B.4: Farbstoff-Markierung der DNA

Das beim Umschreiben in die cDNA eingebaute Aminoallyl-dUTP (aa-dUTP) ermöglicht die Markierung mit Cyanin-Farbstoffen durch die Bildung einer Peptidbrückenbindung zwischen dem Aminorest des aa-dUTP und dem NHS-Ester des Farbstoffes (in dieser Abbildung Cy5).

zeitig behandelt. In der späteren Auswertung sollte das Ergebnis Markierungs-unabhängig sein. Cyanin-Farbstoffe sind lichtempfindlich, deswegen werden alle nun folgenden Schritte im Dunkeln ausgeführt. Die Markierungsreaktion wird durch eine erneute Ethanol-Fällung abgestoppt. Um störende Reste von ungebundenen Farbstoffen zu entfernen, wird die markierte cDNA in 100 μ l 10 mM Tris Puffer (Elution Puffer, PCR Purification Kit, Qiagen) aufgenommen, mit 500 μ l PB Puffer versetzt und auf eine Säule gegeben. Nach 1 minütigem Abzentrifugieren bei 6000 U/min wird zweimal mit je 700 μ l PE Puffer gewaschen und die Säule durch 1 Minute abzentrifugieren bei 13000 U/min getrocknet. Die Eluierung findet in zwei Schritten statt, zuerst in 50 μ l und beim zweiten Mal mit 30 μ l EB Puffer, um den Verlust an DNA so gering wie möglich zu halten.

Hybridisierung Für die Hybridisierung wird die entsprechend markierte Wildtyp- und Mutant-cDNA in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Um unspezifische Hybridisierungen zu unterdrücken, werden 20 μ g Salmon Sperm DNA, sowie 15 μ g PolydA zugegeben. Der Ansatz wird komplett in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet, um eine Umpufferung in 80 μ l Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 42°C) zu ermöglichen. Die DNA wird anschließend 10 Minuten bei 95°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt, um die Neubildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Nun kann der Ansatz auf die vorbereiteten Microarrays (s. Seite 97) aufgetragen, eingedeckelt und in einer feuchten Kammer (Hybchamber) bei 42°C über Nacht inkubiert werden.

Die Hybridisierung wird durch das Entfernen der Deckgläschen beendet, die in Milli-Q-H₂O abgestreift werden. Danach werden die Microarrays mit einer fünfstufigen SSC-Puffer-Reihe

(3 ×, 1 ×, 0,5 ×, 0,25 ×, 0,1 × SSC) gewaschen und anschließend getrocknet.

Datenevaluierung Die Auswertung der Microarrays findet in einem speziellen Scanner (GenePix, Axon Instruments) statt, der die Objektträger mittels Laser scannt. Hier werden die Farbstoffe mit zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt (Cy3 bei 550 nm und Cy5 bei 650 nm) und die emittierten Wellenlängen gemessen. So ergeben sich zwei Bilder (Grün für Cy3 und Rot für Cy5), die vom Computer miteinander verglichen werden, indem er die beiden Bilder übereinander gelegt präsentiert. Erscheint ein Oligonucleotid-Punkt in gelb-braun, so hybridisierten die Wildtyp- und Mutant-cDNA zu gleichen Mengen mit diesem Oligostrang, (grün und rot halten sich die Waage), die Sequenz wird im Wildtyp wie in der Mutante gleich abgelesen, es tritt also in der Mutante keine Veränderung der Sequenzaktivität auf. Erscheint ein Oligonucleotid-Punkt jedoch in grün oder rot, dann lagerte sich nur eine der beiden cDNAs an, in einem der Ursprungsgewebe wurde diese Sequenz nicht abgelesen und konnte somit nicht umgeschrieben und markiert werden. Die Sequenzaktivität ist in der Mutante verändert. An dieser Stelle kommt der "colour-flip", die Farbkontrolle als interne Kontrolle ins Spiel. Beide Microarrays wurden mit derselben cDNA hybridisiert, die allerdings gegensätzlich markiert wurde (einmal mit Cy3 für den Wildtyp, Cy5 für die Mutante und einmal umgekehrt). Beide Objektträger sollten beim gleichen Oligonucleotid-Punkt das gleiche Ergebnis zeigen, nur in den entgegengesetzten Farben.

Die erhaltenen Bilder werden durch das Computerprogramm "GenePix Pro" ausgewertet und als Scatter-Plot wiedergegeben. Dabei wird zusätzlich zur Farbinformation jedem Oligonucleotid-Punkt die entsprechende Identität in der LION Klondatenbank (die anschließend über einen Vergleich mit der NCBI Datenbank überprüft wurde) zugeordnet. Anschließend wird eine Normalisierung durchgeführt, die eine Mittelwertsberechnung der Farbintensität aller Oligonucleotid-Punkte inklusive Standardabweichung darstellt. Die Oligonucleotid-Punkte, welche beide Farbinformationen in gleichen Maßen besitzen, finden sich so um den Mittelwert verteilt wieder. Diejenigen, die sich signifikant entweder im grünen oder roten Bereich befinden, sind auf diese Weise einfacher zu erkennen.

Für diese Arbeit relevant war das Verhältnis der Sequenzaktivität von Wildtyp zu Mutante. Deswegen wurden der Quotient der beiden Lichtintensitäten derselben Sequenz gebildet:

$$\text{relative Sequenz-Aktivität} = \frac{\text{Lichtintensität [aphakia]}}{\text{Lichtintensität [Wildtyp]}}$$

Bei einem Verhältnis von 1 gab es keinen Unterschied zwischen der Sequenzexpression in Wildtyp oder Mutante. War das Ergebnis größer als 1, wurde die Sequenz in *aphakia* stärker abgelesen als im Wildtyp. Im umgekehrten Fall war das Ergebnis kleiner als 1.

B.4.2 RealTime PCR

Die RealTime PCR ist eine Polymerase Ketten-Reaktion, bei der es die Zugabe eines an die DNA bindenden Farbstoffes ermöglicht, eine genaue Aussage über die ursprünglich eingesetzte Menge des zu amplifizierenden Produkts zu treffen.

In dieser Arbeit wurde mit dem LightCycler (Roche) gearbeitet und der dafür optimierte Kit mit SYBR Green I Dye verwendet. Der Fluoreszenz-Farbstoff zeigt in Lösung nur sehr geringe Lichtemission, die sprunghaft ansteigt, sobald er an doppelsträngige DNA bindet. Je mehr DNA

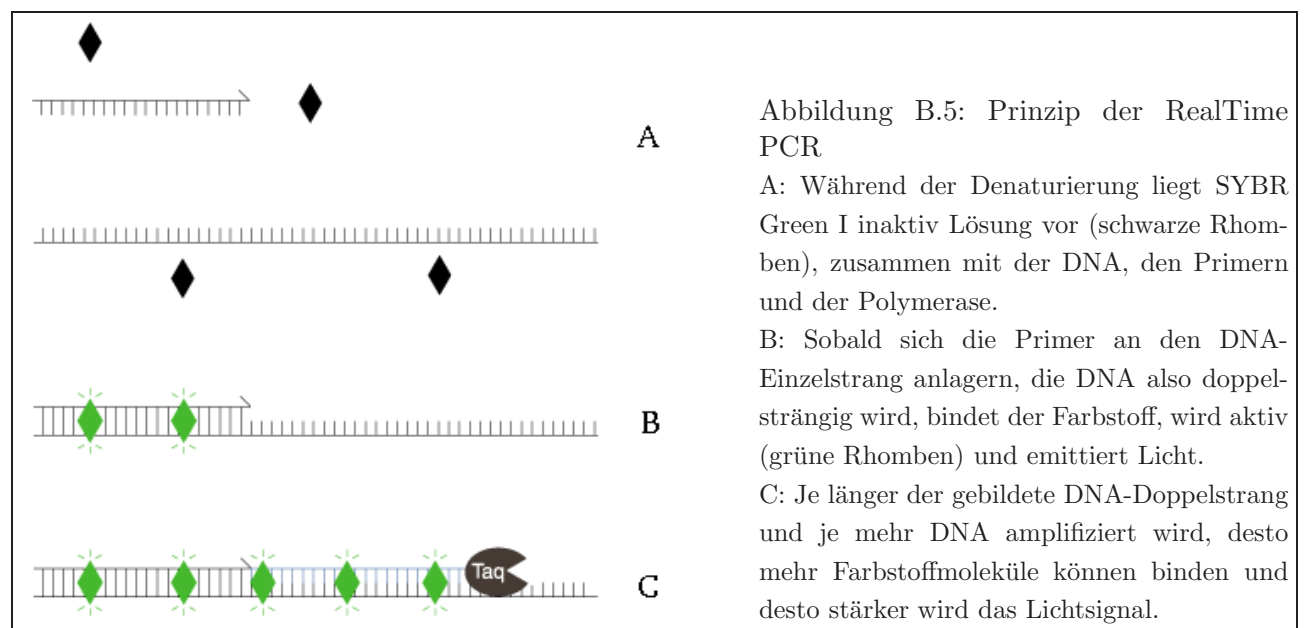


Abbildung B.5: Prinzip der RealTime PCR

A: Während der Denaturierung liegt SYBR Green I inaktiv in Lösung vor (schwarze Rhomben), zusammen mit der DNA, den Primern und der Polymerase.

B: Sobald sich die Primer an den DNA-Einzelstrang anlagern, wird die DNA doppelsträngig. Der Farbstoff bindet an den Doppelstrang und emittiert Licht.

C: Je länger der gebildete DNA-Doppelstrang und je mehr DNA amplifiziert wird, desto mehr Farbstoffmoleküle können binden und desto stärker wird das Lichtsignal.

gebildet wird, desto höher die gemessene Fluoreszenz am Ende des Zyklus' (s. Abbildung B.5). Die Qualität des amplifizierten Produkts wird nach dem Ende des letzten Zyklus durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Jedes DNA-Fragment hat einen bestimmten Schmelzpunkt, der durch die individuelle Länge und den G/C-Gehalt bestimmt wird. Sobald die DNA durch die ansteigende Temperatur denaturiert wird, löst sich der Farbstoff von der DNA und das Lichtsignal wird schwächer. Ab dem DNA-Schmelzpunkt nimmt das Signal rapide ab. Somit zeigt eine DNA-Schmelzkurve einen bestimmten Wendepunkt für ein bestimmtes DNA-Fragment. Wurden in der vorangegangenen PCR mehrere Fragmente amplifiziert, finden sich mehrere Wendepunkte in der Schmelzkurve. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA mittels Gelelektrophorese überprüft, da bei Verunreinigungen die Bestimmung der amplifizierten DNA-Menge eines Sequenzabschnitts unmöglich ist.

Vorbereitungen Um einen Vergleich mit den aus den Microarrays gewonnenen Daten anstellen zu können, wurden die Reste der dort verwendeten RNA der Embryonalstadien E 9.5 bis E 13.5 zusammengefaßt und in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden je $1\ \mu\text{g}$ RNA mit 25 pmol Primern (dT_{25}VN) in einem Endvolumen von $25\ \mu\text{l}$ für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wird danach sofort auf Eis gestellt, bevor $5 \times 1^{\text{st}}$ strand labelling Puffer, $10 \times$ DTT, 10×4 dNTP und 500 U Superscript II zugegeben werden. Das Endvolumen wird mit DEPC- H_2O auf $50\ \mu\text{l}$ eingestellt, und der Ansatz über Nacht bei 42°C inkubiert. Das Umschreiben wird mit einer erneuten Denaturierung von 5 Minuten bei 70°C beendet.

Die Primer wurden mithilfe des Programms VectorNTI erstellt und von MWG synthetisiert, da selbst geringste Verunreinigungen das Ergebnis beeinflussen können. Die amplifizierten Fragmente umfassen alle etwa 200 bis 300 Basenpaare und wurden anhand der LION-Klonsequenzen ausgewählt, deren veränderte Expression bereits bei den Microarrays aufgefallen ist. Als Kontrolle dienen Primer für die Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (Hprt), deren Gen in der Maus ubiquitär exprimiert wird (nach [86]).

Amplifizierung der DNA Zur Amplifizierung wurden, je nach Verdünnung, 1 ng bzw. 0,1 ng cDNA eingesetzt. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz Primer in einer Konzentration von je 0,1 μM , 4 mM MgCl_2 sowie $1 \times$ SYBR Green I Reaktionsmix in einem Endvolumen von 20 μl . Die Amplifikation fand in gläsernen Kapillaren statt, um die Lichtausbeute messen zu können. Dabei wurde das in Tabelle B.4 beschriebene Protokoll verwendet.

Tabelle B.4: RealTime PCR Protokoll

Zyklus	Reaktion	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
1	Denaturierung	2 min	95°C	1 $\times$
2	Amplifikation	10 sek	95°C	50 $\times$
		10 sek	55°C	
		20 sek	72°C	
3	Schmelzkurve	9,2 min	40°C $\rightarrow$ 95°C	1 $\times$
4	Kühlen	∞	10°C	1 $\times$

Datenevaluierung Die Auswertung erfolgt nach [67]. Eine PCR Reaktion wird durch eine Logistikfunktion beschrieben. Deren erster Teil nähert sich einer Exponentialfunktion an, da mit jedem Zyklus das Ausgangsprodukt verdoppelt wird:

$$\text{Menge an amplifizierten Produkt } M = 2^n \quad \text{mit} \quad n = \text{Zyklenzahl}$$

Da zufällige Fehler in der Amplifikation und eine nachlassende Enzymaktivität die Menge M limitieren, kann diese nicht zur Bestimmung der eingesetzten Anfangsmenge an Produkt herangezogen werden. Diesen Zweck erfüllt ein anderes Charakteristika der PCR, der sogenannte "Crossing Point". Damit wird der Wendepunkt bezeichnet, an dem die schnelle Wachstumsrate (1. Ableitung der Logistikfunktion) in eine langsamere Rate übergeht (die 2. Ableitung hat hier einen Nullpunkt). Dieser Punkt befindet sich bei gleicher Ausgangsmenge an immer derselben Zyklenzahl n , die mit abnehmender Ausgangsmenge immer größer wird.

Um die Ausgangsmenge einer Gensequenz bestimmen zu können, wird dessen Ct-Wert mit dem eines ubiquitär exprimierten Gens (hier *Hprt*) validiert.

$$\Delta\text{Ct} = |\text{Ct}[\text{Hprt}] - \text{Ct}[\text{Gen x}]| \quad \text{mit} \quad \text{Ct} = \text{Zyklenzahl am Wendepunkt}$$

Die ΔCt Werte werden von beiden Verdünnungen aus jeweils Wildtyp und *aphakia* cDNA berechnet. Aus den beiden Werten wird der Mittelwert $\overline{\Delta\text{Ct}}$ für Wildtyp und Mutante gebildet. Die Differenz zwischen $\overline{\Delta\text{Ct}}$ von Wildtyp und Mutante läßt sich in das Verhältnis R der ursprünglich eingesetzten Sequenzmengen umrechnen.

$$R = \frac{2^{\overline{\Delta\text{Ct}}[\text{ak}] - \overline{\Delta\text{Ct}}[\text{wt}]}}{2^{\overline{\Delta\text{Ct}}[\text{wt}]}} = \frac{2^{\overline{\Delta\text{Ct}}[\text{ak}]}}{2^{\overline{\Delta\text{Ct}}[\text{wt}]}}$$

Ist $R = 1$, so gab es keinen Unterschied zwischen der Sequenzexpression in Wildtyp oder Mutante. Bei einem Ergebnis größer als 1, wurde die Sequenz in *aphakia* stärker abgelesen als im Wildtyp. Im umgekehrten Fall war das Ergebnis kleiner als 1.

B.4.3 *In situ* Hybridisierung

Bei dieser Methode steht nicht die quantitative Sequenzaktivität im Vordergrund, sondern die Bestimmung des Expressionortes. Dieser wird mittels RNA-Sonden ermittelt, die spezifisch an jene Sequenzen binden, die bereits bei den vorhergehenden Experimenten der Microarrays und der RealTime PCR durch Veränderungen der Expression von Wildtyp zur Mutante in Embryonen im Stadium E 9.5 bis E 13.5 auffielen.

An den Stadien E 9.5 und E 10.5 wurden die *In situ* Hybridisierungen auf ganzen Embryonen durchgeführt ("Whole mount" ISH), da es aufgrund der geringen Größe Probleme beim Einbetten gab. Ab dem Stadium E 11.5 ergab diese Art der Hybridisierung keine eindeutigen Ergebnisse mehr, deswegen wurden ab hier die Hybridisierungen auf Gewebeschnitten durchgeführt.

Vorbereitungen Da die *In situ* Hybridisierungen mit RNA-Sonden durchgeführt wurden, galt für alle Schritte von den Vorbereitungen der Embryonen und Sonden bis zur Beendigung der Hybridisierung besondere Vorsicht, was die Kontamination mit RNasen anging. Alle Puffer und Lösungen, die vor und während der Hybridisierung mit RNA-Sonden benutzt werden, müssen unbedingt RNase-frei sein. Deswegen wird beim Ansetzen MilliQ-H₂O verwendet und die eventuell enthaltenen RNasen durch die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert. Da DEPC stark krebserregend ist, muß es vor Gebrauch der Lösungen durch dreimaliges Autoklavieren wieder zerstört werden. Die Tabellen A.10 und A.12 enthalten alle Puffer, die für die Hybridisierungen sowohl auf Paraffinschnitten als auch auf ganzen Embryonen RNase-frei sein müssen.

Die Embryonen der verschiedenen Stadien werden in PBS präpariert und in 4% PFA/PBS für mindestens 4 Tage im Kühlschrank fixiert. Sind die Embryonen für "Whole Mount" bestimmt, werden sie anschließend in einer Methanolreihe dehydratisiert. Sollen sie für Gewebeschnitte in Paraffin eingebettet werden, so erfolgt die Dehydratisierung über eine Ethanolreihe.

Als Sonden wurden markierte PCR Fragmente verwendet, die mit denselben Primern erstellt wurden, die bereits bei der RealTime PCR eingesetzt wurden (s. Tabelle A.7). Jene cDNA-Sequenzen wurden in Trägervektoren kloniert und anschließend mittels RNA-Polymerasen in RNA zurück geschrieben. Dabei wurden die Sequenzen mit einem Dioxygeninfarbstoff (DIG, Roche) markiert.

Hybridisierung Vor der eigentlichen Hybridisierung muß bei den in Paraffin fixierten Gewebeschnitten das Paraffin durch Xylol entfernt werden. Danach werden die Embryonen zunächst durch eine Methanolreihe ("Whole Mount") bzw. eine Ethanolreihe rehydratisiert. Im Anschluß werden die Embryonen in 6% H₂O₂ gebleicht ("Whole Mount") bzw. in 4% PFA/PBS nachfixiert. Bei beiden Varianten werden nun die Proteine mit Proteinase K verdaut und das Gewebe wieder in 4% PFA/PBS nachfixiert. Nach einem Salzwechsel werden die Embryonen nun im jeweiligen Hybridisierungspuffer aber noch ohne Sonden auf die Hybridisierung vorbereitet.

Zur Hybridisierung werden die RNA-Sonden in einer Verdünnung von 1:100 oder 1:50 mit tRNA und Hybridisierungspuffer angesetzt und 3 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Zugabe von tRNA unterdrückt unspezifische Bindungen während der Hybridisierung. Die Hybridisierung findet am besten über Nacht bei einer Temperatur von 65°C statt.

Nach der Hybridisierung werden die ungebundene Sonden durch mehrere Waschschr

Formamid und durch einen RNase-Verdau entfernt. Ungebundene RNA-Sonden können die folgende Antikörper-Bindung stören. Die Lösungen in Tabelle A.11 werden für die Schritte nach der Hybridisierung verwendet und können deswegen mit unbehandeltem MilliQ-Wasser angesetzt werden. Nach den Hybridisierungen auf ganzen Embryonen werden die Puffer aus Tabelle A.11 ebenfalls benötigt. Zusätzlich werden die Puffer in Tabelle A.13 gebraucht.

Sowohl bei der ISH auf Schnitten als auch auf ganzen Embryonen werden Proben vor der eigentlichen Antikörperzugabe mit sogenannter *Blocking solution* präinkubiert, um das Risiko unspezifischer Bindungen herabzusetzen. Der Antikörper wird dann in einer Verdünnung von 1:5000 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Detektion Zur Anfärbung der Embryonen wird zuerst der Antikörper in mehreren Waschschritten entfernt bevor die Farblösung zugesetzt wird. Diese enthält BM Purple (Roche), das zur besseren Färbung mit Levamisol und Tween20 versetzt ist. Das Substrat wird zu den Embryonen gegeben und solange inkubiert, bis eine Färbung eintritt. Findet die Inkubation bei Raumtemperatur statt, läuft die Färbereaktion schneller ab, allerdings tritt hier auch eine starke Hintergrundfärbung ein. Wenn die Färbung nicht nach einem Tag bei Raumtemperatur eingetreten ist, werden die Embryonen deshalb bei 4°C weiterinkubiert.

Nach erfolgreicher Färbung wird die Reaktion durch einige Waschschritte in NTMT (pH 9,5) abgestoppt und die Embryonen in 4% PFA/PBS nachfixiert. Zur längeren Aufbewahrung werden die Gewebeschnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

B.5 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

Die hier benutzten Nachweismethoden für Proteine beschränken sich auf die Aufreinigung aus Zellaufschlüssen und den Nachweis bestimmter Proteine durch spezifische Antikörperbindung.

Proteinaufreinigung

Zellaufschluß Im Anschluß an die Zellernte (s. Seite 94), wird das Pellet in 200 µl 1 × PLB Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Für den Zellaufschluß wird die Zellsuspension für 5 Minuten bei -80°C schockgefroren, danach für 5 Minuten auf 37°C erhitzt und dann für 30 Sekunden auf der höchsten Stufe des Labormixers gemischt. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt, bevor die Suspension 10 Minuten bei 4°C und 10 000 rpm abzentrifugiert wird. Der Überstand enthält nun den Protein-Zellaufschluß und wird in ein frisches Reaktionsgefäß abgezogen.

Konzentrationsbestimmung Die Proteinkonzentration des Zellaufschlusses wird nach Lowry ermittelt. Zunächst wird eine Eichgerade aus fünf BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt, indem zu den BSA Verdünnungen jeweils 25 µl Reagenz AS (BioRad, 1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B zugegeben wird. Dieser Ansatz wird 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor die Extinktion bei 750 nm gemessen wird. Der Zellaufschluß wird derselben Prozedur unterzogen. Danach werden die hierfür ermittelten Werte mit denen bekannter Konzentration verglichen.

Proteinnachweis durch spezifische Antikörperbindung

Der Proteinnachweis wurde mit dem Elektrophorese- und WesternBlot System NuPAGE von Invitrogen durchgeführt.

Gelelektrophorese Zur Auftrennung des Zellaufschlusses wurde eine Elektrophorese auf einem 4-12 % NuPAGE Novex Bis-Tris PAA Gel durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen: Zur späteren Coomassie-Färbung wurden Konzentrationen von 10 μg und 20 μg aufgetragen, während für den späteren WesternBlot 30 μg und 60 μg eingesetzt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Proben auf demselben Gel gefahren. Bei allen Proben wurden noch 2,5 μl LDS Sample Puffer und 1 μl Reducing Agent in einem Gesamtvolumen von 10 μl zugesetzt. Während die Proben bei 70°C für 10 Minuten denaturiert wurden, wurden 50 ml 20 $\times$ NuPAGE MES SDS Laufpuffer in 1 Liter MilliQ-Wasser verdünnt. Davon wurden 200 ml mit 500 μl Antioxidant Reagenz versetzt, das zur besseren Auftrennung der reduzierten Proteine dient. Dieser Puffer wird in die innere Kammer (zwischen den beiden Gelplätzen) gefüllt, während der unbehandelte Puffer die äußere Kammer füllt. Das Gel wird mit 200 V / 80 mA für ca. 45 Minuten gefahren, bevor es zur Weiterbearbeitung geteilt wird.

Coomassie-Färbung Zur Coomassie-Färbung werden die Lösungen in Tabelle A.16 benötigt. Zur Überprüfung des Zellaufschlusses wurde der Gelteil mit den Proben in einer Konzentration von 10 μg und 20 μg in Coomassie Färbelösung für eine Stunde in einem Schwenker inkubiert. Anschließend wird das Gel in der Entfärbelösung solange geschwenkt, bis der Hintergrund wieder farblos und die Banden die gewünschte Färbung erreicht haben. Das Gel kann danach vakuumgetrocknet werden.

WesternBlot Für die Übertragung der Proteine von Gel zu Membran und die anschließende Detektion werden die Lösungen und Antikörper aus Tabelle A.17 benötigt.

Für den Proteintransfer von Gel zu Membran müssen zunächst die Blotschwämme in ca. 400 ml Transferpuffer equilibriert werden. Hier ist darauf zu achten, daß die Schwämme vollständig durchtränkt sind und keine Blasen entstehen, die den späteren Transfer beeinträchtigen. Auch die Nitrozellulose-Membran wird in 50 ml Transferpuffer für 10 Minuten inkubiert. Kurz vor Verwendung werden noch die zwei zur Membran zugehörigen Filterpapiere durch die Flüssigkeit gezogen. Das Gel wird nicht in Puffer getränkt, sondern direkt aus der Gelkammer in die Blotapparatatur überführt, deren Aufbau in Abbildung ?? gezeigt ist.

Die Proteine werden mit 20-30 V / 170 mA ca. 1 Stunde auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Danach wird sie für 1,5 Stunden in 5 % Milchpulver in PBS inkubiert, bevor die Membran in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt wird. Dort wird sie mit 5 % Milchpulver in PBS, die den ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 enthält über Nacht bei 4° auf einem Schwenker inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran in ein größeres Gefäß überführt und hier 3 $\times$ 20 Minuten mit PBS gewaschen. Währenddessen wird der zweite Antikörper in PBS 1:1000 verdünnt und anschließend auf die Membran aufgebracht. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wird diese wieder 3 $\times$ 20 Minuten mit PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wird die Färbelösung angesetzt, mit der die Membran für 2-5 Minuten gefärbt wird. Haben sich die entsprechenden Banden braun gefärbt, so wird die Reaktion mit H₂O abgestoppt und die Membran getrocknet.

B.6 HISTOLOGIE

Zur genaueren Untersuchung des Phänotyps wurden von drei Wochen alten Mäusen (P21) und von Embryonen (E 17.5) die Augen entnommen, in Plastik eingebettet und mittels Mikrotom (Zeiss) geschnitten. Bei den Embryonen wurde diese Methode auch auf den gesamten Kopf angewendet.

Das entnommene Gewebe wird für drei bis vier Tage in Davidson Lösung bei 4°C fixiert und danach 3×15 Minuten mit 100 % Ethanol entwässert. Das Gewebe muß vor der Fixierung mit JB-4 katalysiert durchtränkt sein (ca. 2 Tage), bevor es in Plastikkapseln mit Polymerisierungslösung eingebettet wird. Bei Augen ist hier darauf zu achten, daß sich der Sehnerv im 90° Winkel zur Kapselachse befindet, da er sonst nicht auf den Schnitten zusammen mit der Linse zu sehen ist.

Die Schnitte werden an einem Ultramikrotom (Zeiss) in einer Dicke von 2 μm mit Glasmessern angefertigt und mit Wasser auf einen gereinigten Objektträger aufgebracht. Bis zur weiteren Verwendung sollten die Schnitte staubfrei aufbewahrt werden. Zur Färbung werden die Schnitte kurz in MilliQ-H₂O angefeuchtet, bevor sie in der Färbelösung für 45 Sekunden gefärbt werden. Danach wird überschüssige Lösung wieder in MilliQ-H₂O abgewaschen. Die Schnitte werden nun über Nacht staubfrei getrocknet, bevor sie mit Eukitt (im Abzug) eingedeckelt werden.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Entstehung der Augen aus dem Vorderhirn	3
1.2	Position des Augenbläschens	4
1.3	Entstehung der Augenlinse	5
1.4	Ausschnitt aus der Regulationskaskade der Augenentwicklung	7
1.5	Phänotyp der <i>aphakia</i> Maus	8
1.6	Das <i>Pitx3</i> Gen	10
2.1	Sequenzähnlichkeiten	14
2.2	Expressionsveränderungen von <i>Glp1r</i> . EST (MG-14-26f22), <i>Afp</i> und <i>Rbp4</i>	19
2.3	Expressionsveränderung in jeweils zwei Stadien	20
2.4	Expressionsveränderung in einem Stadium	21
2.5	<i>Rbp4</i> Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5	25
2.6	<i>Rbp4</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)	27
2.7	<i>Ap2α</i> Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5	28
2.8	<i>Ap2α</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Mittelhirn)	29
2.9	<i>Ap2α</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Hinterhirn)	30
2.10	<i>Ap2α</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)	31
2.11	<i>Pax6</i> Expression in den Stadien E 9.5 und E 10.5	32
2.12	<i>Pax6</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (gesamter Kopf)	33
2.13	<i>Pax6</i> Expression in den Stadien E 11.5 bis E 13.5 (Auge)	34
2.14	<i>Pitx3</i> Expression in den Stadien E 9.0 bis E 11.5	35
2.15	Der <i>Pitx3</i> Promotor	36
2.16	Amplifizierung des <i>Ap2α</i> Gens	37
2.17	Orientierung des <i>Ap2α</i> Gens im pCR.II-TOPO Vektor	38
2.18	<i>Ap2α</i> im pcDNA3.1 Vektor	38
2.19	<i>Ap2α</i> Nachweis in Zellkultur	39
2.20	Cotransfektion des <i>Pitx3</i> Promotors	41
2.21	Der <i>Ap2α</i> Promotor	42
2.22	Orientierung der <i>Ap2α</i> Promotorfragmente in pCR.II-TOPO Vektor	43
2.23	<i>Ap2α</i> Promotorfragmente im pPLLucII Vektor	44
2.24	Aktivität der <i>Ap2α</i> Promotorfragmente	45
2.25	Cotransfektionen der <i>Ap2α</i> Promotorfragmente	46
2.26	Genotypisierung der <i>Pitx3/Pax6</i> Doppelmutanten	48
2.27	Embryonen der <i>Pitx3/Pax6</i> Doppelmutanten (E17.5)	48
2.28	Augen der <i>Pitx3/Pax6</i> Doppelmutanten (P 21)	49
2.29	Köpfe der <i>Pitx3/Pax6</i> Doppelmutanten (E17.5)	49

3.1	Die möglichen Auswirkungen von Pitx3	53
3.2	Augen- und Gehirnentwicklung in den Stadien E 8.0 - E 9.0	55
3.3	Bindung von $Ap2\alpha$ an den <i>Pitx3</i> Promotor	58
3.4	Kontrolle der <i>Pitx3</i> Expression bis E 9.0	59
3.5	Augen- und Gehirnentwicklung in den Stadien E 9.5 - E 13.5	61
3.6	Pitx3 in der Augenentwicklung ab Stadium E 9.5	65
3.7	Der Einfluß von Pax6 und Pitx3 auf die <i>Ap2\alpha</i> Expression	68
B.1	PolyFect/DNA Interaktion	95
B.2	Biolumineszenz-Reaktionen	95
B.3	Überblick über die DNA Microarray-Technik	98
B.4	Farbstoff-Markierung der DNA	99
B.5	Prinzip der RealTime PCR	101

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Funktion der veränderten Sequenzen	15
2.2	Zeitpunkt der Expressionsveränderung	17
2.3	Expressionsveränderungen	18
2.4	Ergebnisse der RealTime PCR	24
3.1	Expression und mögliche Funktion der Kandidatengene	52
A.1	Bakterienstämme und Plasmide	78
A.2	Chemikalien	79
A.3	Geräte	80
A.4	Zellkulturmaterial	80
A.5	Enzyme	81
A.6	Oligonucleotide für PCR	81
A.7	Oligonucleotide für RealTime PCR	82
A.8	Kultivierung von Bakterien	83
A.9	Lösungen zur Agarosegelelektrophorese	83
A.10	Lösungen für ISH (Paraffinschnitte 1)	84
A.11	Lösungen für ISH (Paraffinschnitte 2)	85
A.12	Lösungen für ISH (<i>whole mounts</i> 1)	86
A.13	Lösungen für ISH (<i>whole mounts</i> 2)	86
A.14	Lösungen zur Rehydratisierung	87
A.15	Lösungen zur Microarray Hybridisierung	87
A.16	Lösungen für die Coomassie-Färbung	87
A.17	Lösungen und Antikörper für WesternBlot	88
A.18	Lösungen für Histologie	88
A.19	Sonstige Puffer	89
B.1	Gewebemengen zur RNA Präparation	91
B.2	PCR-Protokolle	93
B.3	Methodenvergleich der Genexpressionsanalyse	96
B.4	RealTime PCR Protokoll	102

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich allen danken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben:

- Herrn **Jochen Graw**, der mir die Arbeit an diesem Thema ermöglichte und meine Dickköpfigkeit ertrug.
- Frau **Erika Bürkle** und Frau **Monika Stadler**, deren methodisches Fachwissen mich vor vielen Fettnäpfchen bewahrte.
- Frau **Mareike Maurer**, Frau **Sabrina Hauser**, Frau **Michaela List** und Frau **Klara Fizi**, mit denen ich immer sehr anregende Diskussionen führte.
- Frau **Claudia Dalke** und Herr **Koustav Ganguly**, mit denen ich interessante Konferenzen erlebte.
- Frau **Aleksandra Terzic** und Frau **Sandra Rieger**, die mir viel über *in situ* Hybridisierungen und DNA Microarrays beibrachten.
- Herrn **Utz Linzner**, dessen schnelle Synthese von Oligos meine Experimente gut voranbrachte.
- Allen Mitglieder des IDG, mit denen ich unglaublich spannende Seminare erlebte.

Zu meinem seelischen Wohlbefinden trugen natürlich noch viele Freunde und Verwandte bei, allen voran **meine Eltern**, die mich in jeder Hinsicht großzügig unterstützen und **mein Schatzbär**, der mich immer wieder auf das "Raab!" im Leben hinwies.

LEBENS LAUF

1. Persönliche Angaben

Name: Münster
Vorname: Doris
Geburtsdatum: 08.02.1978
Anschrift: Schlossberg 2,
D-85386 Eching-Ottenburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

2. Ausbildung

Promotion: 01.02.2001 - 31.01.2005 an der TU München
Studium der Biologie: 21.09.1996 - 31.01.2001 an der TU München
Abschluß mit Diplom, Note 1,7
Gymnasium: 1988 - 1996 am Maria-Theresia-Gymnasium (München)
Abschluß mit Abitur, Note 1,4
Grundschule: 1984 - 1988 in der Grundschule an der Fromundstrasse (München)