

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungs-genetik

Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des *Eya3*-Gens

in Vertebraten

Torben Söker

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. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. Graw
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 18.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.09.2008 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung .....	2
1.1 Das Auge und die Genfamilie <i>Eyes absent</i> ( <i>Eya</i> ) als Gegenstand der Forschung .....	2
1.2 Die strukturellen Merkmale der <i>Eya</i> -Proteine .....	3
1.2.1 Die C-terminale Region mit der <i>Eya</i> -Domäne.....	4
1.2.2 Die N-terminale Region .....	6
1.3 Die funktionale Bedeutung der <i>Eya</i> -Gene .....	7
1.4 Die Beteiligung der <i>Eya</i> -Gene an einem konservierten regulatorischen Netzwerk .....	12
1.5 Zielsetzung .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.2 Enzyme .....	17
2.1.3 Geräte.....	18
2.1.4 Zellen.....	19
2.1.4.1 Bakterienstämme.....	19
2.1.4.2 Eukaryotische Zellen.....	19
2.1.5 Kulturmedien .....	19
2.1.5.1 Kulturmedien für Bakterien.....	19
2.1.5.2 Kulturmedien für eukaryotische Zellen.....	20
2.1.6 Plasmide .....	20
2.1.7 Oligonukleotide .....	22
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 DNA-Methoden .....	24
2.2.1.1 Plasmid-Isolierung aus Bakterien .....	24
Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit.....	24
Präparation von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit.....	25
2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen .....	26
2.2.1.3 Restriktionsspaltungen .....	26

2.2.1.4	DNA-Ligation / Dephosphorylierung von freien DNA-Enden.....	26
	Ligation von DNA.....	26
	Dephosphorylierung von DNA.....	27
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
2.2.2	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	28
	Gel-Extraktion.....	29
2.2.3	Handhabung von Bakterien.....	29
2.2.3.1	Anlegen von Kulturen / Blau-Weiss-Selektion / Glycerol-Stocks...	29
2.2.3.2	Transformation von Bakterien.....	30
2.2.4	PCR – Methoden.....	30
2.2.4.1	Standard-PCR.....	30
2.2.4.2	weitere PCR-Typen.....	31
	PCR mit <i>Pfu</i> -Polymerase.....	31
	PCR mit BD Advantage® 2-Polymerase.....	32
	Real-Time PCR.....	33
	Kolonie-PCR.....	34
2.2.4.3	PCR-Aufreinigung.....	34
2.2.4.4	Klonierung von PCR-Produkten.....	35
2.2.5	RNA-Methoden.....	36
2.2.5.1	RNA-Isolierung.....	36
2.2.5.2	RT-PCR.....	36
2.2.5.3	Northern-Blot.....	37
2.2.6	Methoden zur Expressionsanalyse.....	39
2.2.6.1	<i>LacZ</i> -Färbung.....	39
2.2.6.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	40
2.2.7	Histologische Untersuchungen.....	45
2.2.8	Elektroretinographie (ERG).....	45
2.2.9	Die optokinetische Trommel.....	46
2.2.10	Neurofilament-Färbung.....	46
2.2.11	Zellkultur – Methoden.....	47
2.2.11.1	Kultivierung von Zellen.....	47
2.2.11.2	Splitten von Zellen.....	47
2.2.11.3	Auszählen von Zellen.....	48
2.2.11.4	Cryo-Konservierung von Zellen.....	48

2.2.11.5	Transiente Transfektion der Zellen.....	49
2.2.11.6	Promotoranalyse: Kombinierte Detektion von Firefly Luciferase und <i>Renilla</i> Luciferase.....	50
2.2.12	Untersuchungen am Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ).....	51
2.2.12.1	Expressionsanalyse mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	51
2.2.12.2	Morpholino-Injektionen.....	52
2.3	<i>In silico</i> -Methoden.....	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Molekulare Charakterisierung der <i>Eya3</i> -Mutante.....	55
3.1.1	Identifizierung der Vektorintegration.....	55
3.1.2	Verifizierung der Insertionsmutagenese.....	58
3.1.3	Bestimmung der Expression von <i>Eya1</i> , 2 und 4 sowie <i>Six</i> - und <i>Dachshund</i> -Genen in <i>Eya3</i> -Mutanten.....	60
3.1.3.1	Expression anderer <i>Eya</i> -Gene.....	60
3.1.3.2	Expression der <i>Six</i> - und <i>Dachshund</i> -Gene.....	61
3.1.4	Untersuchungen zur Transkriptionsregulation von <i>Eya3</i> .....	62
3.1.4.1	Analyse der <i>Eya3</i> -Expression in <i>Pax6</i> - und <i>Pitx3</i> -Mutanten.....	62
3.1.4.2	Untersuchungen am <i>Eya3</i> -Promotor.....	64
	<i>In silico</i> -Analysen der Promotorregion.....	64
	Vorbereitung der <i>in vitro</i> -Arbeiten.....	67
	<i>In vitro</i> -Arbeiten im Zellkulturtestsysteem.....	68
3.2	Analysen zur Funktion von <i>Eya3</i> in der Maus.....	73
3.2.1	Nachweis der Integration des pT1 $\beta$ geo-Vektors über die Expression der <i>lacZ</i> -Kassette in den Mutanten.....	73
3.2.2	Bestimmung des Expressionsprofils von <i>Eya3</i> in der Maus.....	74
3.2.2.1	Embryonale Expression.....	74
3.2.2.2	Expression von <i>Eya3</i> im adulten Organismus.....	82
3.2.3	Untersuchungen zur Charakterisierung der <i>Eya3</i> -Mutante.....	83
3.2.3.1	Vorbereitung der Studien in der Deutschen Mauslinik.....	83
3.2.3.2	Einfluss von <i>Eya3</i> auf das neuronale Wachstum.....	84
3.2.3.3	Untersuchungen am Auge.....	87
	Histologie.....	87
	Elektroretinographie (ERG).....	88
	Untersuchung in der optokinetischen Trommel.....	89

3.2.3.4	Real-Time PCR: Validierung der Daten aus der differentiellen Gen- Expressionsanalyse für <i>Eya3</i> .....	90
3.3	Vergleichende Untersuchungen zur Funktion von <i>Eya3</i> im Zebrafisch.....	90
3.3.1	<i>eya3</i> -Expression im Zebrafischembryo.....	91
3.3.2	Morpholino-knockdown für <i>eya3</i> .....	92
4	Diskussion.....	95
4.1	Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung der <i>Eya3</i> -Mutante .....	95
4.2	Studien zur transkriptionellen Regulation von <i>Eya3</i> .....	96
4.3	Funktionsbezogene Analysen zu <i>Eya3</i> .....	98
4.3.1	<i>Eya3</i> – ein bedeutender Faktor in der Augenentwicklung? .....	98
4.3.2	Aufklärung einer Funktion von <i>Eya3</i> außerhalb des Auges .....	101
4.3.2.1	Expressionsmuster von <i>Eya3</i> .....	101
4.3.2.2	<i>Eya3</i> - eine Funktion im neuronalen Wachstum ? .....	102
4.3.2.3	Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der <i>Eya3</i> -Mutante .....	104
Analyse der Muskelkraft .....	106	
Analyse der Herzfunktion .....	107	
Verhaltensanalyse .....	109	
4.3.2.4	Differentielle Genexpressionsanalyse in <i>Eya3</i> -Mutanten mittels cDNA-Microarray .....	110
4.4	Vergleichende Studien zu <i>Eya3</i> im Zebrafisch.....	112
4.5	Ausblick .....	115
5	Literaturverzeichnis .....	117
6	Anhang .....	128
6.1	Ergänzende Daten zu den Untersuchungen am Auge.....	128
Funduskopie und Spaltlampe .....	128	
Laserinterferenzbiometrie.....	129	
6.2	Allgemeine Charakterisierung der <i>Eya3</i> -Mutante in der Deutschen Mausklinik (German Mouse Clinic, GMC) .....	131
Morphologische Untersuchungen .....	131	
Metabolische Funktionen .....	132	
Histologische Untersuchung der Testes .....	132	
Analyse der Lungenfunktion .....	133	
Auditives Testverfahren: Click-box-Test .....	133	

	Verhaltensanalyse .....	133
	Test der Muskelkraft in den vorderen Extremitäten .....	134
	Kardiovaskuläre Funktion.....	135
6.3	Genexpressionsanalyse: cDNA-Microarray .....	137
6.4	Ergebnisse aus MatInspector .....	140
6.5	Untersuchungen im Zebrafisch .....	141
7	Abkürzungsverzeichnis.....	142

## Zusammenfassung

Studien an *Drosophila melanogaster* konnten zeigen, dass Mutationen im Gen *eyes absent* zu schweren embryonalen Defekten bei der Augenentwicklung führen. Dagegen ist die Funktion der orthologen Gene *Eya1-4* in Vertebraten nur unzureichend verstanden. Vor allem für das Gen *Eya3* konnte bisher weder in der Maus noch im Menschen eine Funktion ermittelt werden.

Aus diesem Grund wurde der Phänotyp einer *Eya3*-defizienten Mauslinie charakterisiert. Die Genexpressionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung und *lacZ*-Färbung veranschaulichte ein breites Expressionsprofil von *Eya3* während der embryonalen Entwicklung, z.B. in Gehirn, Auge, Somiten, Herz und Extremitäten. Dieses legt die Möglichkeit pleiotroper Auswirkungen nahe. Interessanterweise ergaben eingehende Untersuchungen in den Mutanten, anders als in *Drosophila*, keine Hinweise auf Augendefekte. Hingegen konnte die Färbung der Neurofilamente leichte Veränderungen im Wachstum des *Nervus trigeminus* zeigen. Darüber hinaus wiesen die Mutanten vor allem Beeinträchtigungen in der Elektrophysiologie des Herzens, der Muskelkraft und des lokomotorischen Verhaltens auf. Eine differentielle Genexpressionsanalyse zeigte eine Vielzahl verändert exprimierter Gene in Herz und Gehirn der *Eya3*-defizienten Tiere. Dabei konnte die verringerte Expression von *Nup155* in beiden Geweben mit Hilfe der Real-Time PCR bestätigt werden. Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von *Eya3* in der Zellkultur ergaben außerdem Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von *Pax6* und *Prox1*.

Vergleichende Studien im Zebrafisch konnten wie in der Maus eine ubiquitäre Expression für *eya3* während der frühen Neurogenese mit einem Übergang zur spezifischen Expression in späteren Stadien zeigen. Die Morpholino-Injektion in Zebrafischembryonen führte im Gegensatz zu Studien im *Xenopus* nicht zu einem Verlust neuronaler Strukturen und der daraus resultierenden Gewebe.

Weitere Untersuchungen in anderen Spezies könnten zu einem noch besseren Verständnis der Aufgaben von *Eya3* in Vertebraten beitragen. Dabei sollten in zukünftigen Untersuchungen altersabhängige Effekte besonders berücksichtigt werden. Denn die vielfältigen physiologischen Veränderungen in *Eya3*-Mutanten führen in der Summe zu einer verschlechterten Gesamtkonstitution der Tiere und könnten sich mit steigendem Alter noch offensichtlicher auswirken.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Auge und die Genfamilie *Eyes absent (Eya)* als Gegenstand der Forschung

Lichtsinneseorgane zur Wahrnehmung von Reizen aus der Umwelt sind in tierischen Organismen weit verbreitet. Es können dabei verschiedene Stufen der Entwicklung beobachtet werden, die von einer vergleichsweise einfachen Ansammlung von Photorezeptoren an der Körperoberfläche bis hin zu komplexen visuellen Systemen reichen. Beispiele für die Mannigfaltigkeit der Lichtsinnesorgane sind die Photorezeptoren auf der Körperoberfläche des Regenwurms, das Facettenauge der Insekten oder das Einzellinsenauge bei höher entwickelten Vertebraten. Die große Bedeutung des visuellen Systems für die Außenwahrnehmung beim Mensch war und ist treibende Kraft für die Forschung am Untersuchungsobjekt Auge. Dabei nimmt die Identifizierung der an der Augenentwicklung beteiligten Gene eine wichtige Rolle ein, nicht zu letzt, um Erkrankungen des visuellen Systems frühzeitig zu erkennen und, wenn möglich, zu heilen. Gene und deren Defekte, die für die Entstehung von Augenerkrankungen beim Menschen ursächlich sind, können heutzutage über die Maus (*Mus musculus*) als Modellsystem identifiziert und weiter untersucht werden. Ebenso wird bei der Suche nach Genen in Vertebraten, die für Entwicklungsprozesse entscheidend sind, auf bereits bekannte Gene aus *Drosophila melanogaster* und anderen Invertebraten zurückgegriffen, die in ihrer Sequenz zwischen den verschiedenen Spezies konserviert sind und analoge Funktionen in den Organismen ausüben. Ein gutes Beispiel hierfür liefern Studien am Gen *Paired-box6 (Pax6)* der Vertebraten und dessen Homolog *eyeless (ey)* in *Drosophila*, die vergleichbare Aufgaben bei der Induktion der Augenbildung in den verschiedenen Spezies ausüben (Tomarev, 1997).

Mit der Entdeckung des für die Augenentwicklung in *Drosophila* unabdingbaren Gens *eyes absent (eya)* (Bonini et al., 1993) wurde das erste Mitglied einer neuen Genfamilie identifiziert. In den folgenden Jahren wurde offenkundig, dass die Mitglieder dieser Familie weit verbreitet sind und in den meisten Arten des Tierreichs (Jemc und Rebay, 2007a), aber auch in höheren Pflanzenarten wie zum Beispiel der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) oder dem Reis

(*Oryza sativa*) vorkommen (Rayapureddi et al., 2005; Takeda et al., 1999). Im Tierreich konnten orthologe Gene selbst in einfachen Organismen, wie in der zu den Manteltieren gehörenden Art *Ciona intestinalis* (Mazet et al., 2005) oder im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Furuya et al., 2005) identifiziert werden. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass in den Genomen der Säugetiere und der übrigen Vertebraten jeweils vier orthologe Gene zu *eyes absent* aus *Drosophila* vorhanden sind. Entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung wurden die auf verschiedenen Chromosomen lokalisierten Gene mit den Bezeichnungen *Eya1-4* versehen (Abdelhak et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Xu et al., 1997a; Borsani et al., 1999). Die murinen Gene *Eya1-4* kartieren auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 10, wobei die Größe der Gene zwischen 85 kb (*Eya3*) und 246 kb (*Eya4*) beträgt.

## 1.2 Die strukturellen Merkmale der Eya-Proteine

Die nähere Untersuchung der Struktur der von den *Eya*-Genen kodierten Proteine machte deutlich, dass eine allgemeine Aufteilung der Proteinstruktur in einen gering konservierten N-terminalen Bereich und einen hochkonservierten C-terminalen Bereich möglich ist (Duncan et al., 1997; Bonini et al., 1998; Rebay et al., 2005). Charakteristisch für den hochkonservierten C-terminalen Bereich ist die sogenannte Eya-Domäne (ED). Dagegen findet sich im gering konservierten N-terminalen Bereich der Proteine eine Prolin-Serin-Threonin (PST)-reiche Region mit einer darin eingebetteten kleinen zweiten Domäne, die vielfach als Eya-Domäne 2 (ED2) bezeichnet wird (Duncan et al., 1997; Zimmermann et al., 1997) (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1** Struktur der Eya-Proteine. C-terminal gelegen ist die hochkonservierte, aus 271 Aminosäuren bestehende Eya-Domäne (ED). Der N-terminus beinhaltet eine Prolin-Serin-Threonin reiche Region, in die eine gering konservierte zweite Domäne (ED2) eingebettet ist.

### 1.2.1 Die C-terminale Region mit der Eya-Domäne

Die C-terminale Region der durch die *Eya*-Gene kodierten Proteine beinhaltet die hydrophobe Eya-Domäne. Diese Domäne weist in den meisten Spezies eine Größe von ca. 270 Aminosäuren auf und enthält zwei konservierte  $\alpha$ -helikale Abschnitte. Vergleichende Analysen konnten zeigen, dass sie zu einem hohen Prozentsatz zwischen verschiedenen Arten konserviert ist. So weisen die C-terminale Region der Eya-Proteine von *Drosophila* und Mensch bzw. *Drosophila* und Maus trotz der getrennten Entwicklung von mehr als 500 Millionen Jahren eine Identität der Aminosäuresequenz von über 60 % auf. (Abdelhak et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Xu et al., 1997; Borsani et al., 1999). Die Konservierung der Domäne beschränkt sich dabei nicht nur auf die Aminosäuresequenz, sondern auch auf funktionale Aspekte. So konnte die Expression von cDNA der murinen Gene *Eya1-3* in *eyes absent*-Mutanten von *Drosophila* die Ausbildung von Augen bewirken und damit den endogenen Funktionsverlust kompensieren (Bonini et al., 1997; Bui et al., 2000).

Bei der Suche nach der Aufgabe, die die C-terminale Region in Eya-Proteinen übernimmt, konnte in Experimenten mit dem Yeast-two-hybrid-System gezeigt werden, dass Eya-Proteine mit Proteinen der Gene *sine oculis* (*so*) (Pignoni et al., 1997; Silver et al., 2003) und *dachshund* (*dac*) (Chen et al., 1997) interagieren können. Diese Interaktion konnte später auch mit den homologen Proteinen der Vertebraten nachvollzogen werden (Heanue et al., 1999; Ohto et al., 1999; Buller et al., 2001). *In vitro*-Studien konnten ferner offenbaren, dass die Mediatoren bei der Interaktion von Eya- und Six-Proteinen die Eya- und die Six-Domäne sind (Pignoni et al., 1997; Buller et al., 2001) bzw. die Eya- und die Dachshund-Domäne 2 (DD2) bei der Wechselwirkung von Eya- und Dach-Proteinen (Bui et al., 2000).

Diese Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion ist von essentieller Bedeutung für die Wirkung der Eya-Proteine, da diese selbst kein DNA-Bindemotiv besitzen und erst die Interaktion eine Wirkung der Eya-Proteine als transkriptionelle Co-Faktoren im Zellkern ermöglicht (Ohto et al., 1999). Im Zellkern erfolgt die Bindung an die DNA über die Homöobox-Domäne der Six-Proteine (Kawakami et al., 2000) bzw. über die Dachshund-Domäne 1 (DD1) der Dach-Proteine (Bui et al., 2000).

Beispiele für ein synergistisches Zusammenwirken der Eya-, Six- und Dach-Proteine konnten zahlreiche Untersuchungen liefern. So wurde eine Interaktion von Eya1 mit Six1 in der frühen Entwicklung der Nieren beobachtet (Xu et al., 2003) oder eine Interaktion von Eya2 mit Dach2 und Six1 zur Regulation von *Pax3* während der Myogenese im Huhn (Heanue et al., 1999).

Auch für Eya3-Proteine gibt es Belege für eine Interaktion mit Six- und Dach-Proteinen. So konnte in Zellkulturversuchen für Eya3-Proteine eine Interaktion mit Six1, Six2, Six4 und Six5 nachgewiesen werden (Ikeda et al., 2002), dagegen nicht mit Six3 und Six6-Proteinen (Buller et al., 2001). Außerdem konnten *in vitro*-Experimente zeigen, dass die Co-Transfektion von *Eya3*, *Six5* und *Dach1* zu einer erheblichen Zunahme der Aktivität eines Reporters führt, während *Eya3* und *Dach1* sowie *Six5* und *Dach1* den Reporter allein nicht stimulieren konnten (Ikeda et al., 2002). In einer weiteren *in vitro*-Untersuchung führte die alleinige Expression von *Six1* zur Reprimierung eines Reporters, die durch die Co-Expression von *Dach1* sogar noch verstärkt werden konnte. Wurde zusätzlich noch *Eya3* co-exprimiert, dann konnte die Reprimierung des Reporters in eine Aktivierung umgewandelt werden (Li et al., 2003). Analog zu den Studien, die ein Zusammenwirken der Proteine zeigen konnten, veranschaulichten andere Untersuchungen, dass Mutationen oder die Deletion der Eya-Domäne zum Verlust der Interaktion zwischen Eya-, Six- und Dach-Proteinen in *Drosophila* bzw. der homologen Proteine in Vertebraten führen (Bui et al., 2000; Silver et al., 2003; Ikeda et al., 2002).

Innerhalb der Eya-Domäne fallen drei Motive durch ein besonders hohes Maß an Konservierung auf, für die eine Protein-Tyrosin-Phosphatase-Funktion angenommen wird (Tootle et al., 2003; Li et al., 2003; Rayapureddi et al., 2003). *In vitro*-Studien mit rekombinantem Eya-Protein aus verschiedenen Organismen konnten die vermutete Phosphatase-Funktion für die Eya-Domäne aus Maus, *Drosophila* und *Arabidopsis* belegen (Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Die insgesamt höchste dephosphorylierende Aktivität wurde dabei für die Eya-Domäne aus *Arabidopsis* festgestellt, während unter den Maus-Proteinen die Domäne aus Eya3 die höchste Phosphatase-Aktivität offenbarte. Die insgesamt niedrigste Aktivität ergab sich für die Eya-Domäne aus *Drosophila* (Rayapureddi et al., 2003). *In vivo*-Studien an *Drosophila*, die die Bedeutung der katalytischen Aktivität der Eya-Domäne für die Entwicklung des Facettenauges

demonstrieren, konnten die *in vitro* ermittelte Bedeutung der Phosphatase-Funktion bestätigen (Rayapureddi et al., 2003; Tootle et al., 2003). Bei der Suche nach den möglichen Substraten der katalytischen Aktivität der Eya-Proteine konnten *in vitro*-Analysen bisher erst zwei potentielle Ziele aufzeigen. Zum einen scheint die RNA-Polymerase II ein Substrat zu sein (Li et al., 2003), zum anderen konnte Eya selbst als mögliches Ziel einer dephosphorylierenden Wirkung ausfindig gemacht werden (Tootle et al., 2003).

Die Entdeckung der Phosphatase-Aktivität eröffnet neue Perspektiven für die Aufgaben der Eya-Proteine, denn die Eya-Domäne besitzt folglich eine doppelte Funktion, die neben der Möglichkeit zur Interaktion auch eine zweite, unabhängige katalytische Funktion beinhaltet (Jemc und Rebay, 2007b). Dabei scheint die katalytische Aktivität in dem genannten Beispiel der Interaktion zwischen Eya3, Six1 und Dach1 ursächlich für den Wechsel von einer inhibierenden zu einer aktivierenden Wirkung des Komplexes zu sein (Li et al., 2003). Die Phosphatase-Funktion der Eya-Proteine könnte die weite Verbreitung der Genfamilie erklären und zumindest ein weiterer Grund für das hohe Maß an Konservierung des C-terminalen Bereichs der Proteine zwischen verschiedenen Organismen sein (Rebay et al., 2005). Darauf deutet auch, dass die Eya-Proteine in Pflanzen zwar die hochkonservierte Eya-Domäne besitzen, aber keinen beziehungsweise nur einen sehr kurzen N-terminalen Abschnitt haben (Rayapureddi et al., 2005).

### 1.2.2 Die N-terminale Region

Neben der konservierten C-terminalen Region kennzeichnet vor allem die Eya-Proteine aus tierischen Organismen noch eine N-terminale Region von variabler Länge und geringer Sequenzkonservierung (Abb. 1.1). In diesem N-terminalen Bereich wurde eine tyrosinreiche Domäne (Eya-Domäne 2, ED2) lokalisiert, die in eine PST-reiche Region eingebettet ist und gegenüber der Eya-Domäne mit einer Länge von rund 30 Aminosäuren deutlich kürzer und wesentlich weniger konserviert ist. Neben den genannten Abschnitten enthält der N-terminale Bereich noch zwei *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Phosphorylierungs-Sequenzen, die als Bindestellen für eine Aktivierung der Eya-Proteine über diesen Signalweg in Betracht kommen (Hsiao et al., 2001).

Die Funktion des N-terminalen Bereichs ist noch unklar (Jemc und Rebay, 2007a). Für die Prolin-Serin-Threonin (PST)-reiche Region mit der ED2 konnte in einigen *in vitro*-Studien eine transaktivierende Funktion gezeigt werden (Pignoni et al., 1997; Xu et al., 1997b; Silver et al., 2003). Der N-terminale Bereich der Eya-Proteine könnte somit als Aktivator bei der Interaktion von Eya-Proteinen mit Six- und Dach-Proteinen eine Bedeutung haben. Dabei scheint die PST-reiche Region eine besondere Rolle zu haben, denn die ED2 führt ohne diesen Abschnitt nur zu einer geringen Aktivierung eines Luciferase-Reporters und wird vermutlich nur für die maximale Aktivierung des Zielgens benötigt (Silver et al., 2003; Jemc und Rebay, 2007a). Interessanterweise konnte die N-terminale Region von Eya1 und Eya2 bei *in vitro*-Experimenten eine stärkere transkriptionelle Aktivierung bewirken als der N-terminale Bereich von Eya3 (Xu et al., 1997b). Weitere Untersuchungen lieferten den Hinweis, dass eine Funktion des N-terminalen Bereiches in der Interaktion von Eya-Proteinen mit sich selbst liegt, um damit die eigene Aktivität zu kontrollieren (Silver et al., 2003).

Eya-Proteine sind in der Zelle cytoplasmatisch lokalisiert und besitzen selbst kein DNA-Bindemotiv. Somit scheint die Funktion des N-terminalen Bereichs in Abhängigkeit zur gleichzeitigen Präsenz der C-terminalen Eya-Domäne zu stehen, die für die Protein-Protein-Interaktion mit Six und Dach verantwortlich ist (Ohto et al., 1999; Silver et al., 2003). Ob der N-terminale Bereich Einfluss auf die Phosphatase-Funktion der Eya-Domäne hat, ist noch ungeklärt. Neuere Untersuchungsergebnisse legen jedoch nahe, dass der N-terminale Bereich die Phosphatase-Funktion einschränkt (Rayapureddi und Hegde, 2006).

### **1.3 Die funktionale Bedeutung der *Eya*-Gene**

Die genauen Aufgaben, die Eya-Proteine in der Zelle übernehmen, sind bisher noch unbekannt. Jedoch legen die Resultate bisheriger Studien eine Bildung von Komplexen mit Six- und Dach-Proteinen zur transkriptionellen Kontrolle Zellzyklus-regulierender Gene nahe. So konnte zum Beispiel bei *in vitro*-Studien mit einer Säugerzelllinie die Anwesenheit der Proteine Eya1 oder Eya3 mit Six1 auf den regulatorischen Sequenzen der Gene *c-Myc* oder *Gdnf* (*glial-derived neurotrophic factor*) nachgewiesen werden (Li et al., 2003). Dazu passt, dass

eine Reihe von Untersuchungen eine Beteiligung der *Eya*-Gene und ihrer Proteine an zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose zeigen konnten (Bonini et al., 1993; Clark et al., 2002; Silver und Rebay, 2005; Nica et al., 2006). Auch in *Drosophila* gibt es zahlreiche Belege für einen regulatorischen Einfluss von *eyes absent* auf die Proliferation und die Differenzierung von Zellen (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997; Bai und Montell, 2002).

Die durch Mutationen in *Eya*-Genen verursachten phänotypischen Beeinträchtigungen demonstrieren die vielfältige Wirkung der *Eya*-Gene und ihrer Proteine. Häufig sind die identifizierten Mutationen in der *Eya*-Domäne lokalisiert und offenbaren damit die Bedeutung dieser Domäne für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. In Studien an *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der *Eya*-Domäne zu einer Null-Aktivität führt (Bui et al., 2000) und schwere Beeinträchtigungen in der embryonalen Entwicklung bedingt. Die Missbildungen beschränken sich dabei nicht nur auf das namensgebende Fehlen der Augen, das durch ein Absterben der Vorläufer-Zellen verursacht wird (Bonini et al., 1993), sondern drücken sich auch in einer Deformation des Kopfes mit Missbildungen des Gehirns, einer Beeinträchtigung der Entwicklung der Körpermuskulatur sowie einer männlichen und weiblichen Infertilität aufgrund von Missbildungen der Gonaden aus (Bonini et al., 1993; Boyle et al., 1997; Bonini et al., 1998).

Auch in den Spezies der Vertebraten konnten Mutationen in den Genen *Eya1-4* mit verschiedenen Phänotypen beziehungsweise Syndromen in Verbindung gebracht werden. Hierbei fällt auf, dass die auslösenden Mutationen sehr häufig in dem Genabschnitt lokalisiert sind, der für die *Eya*-Domäne kodiert. So konnte der Knockout für das Gen *Eya1* in der Maus (Xu et al., 1999) zeigen, dass *Eya1*-Proteine die initialen Prozesse zur Ausbildung von Ohren und Nieren entscheidend mitbeeinflussen. Ein Verlust der in der *Eya*-Domäne gelegenen Exons 10 – 13 in den homozygoten Mutanten führt zu einer embryonalen Lethalität verbunden mit erheblichen Beeinträchtigungen der Entwicklung der Nieren, der Ohren und der Muskulatur. Die heterozygoten Embryonen überleben, zeigen aber Missbildungen der Nieren und des Mittelohres. Der in der Maus ermittelte pathologische Phänotyp weist Parallelen zu humanen Patienten auf, die an dem autosomal dominanten *branchio-oto-renal* (BOR)-Syndrom

leiden. Für die BOR-Erkrankung (Melnick et al., 1976) können verschiedene Gen-Defekte ursächlich sein. In 40 % der Fälle wird diese Erkrankung jedoch durch Mutationen im *EYA1*-Gen ausgelöst (Chang et al., 2004). Humane Patienten mit dem BOR-Syndrom zeigen vor allem schwere Fehlbildungen des Hörorgans, die in fast 100 % der Erkrankungen zur Taubheit führen (Zhang et al., 2004). Weitere, das BOR-Syndrom kennzeichnende Symptome sind Anomalien bei der Entwicklung des viszeralen Kopf-Halsbereichs (bei ca. 70 % der Erkrankten) sowie Anomalien der Nieren (bei rund 40 % der Erkrankten), die je nach Schwere der Störung zum Tode führen können (Zhang et al., 2004; Abdelhak et al., 1997). In vielen Fällen konnten die für das BOR-Syndrom ursächlichen Mutationen in der Eya-Domäne lokalisiert werden (Abdelhak et al., 1997), die einen Verlust der Interaktion mit Six-Proteinen bedingen können (Ozaki et al., 2002). Ebenso können Mutationen im *SIX1*-Gen, die die Komplexbildung von EYA1 und SIX1 verhindern, ursächlich für die Entstehung des BOR-Syndroms sein (Ruf et al., 2004).

Mit einer Missbildung des Hörorgans assoziierte Mutationen finden sich auch in Zebrafisch-Mutanten mit dem sog. *dog-eared* Phänotyp (Whitfield et al., 1996). Hier kommt es zu einer Fehlentwicklung des Innenohres, wobei ebenfalls Punktmutationen in der Eya-Domäne als ursächlich identifiziert wurden. Die Mutationen führen zu einem verkürzten Protein und leiten damit einen durch Apoptose bedingten, erhöhten Verlust an Zellen in den otischen Vesikeln der Mutanten ein (Kozlowski et al., 2005).

Neben Mutationen im *EYA1*-Gen konnten in humanen Patienten mit einem Verlust des Hörvermögens auch Mutationen im *Eya4*-Gen als ursächlich identifiziert werden (Wayne et al., 2001; Pfister et al., 2002). Außer der Beeinträchtigung des Gehörs fand sich in einigen Patienten noch eine zusätzliche Kardiomyopathie mit einer daraus resultierenden Herzinsuffizienz (Schönberger et al., 2005). In allen Fällen verursachten die Mutationen eine Verkürzung des C-terminalen Abschnittes der Proteine. Dieser war verbunden mit dem teilweisen oder vollständigen Verlust der Eya-Domäne, wobei die zum Herzphänotyp führende Mutation die größte Deletion offenbarte (Schönberger et al., 2005).

In dem Mausmodell zu *Eya4*, in dem ein Teil der Eya-Domäne deletiert ist, weisen die Tiere einen frühzeitigen Hörverlust auf. Dieser ist bedingt durch

Veränderungen der Mittelohrstruktur, die zur Entstehung einer chronischen Entzündung (*otitis media*) in diesem Bereich beitragen (Depreux et al., 2008; Lazaridis und Saunders, 2008). Über eine Veränderung der Herzleistung in der *Eya4*-Mausmutante ist bisher nichts bekannt. Dagegen konnten Studien an Zebrafischembryonen mit Morpholino-Oligonukleotiden gegen *eya4*-Transkripte ebenfalls eine Beeinträchtigung der Herzentwicklung herbeiführen. Die Untersuchung der injizierten Zebrafischembryonen belegt eine Aufgabe für *eya4* im embryonalen Herz durch die Präsenz von perikardialen Ödemen und der verringerten Kontraktionsleistung der Ventrikel (Schönberger et al., 2005).

Auffällig sind neben auditiven, nephrologischen und kardiovaskulären Funktionen der *Eya*-Gene auch eine Beteiligung an der muskulären Entwicklung und der neuronalen Differenzierung. So ergaben Untersuchungen an murinen *Eya1<sup>-/-</sup>Eya2<sup>-/-</sup>*-Doppelmutanten schwere muskuläre Defekte, die zu einer fehlenden Entwicklung der Skelettmuskulatur in den Extremitäten führen (Grifone et al., 2006). Ähnliche muskuläre Defekte konnten auch schon in Doppelmutanten für *Eya1* und *Six1* nachgewiesen werden, bei denen alle hypaxialen Muskeln fehlen und die epaxiale Muskulatur stark reduziert ist (Li et al., 2003). Außerdem kommt es in *Eya1<sup>-/-</sup>*-Embryonen zu einer Störung der neuronalen Differenzierung und dadurch bedingt zu einer beeinträchtigten Projektion der Nervenfasern zu ihrem Zielort und sogar zu einem Verlust einzelner sensorischer Ganglien (Zou et al., 2004). Probleme bei der neuronalen Migration sind auch schon in homozygoten *eya*-Mutanten von *Drosophila* entdeckt worden, die eine desorganisierte Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems zeigen (Bonini et al., 1998). Dabei scheint *eya* eine wichtige Rolle bei der Migration der Axone bestimmter Neuronentypen zu spielen (Miguel-Aliaga et al., 2004).

Hinweise auf die Funktion des Gens *Eya3* in Vertebraten konnten bisher nur Untersuchungen aus der Gattung *Xenopus* liefern. Diese offenbarten einen starken Einfluss von *Xeya3* (*Xenopus* Homolog von *Eya3*) auf die Entwicklung von Auge und Gehirn (Kriebel et al., 2007). *Xeya3* wurde als einziges Mitglied dieser Genfamilie spezifisch während der embryonalen Entwicklung in der vorderen Neuralplatte exprimiert. Im Rahmen weiterer Analysen wurde deutlich, dass *Xeya3* einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der neuronalen Vorläuferzellen in dieser Region hat und die Inhibierung dieses Gens zu einer

erheblichen Beeinträchtigung der Ausbildung der vorderen Neuralplatte und den daraus hervorgehenden Strukturen führt.

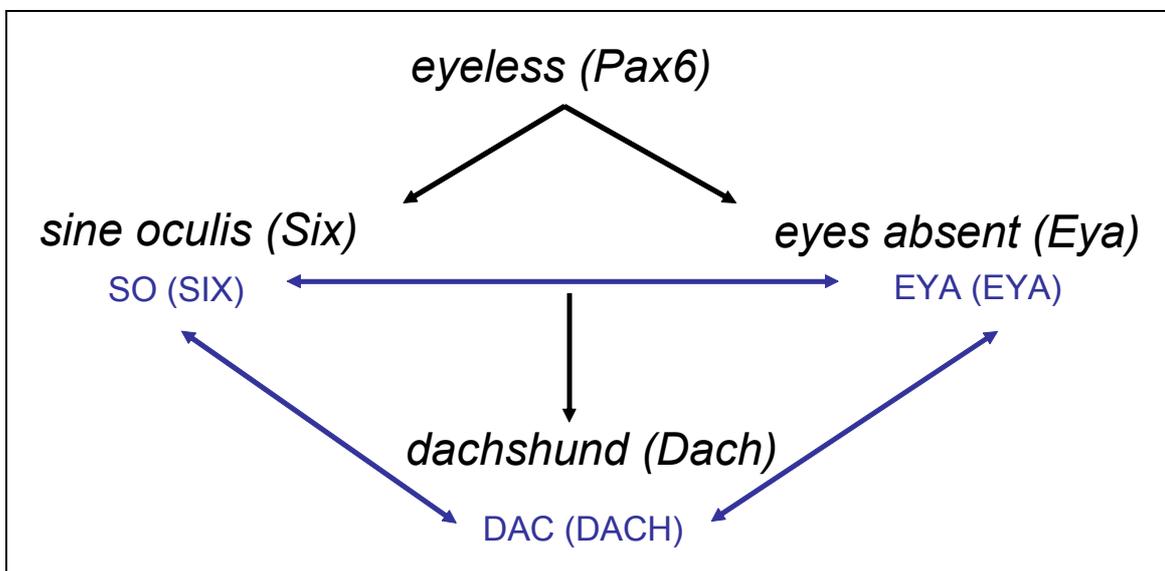
Die nachfolgende Tabelle 1.1 enthält eine Übersicht der im Zusammenhang mit Mutationen in *Eya*-Genen verschiedener Vertebratenspezies beobachteten Phänotypen und Syndrome.

**Tabelle 1.1** Zusammenfassende Übersicht der mit Mutationen in den *Eya*-Genen assoziierten Phänotypen bzw. Syndrome in verschiedenen Spezies der Vertebraten. Die zu Beginn dieser Studie bekannten Phänotypen sind in schwarzer Schrift aufgeführt, die weiteren im Laufe dieser Studie veröffentlichten Phänotypen sind in blauer Schrift dargestellt. Auffällig ist, dass bisher keine Ergebnisse über die mögliche Funktion des *Eya3*-Gens in Mensch, Maus oder Zebrafisch veröffentlicht worden sind.

	Mensch	Maus	Zebrafisch	Xenopus
<b><i>Eya1</i></b>	<i>branchio-otorenales</i> (BOR) Syndrom (Abdelhak et al., 1997; Orten et al., 2008)	<u><i>Eya1</i><sup>+/-</sup></u> Anomalien der Nieren, Hörverlust <u><i>Eya1</i><sup>-/-</sup></u> Fehlen von Außenohr, Nieren, Thymus, Hirnanhangsdrüse, muskuläre und neuronale Defekte → embryonal lethal (Xu et al., 1999; Xu et al., 2002; Li et al., 2003; Zou et al., 2004 ;	Anomalien in der Entwicklung von Gehörbläschen ( <i>dog eared-Mutation</i> ) und Nebenschilddrüse (Kozlowski et al., 2005; Nica et al., 2006)	unbekannt
<b><i>Eya2</i></b>	Nachweis der verstärkten Expression in epithelialen Gebärmuttertumorzellen (Zhang et al., 2005)	keine erkennbaren Veränderungen, lebensfähig und fertil, aber muskuläre Defekte bei <i>Eya1/Eya2</i> -Doppelmutanten (Grifone et al., 2006)	unbekannt	unbekannt
<b><i>Eya3</i></b>	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Verlust anteriorer neuronaler Strukturen (Kriebel et al., 2007)
<b><i>Eya4</i></b>	Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Hörverlust (Zhang et al., 2004; Schönberger et al., 2005)	morphologische Veränderung des Mittelohres, dadurch Entzündung des Mittelohres ( <i>otitis media</i> ) (Depreux et al., 2008)	perikardiale Ödeme, verringerte ventrikuläre Kontraktion (Schönberger et al., 2005)	unbekannt

## 1.4 Die Beteiligung der *Eya*-Gene an einem konservierten regulatorischen Netzwerk

Wie schon aus der Suche nach den molekularen Ursachen für die im Zusammenhang mit den *Eya*-Genen beobachteten Phänotypen in Vertebraten hervorgeht, hat die *Eya*-Domäne in vielen Fällen eine zentrale Bedeutung durch die Möglichkeit zur Protein-Protein-Interaktion. Diese auch schon aus Studien an *Drosophila* hervorgegangene Bedeutung der Interaktion von *Eya*-, *So*- und *Dac*-Proteinen hat zur Entwicklung eines Modells geführt, das diese Gene und ihre Proteine in einen regulatorischen und funktionalen Zusammenhang stellt, wobei *eyeless* (*ey*) als übergeordnetes Schlüsselgen (engl. *master control gene*) die Expression der anderen Gene induziert (Bonini et al., 1997; Chen et al., 1997; Halder et al., 1998). Für diese netzwerkartige Verknüpfung wurde in Anlehnung an die wichtige Funktion der Gene bei der Entwicklung des Auges in *Drosophila* die englische Bezeichnung *retinal determination gene network* (RDGN) gewählt (Abb. 1.2) (Silver et al., 2005; Rebay et al., 2005).



**Abbildung 1.2** Darstellung des *retinal determination gene network* (RDGN). Dieses durch Untersuchungen in *Drosophila* ermittelte Netzwerk wird mit den entsprechenden orthologen Genen auch in Vertebraten vermutet. An der Spitze dieses Netzwerkes wird *eyeless* bzw. *Pax6*, als sog. „Master-Kontrollgen“ vermutet. Die nachgeschalteten Gene *sine oculis* / *Six1-6*, *eyes absent* / *Eya1-4* und *dachshund* / *Dach1-2* werden direkt bzw. indirekt durch *eyeless* / *Pax6* kontrolliert und stehen selbst durch Protein-Protein-Interaktionen miteinander in Verbindung. (Gene und regulatorische Beziehungen sind schwarz markiert; die korrespondierenden Proteine und Protein-Protein-Interaktionen sind blau markiert) (modifiziert nach Rebay et al., 2005).

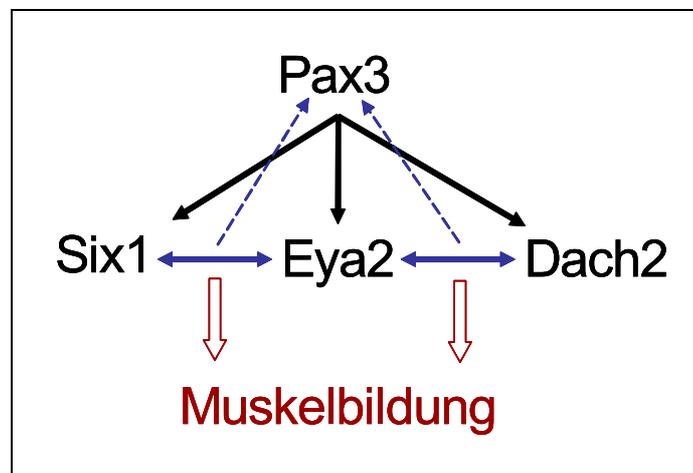
---

Die Identifizierung zahlreicher homologer Gene in den Vertebraten zu den aus *Drosophila* bekannten Mitgliedern des RDGN gab Anlass zu der Annahme, dass dieses Netzwerk zwischen *Drosophila* und Vertebraten konserviert ist (Treisman, 1999; Wawersik et al., 2000; Silver et al., 2003). Analog zu *eyeless* an der Spitze dieses Netzwerkes in *Drosophila*, wird in der Augenentwicklung der Vertebraten das zu *eyeless* homologe Gen *Pax6* als übergeordnetes Schlüsselgen im RDGN vermutet. Bei *Pax6* handelt es sich um einen Schlüsselfaktor in der Augenentwicklung der Vertebraten (Chi und Epstein, 2002). Der Verlust der Expression von *Pax6* führt zu Mikrophthalmie oder Anophthalmie (Halder et al., 1995; Hill et al., 1991) und die homozygoten Mutanten sterben kurz nach der Geburt (Grindley et al., 1995).

Mutationen im *Pax6*-Gen können neben einem Einfluss auf die Augenentwicklung auch noch zu zahlreichen weiteren Beeinträchtigungen führen, die aus den manigfaltigen Aufgaben dieses Gens resultieren. So konnte für *Pax6* eine wichtige Funktion in den B-Typ-Inselzellen des Pankreas nachgewiesen werden, die für die Insulinproduktion benötigt werden. Bei einer konditionalen Inaktivierung des *Pax6*-Gens kommt es postnatal zu einer reduzierten Insulinproduktion und damit zur Ausbildung eines schweren diabetösen Phänotyps (Ashery-Padan et al., 2004; Cerf, 2006). Weiterhin konnte schon früh eine Beteiligung von *Pax6* an der Entwicklung der olfaktorischen Region, des Gehirns und der neuronalen Differenzierung und Migration gezeigt werden (Hill et al., 1991; Schmahl et al., 1993). *Pax6* wird während der Neurogenese in den Radialgliazellen exprimiert (Götz et al., 1998) und ist an der Ausbildung der Strukturen des Kortex aus dem Telencephalon beteiligt (Stoykova et al., 2000). Untersuchungen an *Pax6*-defizienten *Sey/Sey*-Mäusen konnten eine starke Einschränkung des neurogenen Potentials der an der Neurogenese beteiligten Radialgliazellen offenbaren, was zu einer deutlichen Reduzierung der kortikalen Neuronen in diesen Tieren führt (Heins et al., 2002). Dabei scheint die Gendosis von entscheidender Bedeutung zu sein. Denn eine konditionale Aktivierung von *Pax6* in frühen kortikalen Vorläuferzellen führt zu Störungen der Regulation des Zellzyklus in diesen Zellen und damit zu einer Inhibierung der Proliferation (Berger et al., 2007).

Die Existenz weiterer *Pax*-Gene in Vertebraten lässt die Vermutung zu, dass *Pax6* gewebespezifisch durch andere *Pax*-Gene an der Spitze des RDGN

ersetzt werden kann (Silver und Rebay, 2005). So konnte bei *in vitro*-Analysen mit Somitenzellen ein Zusammenwirken von *Pax3*, *Six1*, *Eya2* und *Dach2* bei der myogenen Differenzierung gezeigt werden (Heanue et al., 1999; Rebay et al., 2005) (Abb. 1.3). Weitere Beispiele für einen vergleichbaren netzwerkartigen Zusammenhang in Vertebraten sind das Zusammenwirken von *Pax2*, *Eya1* und *Six1* bei der Ausbildung des Gehörs (Zheng et al., 2003; Silver und Rebay, 2005) sowie eine Interaktion der Proteine von *Hox11*, *Pax2* und *Eya2* bei der Aktivierung von *Six2* in der frühen Phase der Ausbildung der Nieren (Gong et al., 2007).



**Abbildung 1.3** Darstellung des Zusammenwirkens von *Pax3*, *Six1*, *Eya2* und *Dach2* während der Myogenese in Vertebraten. *Six1*- und *Eya2*-Proteine bzw. *Dach2*- und *Eya2*-Proteine interagieren miteinander und induzieren so die für die Muskelbildung verantwortlichen Gene *MyoD* und *Myogenin* in Somitenzellen. Gleichzeitig können die gebildeten Komplexe auch auf die Regulation von *Pax3* einwirken. (schwarze Pfeile deuten die transkriptionelle Regulation durch *Pax3* an, blaue Doppelpfeile zeigen Interaktionen zwischen *Six1*, *Eya2* und *Dach2*, blaue gestrichelte Pfeile stellen den regulatorischen Einfluss der gebildeten Komplexe auf *Pax3* dar)

Es gibt Hinweise, dass das RDGN Eingang von einer ganzen Reihe von Signalwegen erhält. So konnten Studien einen Einfluss durch die Signalwege *RAS/mitogen-activated-protein-kinase (MAPK)* (Hsiao et al., 2001), *transforming growth factor-β (TGFB)* (Chen et al., 1999), *wingless* (Baonza und Freeman, 2002), *decapentaplegic (dpp)/hedgehog (hh)* (Curtiss und Mlodzik, 2000) und *Notch* (Kumar und Moses, 2001) zeigen. Die Vielzahl von Signalwegen, die auf das RDGN einwirken, im Kontext mit der Beobachtung zahlreicher Phänotypen in verschiedenen Geweben auch außerhalb des Auges, haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, dass für dieses Netzwerk eine Funktion in einer ganzen Reihe von Entwicklungsprozessen angenommen wird. Diese betreffen

---

neben dem Auge auch das Ohr, das Herz, die Muskulatur oder die Fertilität (Silver et al., 2005; Schönberger et al., 2005; Jemc und Rebay 2007a).

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die erste funktionelle Charakterisierung des *Eya3*-Gens in Vertebraten. Eine zentrale Rolle bei der Untersuchung der Funktion dieses Gens nahm dabei die vom German Gene Trap Consortium (GGTC) durch Insertions-Mutagenese erzeugte *Eya3*-Mausmutante ein (Wiles et al., 2000; Wurst und Gossler, 2000). Diese sollte aufzeigen, welche phänotypischen Veränderungen durch einen Verlust der Expression von *Eya3* bewirkt werden können. Bei der phänotypischen Charakterisierung der Mausmutante sollte die Aufklärung des Expressionsmusters von *Eya3*, insbesondere während der Embryogenese, helfen, die potentiellen Funktionen des Gens einzugrenzen. Da in *Drosophila melanogaster* eine Fehlexpression des orthologen Gens *eyes absent* erhebliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Augen bedingt, kam der Untersuchung des visuellen Systems in der Maus eine zentrale Bedeutung zu. Nicht zuletzt die Beschreibungen von Phänotypen außerhalb des visuellen Systems für *Eya1*- und *Eya4*-Mutationen in der Maus waren aber auch Anlass für eine Ausweitung der Untersuchungen auf eine Beeinträchtigung anderer Körperfunktionen, wobei hier u.a. die Möglichkeit der Kollaboration mit der Deutschen Mauslinik (German Mouse Clinic, GMC) zur Phänotypisierung genutzt wurde. Im Hinblick auf vorliegende Ergebnisse zur potentiellen Funktion von *Eya3* im *Xenopus* wurde eine vergleichende Analyse in Maus und Zebrafisch vorgenommen, um mögliche funktionelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen den verschiedenen Vertebraten aufzuzeigen. Neben der funktionellen Charakterisierung der *Eya3*-Mutanten sollten außerdem Untersuchungen zur Transkriptionsregulation des *Eya3*-Gens erfolgen. Eine besondere Bedeutung kam hier dem vermuteten Einfluss des Transkriptionsfaktors *Pax6* zu.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.1** Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Agarose	Biozym, Hess.-Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-DIG-AP-Antikörper	Roche Diagnostics, Mannheim
BCIP	Roche Diagnostics, Mannheim
Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
BM-Purple AP Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco´s Modified Eagle Medium	PAA Laboratories, Pasching/Österr.
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid (20 µg/µl)	Peqlab, Erlangen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formamid (100%)	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hybond-N <sup>+</sup> Membran	Amersham, Braunschweig
IPTG (Isopropylthio-β-D-Galactoside)	Peqlab, Erlangen
JB-4 Embedding Kit	Polysciences, Eppelheim
Jung-Histowax	Cambridge Instruments, Nussloch
LightCycler FastStart DNA Master <sup>®</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim
NBT	Roche Diagnostics, Mannheim

Nucleospin <sup>®</sup> Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR-Master GO-Taq	Promega, Mannheim
pCRII TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Polyfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Quantum 333 Fibroblasten Medium	PAA Laboratories, Pasching / Österr.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Rapid Ligation Buffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNABee	Tel-Test Inc., Friendswood, TX / USA
tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosidase)	Peqlab, Erlangen
Zellkultur-Flaschen u. Platten	Nunc, Wiesbaden

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

### 2.1.2 Enzyme

**Tabelle 2.2** Enzyme

Alkaline Shrimp Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
BD Advantage 2-Polymerase <sup>®</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Superscript II RT	Invitrogen, Karlsruhe

SP6-RNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 2.3** Geräte

Bakterienschüttler	Infors, Bottmingen / Schweiz
Binokular (Stemi SV11 Apo)	Zeiss, Jena
Gelelektrophorese-Apparaturen Horizon 58, Horizon 1114 PerfectBlue™ Gelsystem Mini S, Mini L	Bio-Rad, München Peqlab, Erlangen
Gelelektrophorese: Spannungsgeber (Power Pac 300)	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese: Dokumentationsanlage	BioStep, Jahnsdorf
Luminometer (Centro LB 960)	Berthold, Bad Wildbad
Mikro-Injektor (FemtoJet 5246 Basic)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop (Zeiss Axioplan 2)	Zeiss, Jena
Mikroskop: Kamera (Zeiss AxioCam)	Zeiss, Jena
Mikroskop: Software (Zeiss Axiovision 3.1)	Zeiss, Jena
Mikrotom (Jung 2055 Autocut)	Leica, Wetzlar
PCR-Geräte: DNA Engine Tetrad PTC-225 Light Cycler 2.0 ABI Prism 7700	Bio-Rad, München Roche Diagnostics, Mannheim Applied Biosystems, Darmstadt
Photometer (BioPhotometer 6131)	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler (Thermomixer 5436)	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom	Leica, Wetzlar
Vortex-Gerät (Vortex Genie 2)	Roth, Karlsruhe
Zellkultur-Sterilbank	Gelaire, Opera / Italien

Zellkultur-Brutschränke Heraeus B 5060 Selutec Teco 20	Heraeus, Hanau NeoLab, Heidelberg
Zentrifugen: Kühlzentrifuge (Sigma 3K18) Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B) Tischzentrifuge (Biofuge Pico)	Sigma, Aichach Sorvall, Bad Homburg Heraeus, Hanau

## 2.1.4 Zellen

### 2.1.4.1 Bakterienstämme

- ***E. coli* Top10 F'** (TOPO TA Cloning, Invitrogen, Karlsruhe): F' *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*
- ***E. coli* DH5 $\alpha$**  (Subcloning Efficiency™ Competent Cells, Invitrogen): F'  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1* *endA1* *hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup>
- ***E. coli* JM109** (Competent cells, Promega, Mannheim): *endA1* *recA1* *gyrA96* *thi* *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *relA1* *supE44*  $\Delta$ (*lac-proAB*) [F' *traD36* *proAB* *lacI*<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15]

### 2.1.4.2 Eukaryotische Zellen

- **HEK293T** Zelltyp: humane Fibroblasten-Zellen (DSMZ-Nr.: ACC 305)

## 2.1.5 Kulturmedien

### 2.1.5.1 Kulturmedien für Bakterien

- **LB-Medium** (Luria-Bertani-Medium)

Zur Anzucht von Bakterienkulturen verwendetes Medium

Herstellung (1 Liter): 10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

add 1 l H<sub>2</sub>O, anschließend pH 7.0 mit 300  $\mu$ l 5 N NaOH einstellen

- **SOC-Medium**

Zur Regeneration von Bakterien nach Hitzeschock-Transformationen verwendetes Medium

Herstellung (1 Liter):

- 20 g Bacto-Trypton
- 5 g Bacto-Hefeextrakt
- 0,5 g NaCl
- 10 ml 0,25 M KCl
- 5 ml 2M MgCl<sub>2</sub>

add 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7.0 mit NaOH einstellen, dann autoklavieren

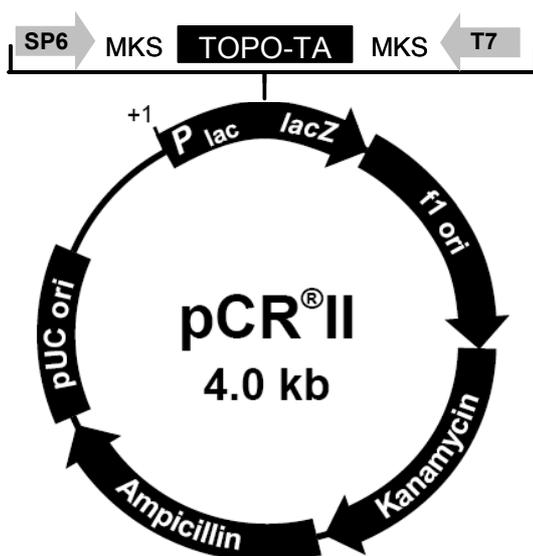
Nach dem Autoklavieren noch 20 ml 1 M Glucose (steril filtriert) zugeben

### 2.1.5.2 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Für die Kultivierung der HEK293T-Zellen wurde Quantum 333 Fibroblasten Medium eingesetzt. Während der Transfektion der Zellen wurde serumfreies Dulbecco`s-Modified-Eagle-Medium (DMEM) verwendet.

### 2.1.6 Plasmide

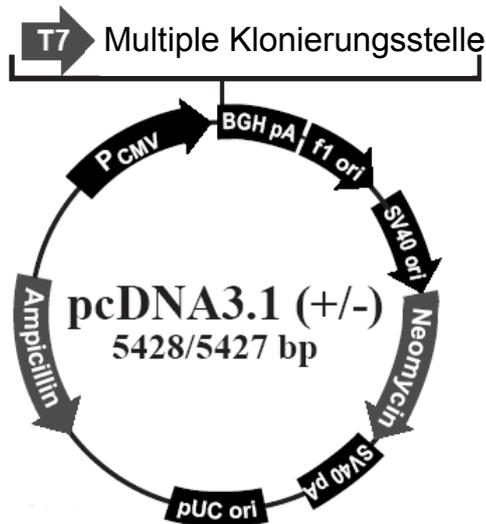
- **pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>**



**Abb. 2.1 Vektorkarte pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)**

Ein zur standardmäßigen Klonierung von PCR-Produkten eingesetzter Vektor. Die Insertion des PCR-Produktes erfolgt als TA-Klonierung über kovalent an 3' T-Überhänge gebundene Topoisomerase-I-Enzyme, so dass mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden können. Der Vektor besitzt weiterhin zwei Multiple Klonierungsstellen (MKS) und eignet sich durch Startstellen für SP6- und T7-Polymerasen zur Sequenzierung und zur *in vitro*-Transkription. Eine Selektion auf Ampicillin-Resistenz sowie eine Blau-Weiß-Selektion sind möglich.

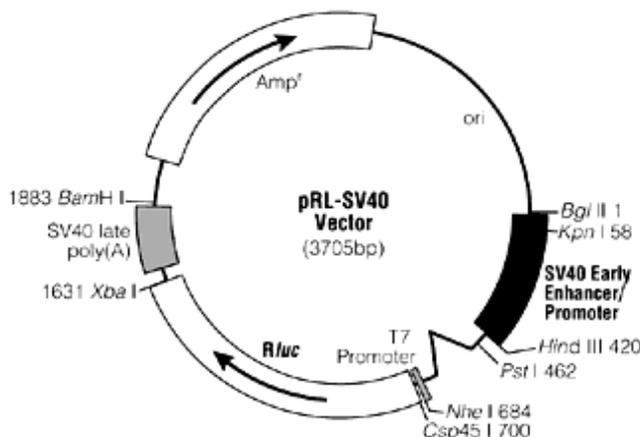
- pcDNA3.1<sup>®</sup>



**Abbildung 2.2 Vektorkarte pcDNA3.1<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe).**

Ein Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Expression von Genen in eukaryotischen Zellen. Der Vektor enthält neben der Neomycin-Resistenz auch noch eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in prokaryotischen Zellen. In dieser Arbeit wurde der Vektor zur Expression von cDNA in einem Zellkultur-Testsystem genutzt.

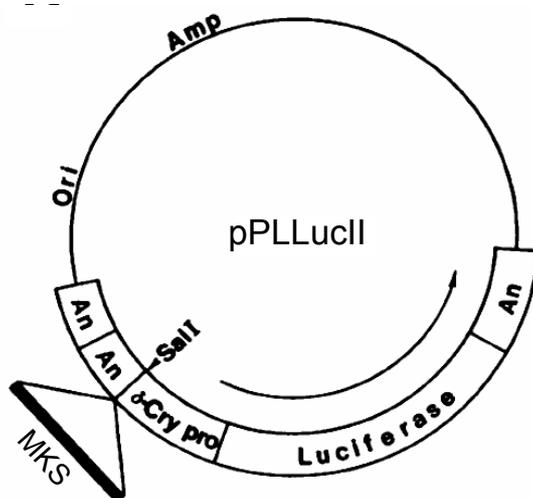
- pRL-SV40<sup>®</sup>



**Abbildung 2.3 Vektorkarte pRL-SV40<sup>®</sup> (Promega, Mannheim).**

Ein Vektor, der die Renilla-Luciferase unter Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert und der in dieser Arbeit zur Korrektur von unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in einem Zellkultur-Testsystem eingesetzt wurde.

- pPLLucII



**Abbildung 2.4 Vektorkarte pPLLucII (Kamachi und Kondoh, 1993).**

Ein Vektor, der eine Firefly-Luciferase-Kassette trägt und in dieser Arbeit zu Promotoranalysen in einem Zellkultur-Testsystem eingesetzt wurde. Die Promotorfragmente können in eine Multiple Klonierungsstelle (MKS) vor der Luciferase-Kassette inseriert werden.

- **pT1 $\beta$ geo**



**pT1 $\beta$ geo (8951 bp)**

**Abbildung 2.5 Vektorkarte pT1 $\beta$ geo (German Gene Trap Consortium, GGTC)**

Der pT1 $\beta$ geo-Vektor wurde vom German Gene Trap Consortium (GGTC) zur Generierung der *Eya3*-Mausmutante genutzt. Er verfügt über eine intronische Sequenz aus dem *Engrailed2*-Gen, gefolgt von einem Spleißakzeptor (SA), der das Einspleißen einer  $\beta$ geo-Kassette (*lacZ/Neomycin*-Kassette) bewirkt, die mit einem Transkriptionsstop und einem polyA-Schwanz ausgestattet ist.

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, oder Sigma Genosys, Steinheim, bezogen.

Folgende Oligonukleotide wurden für die Synthese der PCR-Produkte eingesetzt:

**Tabelle 2.4** Oligonukleotide

<b>Identifizierung der Vektorintegration / Genotypisierung</b>				
Name	Sequenz 5' → 3'	Größe PCR-Produkt	Annealing-Temperatur (°C)	Referenz
Eya3_1_for	CTGCAGCAATCTCAACCCTACGC	6 kb	67,3	diese Arbeit
Eya3_2_for	TTCCCAAGGCGTTGTTCAATTG	2,8 kb	68,1	diese Arbeit
Eya3_3_for	GCTGTCAGCCTCGCTCCATGTT	kein Produkt, da hinter Integration	68,2	diese Arbeit
Eya3_4_for	GAAGGGGGCTAGCAACTCAGCA		67,0	diese Arbeit
Eya3_5_for	CAAGTGACCCATCCCCATCCT		68,5	diese Arbeit
Eya3_2.2_for	TGGGATGCAAACCTCGGGTCTTA	2,1 kb	67,9	diese Arbeit
Eya3_2.3_for	TGGGACCAGCAGGATAACAGCA	kein Produkt, da hinter Integration	67,2	diese Arbeit
Eya3_2.4_for	ACGGGGCTATCTTAGACCCAGCA		67,1	diese Arbeit
Eya3_2.5_for	CCAGCTGCACCATGTTTCGCTTA		67,7	diese Arbeit
lacZ_rev	CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG		68,0	T.Floss
GT_WT_Mut_for	CAGGAACAGACTGAAACCATGC	488 bp /581 bp	60,3	diese Arbeit
GT_WT_rev	AGGTTGTCAGACTGGCACTTCA	488 bp	60,3	diese Arbeit
GT_Mut_rev	CACGCCATACAGTCTTTCAC	581 bp	62,1	diese Arbeit
<b>RT-PCR, <i>in-situ</i> Hybridisierung, Real-Time</b>				
L7_forward	AGATGTACCGCACTGAGATTC	357 bp	56,2	diese Arbeit
L7_reverse	ACTTACCAAGAGACCGAGCAA	357 bp	58,6	diese Arbeit
beta-actin_for	GGCATTGTTACCAACTGGGACG	174 bp	63,1	diese Arbeit
beta-actin_rev	ATGGCTGGGGTGTGAAGGTCT	174 bp	63,1	diese Arbeit
beta-actin_for	AGAAGGACTCCTATGTGGGTGA	368 bp	59,9	diese Arbeit

beta-actin_rev	GAGAGCATAGCCCTCGTAGATG	368 bp	60,4	diese Arbeit
Eya3_Ex1_for	CAGAGTGGGTCCGTAATCGT	396 bp	59,4	diese Arbeit
Eya3_Ex7_rev	TGCCCAGGATAAGTGGTTTC	396 bp	57,3	diese Arbeit
Eya3_Ex8_for	CCAGCCTGATACCCACTTCA	399 bp	61,1	diese Arbeit
Eya3_Ex11_rev	ATACCCGTTCCAATCACTGTC	399 bp	60,1	diese Arbeit
Eya3_Ex12_for	CCAACAGTAGTAATTGGCTCAGGT	351 bp	62,0	diese Arbeit
Eya3_Ex15_rev	ACCTCGATCTCTGCTCTGAGTCT	351 bp	63,4	diese Arbeit
Eya1_for	AACTCCTCCGGATTCAACAGT	406 bp	60,4	diese Arbeit
Eya1_rev	AAGGAGTGGAAAACAATGATGG	406 bp	60,2	diese Arbeit
Eya2_for	GGATATCCTGTCATGCTGACCT	389 bp	59,6	diese Arbeit
Eya2_rev	AACACAACTGGGTACTCACCA	389 bp	60,4	diese Arbeit
Eya4_for	AGACTCAGTACTCTGGGATGCAG	488 bp	59,9	diese Arbeit
Eya4_rev	CTGTATCAAACCTCTCCTGGTTGG	488 bp	60,1	diese Arbeit
Six1_for	GAGGAGACCAGCTACTGCTTTA	379 bp	61,2	diese Arbeit
Six1_rev	GGCCTGGAAGAGAATAGTTTGA	379 bp	59,4	diese Arbeit
Six2_for	CAAGTCAGCAACTGGTTCAAGA	362 bp	59,4	diese Arbeit
Six2_rev	ATGGGGTTGAGTATGGAGTCCT	362 bp	61,2	diese Arbeit
Six3_for	ACCACATCCTGGAGAACCAC	380 bp	60,3	diese Arbeit
Six3_rev	GATGGCCTGATGCTGGA	380 bp	56,0	diese Arbeit
Six4_for	AGGAGCTCTACAAGCAGAATCG	383 bp	61,2	diese Arbeit
Six4_rev	GCCATTAAGGAAGACAGGTGAA	383 bp	59,4	diese Arbeit
Six5_for	CTTACACAGGTCAGCAACTGGT	326 bp	61,0	diese Arbeit
Six5_rev	AGGGCCAAGCTATTGATAATGA	326 bp	57,5	diese Arbeit
Six6_for	GCATTACCAGGAGGCAGAGA	458 bp	60,3	diese Arbeit
Six6_rev	AGATGTGCGCACTCACTGTCG	458 bp	60,1	diese Arbeit
Dach1_for	CACCGTCTACACCAAGCTGA	455 bp	60,3	diese Arbeit
Dach1_rev	AATTCATGTCCCCGTTTTCA	455 bp	54,1	diese Arbeit
Dach2_for	CCGCAAGTCTTTGACTTTT	437 bp	56,2	diese Arbeit
Dach2_rev	TGGCTTCCATTACCCTGAAG	437 bp	58,2	diese Arbeit
Nup155_for	AAGCTGGCATCTTTCAACCT	179 bp	58,9	diese Arbeit
Nup155_rev	GTTGTCCGTGGGAAGAGAAT	179 bp	59,0	diese Arbeit
Hba-a1_for	ATCCCGTCAACTTCAAGCTC	200 bp	59,3	diese Arbeit
Hba-a1_rev	GTGCAAGGGGAGAGAAGAAGG	200 bp	59,0	diese Arbeit
Tnnc1_for	AGGAGCTGCAGGAGATGATT	224 bp	59,0	diese Arbeit
Tnnc1_rev	CGTAATGGTCTCACCTGTGG	224 bp	59,0	diese Arbeit

### Promotorklonierungen

Name	Sequenz	Größe PCR- Produkt	Annealing- Temperatur (°C)	Referenz
PromF_4_for	GGATCCGCCATTGGAAGAAGCACACGATC	1434 bp	66,6	diese Arbeit
PromF_3_for	GGATCCAAGCGGTCCGGTGCTCTTACC	920 bp	68,5	diese Arbeit
PromF_2_for	GGATCCATTCTAGGCCAAGGTCCATAGAG	679 bp	65,2	diese Arbeit
PromF_1_for	GGATCCGTCCCTTTACGGTAGGAATCACAC	384 bp	66,4	diese Arbeit
PromF_1-4_rev	AAGCTTAGCCACCGGAAGTAGATGCGG		66,4	diese Arbeit

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Methoden

#### 2.2.1.1 Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Bei Plasmid-Isolierungen wurde in Abhängigkeit zur gewünschten Menge des zu isolierenden Plasmids auf das NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (für Plasmid-Mengen < 20µg) oder auf das Plasmid DNA Midi Kit der Firma Qiagen (für Plasmid-Mengen > 20 µg) zurückgegriffen.

#### **Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit**

Bei Folgeanwendungen die nur geringe Mengen an Plasmid-DNA erforderten, wie z.B. Sequenzierungen oder Zwischenklonierungen, wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit gearbeitet. Bei einem Ausgangsvolumen von 5 ml Übernachtskultur konnten so ca. 15 – 20 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Die Übernachtskultur wurde dazu für 30 Sekunden bei 11.000 g in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer Tischzentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus) herunterzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert und das Reaktionsgefäß nach Zugabe von 250 µl Puffer A2 mehrfach invertiert. Nach Inkubation der Probe für maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 300 µl Puffer A3 zugegeben und die Probe abermals einige Male invertiert. Der gesamte Ansatz wurde nun für 10 Minuten bei 11.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde der Überstand auf eine mitgelieferte Anionenaustauscher-Säule geladen und für 1 Minute bei 11.000 g erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 600 µl Puffer A4 zur Entfernung von Salzen und makromolekularen Zellrückständen beladen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 11.000 g wurde der Durchfluss erneut verworfen und die Säule abermals für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte die Plasmid-DNA mit 30 - 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> durch eine einminütige Zentrifugation bei 11.000 g eluiert werden. Die Plasmidkonzentration wurde danach photometrisch bestimmt und die Plasmidlösung bei -20°C gelagert.

### **Präparation von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit**

Auch hier erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulen, durch die die degradierte RNA sowie zelluläre und nukleinsäureassoziierte Proteine von der Plasmid-DNA getrennt werden. Eine erhöhte Bindekapazität der Säulen ermöglicht jedoch die Bindung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA pro Säule. Die Durchführung der Präparation wurde auch hier durch das Anlegen einer Übernachtskultur in einem Selektivmedium (LB-Medium + Ampicillin) vorbereitet. Jedoch wurde das Volumen der Kultur auf 100 ml erhöht. Das Ernten der Bakterien erfolgte in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor) bei 4°C und 6000 g für 15 min.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer P2 zur Denaturierung der DNA zugegeben. Um ein Scheitern der genomischen DNA zu verhindern, wurde 4-6 x vorsichtig invertiert und dann 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml eisgekühltem Puffer P3, mehrfaches Invertieren und 15-minütiges Inkubieren auf Eis fielen genomische DNA sowie ein Großteil der Proteine als sichtbare weisse Flocken aus und wurden bei 20.000 g und 4°C für 30 min herunterzentrifugiert. Für diesen und alle weiteren Zentrifugationsschritte wurde die Kühlzentrifuge Sigma 3K18, Rotor-Nr. 12150, verwendet. Der Überstand wurde abermals bei 20.000 g für 15 min und 4°C zentrifugiert und sofort auf die mit 4 ml Äquilibrierungspuffer QBT vorbereiteten Anionenaustauschersäulen gegeben. Durch zweimaliges Waschen mit 10 ml Puffer QC konnte die Plasmid-DNA von restlichen Verunreinigungen befreit werden und anschließend mit 5 ml Puffer QF aus den Säulen eluiert werden.

Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation bei 5.000 g für 60 min bei 4°C pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % EtOH wurde erneut bei 5.000 g für 60 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und dann in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen und für 10 min auf dem Schüttler gelöst. Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung im Photometer, um die aus der Präparation gewonnene DNA-Menge zu quantifizieren.

### 2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen

Zur Genotypisierung der Mäuse war es erforderlich die DNA aus der Schwanzspitze der Tiere zu isolieren. Dazu wurden die Schwanzspitzen üN bei 55°C in 500 µl Präparationspuffer (1M Tris-HCl (pH 8.0), 5 M NaCl, 0,5 M EDTA (pH 8.0), 10% SDS, 10 µl Proteinase K) verdaut. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl 5 M NaCl und ein 10-minütiges Schütteln (Stufe 8) bei RT auf dem Thermoschüttler. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min wurde der Ansatz bei 5000 g in einer Tischzentrifuge (Biofuge Pico) bei RT für 10 min zentrifugiert. Die oberen 500 µl wurden vorsichtig entnommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (100 %) überführt und 2-3x invertiert. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (Sigma, Rotor 12154) bei 12.000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und der Schritt mit 70 % EtOH wiederholt. Danach wurde das DNA-Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und in 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen und üN bei 4°C gelöst.

### 2.2.1.3 Restriktionsspaltungen

Die für Klonierungsarbeiten notwendigen Restriktionsspaltungen wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt, welche die DNA an definierten Erkennungssequenzen durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen öffnen. Je nach verwendetem Enzym konnten dabei überhängende („sticky ends“) oder glatte („blunt ends“) Enden entstehen.

Das Ansatzvolumen für eine Restriktionsspaltung betrug zumeist 20 µl. Entsprechend der benötigten Menge gespaltener DNA wurden zwischen 0,5 µg – 5 µg DNA eingesetzt und mit 0,5 µl (= 5 U) Restriktionsenzym und 2 µl 10-fach Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 37°C für 2 – 3 h verdaut.

### 2.2.1.4 DNA-Ligation / Dephosphorylierung von freien DNA-Enden

#### Ligation von DNA

Ligationsreaktionen wurden mit einer T4-Ligase vorgenommen. Das Ansatzvolumen für eine Ligationsreaktion betrug zumeist 20 µl, wobei das Mengenverhältnis zwischen Vektor und Insert 1:5 betrug. Außer der DNA wurden dem Ligationsansatz noch 1 µl T4-Ligase sowie 4 µl 5x Rapid-Ligation-

Buffer zugegeben und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der fertige Ligationsansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C üN inkubiert.

### **Dephosphorylierung von DNA**

Bei einer Ligationsreaktion, bei der der zu verwendende Vektor mit nur einem Restriktionsenzym gespalten worden war, wurden die freien Vektorenden vor der Ligation dephosphoryliert, um Religationen zu verhindern. Dazu wurden nach der Spaltungsreaktion 2  $\mu\text{l}$  Alkaline Shrimp Phosphatase (SAP) sowie eine dem Ansatzvolumen entsprechende Menge 10x SAP-Puffer zugegeben, und für 2 h bei 37°C inkubiert.

Nach der Dephosphorylierung war es erforderlich die SAP durch eine Hitzeinaktivierung (15 min bei 65°C) oder eine PCR-Aufreinigung zu entfernen.

#### **2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Eine Quantifizierung von Nucleinsäuren kann durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgen. Für eine zuverlässige Messung ist es erforderlich, daß die OD in einem Bereich zwischen 0,1 und 1,0 liegt, wobei eine reine Lösung doppelsträngiger DNA mit 50  $\mu\text{g/ml}$  eine  $\text{OD}_{260}$  von 1,0 hat. Da alle Nucleinsäuren bei 260 nm absorbieren, sollte bei der Quantifizierung einer Plasmid-DNA Präparation gesichert sein, daß keine RNA-Verunreinigungen vorliegen. Um eine Unterscheidung zwischen Absorption von DNA und RNA zu ermöglichen, und damit auch ein Maß für die Reinheit der Präparation zu erhalten, wird der Quotient  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  gebildet. Bei reiner DNA ergibt sich ein Wert von 1,8, bei RNA-Verunreinigungen steigt der Wert aufgrund von Hyperchromazität auf > 2,0. Proteinverunreinigungen führen zu einem Wert unter 1,8, wobei gilt, je niedriger der Wert, desto größer die Protein-Verunreinigung.

Alle Messungen erfolgten mit dem Photometer bei 260 nm. Bei jeder Messung wurde die Probe im Verhältnis 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnt.

## 2.2.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld (80 – 120 V) aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) auf einem UV-Tisch für eine Fotodokumentation sichtbar gemacht. Basis der Gel-Elektrophorese ist eine Gelmatrix, in der die Laufstrecke der negativ geladenen, linearen DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Ein wichtiger Parameter ist die Agarose-Konzentration. Diese betrug in Abhängigkeit zu der zu erwartenden Fragmentgröße 1 – 3 % in TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer; 0,09 M Tris, 0,09 M Borsäure, 2 mM EDTA). Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer gewählt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer (MBI Fermentas) versetzt, um ein Absinken in die Gel-Taschen zu gewährleisten. Zur Größenbestimmung wurden gleichzeitig Längenstandards mit bekannten Fragmentgrößen aufgetragen.

**Tabelle 2.5** gewählte Agarose-Konzentrationen

Fragmentlänge (bp)	Agarosekonzentration (w/v)
500 – 7000 bp	1,0 %
300 – 5000 bp	1,5 %
150 – 2000 bp	2,0 %
100 – 1000 bp	2,5 %
80 – 500 bp	3,0 %

**Tabelle 2.6** gewählte DNA-Längenstandards

Längenstandard	Größe der Banden (bp)
Marker VIII (MBI)	67, 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501, 692, 881, 1118
Marker III (MBI)	564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226
Gene Ruler 100 bp Ladder (MBI)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000
Gene Ruler 1kb Ladder (MBI)	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

## **Gel-Extraktion**

Sollten die bei einer Restriktionsspaltung erhaltenen Fragmente für eine nachfolgende Ligation dienen, so wurde der Spaltungsansatz in einem Gel aufgetrennt und die Bande mit dem gewünschten Fragment aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde das DNA-Fragment nach der Gel-Elektrophorese mit einem sauberen Skalpell auf einem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des NucleoSpin® Extract Kits oder dem QiaQuick Gel Extraction Kit aus dem Gelstück isoliert. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück und die Aufreinigung über Säulen erfolgten dabei nach den Angaben des Herstellers. Abschließend wurde die DNA mit 30 – 50 µl Elutionspuffer oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aus der Säule eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

## **2.2.3 Handhabung von Bakterien**

### **2.2.3.1 Anlegen von Kulturen / Blau-Weiss-Selektion / Glycerol-Stocks**

Für das Wachstum in Flüssigkultur wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Sollte die Bakterienkultur auf einer Agarplatte angelegt werden, wurden 15 g/l Agar-Agar zugesetzt. Bei Klonierungsarbeiten wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin als Antibiotikum beigegeben, um eine Selektion auf antibiotikaresistente Rekombinanten zu ermöglichen. Der für Klonierungsarbeiten regelmäßig eingesetzte pCRII-TOPO-Vektor ermöglichte überdies eine Blau-Weiss-Selektion, die eine Unterscheidung zwischen rekombinanten und nicht-rekombinanten Klonen anhand der Färbung der Kolonie gestattete. Dazu wurden vor dem Gießen der Platten 400 µl X-Gal (20 mg/ml) und 80 µl einer 100nM IPTG-Lösung hinzugefügt. Die Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte anschließend anhand der Färbung der Bakterienkolonien. Nur Klone mit erfolgreicher Insertion in die β-Galactosidase-Kassette des pCRII-Vektors zeigen eine weiße statt einer blauen Färbung der Kolonie, da diese keine aktive β-Galactosidase exprimieren können. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin-Kulturen von den rekombinanten Bakterien angelegt. Hierfür wurden 800 µl einer Bakterien-Suspension zu 200 µl einer 100 %igen Glycerin-Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, auf einem Vortexgerät gemischt und anschließend bei –80°C gelagert.

Bei Bedarf wurde eine kleine Menge von der gefrorenen Glycerinkultur mit der Spitze einer Pipette abgenommen und in eine LB-Flüssigkultur überführt oder auf einer Agarplatte ausgestrichen.

### **2.2.3.2 Transformation von Bakterien**

Bei Transformationen wurden chemisch kompetente *E.coli*-Zellen der Stämme DH5 $\alpha$ , JM109 und Top10F' verwendet. Die Transformation erfolgte durch eine Hitzeschockbehandlung. Dazu wurden die tiefgekühlten, kompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 4  $\mu$ l Ligationsansatz vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit der Zellen für 30 min auf Eis, wurden die Bakterien einer 45 Sekunden währenden Hitzeschockbehandlung unterzogen und nach Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 bzw. 200  $\mu$ l auf einer mit Ampicillin, X-Gal und IPTG vorbereiteten LB-Platte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

### **2.2.4 PCR – Methoden**

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann DNA selektiv amplifiziert werden. Voraussetzung ist, dass man Sequenzinformationen zu den flankierenden Bereichen des zu vervielfältigenden Stückes besitzt. Für diese Bereiche wurden Oligonukleotid-Primer synthetisiert, die in gegenläufiger Richtung an die komplementären DNA-Stränge binden und als Startpunkte für die hitzestabile DNA-Polymerase dienen. Bei der eigentlichen PCR-Reaktion handelt es sich um eine zyklische Wiederholung (30 – 40x) der folgenden drei Schritte: Denaturierung der DNA bei 94°C, spezifische Anlagerung der Primer bei ca. 60°C (Annealing) und Verlängerung der angelagerten Oligonukleotid-Primer durch eine DNA-Polymerase bei 72°C (Elongation). Das bei jedem Zyklus entstehende Fragment dient im nächsten Zyklus als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet.

#### **2.2.4.1 Standard-PCR**

In Standard-PCR-Reaktionen wurde stets die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* genutzt. Diese besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und eine Polymerisationsgeschwindigkeit von 0,5 – 1 kb/min. Nach-

folgend ist ein Pipettierschema für eine Standard-PCR-Reaktion (20 µl Ansatz) sowie ein Programmablauf dargestellt:

**Tabelle 2.7** Standard-PCR: Pipettierschema

	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>eingesetztes Volumen (µl)</b>
H <sub>2</sub> O		13,7
dNTPs	2,5 mM pro dNTP	2
MgCl <sub>2</sub>	(12.5 – 20 mM)	2
forward-Primer	10 pmol/µl	0,5
reverse-Primer	10 pmol/µl	0,5
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,3
DNA-Template	100 ng/µl	1

Bei jeder PCR wurde ein Reaktionsansatz ohne Template-DNA als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

**Tabelle 2.8** Standard-PCR: Programm

<b>Reaktion</b>		<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeitdauer (min)</b>
initiale Denaturierung		94	3
35 Zyklen	Denaturierung	94	0:45
	Annealing	primerspezifisch	0:45
	Elongation	72	0:45 – 1:00
finale Elongation		72	5

#### 2.2.4.2 weitere PCR-Typen

##### PCR mit *Pfu*-Polymerase

Die bei Standard-PCR-Reaktionen verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturleseaktivität und ist daher für das Generieren von PCR-Produkten, bei denen es auf eine korrekte Sequenz ankommt, nicht geeignet. Deshalb kam bei PCR-Reaktionen, deren Produkt später für die Klonierung in Expressions-

Vektoren eingesetzt werden sollte, eine *Pfu*-Polymerase aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* zum Einsatz. Diese besitzt eine Korrekturleseaktivität (3'-5' Exonuclease Aktivität) und ist somit befähigt ein PCR-Produkt zu erzeugen, das keine oder sehr wenige Punktmutationen enthält. Das folgende Pipettierschema entspricht den Angaben der Firma MBI Fermentas für die Verwendung der *Pfu*-Polymerase (50 µl Ansatz).

**Tabelle 2.9** Pipettierschema für *Pfu*-Polymerase

	Ausgangskonzentration	eingesetztes Volumen (µl)
<i>Pfu</i> -Buffer	10 x	5
forward-Primer	10 pmol/µl	2,5
reverse-Primer	10 pmol/µl	2,5
dNTP Mix	2,5 mM pro dNTP	6
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 units	2
H <sub>2</sub> O		variabel
DNA-Template	10 - 100 ng/µl	1-10

Das verwendete PCR-Programm glich im Wesentlichen dem PCR-Standardprogramm, jedoch wurde die Elongationszeit auf 4 Minuten erhöht, um diese an die Größe der Fragmente und die geringere Prozessivität der Polymerase anzupassen.

### PCR mit BD Advantage<sup>®</sup> 2-Polymerase

Für die Identifizierung der Integrationsstelle des Gene Trap-Vektors wurde die BD Advantage<sup>®</sup> 2-Polymerase der Firma BD Biosciences verwendet, die die Amplifizierung von Fragmenten bis zu 20 kb erlaubt. Eine Besonderheit dieser PCR-Reaktion ist, dass die Anlagerung der Primer und die Elongation in einem Schritt bei 68°C erfolgen, weshalb die Primer eine Annealing-Temperatur von ca. 68°C aufweisen sollten. Nachfolgend sind ein Reaktionsansatz und das gewählte PCR-Programm dargestellt.

**Tabelle 2.10** Pipettierschema für BD Advantage® 2-Polymerase

	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>eingesetztes Volumen (µl)</b>
Advantage-Buffer	10 x	5
forward-Primer	10 pmol/µl	2
reverse-Primer	10 pmol/µl	2
dNTP Mix	10 mM pro dNTP	1
BD Advantage® 2-Polymerase	50 x	1
H <sub>2</sub> O		38
DNA-Template	100 ng/µl	1

**Tabelle 2.11** PCR-Programm für BD Advantage® 2-Polymerase

<b>Reaktion</b>		<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeitdauer (min)</b>
initiale Denaturierung		95	1
35 Zyklen	Denaturierung	95	0:30
	Annealing & Elongation	68	3
finale Elongation		68	3

### Real-Time PCR

Zur Validierung der Daten aus der differentiellen Gen-Expressionsanalyse (Microarray) wurde die Real-Time PCR benutzt. Dabei konnte die identische Gesamt-RNA für Herz und Gehirn aus den Microarray-Experimenten als Probe eingesetzt werden. Mit dem Ready-to-go T-primed First-strand Kit (Amersham Biosciences, Braunschweig) wurde nach Herstellerangaben 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in den Real-Time Ansätzen als DNA-Matrize eingesetzt. Zur Vorbereitung der Real-Time Ansätze wurde nur steriles Einweg-Material (Spitzen, Eppendorf-Gefäße etc.) verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema in einer 96-well Platte mit dem SYBR-Green Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) vorbereitet:

**Tabelle 2.12** Pipettierschema für Real-Time PCR

	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>eingesetztes Volumen (µl)</b>
forward-Primer	10 pmol/µl	1
reverse-Primer	10 pmol/µl	1
SYBR-Green Mix	10 x	12,5
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)		10,5
DNA-Template	100 ng/µl	1

Die anschließende Amplifikation und Detektion erfolgte nach Herstellervorgaben in dem Gerät ABI Prism 7000 Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung der Software ABI Prism 7000 SDS. Für die Auswertung der Daten kam das Programm REST (Relative Expression Software Tool; Pfaffl, 2002) zur Anwendung.

### **Kolonie-PCR**

Eine Methode zur schnellen Analyse rekombinanter Klone ist die Kolonie-PCR. Zunächst wurde ein Ansatz wie bei einer Standard-PCR zusammengestellt, jedoch wurde auf die Zugabe von Template-DNA verzichtet. Das fehlende Volumen war durch Wasser zu ersetzen. Anschließend wurde mit einer Pipettenspitze die zu untersuchende Bakterienkolonie vorsichtig auf der Platte angepickt und in den PCR-Ansatz unter leichten Drehungen abgestreift. Die Pipettenspitze wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit LB-Medium zur Anzucht gegeben. Das verwendete PCR-Programm glich dem PCR-Programm einer Standard-PCR. Um die Zellen der Bakterien aufzubrechen und die DNA verfügbar zu machen, wurde die initiale Denaturierung auf 5 min ausgedehnt.

#### **2.2.4.3 PCR-Aufreinigung**

PCR-Produkte, die für Sequenzierungs- oder Ligations-Reaktionen eingesetzt werden sollten, wurden mit dem Qiagen PCR Purification Kit oder dem Nucleospin<sup>®</sup> Extract Kit aufgereinigt, um störende Puffersalze, Nukleotide, Primer oder Polymerasen zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte nach

---

Herstellerangaben und ist nahezu identisch mit dem bereits beschriebenen Extraktions-Verfahren von DNA aus Agarosegelen.

#### 2.2.4.4 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des TOPO TA-Cloning<sup>®</sup> – Kits der Firma Invitrogen. Dieses System macht sich die terminale Transferaseaktivität der *Taq*-Polymerase zu nutze, die unabhängig von der Template-DNA einen Desoxyadenosin (A)-Überhang am 3'Ende des PCR-Produktes erzeugt. Der in dem Kit enthaltene Klonierungsvektor pCRII-TOPO<sup>®</sup> besitzt an den 3'Enden einen zu den A-Überhängen komplementären Desoxythymidin (T)-Rest, so dass PCR-Produkte mit einem A-Überhang effizient in den Vektor ligieren können. Außerdem sind an den Enden des linearisierten Vektors aktivierte *Vaccinia* Topoisomerase I -Enzyme kovalent gebunden, die eine Religation der Vektorenden verhindern und eine schnelle und effiziente Ligation des PCR-Produktes in den Vektor bewirken.

Sollten PCR-Produkte kloniert werden, die aufgrund der Verwendung einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion keine A-Überhänge besaßen, so wurden dem fertigen PCR-Ansatz nach Programmende 1 µl *Taq*-Polymerase zugegeben und dieser für 30 Minuten bei 72 °C inkubiert. Eine weitere Zugabe von dATP war nicht notwendig, da in einem PCR-Ansatz auch nach der PCR noch genügend freies dATP vorhanden ist.

Für die darauf folgende Ligationsreaktion wurden gemäß Anweisung des Herstellers 0,5 – 4 µl PCR-Produkt sowie 1 µl pCRII-TOPO-Vektor und 1 µl Salz-Lösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 6 µl aufgefüllt und für 5 – 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde wie schon unter Transformation von Bakterien beschrieben weiterverfahren.

---

## 2.2.5 RNA-Methoden

### 2.2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte aus frisch präpariertem Gewebe, das sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis weggefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden war. Für die Präparation von embryonalem Gewebe wurden bis zum Entwicklungsstadium E11.5 ganze Embryonen eingesetzt. Bei älteren Stadien wurde der ganze Kopf (bis E13.5) oder lediglich ein Teil davon (älter als E13.5) verwendet. Bei den HEK293T-Zellen wurde die aus einer  $75\text{ cm}^2$ -Flasche gewonnene Zellsuspension eingesetzt. Die Homogenisation des Gewebes erfolgte mit einem Pestill unter Zugabe von 1 ml RNA-Bee<sup>®</sup> in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz für 30 Sekunden auf einem Vortex-Gerät kräftig durchmischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 min wurde der gesamte Ansatz bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase (ca. 500  $\mu\text{l}$ ) wurde abgenommen und mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt. Nach mehrfachem Invertieren wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 70 % EtOH gewaschen und noch einmal für 10 min bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend konnte das Pellet an der Luft getrocknet und in 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert werden. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

### 2.2.5.2 RT-PCR

Die Reverse Transkription von RNA erfolgte mit Hilfe der Superscript II<sup>®</sup> RT der Firma Invitrogen, mit der total RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Der folgende 12  $\mu\text{l}$  Ansatz wurde für die Reaktion verwendet.

**Tabelle 2.13** Superscript II<sup>®</sup> RT-Ansatz

Reagentien	Volumina (µl)
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,5
Oligo-dT-Primer	1,5
total RNA (2-3 µg)	x
DEPC- H <sub>2</sub> O	auf 12 µl

Nach dem Zusammenstellen des Ansatzes wird dieser zunächst für 5 min bei 65°C erhitzt, dann schnell auf Eis gekühlt. Anschließend werden dem Ansatz 4 µl 5x Puffer, sowie 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNasin hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C wird noch 1 µl SuperScript II<sup>®</sup> RT hinzugefügt und durch Pipettieren vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 50 min bei 42°C wird die Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die cDNA ist an dieser Stelle schon für eine PCR einsetzbar. Für empfindliche Reaktionen kann die restliche RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation bei 37°C für 20 min entfernt werden.

Alternativ zu der SuperScript II<sup>®</sup> RT fand auch das Ready-to-go T-primed First-strand Kit (Amersham) Anwendung, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

### 2.2.5.3 Northern-Blot

Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem denaturierenden Formalin-Gel, das die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. Zur Herstellung des Formalin-Gels wurden 1,3 g Agarose in 73 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O und 10 ml 10x MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure)-Puffer gelöst. Nach kurzem Aufkochen und Abkühlen auf 60°C wurden unter dem Abzug 17 ml Formaldehyd (37 %-ige Lösung) dazugegeben, kurz gerührt und das Gel gegossen. Zur Vorbereitung der Proben wurden 15 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 6 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 2,5 µl 10x MOPS, 12,5 µl Formamid, 4 µl Formaldehyd, 0,5 µl Ethidiumbromid sowie 1,5 µl Stopplösung versetzt.

Der Ansatz wurde dann bei 68°C für 10 min im Wasserbad denaturiert, auf das vorbereitete Gel geladen und bei 60-80 mA für 3-4 Stunden aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet. Anschließend wurde das Gel zur Kontrolle

auf einen UV-Tisch gelegt, wobei die 23S-, 16S- und 5S-RNA-Banden zu sehen sein sollten. Der Transfer der RNA auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Amersham) erfolgte mittels eines Kapillar-Blots unter Verwendung von 20x SSC üN.

Am nächsten Morgen wurde die Membran kurz an der Luft getrocknet und UV-fixiert. Für die Hybridisierung wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 2 Stunden in CHURCH-Puffer bei 52°C vorhybridisiert. Danach wurde die zuvor für 10 min bei 90°C denaturierte mit RNA-Dig-dUTP markierte Sonde auf die Membran aufgebracht und üN bei 52°C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran bei RT mit 2x SSC, 0,1% SDS für 5 min gewaschen und danach je noch einmal für 20 min mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 52°C und mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 68°C. Diesen Schritten folgte das Waschen der Membran für 1 min mit Puffer 1 sowie für 30 min bei 52°C in Puffer 2. Darauf wurde kurz in Puffer 1 bei RT inkubiert und 4 µl Antikörper (Dig-F<sub>ab</sub>-Fragment, Roche), der in 20 ml Puffer 1 gelöst worden war, zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Membran zweimal für je 15 min in Puffer 1 gewaschen und zur Detektion in ein Gefäß mit 20 ml Färbelösung für die immunologische Detektion geben. Die Färbung erfolgte unter ständiger Kontrolle für mehrere Stunden und wurde durch Waschen der Membran in Puffer 4 gestoppt.

**Tabelle 2.14** Lösungen für Northern-Blot

<b>Lösungen für Northern-Blot</b>	
10xMOPS	0,2 M MOPS 0,05 M NaOAc 0,01 M EDTA pH 7.0 mit NaOH einstellen
Stop-Lösung	95 % Formamid 20 mM EDTA (pH 7.0 mit NaOH) 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
CHURCH-Puffer	7 % SDS 50 % Formamid (deionisiert) 5x SSC (pH 7.0) 2 % Blocking Reagenz 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.0) 0,1 % Laurylsarkosyl
20x SSC	0,3 M Na-Citrat 3 M NaCl pH 7.0 mit HCl einstellen

Waschpuffer 1	2x SSC (pH 7.0) 0,1 % (w/v) SDS
Waschpuffer 2	0,1x SSC (pH 7.0) 0,1 % (w/v) SDS
Puffer 1	100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 150 mM NaCl
Puffer 2	1 % (w/v) Blocking-Reagenz in Puffer 1
Puffer 3	100 mM Tris-HCl (pH 9.5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer 4	100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0)
Färbelösung	45 µl Nitroblau-Tetrazolium-Lösung (NBT, 50 mg/ml in Dimethylformamid) 35 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidin-Salz (X-Phosphat, 75 mg/ml in 70% (v/v) Dimethylformamid) 10 ml Puffer 3

## 2.2.6 Methoden zur Expressionsanalyse

### 2.2.6.1 *LacZ*-Färbung

Die Verwendung des pT1 $\beta$ geo-Vektors zur Herstellung der transgenen Mauslinie erlaubt den Einsatz der *lacZ*-Färbung zur Expressionsanalyse, da dieser Vektor ein in den Mutanten exprimiertes  $\beta$ -Galaktosidase-Gen trägt. Für die *lacZ*-Färbung wurden die frisch präparierten Embryonen je nach Stadium für 30 – 60 Minuten in 4 % Paraformaldehyd (PFA) /PBS fixiert und anschließend dreimal in PBS mit 0,01 % Na-deoxycholat, 0,02 % Non-idet P40, 5 mM EGTA (pH 8.0) und 2 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Danach wurden die Embryonen für mehrere Stunden bis üN in einer Färbelösung (0,5 mg/ml X-gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,01 % Na-deoxycholat, 0,02 % Non-idet P-40 in PBS) bei 37°C gefärbt. Der Färbeprozess wurde dabei unter dem Binokular überwacht. Danach wurden die Embryonen dreimal in PBS gewaschen und für 1 Stunde in 4 % PFA/PBS nachfixiert. Der gefärbte Embryo wurde fotografiert. Die Lagerung der Embryonen erfolgte in 80 % Glycerol in PBS.

### 2.2.6.2 *In situ*-Hybridisierung

Für die Expressionsanalyse durch *in situ*-Hybridisierung wurden spezifische RNA-Sonden verwendet, die mit Digoxygenin (DIG, Roche) markiert worden waren. Diese wurden mit für das zu untersuchende Gen spezifischen Primern aus cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pCRII-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Für die Sonden gegen *Eya3* wurden die in Tabelle 2.4 genannten Oligonukleotide eingesetzt. Je nach Orientierung des Fragments und gewünschter Art der Sonde (sense oder antisense) wurde mit der SP6- oder T7-Polymerase amplifiziert. Das Gewebematerial für die Hybridisierung waren entweder ganze Embryonen (*whole-mount*) der Stadien E9.5 bis E12.5 oder Paraffinschnitte der Stadien E11.5 bis E17.5. Direkt nach der Präparation wurden die Embryonen in 4% PFA/PBS üN bei 4°C fixiert und wie folgt weiterbehandelt:

#### *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitte:

Embryonen, von denen Paraffinschnitte angefertigt werden sollten, wurden zunächst üN in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25 %, 50 %, 75 %, 100 %) dehydriert und an einer Histo-Station in Paraffin (Jung-Histowax) eingebettet. Die Gewebeschnitte (Stärke: 8 µm) wurden an einem Mikrotom (Leica) erstellt und auf Objektträger aufgezogen. Zu Beginn der Hybridisierung musste das Paraffin von den Gewebeschnitten durch eine Xylol-Behandlung wieder entfernt werden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert und mit Proteinase K in Proteinase K-Puffer zur Entfernung von Proteinen behandelt. Anschließend folgten eine erneute Fixierung des Gewebes in 4 % PFA/PBS, ein Salzwechsel mit 2x SSC sowie die Prähybridisierung mit Tris/Glycin-Puffer. Für die Hybridisierung, die üN bei 65°C erfolgte, wurde Hybridisierungspuffer verwendet, dem 2 mg/ml Heparin, 100 µg/ml tRNA sowie die markierte RNA-Sonde im Verhältnis 1:50 – 1:100 hinzugegeben worden waren. Nach der Hybridisierung wurden ungebundene Sonden durch mehrere Waschschriffe mit 0,5x SSC / 20 % Formamid und einem RNase-Verdau (10 µg/ml RNase A in NTE) entfernt. Die Zugabe des Antikörpers wurde durch Präinkubation der Gewebeschnitte mit Blocking Solution vorbereitet, um die Möglichkeit unspezifischer Bindungen zu reduzieren. Der Antikörper (Anti-DIG-

AP-Antikörper) wurde im Verhältnis 1:3500 – 1:5000 in Blocking Solution zugegeben. Die Inkubation erfolgte üN bei 4°C.

Am nächsten Morgen wurde die Antikörperlösung durch zwei Waschschriffe in TBS-T und NTM-T entfernt. Die eigentliche Detektion erfolgte durch eine Färbelösung mit BM purple AP substrate (Roche), welches der Antikörpergebundenen Alkalischen Phosphatase als Substrat dient. Die Detektion erfolgte abgedunkelt für zunächst ca. 6 Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann bei 4°C noch mehrer Tage fortgesetzt bis die gewünschte Stärke des Färbesignals erreicht war. Durch Waschen der Gewebeschnitte in NTM-T und Nachfixierung in 4 % PFA/PBS wurde die Färbereaktion abgestoppt. Zur Aufbewahrung wurden die Präparate mit Kaisers Glyceringelantine (Merck) eingedeckelt. Die Ergebnisse wurden durch Fotodokumentation (Zeiss Axiovision) am Mikroskop (Zeiss Axioplan) festgehalten.

Lösungen für *in situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitte:

Nachfolgend sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Alle Puffer und Lösungen, die vor und während der eigentlichen Hybridisierung benutzt wurden, mussten frei von RNasen sein, weshalb beim Ansetzen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verwendet wurde, das zusätzlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war, um vorhandene RNasen zu zerstören. Eine Inaktivierung des DEPC wurde anschließend durch dreimaliges Autoklavieren gewährleistet.

**Tabelle 2.15** Lösungen für *in situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitte

<b>Lösungen für <i>in situ</i>-Hybridisierung auf Paraffinschnitte</b>	
PBS	30 ml NaCl (5 M) 15 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Puffer (1 M) add 1 l H <sub>2</sub> O pH 7.4 mit NaOH einstellen
PBT	PBS + 0,1% Tween20
4% PFA/PBS	4 g PFA add 100 ml PBS + 3 Tropfen NaOH bei 55°C rühren bis PFA aufgelöst auf Eis abkühlen, pH 7.4 mit HCl einstellen
tRNA	(10 mg/ml) in H <sub>2</sub> O 2 × phenolisieren aliquotiert bei -20°C lagern

Proteinase K Puffer	10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) add 0,5 l H <sub>2</sub> O Zugabe von 2 µg/ ml Proteinase K unmittelbar vor Verwendung
Tris/Glycin-Puffer	24,2 g Tris Base 15 g Glycin add 2 l H <sub>2</sub> O Puffer unmittelbar vor Verwendung ansetzen
20× SSC	17,53 g NaCl 8,82 g NaCitrat in 80 ml H <sub>2</sub> O lösen pH 7.0 einstellen mit HCl add 100 ml H <sub>2</sub> O
5x SSC, 2x SSC, 0,5x SSC	aus 20x SSC mit H <sub>2</sub> O herstellen
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid 5 x SSC 0,1 % Tween 20 5 % Dextransulfat pH auf 6.0 – 6.5 mit Zitronensäure einstellen
Heparin	10 g Heparin 1 M Citrat in H <sub>2</sub> O 100 ml 4 × SSC
10 × TBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 25 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5) add 100 ml H <sub>2</sub> O
TBS-T	1 × TBS + 0,1 % Tween 20
RNase A	RNase A (10 mg/ml) in 0,01 M NaOAc (pH 5.2) durch Erhitzen (für 15 min) lösen Abkühlen auf Raumtemperatur und auf pH 7.4 einstellen mit 1 M Tris-HCl aliquotiert bei -20°C lagern
MAB	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl add 800 ml H <sub>2</sub> O auf pH 7.5 mit festem NaOH einstellen add 1 l H <sub>2</sub> O
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 (pH 8.0)

	add 1 l H <sub>2</sub> O
NTM-T	20 ml 5 M NaCl 100 ml 1 M Tris-HCl (pH 9.5) 50 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> + 0,1% Tween 20 add 1 l H <sub>2</sub> O
1% Blocking Solution	10 g Blocking Pulver + 0,1% Tween 20 add 1 l MAB
Färbelösung	1 ml BM purple AP substrate 1 µl Levamisol 10 µl Tween20 5 min bei 2000 g (4°C) abzentrifugieren

*In situ*-Hybridisierung auf ganze Embryonen (*whole-mount*):

Embryonen, die für eine *whole-mount in situ*-Hybridisierung vorgesehen waren, wurden nach der Fixierung in 4 % PFA/PBS in einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25 %, 50%, 75 %, 100%; in PBS) dehydriert und für 1 Stunde mit 3 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt, um das Gewebe zu bleichen. Die Lagerung der Embryonen erfolgte bei -20°C in 100 % Methanol bis zur Hybridisierung. Diese wurde durch Rehydrierung der Embryonen in einer absteigenden Methanol-Reihe vorbereitet. Für die Stadien E10.5 - E12.5 wurde ein Verdau für 3 – 5 Minuten mit Proteinase K (10 µg/ml) vorgenommen, gefolgt von einem Waschschrift in PBT/Glycin. Nach Inkubation in RIPA-Puffer für 10 Minuten wurden die Embryonen mehrfach mit PBT gewaschen und in 4 % PFA/PBT mit 0,2 % Glutaraldehyd für 20 Minuten nachfixiert. Nach zwei Waschschriften in PBT erfolgte die Prähybridisierung der Embryonen in Hybridisierungspuffer mit 100 µg/ml tRNA bei 65°C für 3 Stunden. Für die Hybridisierung wurden die DIG-markierten RNA-Sonden im Verhältnis 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt und zusammen mit den Embryonen üN bei 65°C inkubiert. Danach folgten zwei Waschschriften in Hybridisierungspuffer bei 65°C und eine 1-stündige Behandlung mit RNase Lösung (100 µg/ml RNase A beinhaltend) bei 37°C. Anschließend wurde 5x in SSC/FA/Tween20 für je 30 Minuten bei 65°C gewaschen. Den Waschschriften folgend wurden die Embryonen je 2x mit TBS-T und 2x mit MAB-T bei Raumtemperatur für 10 Minuten behandelt. Der Präinkubation der Embryonen für 1 Stunde in Blocking

Solution/MAB-T folgte die Antikörperzugabe (Anti-DIG-AP-Antikörper im Verhältnis 1:5000 in Blocking Solution/MAB-T) und eine Inkubation der Embryonen in dieser Lösung üN bei 4°C. Nach Entfernung des Antikörpers wurden die Embryonen zunächst für 8 Stunden in TBS-T bei RT und für weitere 2 Tage in TBS-T bei 4°C gewaschen. Nach zweimaligem Waschen in Alkalinem Phosphatase Puffer für 5 Minuten erfolgte die Detektion wie schon bei den Gewebeschnitten mit einer Färbelösung, die BM purple AP substrate (Roche) enthielt. Die Färbung wurde am Binokular verfolgt und die Embryonen anschließend mit 4 % PFA/PBS üN bei 4°C fixiert. Die Ergebnisse wurden ebenfalls durch Fotodokumentation (Zeiss Axiovision) am Binokular (Leica) festgehalten.

Lösungen für *in situ*-Hybridisierung auf ganze Embryonen:

Etliche Puffer und Lösungen waren mit den oben genannten Lösungen identisch. Zusätzlich waren folgende Lösungen erforderlich:

**Tabelle 2.16** Lösungen für *in situ*-Hybridisierung auf *whole-mounts*

<b>zusätzliche Lösungen für <i>in situ</i>-Hybridisierung auf <i>whole-mounts</i></b>	
Hybridisierungspuffer	5 ml Formamid 2,5 ml 20x SSC 0,1 % Tween 100 µg/ml tRNA 50 mg/ml Heparin add 10 ml H <sub>2</sub> O
RNase Lösung	100 µl 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 1 ml 5 M NaCl 0,1 % Tween20 100 µg/ml RNase A add 10 ml H <sub>2</sub> O
SSC/FA/Tween20	5 ml 20xSSC 25 ml Formamid 0,1 % Tween add 50 ml H <sub>2</sub> O
RIPA	2,5 ml 10 % SDS 15 ml 5 M NaCl 5 ml Non-idet P40 25 ml 10 % Deoxycholat 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) 25 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0) add 500 ml H <sub>2</sub> O

Alkaline Phosphatase Puffer	1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 50 µl Tween20 5 ml 1 M Tris-HCl (pH 9.5) 2 mM Levamisol add 50 ml H <sub>2</sub> O
-----------------------------	--

### 2.2.7 Histologische Untersuchungen

Zur histologischen Untersuchung wurden adulten Tieren nach dem Abtöten die Augen entnommen (Alter: 7 Wochen) und nach ihrer Entnahme in Davidson-Lösung bei 4°C für mehrere Tage fixiert und danach 3x 15 Minuten in 100 % Ethanol dehydriert. Anschließend wurden die Augen für 2 Tage in JB-4 cat aus dem JB-4 Embedding Kit (Polysciences) aufbewahrt und dann in Plastikkapseln unter dem Abzug mit Polymerisationslösung eingebettet. Nach dem Aushärten der Präparate konnten die Objekte am Ultramikrotom (Modell OM-U3, Reichert, Walldorf) geschnitten (Schnittstärke: 2 µm) und auf Objektträger aufgezogen werden. Die Färbung erfolgte durch Methylenblau-basisches Fuchsin. Dazu wurden die Schnitte kurz mit H<sub>2</sub>O angefeuchtet, für 45 Sekunden in der Färbelösung gefärbt und nach dem Trocknen mit Eukitt eingedeckelt.

### 2.2.8 Elektoretinographie (ERG)

Für die Durchführung der Elektoretinographie (Dalke et al., 2004) wurden die Mäuse zunächst für 12 Stunden im Dunkeln gehalten und anschließend mit Ketamin und Xylazin (137 mg bzw. 6,6 mg pro kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach dem Eintropfen mit Atropin (1 %) zur Weitung der Pupillen wurden die Mäuse auf einem Schlitten fixiert und Messelektroden aus Golddraht auf die Hornhaut beider Augen aufgelegt. Die Erdung erfolgte über eine weitere Elektrode am Schwanz der Tiere. Danach konnte die Maus auf dem Schlitten in den Ganzfeldstimulator (Espion ColorBurst; Diagnosys LLC, Littleton, MA) geführt werden, wo die Lichtimpulse mit einer Frequenz von 0,48 Hz in 2 Schritten bei 500 und 12500 (S) cd/m<sup>2</sup> erfolgten. Die dabei erhaltenen Messdaten wurden mit der mitgelieferten Software aufgezeichnet und am Computer ausgewertet.

### 2.2.9 Die optokinetische Trommel

Zur Vorbereitung der Untersuchung in der optokinetischen Trommel (Puk et al., 2008) wurden die Mäuse zunächst in den mittig in der Trommel ( $d = 63$  cm) platzierten Acrylglaszylinder ( $d = 15$  cm) gesetzt und für 3 Minuten ohne Behandlung an die Umgebungsbedingungen gewöhnt. Danach wurde die Trommel zunächst im Uhrzeigersinn in Bewegung gesetzt (10 U/min) und alle 30 Sekunden die Drehrichtung der Trommel geändert. Insgesamt wurden zehn 30 Sekunden-Intervalle gemessen (5 Intervalle pro Richtung) und dabei das Auftreten von Kopfbewegungen der Tiere in Drehrichtung der Trommel (*head tracking*) handschriftlich aufgezeichnet. Als Kopfbewegung im Sinne einer positiven Reaktion wurde jede Verfolgung der Drehrichtung der Trommel mit dem Kopf um mehr als  $15^\circ$  gewertet. Um Lerneffekte auszuschließen wurde die Messung mit einem Zeitabstand von 2 Tagen wiederholt.

### 2.2.10 Neurofilament-Färbung

Für die Neurofilamentfärbung wurden Embryonen des Altersstadium E11.5 in PBS frei präpariert und für 24 h in 4 % PFA/PBS bei  $4^\circ\text{C}$  leicht schüttelnd gelagert. Danach wurden die Embryonen 3x in PBS gewaschen und für weitere 24 h in Dent's Bleach bei  $4^\circ\text{C}$  geblichen (für Lösungen siehe Tab. 2.16). Am nächsten Tag wurde 5x mit Methanol gewaschen und in Dent's Fix für mindestens 24 h bei  $4^\circ\text{C}$  fixiert. Die darauffolgende Antikörperbehandlung wurde mit 3x Waschen in PBS gestartet und mit einem dreimaligen Waschen in PBS für jeweils 1 Stunde fortgesetzt. Danach wurde der primäre Antikörper (Mouse anti-Neurofilament 2H3) im Verhältnis 1:50 in Blocking-Solution dazugegeben und für 4 Tage bei Raumtemperatur abgedunkelt und leicht schüttelnd inkubiert. Die Entfernung des Antikörpers geschah zunächst durch dreimaliges Waschen in PBS und wurde mit fünfmaligen Waschen für jeweils eine Stunde in PBS weitergeführt. Die Zugabe des sekundären Antikörpers (Goat anti-mouse Cy3) erfolgte im Verhältnis 1:250 in Blocking-Solution und die Embryonen wurden anschließend abgedunkelt üN bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Die Entfernung des Antikörpers geschah abermals durch dreimaliges kurzes Waschen in PBS und weiterem fünfmaligen Waschen in PBS für jeweils eine Stunde.

Anschließend wurden die Embryonen nachbehandelt, um sie für die spätere Mikroskopie transparent zu machen. Dazu wurden die Embryonen zunächst für 5 Minuten in PBS/MetOH (1:1) aufbewahrt und anschließend 3x mit MetOH für je 20 Minuten behandelt. Im nächsten Schritt wurde das Methanol gegen Methanol/BABB im Verhältnis 1:1 ausgetauscht. Zuletzt wurden die Embryonen in 100 % BABB gegeben und in dieser Lösung auch bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Auswertung der Färbung erfolgte durch konfokale Mikroskopie am Zeiss-Mikroskop LSM 501.

**Tab. 2.17** Lösungen für die Neurofilament-Färbung

<b>Lösungen für Neurofilamentfärbung</b>	
Dent's Fix	Dimethylsulfoxid (DMSO) : MetOH (1:4)
Dent's Bleach	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Dent's Fix (1:2)
Blocking Solution	5 % Horse serum, 20 % DMSO, 75 % PBS
BABB	Benzylalkohol : Benzylbenzoat (1:2)

## 2.2.11 Zellkultur – Methoden

### 2.2.11.1 Kultivierung von Zellen

Für diese Arbeit wurde die aus der humanen embryonalen Niere gewonnene Zelllinie HEK293T eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Quantum 333 Fibroblasten-Medium. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>- Flaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturbrutschrank gelagert. Die Zelldichte der adhärennten Zellen wurde regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf durch Splitten und Überführen in eine neue Flasche verringert, um ein Überwachsen der Zellen, welches sich nachteilig auf das weitere Wachstum auswirken würde, zu verhindern. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 2-3 Tagen, um frisches Serum beizubringen und ein Übersäuern des Mediums zu unterbinden.

### 2.2.11.2 Splitten von Zellen

Das sog. „Splitten“ der Zellen erfolgte bei Bedarf (ca. 2x pro Woche). Zunächst wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, um Serumrückstände gründlich zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml

Trypsin/EDTA für 1 – 2 min im 37 °C-Schrank inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium inaktiviert und die Zellen durch Auf- und Abziehen in der Pipette und Abspülen des Bodens gleichmäßig suspendiert. Zum Anlegen einer neuen Kultur wurde eine neue Flasche mit ca. 9 ml Medium sowie mit 1 – 2 ml Suspension (entsprechend 10 – 20 % der vorhandenen Zellen) aus der trypsinisierten Flasche befüllt. Die Zellen wurden dann wieder bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert.

Herstellung PBS:

0,2 g KCl

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

8 g NaCl

add 1000 ml H<sub>2</sub>O auffüllen, pH-Wert auf 7.4 einstellen und autoklavieren

### 2.2.11.3 Auszählen von Zellen

Für die Aussaat der Zellen zur Transfektion wurde die genaue Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension nach dem Trypsinisieren der Flasche ermittelt.

Das Zählen der Zellen erfolgte in einer Neuburger-Zählkammer unter einem Mikroskop. Zur Zellzahlbestimmung wurden insgesamt 4 äußere, große Quadrate ausgezählt und der Durchschnitt aus der ermittelten Zellzahl pro Großquadrat gebildet. Dieser Wert mit 10<sup>4</sup> multipliziert, stellte die Zellzahl pro Milliliter Suspension dar. Die Angabe erfolgt zumeist in 10<sup>5</sup> Zellen / ml.

### 2.2.11.4 Cryo-Konservierung von Zellen

Für eine Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Nach dem Trypsinisieren der Zellen wurde ein Volumen der Suspension entsprechend einer Zellzahl von 1x10<sup>6</sup> Zellen für 5 min bei 300 g und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium (50 % DMEM + 40 % FCS + 10 % DMSO) aufgenommen und kurz resuspendiert. Das Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert hierbei eine Kristallbildung und in Verbindung mit dem FCS eine Dehydrierung des Cytoplasmas. Die Zellsuspension wurde zügig in ein sog. „Cryo-Tube“ überführt

und sofort in einer Einfrierhilfe (Cryo freezing container<sup>®</sup>, Nalgene, Hereford, UK) bei  $-70\text{ °C}$  weggefroren. Die mit Isopropanol befüllte Einfrierhilfe gewährleistete ein langsames Einfrieren der Zellen. Am nächsten Tag konnten die Zellen in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Tank zur dauerhaften Lagerung überführt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Erwärmen des „Cryo-Tubes“ im  $37\text{ °C}$  Wasserbad. Bevor die Zellen vollständig aufgetaut waren, wurde das „Cryo-Tube“ aus dem Bad genommen und der Inhalt in eine mit 10 ml Medium vorbereitete Flasche pipettiert, gemischt und im Inkubator gelagert.

### **2.2.11.5 Transiente Transfektion der Zellen**

Für die transiente Transfektion der Zellen wurde PolyFect-Reagenz der Firma Qiagen eingesetzt. Bei der Methode der Lipofektion kommt es zu einer Komplexbildung von kationischen Liposomen und Plasmid-DNA, die dann durch Fusionieren der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle gelangen. Allgemein ist die Transfektionseffizienz dieser Methode sehr hoch (je nach Zelllinie bis zu 90 %). Der Ablauf der Transfektion gestaltete sich wie folgt. Einen Tag vor der Transfektion wurde eine  $75\text{ cm}^2$ - Flasche, die zu 80 – 90 % optisch konfluent war, trypsinisiert und die Zellen in 10 ml Quantum-Medium resuspendiert. 2 ml der Zellsuspension wurden in ein 15 ml-Reaktionsgefäß (Falcon) überführt und mit 8 ml Quantum-Medium gemischt. Von dieser Suspension wurden nun je 300  $\mu\text{l}$  in eine Schale einer 24-well Platte gegeben und  $\text{üN}$  bei  $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Zur Transfektion wurde für jede Schale ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit den zu transfizierenden Plasmiden, dem PolyFect-Reagenz und serumfreiem DMEM-Medium vorbereitet und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde Quantum-Medium zugegeben, welches die Interaktion zwischen DNA und PolyFect abstoppt. Diese Ansätze wurden auf die Zellen getropft, welche anschließend wieder bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert wurden. Nach 48 h Inkubation bei den genannten Bedingungen konnte die Reporter-gen-Aktivität in den Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit 50  $\mu\text{l}$  PLB-Lysispuffer lysiert und eine kombinierte Detektion von Firefly-Luciferase und *Renilla*-

---

Luciferase mit dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) vorgenommen.

#### **2.2.11.6 Promotoranalyse: Kombinierte Detektion von Firefly Luciferase und *Renilla* Luciferase**

In dieser Arbeit wurde eine Promotoranalyse für das murine *Eya3*-Gen in einem auf Zellkultur basierten Testsystem mit zwei Reportergenen vorgenommen. Dazu wurden verschiedene Längen der Promotorregion in einen mit einer Firefly-Luciferase (*Photinus pyralis*) ausgestatteten Reportervektor (pPLlucII) kloniert und in Kombination mit einem zweiten Vektor (pRL-SV40) transfiziert, der als interne Kontrolle eine *Renilla*-Luciferase (*Renilla reniformis*) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors trug. Die Aktivität beider Enzyme, die ohne posttranslationale Modifikationen auskommen, konnte in einer kombinierten Detektion mit dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) bestimmt werden. Dieses System basiert auf der Umsetzung verschiedener Substrate durch die beiden Enzyme, so dass in einer ersten Messung die Aktivität der Firefly-Luciferase und in einer zweiten Messung die Aktivität der *Renilla*-Luciferase bestimmt werden kann. Die Firefly-Luciferase katalysiert die Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Lichtemission, während die *Renilla*-Luciferase die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid katalysiert, ebenfalls unter Emission von Photonen. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte in einem Luminometer (Berthold), welches die auftreffenden Photonen in Photoelektronen umwandelt und als Einzelimpulse digital zählt. Die durch die Firefly-Luciferase bei der Umsetzung des Substrats emittierte Lichtmenge ist dabei der Promotoraktivität direkt proportional. Da aber die emittierte Lichtmenge zugleich von der überhaupt aufgenommenen Vektormenge abhängt, wurden zusätzlich zu den Firefly-Luciferase tragenden Vektoren noch die *Renilla*-Luciferase tragenden Vektoren bei allen Transfektionen co-transfiziert. Die Menge an *Renilla*-Luciferase tragendem Vektor war in allen Ansätzen gleich, so dass die gemessene *Renilla*-Luciferase Aktivität Auskunft über die aufgenommene Vektormenge gab und zu einem Vergleich der Ansätze untereinander herangezogen werden konnte. Die Gesamtmenge an transfizierter Plasmid-DNA war in allen Ansätzen gleich, wobei

pro Transfektionsansatz 1,2 µg DNA transfiziert wurden. Davon waren zwischen 0,25 µg bis zu 1 µg pPLucII Promotor-Plasmid und 0,1 µg pRL-SV40 Kontrollplasmid. Zusätzlich wurden noch verschiedene Transkriptionsfaktoren im pcDNA3.1 Vektor (bis zu 0,6 µg) transfiziert. Zur Auswertung der Messungen wurde von den gemessenen Werten für Firefly-Luciferase Aktivität (FireflyLA) und *Renilla*-Luciferase Aktivität (RenillaLA) zunächst der Leerwert (LW) einer nicht-transfizierten Schale abgezogen und dann der Quotient aus der Aktivität der Firefly-Luciferase und der *Renilla*-Luciferase gebildet und somit die relative Luciferase Aktivität (rLA) bestimmt.

$$rLA = \frac{\text{FireflyLA} - \text{LW}}{\text{RenillaLA} - \text{LW}}$$

Jeder Ansatz wurde mehrfach unter gleichen Bedingungen transfiziert und die Werte zu einem Mittelwert  $\bar{x}$  verrechnet, unter Angabe der Standardabweichung ( $\delta$ ). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels eines t-Tests überprüft.

## 2.2.12 Untersuchungen am Zebrafisch (*Danio rerio*)

### 2.2.12.1 Expressionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung

Zur Aufklärung des Expressionsmusters von *eya3* im Zebrafisch wurden *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen der Entwicklungsstadien 5,5 Stunden nach der Befruchtung (engl. *hours past fertilization*, *hpf*) bis 28 Stunden nach der Befruchtung durchgeführt. Dazu wurden weibliche und männliche Tiere (Stamm AB/EK) in Paarungsboxen zusammengesetzt und die gelegten Eier mit einem Sieb eingesammelt. Die Eier wurden bei 28°C gelagert und bei Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums durch Fixierung in 4 % PFA/PBS in ihrer Entwicklung gestoppt. Nach 24 h Inkubation in 4 % PFA/PBS bei 4°C konnten die Embryonen unter dem Binokular dechorioniert werden und in einer Methanolreihe mit ansteigender Konzentration dehydriert werden. Der Ablauf der Hybridisierung ist der schon oben beschriebenen *in situ*-Hybridisierung auf whole-mounts vergleichbar (2.2.6.2). Die Sequenz des zur Sondenerstellung erhaltenen cDNA-Klons (G. Nica, LMU München) befindet sich im Anhang (Kapitel 6.5). Die Detektion erfolgte durch Zugabe von NBT/BCIP (225 µg/ml

---

NBT, 175 µg/ml BCIP) als Färbesubstrat. Der Verlauf der Färbung wurde alle 30 Minuten unter dem Binokular überprüft und durch Zugabe von PBT gestoppt. Bis zur Fotodokumentation des Ergebnisses wurden die Embryonen bei 4°C in 80 % Glycerol / 20 % PBT gelagert.

#### **2.2.12.2 Morpholino-Injektionen**

Um die Auswirkung des Verlustes einer Expression von *Eya3* auf den Phänotyp der Embryonen zu charakterisieren, wurden Morpholino-Oligonukleotide eingesetzt. Die hier benutzten Spleiß-Morpholinos binden komplementär zur mRNA-Sequenz und verhindern den korrekten Ablauf des Spleißvorgangs durch Blockieren des Spleiß-Akzeptors oder des Spleiß-Donors. Dadurch kann es zum Auslassen eines Exons und zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens bei der Translation kommen, was zu einem erwünschten vorzeitigen Translationsstop führt. Die Morpholino-Oligonukleotide (Kurzform: Morpholino) wurden bei der Firma Gene-Tools (Philomath, OR, USA) geordert und nach Erhalt in RNase-freiem Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 4 Millimol eingestellt. Um die für die Injektion der Morpholinos die notwendigen Embryonen zu erhalten, wurde in der schon unter 2.2.12.1 beschriebenen Weise verfahren. Mit einem Mikroinjektor (Eppendorf) wurden die Morpholinos direkt in das Cytoplasma eines sich im 1-Zell-Stadium befindenden Embryos injiziert. Da die benötigte Dosis zum Erzielen eines Phänotyps unbekannt war, wurden immer verschiedene Konzentrationen eines Morpholinos injiziert, wobei diese zwischen 0,25 – 4mM lagen. Nach der Injektion wurden die Embryonen für die weitere Entwicklung bei 28°C inkubiert und der Fortgang in regelmäßigen Abständen unter dem Binokular kontrolliert. Die Auswirkung der Injektionen auf den Phänotyp wurde fotodokumentarisch festgehalten. Zusätzlich wurde von den injizierten Embryonen nach 24 h die RNA isoliert und mittels RT-PCR überprüft, ob der Morpholino tatsächlich zu dem gewünschten Verlust eines Exons in der mRNA geführt hat. Nachfolgend sind die Sequenzen und die Lage der geordneten Morpholinos im *Eya3*-Gen des Zebrafischs dargestellt.

**Tabelle 2.18** Morpholino-Oligonukleotide

Morpholino-Oligo	Sequenz	Lage
E2i2	GAGTCAGTTTACTCACAGGTA ACTC	3'Ende Exon 2
E3i3	AACAAAATTGCTTACCGTGAATCAC	3'Ende Exon 3
E9i9	TTAAATTAAGGACCCACCTGATGTG	3'Ende Exon 9

### 2.3 *In silico*-Methoden

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden eine Reihe von Datenbanken genutzt, die über das Internet meist frei zugänglich sind. In der folgenden Tabelle 2.19 sind beispielhaft einige Adressen von Servern aufgelistet, die für verschiedene Fragestellungen wie Literaturrecherche, Sequenzsuche, Sequenzbearbeitung, Analyse von Funktionen bestimmter Gene und Sequenzabschnitte, aber auch für die Suche von Primern oder Restriktionsschnittstellen genutzt wurden.

Tabelle 2.19 Internet-Datenbanken

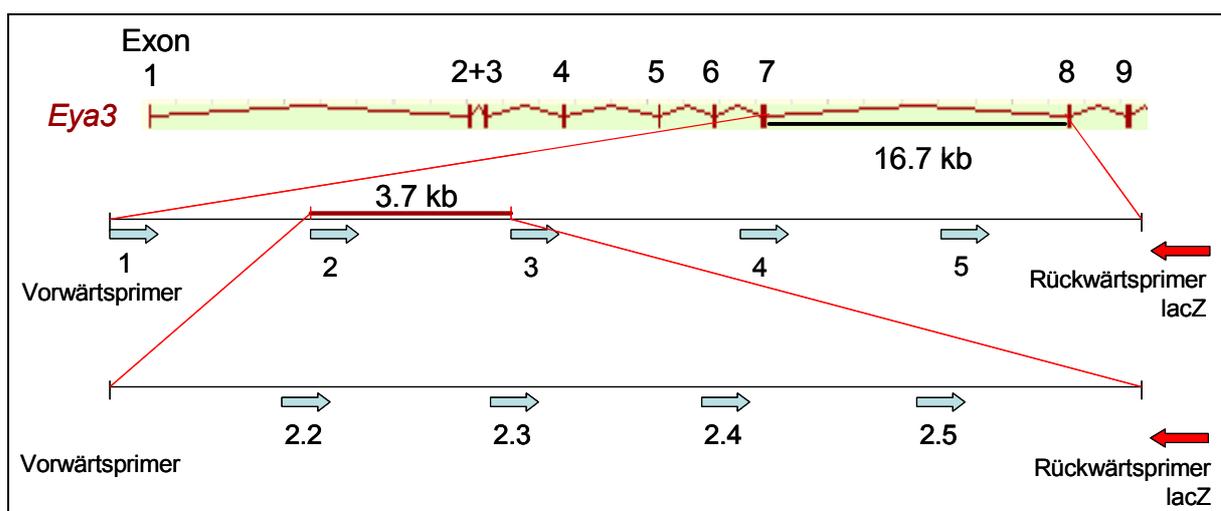
Datenbank	Anwendung	Internetadresse
NCBI Datenbank	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/</a>
MGI Datenbank	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.informatics.jax.org">http://www.informatics.jax.org</a>
Ensembl Datenbank	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
Vega Datenbank	Sequenzdatenbank, v.a. für Zebrafisch genutzt	<a href="http://vega.sanger.ac.uk/Danio rerio">http://vega.sanger.ac.uk/Danio rerio</a>
SWISS-PROT TrEMBL	Proteininformationen	<a href="http://srs.ebi.ac.uk/">http://srs.ebi.ac.uk/</a>
Expasy	Proteinanalytik	<a href="http://www.expasy.org/tools/">http://www.expasy.org/tools/</a>
OMIM	Literaturrecherche und Funktionsanalytik	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/searchomim.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/searchomim.html</a>
PubMed	Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
mVista	Sequenzvergleich versch. Organismen	<a href="http://www-gsd.lbl.gov/vista/mvista">http://www-gsd.lbl.gov/vista/mvista</a>
rVista	Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen	<a href="http://www-gsd.lbl.gov/vista/rvista">http://www-gsd.lbl.gov/vista/rvista</a>
Genomatix z.B. MatInspector	diverse Anwendungen, z.B. Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen	<a href="http://www.genomatix.de">http://www.genomatix.de</a> <a href="http://www.genomatix.de/matinspector">http://www.genomatix.de/matinspector</a>
BCM Search launcher	verschiedene Funktionen zur Sequenzbearbeitung	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html</a>
ClustalW	Sequenzvergleiche	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>
BLAST	Sequenzvergleiche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Primer 3	Auswahl von Primern	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi">http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi</a>
Webcutter	Restriktionsanalysen	<a href="http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html">http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Molekulare Charakterisierung der *Eya3*-Mutante

##### 3.1.1 Identifizierung der Vektorintegration

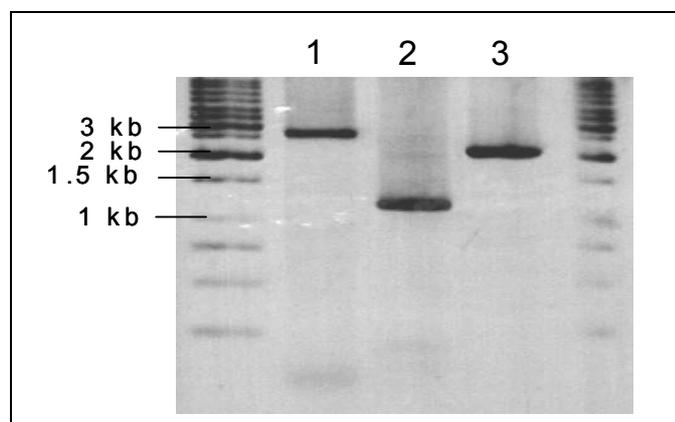
Da die Insertion des pT1 $\beta$ geo-Vektors in das Mausgenom nicht gerichtet erfolgt war, musste zunächst die genaue Lage der Vektorintegration bestimmt werden. Für eine erste Annäherung standen dazu Daten aus einer vom German Gene Trap Consortium (GGTC) durchgeführten 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) zur Verfügung. Die aus der 5'RACE gewonnenen Sequenzdaten wurden zur BLAST-Analyse (basic local alignment search tool; Altschul et al., 1990) mit den im Internet zur Verfügung stehenden Sequenzdatenbanken NCBI und Ensembl genutzt. Die Analyse ergab, dass die Integration des Vektors in der 16,7 kb großen intronischen Region zwischen Exon 7 und Exon 8 des *Eya3*-Gens auf Chromosom 4 erfolgt sein muss. Um eine weitere Eingrenzung vornehmen zu können, war es erforderlich, den Bereich um den Integrationsort mittels PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Aufgrund der Größe des Introns von fast 16,7 kb und der mangelnden Kenntnis, wie viel von der Vektorsequenz zusätzlich in das Genom integriert war, wurden 5 Vorwärts-Primer im Abstand von 3000 – 3700 bp im Intron gelegt (Abb. 3.1)



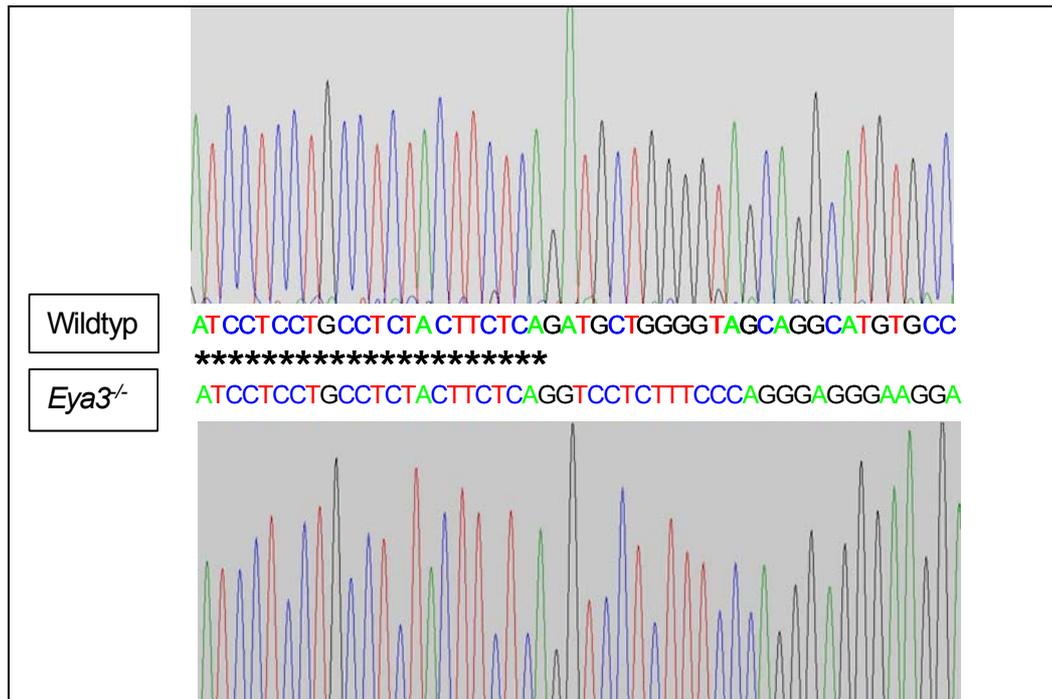
**Abbildung 3.1** Schematische Darstellung der Strategie zur Ermittlung des Integrationsortes des pT1 $\beta$ geo-Vektors im Exon 7 von *Eya3*. Die Pfeile markieren die Lage der gewählten Primer (blaue Pfeile = Vorwärtsprimer im Intron; rote Pfeile = Rückwärtsprimer in der *lacZ*-Kassette). Die Vorwärtsprimer 2 und 2.2 lieferten jeweils in Kombination mit dem Rückwärtsprimer in der *lacZ*-Kassette ein Produkt.

Die Vorwärtsprimer sollten in Kombination mit einem Rückwärts-Primer im *lacZ*-Gen des pT1 $\beta$ geo-Vektors zur Generierung eines PCR-Produktes von noch unbekannter Größe führen. Zur Amplifikation wurde daher eine Polymerase gewählt, die zur Erstellung von PCR-Produkten mit einer Länge von bis zu 10 kb geeignet ist (BD Advantage 2-Polymerase). Mit einer Kombination aus dem 1. bzw. dem 2. Vorwärtsprimer (Positionen: 71 bp und 3276 bp im Intron) und dem Rückwärtsprimer in der *lacZ*-Kassette konnte ein Produkt erzielt werden, dessen Größe ca. 6 kb bzw. 2,8 kb betrug. Daraufhin wurden 5 weitere Primer in dem Intervall zwischen Vorwärtsprimer 2 und 3 gelegt, von denen Primer 2.2 (Position: 3930 bp im Intron) zu einem Produkt von 2,1 kb mit dem schon bekannten Rückwärtsprimer führte (Abb. 3.2). Die Sequenzanalyse (Abb. 3.3) bestätigte die Integration des Vektors mit der genauen Position 132.233.057 Mb auf Chromosom 4 (*Ensembl* Datenbank, Release No. 49, März 2008).

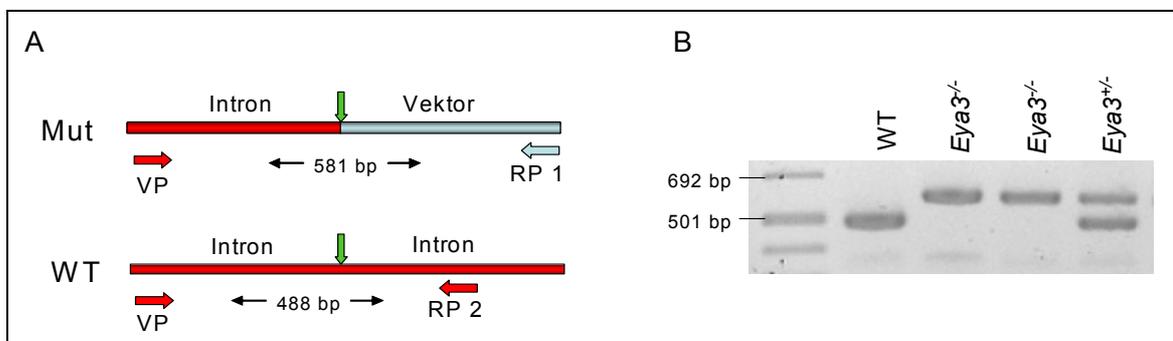
Die Kenntnis der Lage des pT1 $\beta$ geo-Vektors ermöglichte die Entwicklung eines Triplex-PCR Systems zur Genotypisierung der Mäuse. Dazu wurde ein Vorwärtsprimer vor die Integrationsstelle gelegt und in einem PCR-Ansatz mit zwei verschiedenen Rückwärtsprimern kombiniert. Einer der beiden Rückwärtsprimer war in der intronischen Sequenz lokalisiert und diente der Identifizierung von Wildtypen, der andere Primer wurde in der Vektorsequenz positioniert und ermöglichte mithin die Identifizierung von Mutanten. Ein Schema zur Strategie sowie ein typisches Ergebnis der Triplex-PCR sind in Abbildung 3.4 gezeigt.



**Abbildung 3.2** Ergebnis der PCR mit der BD Advantage 2-Polymerase. Die Vorwärtsprimer Eya3\_2\_for (Spur 1) und Eya3\_2.2\_for (Spur 3) lieferten jeweils in Kombination mit Primer *lacZ\_rev* ein PCR-Produkt (Größe: 2,8 kb bzw. 2,1 kb). Zur Kontrolle wurde Primer Eya3\_2\_for mit einem Rückwärtsprimer in der intronischen Sequenz kombiniert (Spur 2) (Produktgröße: 1,2 kb). (1% Agarose-Gel, Marker: Gene Ruler 1kb Ladder)



**Abbildung 3.3** Ergebnis der Sequenzierung der aus Wildtyp und *Eya3*-Mutante amplifizierte DNA-Fragmente. Dargestellt ist der Sequenzabschnitt, der die Insertionsstelle umgibt. Das obere Chromatogramm zeigt die Sequenz im Wildtyp. Das untere Chromatogramm zeigt die Sequenz in der Mutante. Hier schließt hinter der Insertionsstelle die Sequenz des pT1βgeo-Vektors an die genomische Sequenz an.



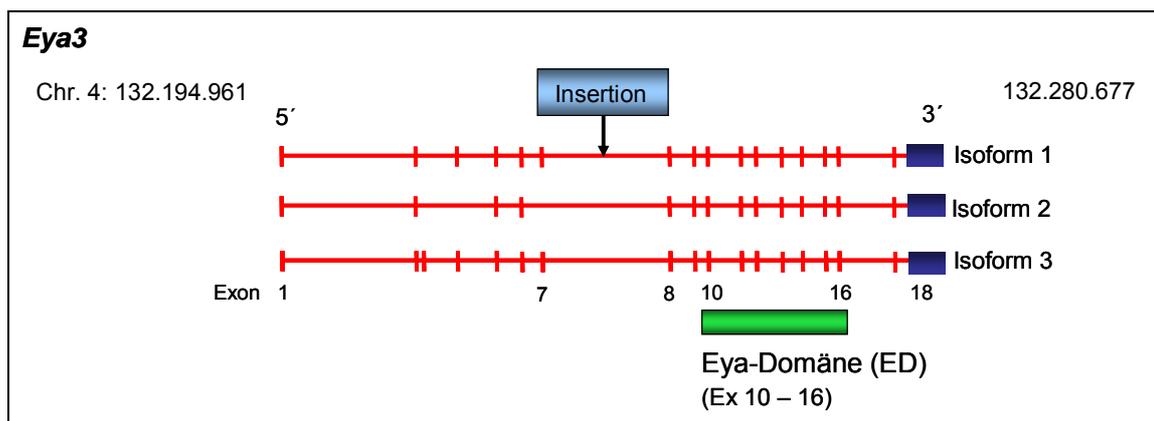
**Abbildung 3.4 (A)** Schema zur Triplex-PCR. Dargestellt ist die Situation für Mutante (Mut) und Wildtyp (WT). Der Vorwärtsprimer (VP) wird in einem Ansatz mit den Rückwärtsprimern RP1 (Identifizierung der Mutante) und RP2 (Identifizierung des Wildtyps) kombiniert. In den homozygoten Mutanten bindet nur der in der Vektorsequenz lokalisierte Rückwärtsprimer RP1 und liefert ein Produkt mit einer Länge von 581 bp. In Wildtypen bindet dagegen nur RP2 und ein 488 bp langes Produkt entsteht. In heterozygoten Mutanten können beide Primer binden, was durch eine Doppelbande auf dem Gel dokumentiert wird.

**(B)** Gelfoto einer Triplex-PCR mit verschiedenen Genotypen. (2% Agarose-Gel, Marker VIII)

### 3.1.2 Verifizierung der Insertionsmutagenese

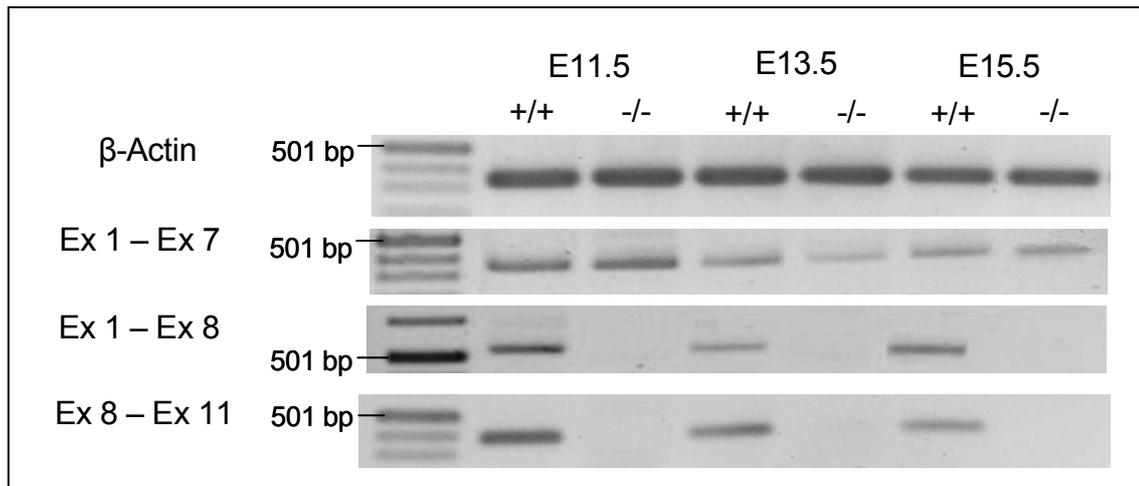
Ziel der mit Gene Trap Vektoren durchgeführten Mutagenese ist es, dass nach Einbau des Vektors in das Genom ein Fusionstranskript aus den vor der Integrationsstelle liegenden Exons des Gens und der durch den pT1 $\beta$ geo-Vektor codierten  $\beta$ geo-Kassette entsteht. Die Transkripte des betroffenen Gens werden dahingehend verändert, dass die stromabwärts der Integrationsstelle liegenden Exons nicht mehr eingespleißt werden und später auf Proteinebene fehlen.

Um eine erfolgreiche Mutagenese des Zielgens zeigen zu können, war es notwendig, das Fehlen der stromabwärts von der Integrationsstelle liegenden Exons in den RNA-Transkripten nachzuweisen. Bezogen auf die vorliegende Mutation des *Eya3*-Gens bedeutete dieses, dass in den *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren die Exons 8 – 18 auf RNA-Ebene fehlen sollten (s. Abb. 3.5).



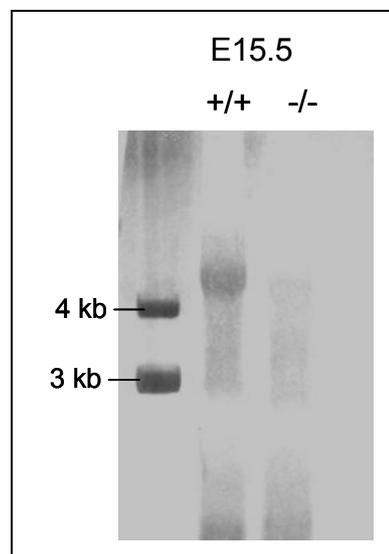
**Abbildung 3.5** Schematische Darstellung der Insertion in das *Eya3*-Gen. Die Insertion des Gene Trap Vektors in Intron 7 bewirkt in den homozygoten Mutanten ein Fehlen der Exons 8 – 18 auf RNA-Ebene. Die von den Exons 10 – 16 kodierte Eya-Domäne fehlt mithin in den homozygoten Tieren.

Der Nachweis dazu wurde mittels RT-PCR und Northern-Blot geführt. Hierzu wurden Embryonen von Wildtypen und von homozygoten Mutanten der Entwicklungsstadien E11.5 (ganzer Embryo), E13.5 (Kopf) und E15.5 (halber Kopf) präpariert und die Gesamt-RNA aus den Geweben isoliert. Das Ergebnis der RT-PCR zeigt ein Fehlen der dem Exon 7 nachfolgenden Exons (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6** Ergebnis der RT-PCR zur Kontrolle des Verlustes der Exons 8 – 18 in den homozygoten *Eya3*-Mutanten. In *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen der Stadien E11.5, E 13.5 und E15.5 sind mittels RT-PCR keine RNA-Transkripte nachweisbar, die auf Exon 7 folgende Exons beinhalten. Für die RNA-Isolierung wurden folgende Gewebe verwendet: E11.5: ganzer Embryo, E13.5: Embryokopf, E15.5: halber Kopf. (1,5% Agarose-Gel, Marker VIII)

Um das mittels RT-PCR erzielte Ergebnis überprüfen zu können, wurde ein Northern-Blot mit einer RNA-Sonde gegen die Exons 8 – 11 durchgeführt. Dabei konnten die zuvor erzielten Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 3.7).



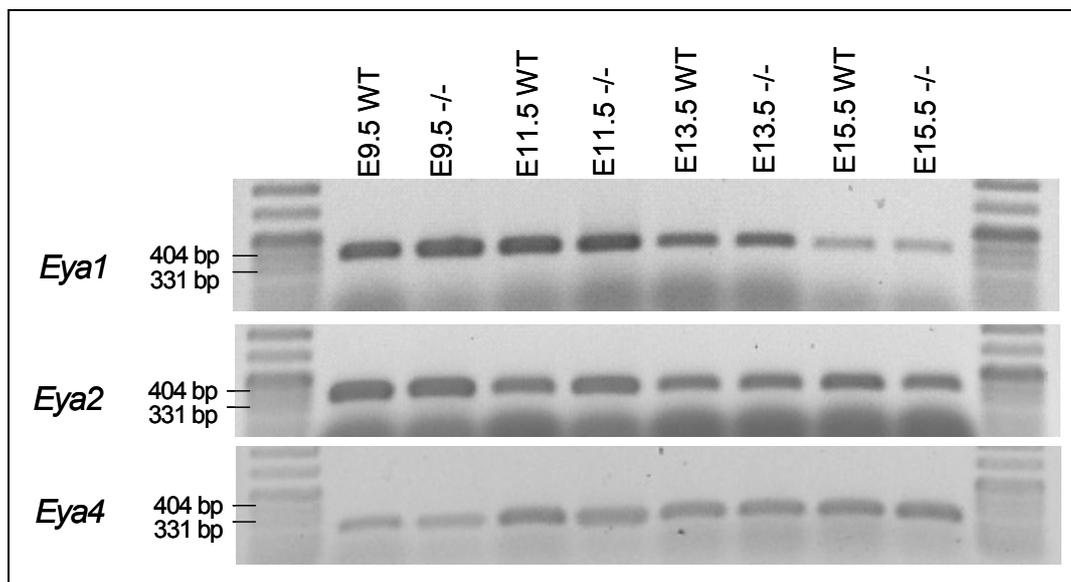
**Abbildung 3.7** Northern-Blot zur Überprüfung des Ergebnisses aus der RT-PCR. Der Blot zeigt einen Verlust der auf Exon 7 folgenden Exons in aus homozygoten Mutanten isolierter RNA. Die RNA-Sonde gegen Exon 8 – 11 kann nicht mehr binden. Gewebe: Embryo (E15.5), halber Kopf

### 3.1.3 Bestimmung der Expression von *Eya1*, 2 und 4 sowie *Six*- und *Dachshund*-Genen in *Eya3*-Mutanten

Um regulatorische Wechselwirkungen oder kompensatorische Effekte zwischen *Eya3* und anderen Genen des sog. *retinal determination gene network* (RDGN) (Kapitel 1.4) aufzuzeigen, wurde die Expression von *Eya1*, 2 und 4 sowie Genen der *Six*- und *Dachshund*-Familien in Mutanten und Kontrollen miteinander verglichen. Dazu wurden RT-PCRs mit cDNA aus verschiedenen Embryonalstadien durchgeführt.

#### 3.1.3.1 Expression anderer *Eya*-Gene

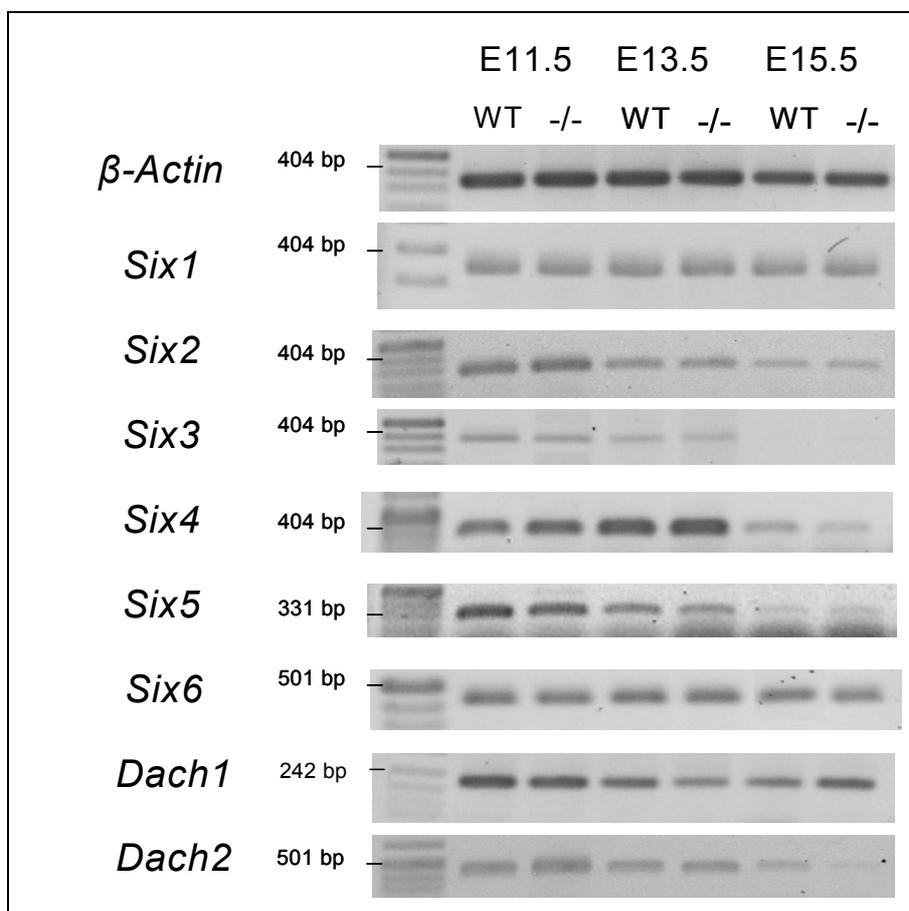
Zunächst wurde die Expression der drei anderen Mitglieder der *Eya*-Genfamilie in den Vertebraten überprüft. Die Resultate dieser PCRs mit cDNA der Embryonalstadien (E9.5 – E15.5) ergaben keinen Hinweis auf eine veränderte Expression für *Eya1*, *Eya2* oder *Eya4* in *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8** RT-PCR auf cDNA aus verschiedenen Embryonalstadien (E9.5 - E15.5) mit Primern für die Gene *Eya1*, *Eya2* und *Eya4*. Die Resultate aus der RT-PCR ergeben keinen Hinweis auf eine veränderte Expression dieser Gene zwischen Wildtyp und *Eya3*-Mutante. Für die RNA-Isolierung wurden folgende Gewebe verwendet: ganzer Embryo (E9.5 und E11.5), Embryokopf (E13.5), halber Kopf (E15.5). (2% Agarose-Gele, Marker VIII)

### 3.1.3.2 Expression der *Six*- und *Dachshund*-Gene

Ferner wurde die Auswirkung der *Eya3*-Mutation auf die Transkription der möglichen Interaktionspartner innerhalb des RDGN untersucht. Dazu wurden RT-PCR-Analysen mit Primerpaaren für die Gene *Six1-6* und *Dachshund1-2* durchgeführt. Die in Abbildung 3.9 gezeigten Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine Veränderung der Genexpression dieser möglichen Kooperationspartner in *Eya3*-defizienten Embryonen gegenüber den Kontrollen ohne Mutation.



**Abbildung 3.9** RT-PCR für *Six1-6* sowie *Dachshund1-2* mit Gesamt-RNA aus Embryonen der Stadien E11.5 – E15.5. Die Ergebnisse der PCR-Analysen zeigten keinen Unterschied der Expression für die genannten Gene zwischen Kontrollen und *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren. Gewebe: ganzer Embryo (bis E11.5), Embryokopf (E13.5), halber Kopf (E15.5). (1,5 % Agarose-Gele, Marker VIII)

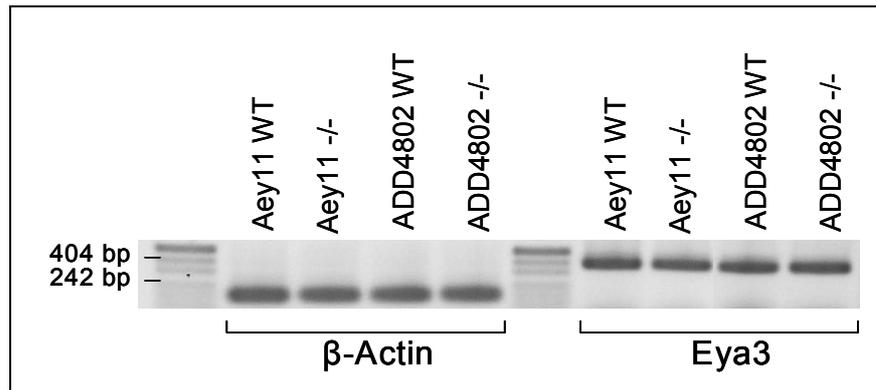
### 3.1.4 Untersuchungen zur Transkriptionsregulation von *Eya3*

#### 3.1.4.1 Analyse der *Eya3*-Expression in *Pax6*- und *Pitx3*-Mutanten

Die an der transkriptionellen Regulation von *Eya3* beteiligten Faktoren sind derzeit noch unbekannt. Da für die *Eya*-Gene der Vertebraten eine vergleichbare Funktion in der Augenentwicklung wie für *eyes absent* in *Drosophila* vermutet wird, ist eine vielfach diskutierte Möglichkeit die Beteiligung der *Eya*-Gene an einem regulatorischen Netzwerk, das – analog dem in *Drosophila* identifizierten retinalen Determinations-Netzwerk – die Expression der beteiligten Gene steuert. An der Spitze dieses Netzwerkes wird der Transkriptionsfaktor *Pax6* vermutet, welcher in den Vertebraten als „Master“-Kontrollgen der Augenentwicklung die Rolle der *Drosophila*-Gene *eyeless* und *twin of eyeless* in diesem Netzwerk übernehmen würde (Treisman, 1999; Jemc und Rebay, 2007). Demnach müsste *Pax6* die regulatorische Kontrolle über *Eya3* besitzen.

Zur Aufdeckung einer Regulation von *Eya3* durch *Pax6* wurde die *Eya3*-Expression in Embryonen der Linien *Aey11* und *ADD4802* überprüft. Beide Mauslinien sind durch eine Mutation im *Pax6*-Gen gekennzeichnet. Bei den *Aey11*-Mutanten liegt ein Basenaustausch (C→T) in Exon 8 vor, der zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons vor der Homeobox-Domäne und damit zu einem nicht funktionsfähigen Protein führt. In den *ADD4802*-Mutanten liegt ebenfalls ein Basenaustausch vor (G→A). Diese am Anfang von Intron 8 lokalisierte Punktmutation führt zu einem fehlerhaften Spleißen und einem vorzeitigen Translationsstop (Graw et al., 2005).

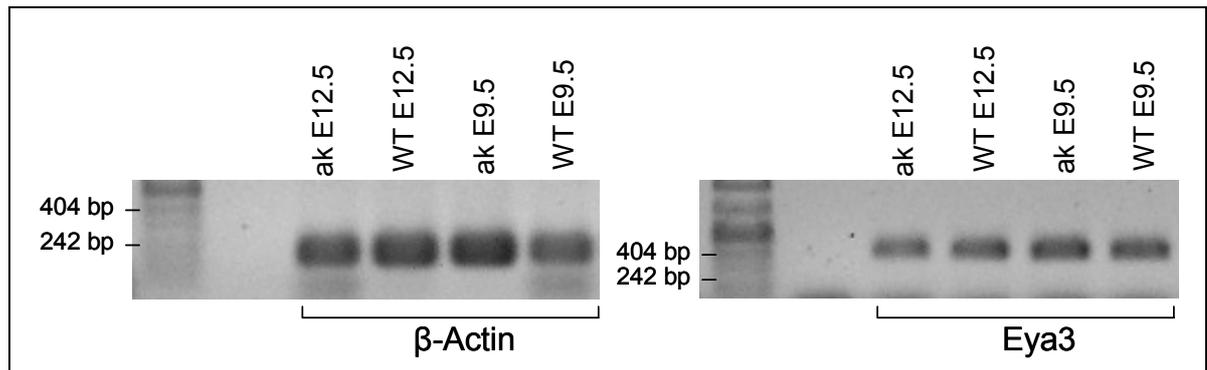
Obwohl die in den *Aey11*- bzw. *ADD4802*-Mutanten gebildeten *Pax6*-Proteine verkürzt sind, konnte in den homozygoten Embryonen mittels RT-PCR keine veränderte Expression von *Eya3* (Abb. 3.10) nachgewiesen werden, welche die Annahme einer direkten Regulation von *Eya3* durch *Pax6* bestätigen würde.



**Abbildung 3.10** RT-PCR für *Eya3*-Expression in Embryonen (E 12.5) der Mauslinien *Aey11* und *ADD4802*. Es sind keine Unterschiede in der Expression zwischen Wildtypen und homozygoten Mutanten zu erkennen. Gewebe: Embryokopf (E12.5). (1,5 % Agarose-Gele, Marker VIII)

Um die Auswirkung einer veränderten *Pax6*-Expression auf *Eya3*-Mutanten *in vivo* zu überprüfen, wurden durch Kreuzung von *Aey11*- und *Eya3*-Mäusen *Pax6/Eya3*-Doppelmutanten erzeugt. Die aus dieser Kreuzung erhaltenen Tiere wiesen neben dem für die *Aey11*-Mutante charakteristischen Phänotyp der verkleinerten Augen sowie Trübungen der Cornea keine zusätzlichen phänotypischen Merkmale auf, die auf eine regulatorische Abhängigkeit von *Eya3* gegenüber *Pax6* deuten könnten.

Da in der Augenentwicklung neben *Pax6* auch noch weitere Faktoren eine entscheidende Rolle spielen, wie z.B. der Transkriptionsfaktor *Pitx3*, wurde außerdem die Expression von *Eya3* in *aphakia*-Mäusen (Grimm et al., 1998) untersucht. Diese Tiere sind durch Deletionen in der Promotorregion des *Pitx3*-Gens gekennzeichnet, die zu einem Verlust der Genexpression führen. Eine Veränderung der Expression von *Eya3* durch einen Verlust von *Pitx3* konnte jedoch weder in Embryonen des Entwicklungsstadiums E9.5 noch in Embryonen des Alters E12.5 mittels RT-PCR festgestellt werden (Abb. 3.11). Eine Regulation von *Eya3* durch den Transkriptionsfaktor *Pitx3* erscheint folglich als unwahrscheinlich.



**Abbildung 3.11** RT-PCR auf Gesamt-RNA von Wildtyp-Embryonen und *aphakia*-Mutanten (Entwicklungsstadien: E9.5, E12.5). Embryonen, die für die *aphakia*-Mutation homozygot sind, weisen keine veränderte Expression von *Eya3* gegenüber dem Wildtyp auf. Gewebe: ganzer Embryo (E9.5), Embryokopf (E12.5) (1,5 % Agarose-Gele, Marker VIII)

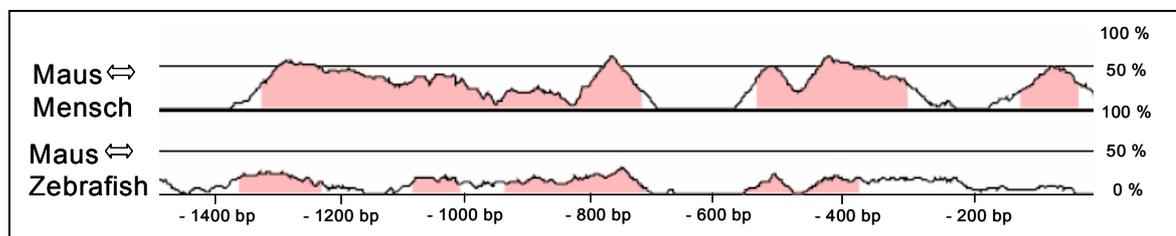
### 3.1.4.2 Untersuchungen am *Eya3*-Promotor

#### *In silico*-Analysen der Promotorregion

Parallel zu den schon angesprochenen Untersuchungen wurde die Möglichkeit einer Regulation von *Eya3* durch *Pax6* in einem Zellkulturtestsystem analysiert. Hierbei sollten unter anderem mögliche *Pax6*-Bindestellen in der *Eya3*-Promotorregion identifiziert und deren regulatorischer Einfluss *in vitro* überprüft werden. Zur Vorbereitung der praktischen Analysen wurde die *Eya3*-Promotorregion zunächst durch *in silico*-Methoden untersucht und in Abschnitte gegliedert. Die Definition der Abschnitte in der *Eya3*-Promotorregion erfolgte zum einen durch einen Interspezies-Vergleich mit der Software VISTA (visualization tool for alignment; Mayor et al. 2000), welche der Identifikation konservierter Sequenzabschnitte durch multiple Sequenzvergleiche dient, zum anderen durch die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen mit dem Programm MatInspector (Quandt et al., 1995).

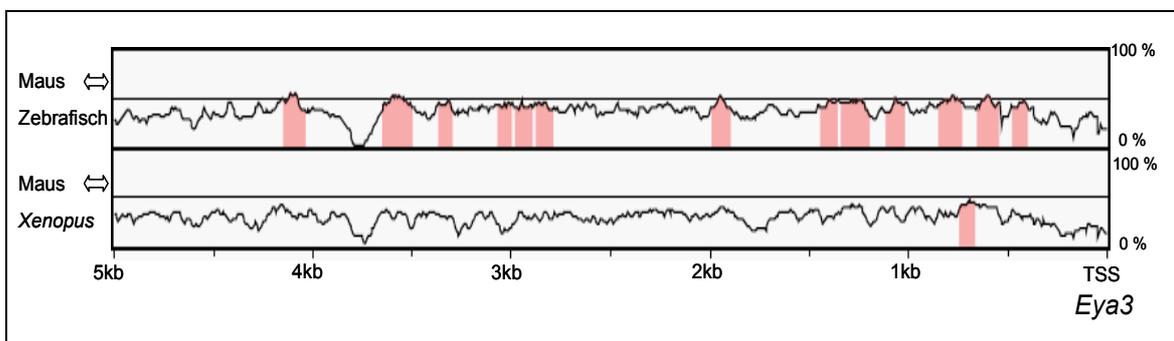
Für einen Sequenzvergleich zur Identifizierung konservierter und damit möglicherweise funktional bedeutsamer Abschnitte wurden die Sequenzen der phylogenetisch unterschiedlich weit voneinander entfernten Spezies Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Mensch (*Homo sapiens*) und Zebrafisch (*Danio rerio*) mit der Funktion mVISTA auf konservierte Bereiche untersucht. Als konservierte Regionen wurden dabei Abschnitte definiert, in denen jedes

Subsegment der Länge 100 bp mindestens 40 % Identität zur Basissequenz (Maus) aufwies. Eine Analyse unter Berücksichtigung der zur Maus vergleichsweise nah verwandten Ratte (phylogenetische Distanz ca. 25 Mio. Jahre) lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse, sondern erwies sich aufgrund des hohen Grades an Sequenzhomologie als untauglich. Deshalb wurden die Ergebnisse zum Sequenzvergleich zwischen Maus und Ratte nicht berücksichtigt. Dagegen konnten bei einer Analyse mit den Sequenzen der phylogenetisch weiter entfernten Spezies Mensch (80 Mio. Jahre) und Zebrafisch (über 400 Mio. Jahre) mehrere konservierte Abschnitte in der stromaufwärts vom *Eya3*-Gen gelegenen Sequenz identifiziert werden (Abbildung 3.12), die häufig eine vergleichbare Lage aufweisen und von funktionaler Bedeutung sein könnten. Auffällig ist zunächst ein ca. 150 bp großer konservierter Abschnitt zwischen den Sequenzen von Mensch und Maus unmittelbar vor dem Transkriptionsstart. Weiterhin ist eine große konservierte Region sowohl zwischen Mensch und Maus als auch zwischen Maus und Zebrafisch im Bereich von -550 bp bis -300 bp zu erkennen, die bei -510 bp und bei -420 bp die höchste Sequenzidentität aufweist. Ferner zeigt sich in beiden Vergleichen ein konservierter Abschnitt zwischen -920 bp und -700 bp vor dem Transkriptionsstart mit einem deutlichen „Gipfel“ bei -770 bp. Von Interesse ist außerdem ein langer konservierter Abschnitt zwischen -1350 bp und -970 bp in dem Vergleich zwischen Maus und Mensch, der sich im Vergleich zwischen Maus und Zebrafisch in zwei Abschnitten zwischen -1100 und -1000 bp sowie zwischen -1350 und -1250 bp widerspiegelt.



**Abbildung 3.12** Vergleich der Sequenzidentität zwischen Maus und Mensch sowie Maus und Zebrafisch mit dem Programm mVISTA (Parameter: 40 % Sequenzidentität, 100 bp Fensterlänge). Dargestellt ist der Bereich bis 1,5 kb vor dem Transkriptionsstart des *Eya3*-Gens. Es finden sich mehrere konservierte Abschnitte von unterschiedlicher Länge zwischen den Sequenzen, die einen Einfluss auf die Regulation des *Eya3*-Gens haben könnten.

Zusätzlich wurde ein 5 kb großer stromaufwärts vom *Eya3*-Transkriptionsstart gelegener Bereich aus dem Mausgenom mit den entsprechenden Regionen in Zebrafisch und *Xenopus* durch mVISTA verglichen. Dieses geschah insbesondere in Hinblick auf die zu beobachtenden Unterschiede in der Expression und Funktion von *Eya3* im Zebrafisch und *Xenopus* (Kapitel 3.3). Auffällig bei diesem Vergleich war, dass zwischen Maus und *Xenopus* deutlich weniger konservierte Sequenzabschnitte identifiziert werden konnten als zwischen Maus und Zebrafisch. Während zwischen Maus und Zebrafisch 13 nicht-kodierende konservierte Bereiche identifiziert werden konnten, die zusammen eine Länge von 1325 bp mit einer durchschnittlichen Sequenzidentität von 52,9 % hatten, war zwischen Maus und *Xenopus* lediglich eine konservierte Region mit einer Länge von 78 bp und 50 % Sequenzidentität zu entdecken (Abb. 3.13). Das Ergebnis dieser Analyse ist folglich ein Hinweis auf ein höheres Maß an Konservierung der Promotorregion zwischen Maus und Zebrafisch gegenüber Maus und *Xenopus*.



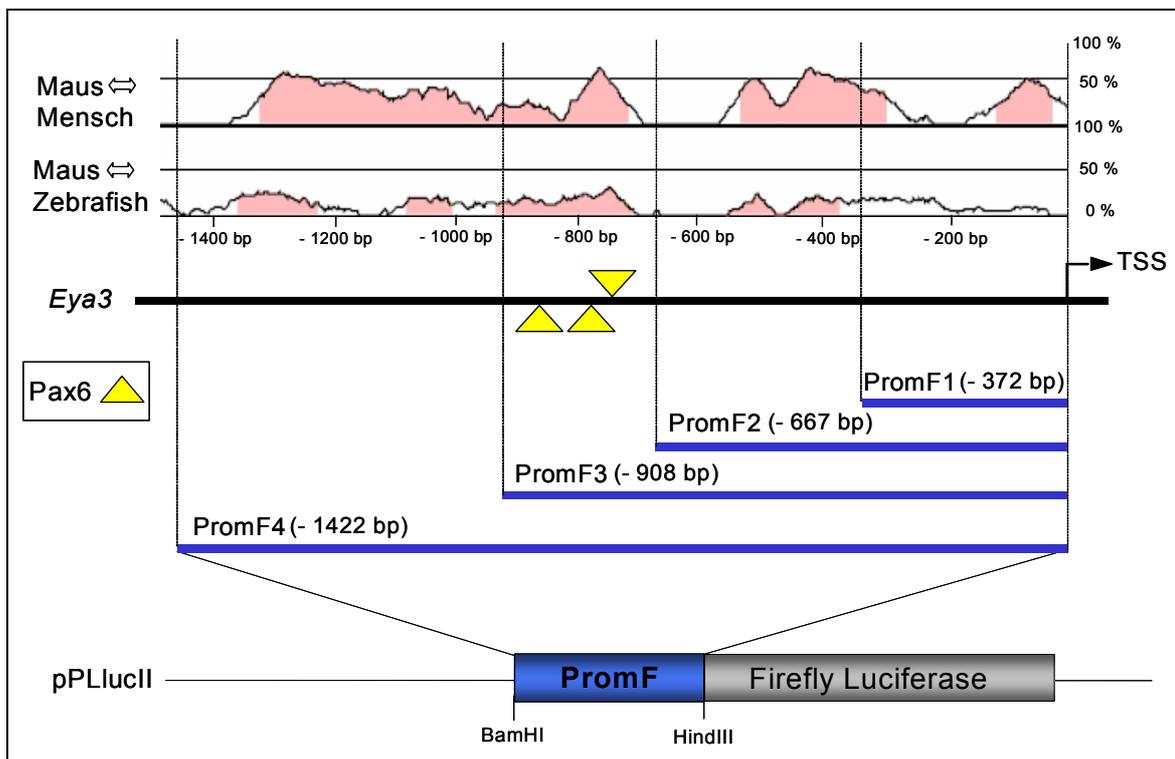
**Abbildung 3.13** Vergleich der *Eya3*-Promotorregion von Zebrafisch und *Xenopus* mit der Promotorregion der Maus durch mVISTA (5 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart). Zwischen Maus und Zebrafisch sind insgesamt 13 konservierte Abschnitte mit einer Gesamtlänge von 1325 bp erkennbar, während zwischen Maus und *Xenopus* nur 1 konservierter Abschnitt mit 78 bp Länge konserviert ist. (Parameter für den Vergleich: 50 % Sequenzidentität, 80 bp Fensterlänge)

Eine Untersuchung der *Eya3*-Promotorregion mit der Anwendung MatInspector konnte für die Gewebe Auge, Nervensystem und Herz eine Vielzahl von potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen identifizieren (Tab. 6.3 im Anhang). Hierbei konnte unter anderem die Existenz von drei *Pax6*-Bindestellen (-747 bp, -830 bp, -865 bp) vorhergesagt werden. Neben den *Pax6*-Bindestellen fanden sich aber auch eine Vielzahl weiterer Bindestellen (>150), z.B. für *Brn2*, *Nanog*, *Neurogenin*, *Nkx2.5*, *Pitx1* und *Sox5*. Da die in Kapitel 3.1.4.1 durchgeführten

Untersuchungen keine Hinweise auf eine Regulation von *Eya3* durch *Pax6* ergeben hatten, war die Vorhersage von drei *Pax6*-Bindestellen in der Promotorregion von besonderem Interesse.

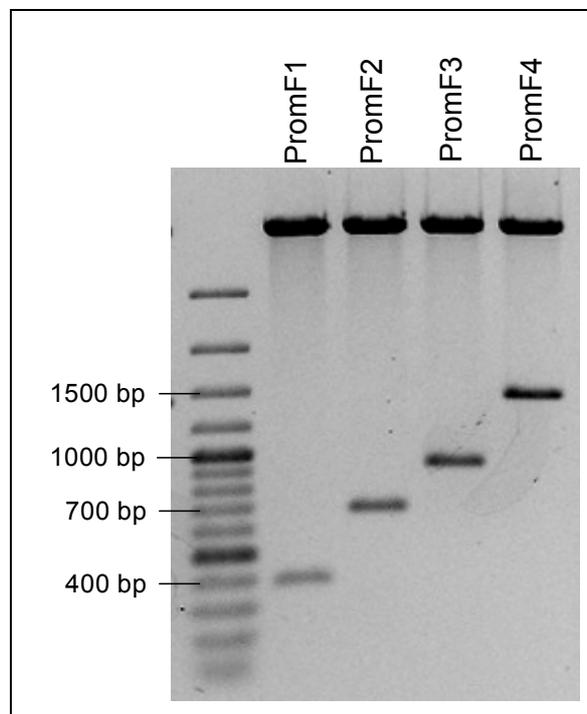
### Vorbereitung der *in vitro*-Arbeiten

Basierend auf den *in silico*-Analysen mit mVISTA und MatInspector wurde die *Eya3*-Promotorregion für die geplanten *in vitro*-Analysen in vier Fragmente eingeteilt. Das Promotorfragment (PromF1) mit der kürzesten Länge umfasste danach den Bereich von -372 bp bis zum Transkriptionsstart, die Fragmente PromF2 – PromF4 dehnten den analysierten Bereich in drei Schritten (-667 bp, -908 bp, -1422 bp) auf bis 1422 bp vor dem Transkriptionsstart aus (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14** Der obere Teil der Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der mVISTA-Analyse mit den Sequenzen von Maus, Mensch und Zebrafisch (Parameter: 100 bp Fensterlänge, 40 % Sequenzidentität). Der Sequenzvergleich offenbart mehrere größere konservierte Abschnitte (rot hinterlegter Bereich) im Vergleich zwischen Maus und Mensch bzw. im Vergleich zwischen Maus und Zebrafisch. Die x-Achse zeigt dabei die Basissequenz (bp) und die y-Achse die ermittelte Sequenzidentität (%). Die gelben Dreiecke symbolisieren die Lage der vorhergesagten *Pax6*-Bindestellen. Im unteren Teil der Abbildung sind die gewählten Längen der Promotorfragmente vor der Transkriptionsstartstelle (TSS) dargestellt sowie die Insertion der Fragmente in den Vektor pPLucII über die Schnittstellen BamHI und HindIII.

Die vier Fragmente wurden mit einer *Pfu*-DNA-Polymerase, die über eine 3'→5' Exonukleaseaktivität verfügt, aus muriner genomischer DNA amplifiziert, wobei die gewählten Primer über eine BamHI-Schnittstelle am 5'-Primer bzw. eine HindIII-Schnittstelle am 3'-Primer verfügten. Nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pCRII-TOPO erfolgte eine Sequenzierung mit der SP6-Polymerase bzw. T7-Polymerase und ein anschließender Restriktionsverdau (BamHI / HindIII) gefolgt von der gerichteten Ligation in den Vektor pLLucII. In diesem wurde die korrekte Insertion mittels eines erneuten Restriktionsverdaus überprüft (Abbildung 3.15).

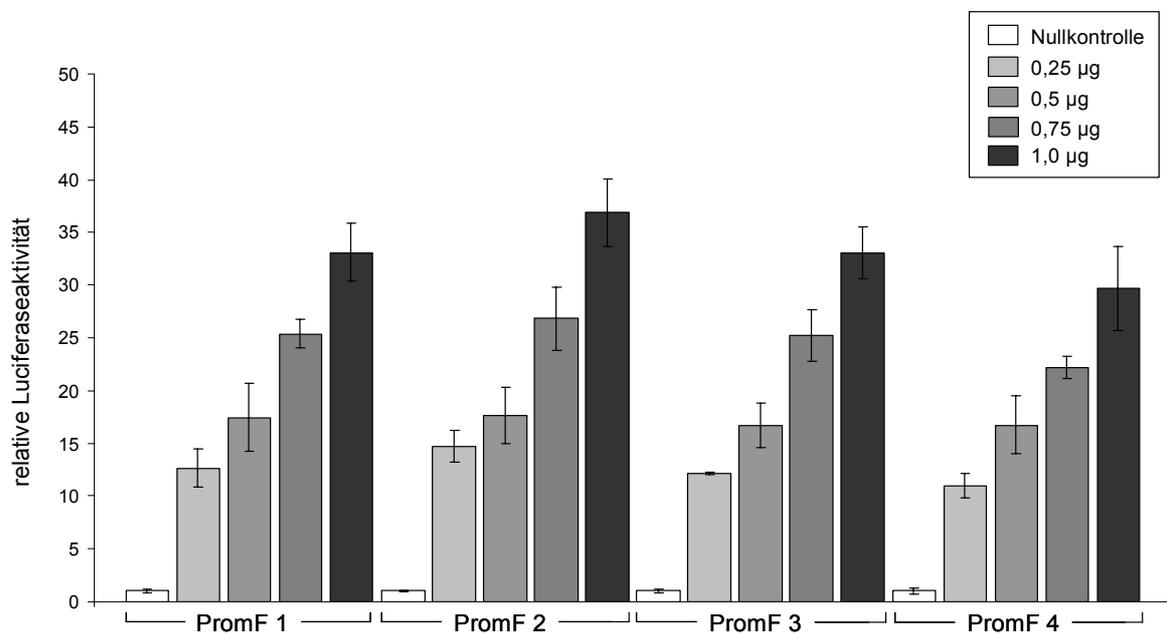


**Abbildung 3.15** Restriktionsverdau (BamHI / HindIII) für die in den Vektor pLLucII klonierten Promotorfragmente PromF1-4. (1 % Agarose-Gel, Marker: Gene Ruler 100 bp DNA-Leiter)

### ***In vitro*-Arbeiten im Zellkulturtestsystem**

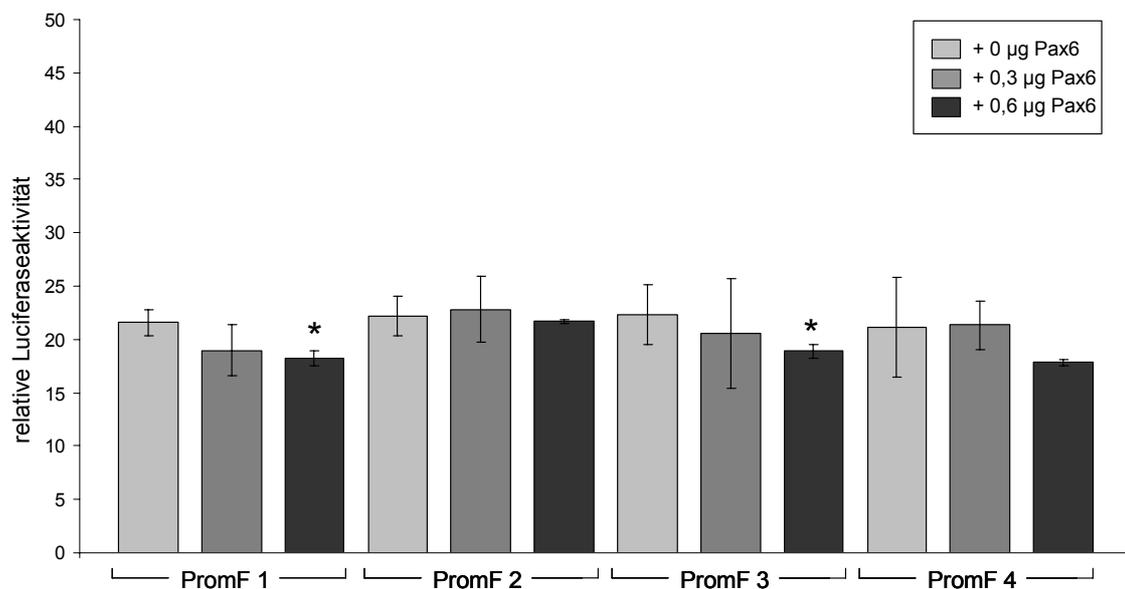
Der pLLucII-Vektor verfügt über eine Firefly-Luciferase-Kassette, die eine Messung der Promotoraktivität in einem Zellkulturtestsystem ermöglicht. Die klonierten Promotorfragmente PromF1-4 wurden dazu in die Zelllinie HEK293 transient transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 48 h (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) lysiert. Neben den Promotorkonstrukten wurde noch zusätzlich in jedem Ansatz der für die *Renilla*-Luciferase kodierende Vektor pRL-SV40 cotransfiziert, um die für die verschiedenen Transfektionsansätze gemessenen Werte der Firefly-

Luciferaseaktivität gegeneinander quantifizieren zu können. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte als kombinierte Detektion mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System in einem Luminometer. Zunächst wurden die Promotorfragmente ohne Zugabe von Transkriptionsfaktoren transfiziert und ihre Aktivität bestimmt, um zum einen die Funktionsfähigkeit der Konstrukte zu überprüfen und zum anderen erste Hinweise auf regulatorisch bedeutsame Abschnitte in der Promotorregion von *Eya3* zu erhalten. Neben den Reportervektoren mit Promotorfragment, die mit ansteigenden Konzentrationen von 0,25 µg bis 1 µg transfiziert wurden, wurde außerdem der leere pRLucII-Vektor als Nullkontrolle in die HEK293-Zellen eingebracht. Für alle Konstrukte wurde so die relative Luciferaseaktivität berechnet, immer bezogen auf die für den Reportervektor ohne Promotorfragment berechnete Aktivität. Für die vier Promotorfragmente konnte eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Zunahme der Reporteraktivität gegenüber der Nullkontrolle beobachtet werden. Bei jedem der vier Fragmente kam es bei einer steigenden Konzentration (0,25 – 1 µg / Ansatz) zu einem deutlichen Anstieg der Luciferaseaktivität (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16** Grafische Darstellung der in den HEK293-Zellen ermittelten relativen Luciferaseaktivität für die Promotorfragmente 1-4. Für die Fragmente konnte eine signifikante Zunahme der Aktivität gegenüber der Nullkontrolle beobachtet werden. Mit steigenden Konzentrationen (0,25 – 1 µg / Ansatz) kam es bei jedem der vier Fragmente zwischen 0,5 und 1 µg transfizierter DNA zu einem deutlichen Anstieg der Luciferaseaktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (n=6)

Die durch MatInspector getroffene Vorhersage von drei *Pax6*-Bindestellen in der *Eya3*-Promotorregion sowie die mögliche Existenz und Beteiligung von *Eya3* an einem regulatorischen Netzwerk mit *Pax6* an der Spitze gab Anlass, den Einfluss von *Pax6* auf die Promotorfragmente 1-4 zu untersuchen. Der Transkriptionsfaktor *Pax6* lag bereits kloniert im Expressionsvektor pcDNA3.1 vor und konnte zusammen mit den im Vektor pLluc11 vorliegenden Promotorfragmenten cotransfiziert werden. Weil die vorhergehenden Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit der klonierten Promotorfragmente (Abb. 3.16) gezeigt hatten, dass ab einer DNA-Menge von 0,5 µg die gemessene Aktivität im linearen Bereich lag, wurden in den folgenden Experimenten immer 0,5 µg Promotorfragment pro Ansatz eingesetzt. Die Menge an cotransfiziertem *Pax6* wurde hingegen variiert. Hier wurden ansteigende Konzentrationen von 0 bis 0,6 µg DNA pro Ansatz eingesetzt. Die aus den Messungen für die vier Promotorfragmente errechnete relative Luciferaseaktivität zeigte bei steigender *Pax6*-Konzentration in der Tendenz eine Abnahme gegenüber den ohne *Pax6* transfizierten Ansätzen (Abb. 3.17). Diese verlief bei Fragment 1 und dem *Pax6*-Bindestellen tragenden Fragment 3 kontinuierlich mit zunehmender Menge an *Pax6*. Dagegen zeigten die Fragmente 2 und 4 bei 0,3 µg cotransfizierter DNA

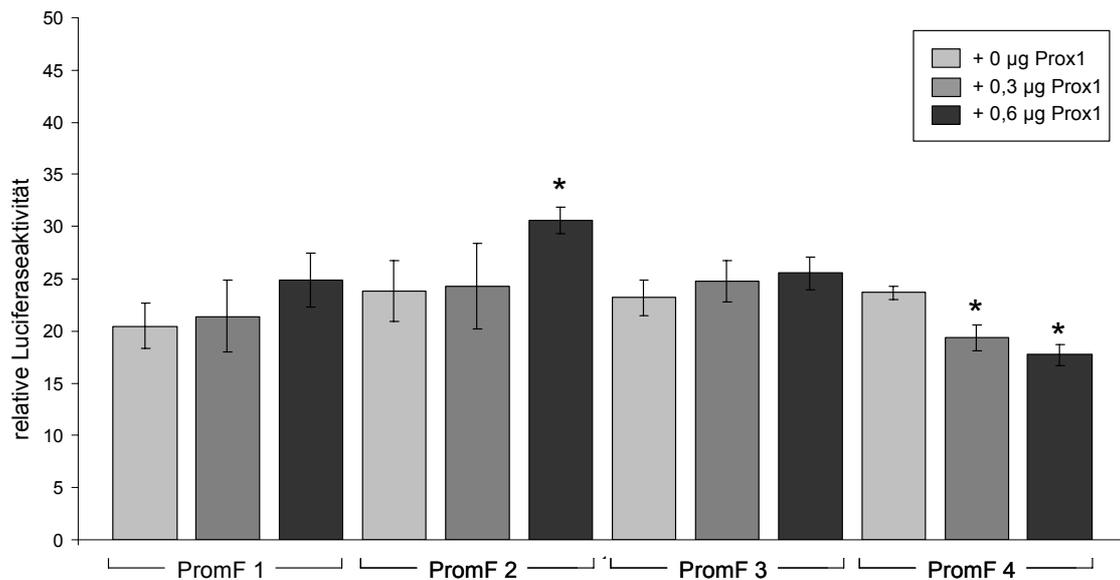


**Abbildung 3.17** Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Cotransfektionen der Promotorfragmente 1-4 (jeweils 0,5 µg) mit *Pax6* in pcDNA3.1 (von 0 – 0,6 µg). Bei allen Fragmenten kommt es bei Zugabe von *Pax6* in der Tendenz zu einer Abnahme der Aktivität, wobei die bei einer Zugabe von 0,6 µg *Pax6* gemessenen Werte für Fragment 1 und 3 signifikant sind ( $p=0.05$  bzw.  $p<0.05$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (n=4)

zunächst eine konstante Aktivität, bevor es mit 0,6 µg *Pax6* zu einer Aktivitätsverringering kam. Die bei einer Menge von 0,6 µg transfiziertem *Pax6* in allen Fragmenten festgestellte Abnahme der Aktivität erreichte bei Fragment 1 und Fragment 3 Signifikanz ( $p < 0.05$ ). Dieses ist insbesondere im Hinblick auf die im Fragment 3 vorhergesagten drei *Pax6*-Bindestellen von Interesse. Die vorliegenden Werte ergeben somit zumindest für eine Konzentration von 0,6 µg *Pax6* pro Ansatz die Möglichkeit, dass *Pax6* einen hemmenden Einfluss auf den *Eya3*-Promotor hat.

Da die regulatorischen Faktoren für *Eya3* bisher unbekannt sind, kamen neben *Pax6* noch weitere Transkriptionsfaktoren als potentiell regulierend in Betracht. Einer dieser Faktoren, der schon in frühen Entwicklungsstadien exprimiert wird, ist *Prox1*, das Homolog der Vertebraten zu *prospero* (*Drosophila*). Dabei führt die Fehlexpression von *prospero* in *Drosophila* zu einer anormalen Entwicklung des Auges (Tomarev et al., 1997).

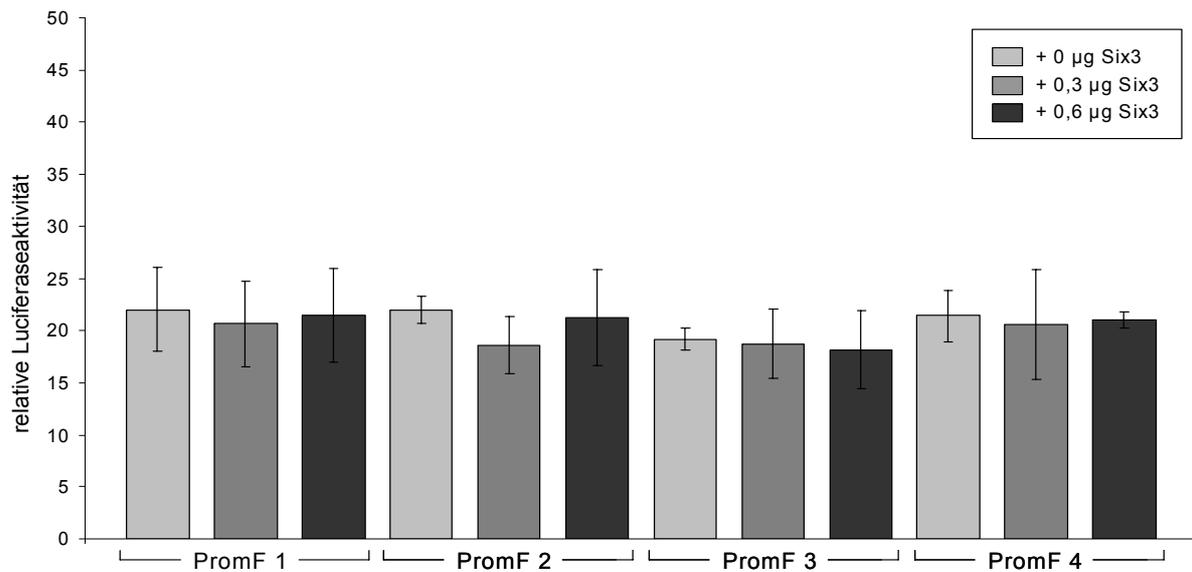
*Prox1* lag ebenfalls im Vektor pcDNA3.1 vor und wurde in ansteigenden Konzentrationen (0 – 0,6 µg) zusammen mit den vier *Eya3*-Promotorkonstrukten (0,5 µg) cotransfiziert. Für die relative Luciferaseaktivität konnte bei den Fragmenten 1-3 mit einer steigenden *Prox1*-Konzentration im Gegensatz zu der Cotransfektion von *Pax6* eine deutliche Zunahme der Aktivität beobachtet werden (Abb. 3.18). Die Zunahme der Aktivität fiel dabei für Fragment 1 und 2 bei Zugabe von 0,6 µg *Prox1* am höchsten aus (+ 25 % bzw. + 33 % bezogen auf den Null-Wert), wobei die Werte für Fragment 2 + 0,6 µg *Prox1* Signifikanz erreichten ( $p < 0.05$ ). Für das längere Fragment 3 wurde dagegen nur ein leichter Anstieg beobachtet, der mit  $p > 0.05$  nicht signifikant war. Für das längste Fragment 4 konnte dagegen mit ansteigender *Prox1*-Konzentration eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Abnahme der Aktivität verglichen mit dem Null-Wert (- 25 %) ermittelt werden. Insgesamt deuten die ermittelten Werte daraufhin, dass es mit zunehmender Länge der Promotorfragmente zu einer Verschiebung von Aktivierung zu Inhibierung kommt (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18** Grafische Darstellung der Ergebnisse der Cotransfektionen für die *Eya3* Promotorfragmente mit dem Transkriptionsfaktor *Prox1*. Bei den Fragmenten 1-3 kommt es mit zunehmender Menge an cotransfiziertem *Prox1* zu einem leichten Anstieg der Aktivität. Dagegen führt eine Zugabe von *Prox1* bei Fragment 4 zu einer Abnahme der Aktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (n=4)

Neben den bereits dargestellten Ergebnissen aus der Analyse mit *Pax6* und *Prox1* wurde auch noch *Six3* als Transkriptionsfaktor mit dem *Eya3*-Promotor getestet. Experimente zur möglichen Interaktion von *Eya3*- mit *Six3*-Proteinen konnten bereits zeigen, dass *Eya3* und *Six3* auf Proteinebene nicht miteinander interagieren (Ohto et al., 1999). Von Interesse war nun, ob *Six3* auch keinen Einfluss auf die Transkription von *Eya3* hat. Dazu wurde *Six3*, wie schon zuvor für *Pax6* und *Prox1* gezeigt, mit den verschiedenen Promotorfragmenten in HEK293-Zellen co-transfiziert und nachfolgend die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Die Co-Transfektion der Promotorfragmente mit *Six3* konnte keine eindeutige Steigerung oder Reprimierung der Promotoraktivität bewirken (Abb. 3.19). Bei allen vier Promotorfragmenten sind bei einer Co-Transfektion von 0,3 µg bzw. 0,6 µg *Six3* nur leichte Schwankungen der ermittelten relativen Luciferase-Aktivität gegenüber dem Null-Wert zu erkennen, die nicht signifikant sind. Berücksichtigt werden muss bei diesen Resultaten, dass aus technischen Gründen nur zwei Experimente möglich waren.

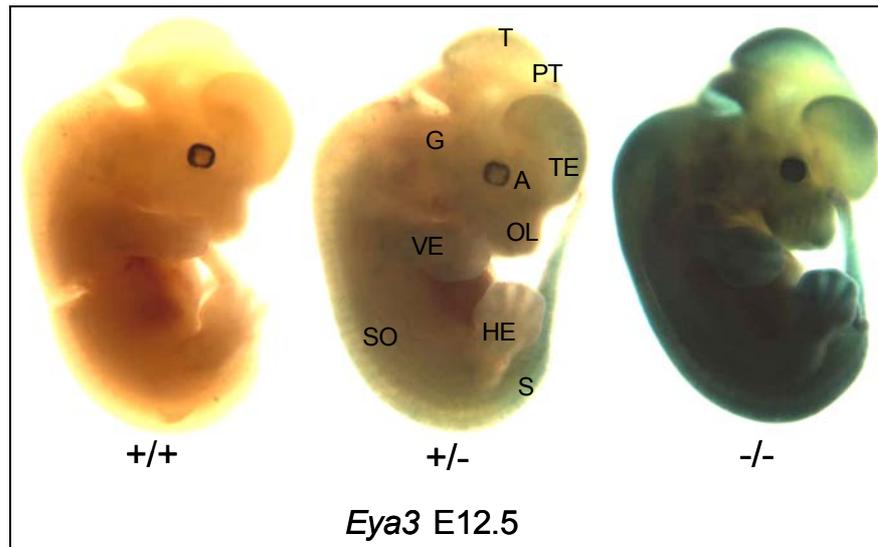


**Abbildung 3.19** Co-Transfektion der *Eya3*-Promotorfragmente mit *Six3*. Bei allen Promotorfragmenten kommt es bei Co-Transfektion von 0,3 µg und 0,6 µg *Six3* nur zu leichten, nicht signifikanten Veränderungen der Luciferase-Aktivität gegenüber dem Null-Wert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (n=2)

## 3.2 Analysen zur Funktion von *Eya3* in der Maus

### 3.2.1 Nachweis der Integration des pT1βgeo-Vektors über die Expression der *lacZ*-Kassette in den Mutanten

Um die erfolgreiche Integration und die Funktionalität der *lacZ*-Kassette zu überprüfen, wurden zu Beginn der Untersuchungen *Eya3*<sup>+/-</sup>-Verpaarungen gebildet und die daraus hervorgehenden Nachkommen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung präpariert. Anschließend wurden die Genotypen der Wurfgeschwister durch PCR (Kapitel 3.1.1) bestimmt und alle Tiere *lacZ*-gefärbt. Dabei zeigte sich, dass trotz gleicher Behandlung nur die Mutanten eine Färbung entwickelten (Abb. 3.20). Die Färbung bestätigte somit die auf molekularer Ebene schon nachgewiesene Integration des pT1βgeo-Vektors (Kapitel 3.1.1) und veranschaulichte zugleich die erfolgreiche Expression der *lacZ*-Kassette in den Mutanten.



**Abbildung 3.20** *LacZ*-Färbung von Embryonen (E12.5) mit unterschiedlichem Genotyp. Dargestellt sind drei Wurfgeschwister. Nur die Mutanten färben sich, der Wildtyp-Embryo bleibt ungefärbt. Die Färbung bestätigt die Integration des pT1 $\beta$ geo-Vektors in den Mutanten und verdeutlicht die Funktionalität der *lacZ*-Kassette.

Eine Untersuchung der präparierten und gefärbten Embryonen (Stadien E9.5 – E12.5) unter dem Binokular konnte keine sichtbaren morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp-Embryonen und Mutanten offenbaren. Parameter wie Körpergröße, Kopfform oder Länge der zukünftigen Extremitäten waren in den Mutanten unverändert. Auch die Anlagen der Augen und Ohren waren erkennbar vorhanden und ließen keine morphologischen Unterschiede erkennen (Abb. 3.20).

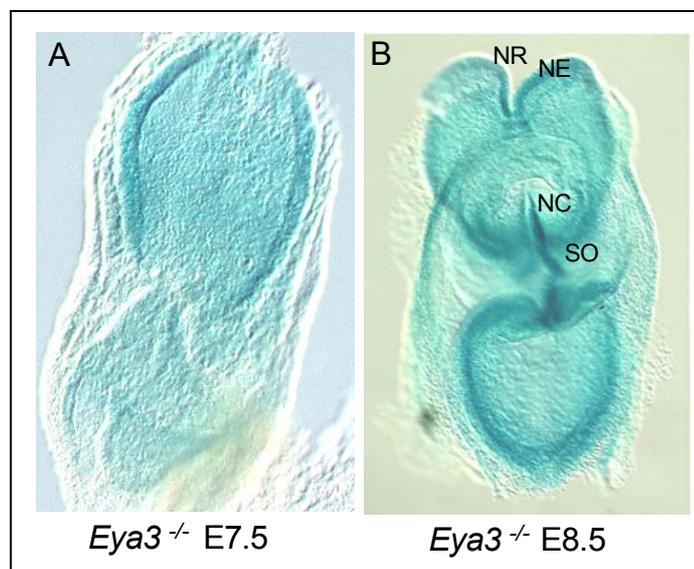
### 3.2.2 Bestimmung des Expressionsprofils von *Eya3* in der Maus

#### 3.2.2.1 Embryonale Expression

Um die möglichen Aufgaben von *Eya3* näher eingrenzen zu können, kam der Aufklärung der Expression im sich entwickelnden und adulten Organismus eine zentrale Bedeutung zu. Da der Literatur nur wenige Informationen hinsichtlich des genauen Expressionsprofils von *Eya3* in der Maus zu entnehmen waren, wurde dieses anhand von Expressionsstudien mit verschiedenen Nachweismethoden (*in situ*-Hybridisierung, *lacZ*-Färbung und RT-PCR) in Wildtyp und Mutante ermittelt. Die *in situ*-Hybridisierung wurde in den Wildtypen zur Erstellung des Expressionsprofils genutzt. Da in den Mutanten Fusionstranskripte aus den ersten Exons von *Eya3* und der *lacZ*-Kassette des pT1 $\beta$ geo-Vektors gebildet

werden, konnte hier mit der *lacZ*-Färbung eine weitere Methode zur Bestätigung der in den Wildtypen durch *in situ*-Hybridisierung erhaltenen Ergebnisse genutzt werden.

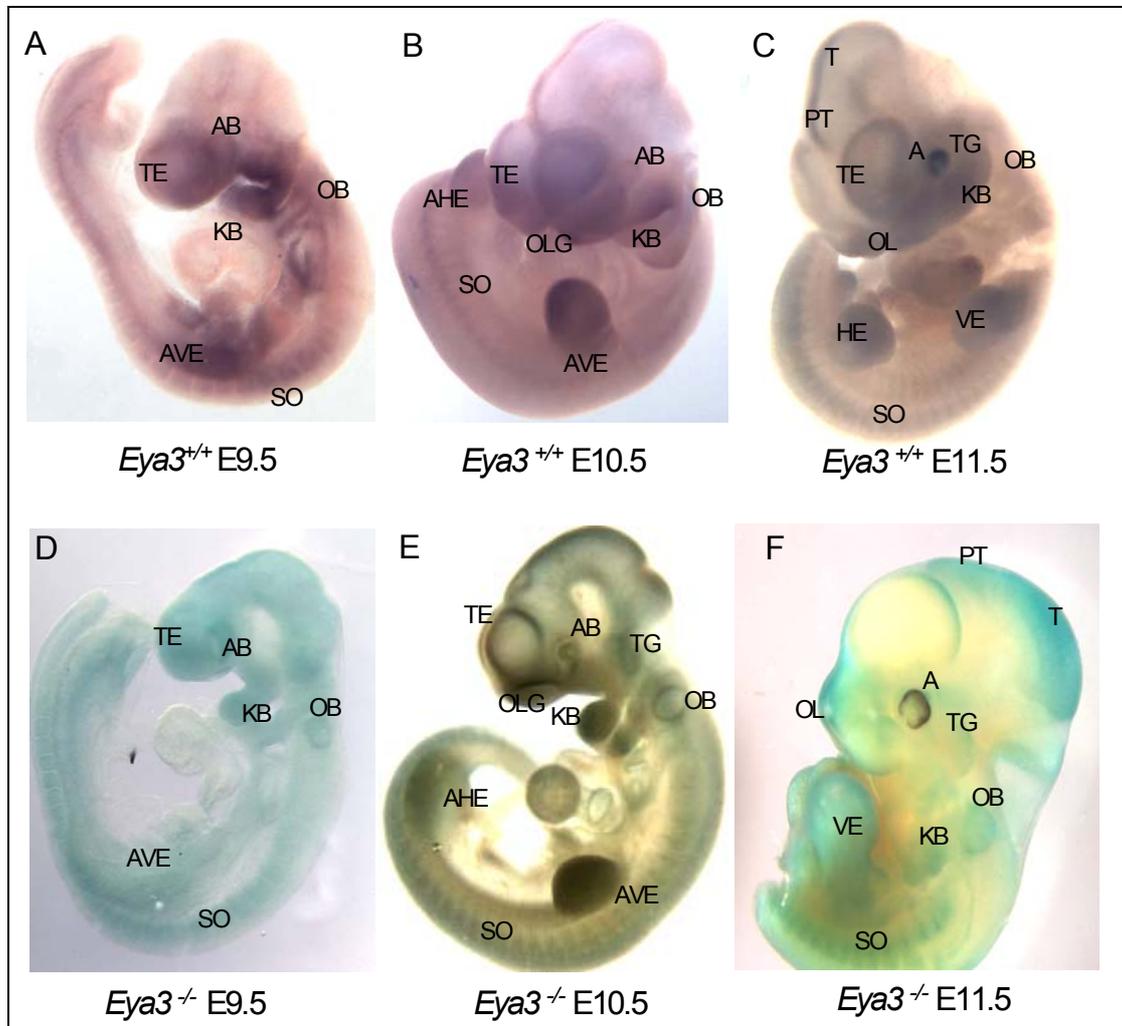
Für die Bestimmung des Expressionsprofils in der Maus während der frühen Neurulation wurden zunächst die Stadien E7.5 bis E8.5 untersucht. Da zwischen Wildtyp-Embryonen und Mutanten keine morphologischen Unterschiede zu erkennen waren und die Gefahr eines unerwünschten Hintergrundes bei der *in situ*-Hybridisierung in diesen Entwicklungsstadien sehr hoch ist, wurde für diese beiden Stadien das Expressionsprofil von *Eya3* nur anhand der *lacZ*-Färbung in den Mutanten ermittelt. Es zeigte sich, dass *Eya3* im Stadium E7.5, in dem zunächst die Neuralplatte ausgebildet wird, ubiquitär exprimiert ist. Die ubiquitäre Expression bestand während der späteren Neurulation und der Drehbewegung des Embryos im Stadium E8.5 fort (Abb. 3.21 A, B). Erst mit Beginn des Stadiums E9.5, wenn sich die einzelnen neuronalen Strukturen ausdifferenzieren beginnen, kommt es zu einer spezifischen Expression von *Eya3* (Abb. 3.22).



**Abbildung 3.21** Expressionsanalyse für *Eya3* mittels *lacZ*-Färbung in den Embryonalstadien E7.5 – E8.5 in der Maus. In beiden Stadien findet sich eine ubiquitäre Expression im ganzen Embryo, die erst ab dem Stadium E9.5 (Abb. 3.22) zu einer spezifischen Expression im Vorderhirn, dem Augenbläschen, den Kiemenbögen und den Somiten übergeht. (NC, Notochord; NE, Neuroepithelium; NR, Neuralrohr; SO, Somiten)

Für die folgenden Stadien wurde die Expression von *Eya3* sowohl durch *in situ*-Hybridisierung als auch durch *lacZ*-Färbung ermittelt. Für das Stadium E9.5 zeigte sich, dass *Eya3* unter anderem in den sich entwickelnden neuronalen

Gewebe exprimiert wird. Eine deutliche Expression fand sich im Neuroepithel des Telencephalon, im Augenbläschen und im otischen Vesikel sowie in den Anlagen der späteren Sinnesorgane Auge und Ohr (Abbildung 3.22 A, D).



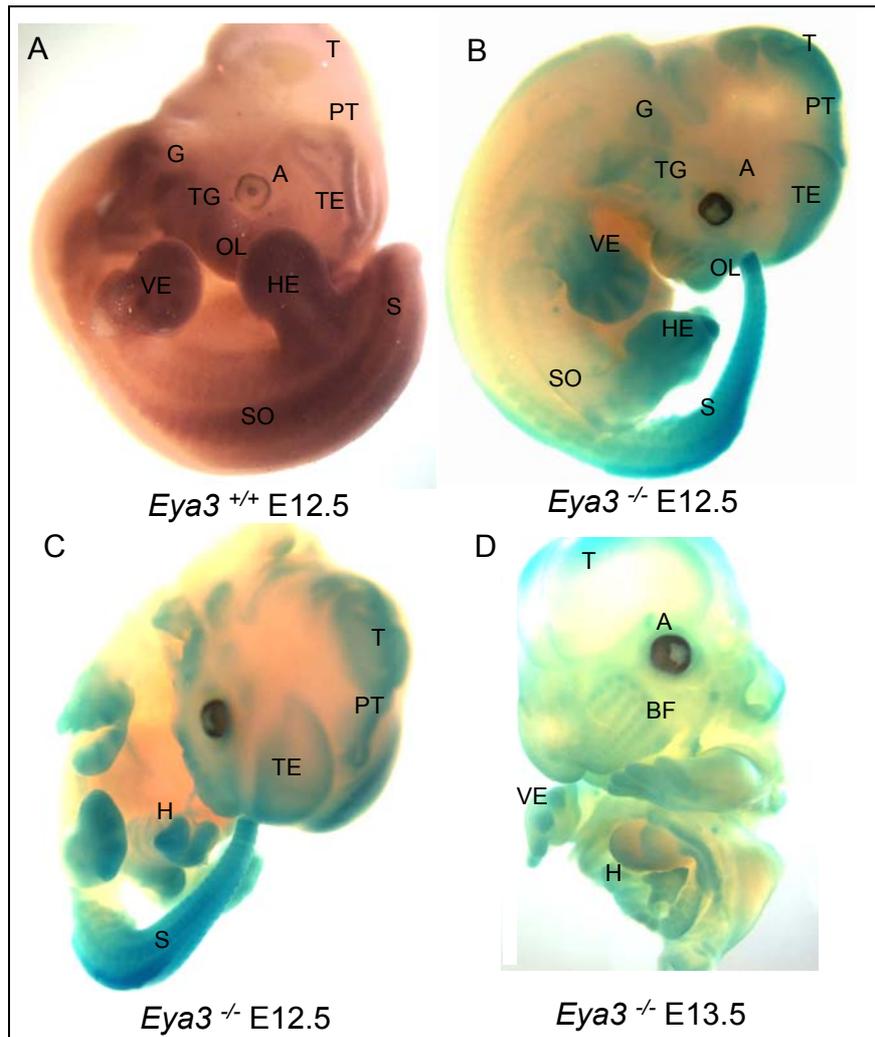
**Abbildung 3.22** Gezeigt ist eine Expressionsanalyse für *Eya3* in den Entwicklungsstadien E9.5 – E11.5 mittels *in situ*-Hybridisierung in Wildtypen (A - C) und *lacZ*-Färbung in Mutanten (D - F). Die Abbildungen (A, D) für das Stadium E9.5 zeigen eine Aktivität von *Eya3* in neuronalen Geweben, wie dem Telencephalon und den Anlagen der späteren Sinnesorgane Auge und Ohr. Außerdem finden sich Transkripte in den Somiten, den Anlagen der Vorderextremitäten und den Kiemenbögen. Für das Stadium E10.5 konnte neben der Expression von *Eya3* im Vorderhirn auch eine beginnende leichte Expression in prätektoralen und tektorialen Bereichen des Gehirns ermittelt werden. Überdies waren Transkripte in den Somiten, im ersten und zweiten Kiemenbogen, im Bereich der olfaktorischen Grube und dem Trigeminus sowie in den Anlagen der vorderen und hinteren Extremitäten sichtbar (B, E). Im Embryonalstadium E11.5 finden sich Transkripte in prätektoralen und tektorialen Regionen des Gehirns, ebenso wie in den sich bildenden Gliedmaßen, den Somiten, der olfaktorischen Region, dem Auge, dem Ohrbläschen und in den Kiemenbögen. (C, F) (A, Auge; AB, Augenbläschen; AHE, Anlage der hinteren Extremitäten; AVE, Anlage der Vorderextremitäten; HE, Hinterextremitäten; KB, Kiemenbögen; OL, olfaktorische Region; OLG, olfaktorische Grube; OB, otisches Bläschen bzw. Ohrbläschen; PT, Prätektum; SO, Somiten; T, Tektum; TE, Telencephalon; TG, trigeminaler Nerv; VE, Vorderextremitäten)

Ferner war eine Expression von *Eya3* im Stadium E9.5 in den Somiten, in der mandibularen und maxillaren Region des ersten Kiemenbogens sowie in den Anlagen der späteren Vorderextremitäten nachweisbar (Abb. 3.22 A, D).

Die Expression von *Eya3* im Telencephalon war auch im Stadium E10.5 noch gut sichtbar, darüber hinaus fanden sich aber auch erste Hinweise einer Transkription in den prätektorialen und tektorialen Bereichen des späteren Gehirns. Weiterhin war nun eine Expression in der die Riechgrube umgebenden olfaktorischen Region zu erkennen. Ebenfalls fanden sich Transkripte in den Anlagen der vorderen und hinteren Extremitäten, im Trigemini sowie im ersten und zweiten Kiemenbogen. Die Expression im ersten Kiemenbogen beschränkte sich in diesem Stadium überwiegend auf den mandibularen Bereich (Abb. 3.22 B, E).

Im Embryonalstadium E11.5 fanden sich *Eya3*-Transkripte in den prätektorialen und tektorialen Regionen des Gehirns, ebenso wie in den sich bildenden Gliedmaßen, den Somiten, der olfaktorischen Region, dem Auge, dem Ohrbläschen und in den Kiemenbögen (Abb. 3.22 C, F). Eine Expression im Telencephalon war in diesem Stadium vor allem in den Wildtypen gut zu erkennen. Dagegen war die *lacZ*-Färbung im Telencephalon der Mutanten in diesem Stadium nur schwach ausgeprägt.

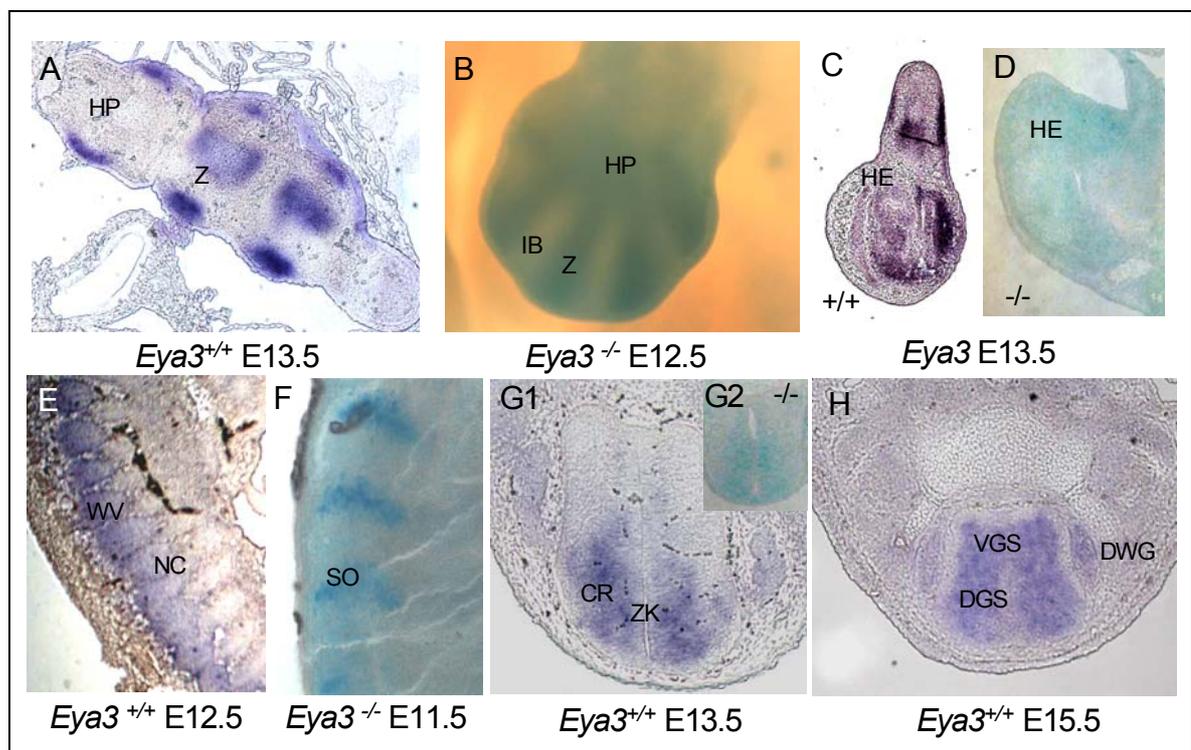
Später, im Stadium E12.5, fand sich eine deutliche Expression im Telencephalon. Außerdem wurde *Eya3* weiterhin in den tektorialen und prätektorialen Arealen des Gehirns exprimiert. Ferner waren Transkripte in den vorderen und hinteren Extremitäten, in den Somiten, im Bereich um die olfaktorische Grube, im Herz, im otischen Bläschen und im Schwanz zu finden (Abbildung 3.23 A – C). Im Stadium E13.5 zeigte sich anhand der *lacZ*-Färbung eine Expression im Tektum und im Herz sowie in den Vorderextremitäten und in den Barthhaarfollikeln (Abb. 3.23 D). Eine Ermittlung der Expression mittels *in situ*-Hybridisierung bei ganzen Embryonen war in diesem Stadium aufgrund der hohen Gewebedichte nicht mehr möglich.



**Abbildung 3.23** Darstellung der Expression von *Eya3* während der Stadien E12.5 und E13.5 mittels *in situ*-Hybridisierung und *lacZ*-Färbung. Im Stadium E12.5 finden sich *Eya3*-Transkripte im Bereich des Telencephalon, des trigeminalen Nervs und in tektorialen und prätektorialen Regionen. Gut zu erkennen ist hier außerdem eine Expression in den Extremitäten und in den Somiten (A). Die *lacZ*-Färbung in den Mutanten kommt zu vergleichbaren Ergebnissen für dieses Stadium (B). Außerdem ist eine Expression im sich ausbildenden Herz gut zu erkennen (C). In Embryonen des Entwicklungsstadiums E13.5 kann anhand der *lacZ*-Färbung in *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren eine Expression in den Gliedmaßen, im Herz, im Auge, im Tektum sowie in den Barthaarfollikeln beobachtet werden (D). (A, Auge; BF, Barthaarfollikel; G, Gehör; H, Herz; HE, Hinterextremitäten; OL, Olfaktorischer Bereich; PT, Prätektum; S, Schwanz; SO, Somiten; T, Tektum; TE, Telencephalon; TG, Trigemini; VE, Vorderextremitäten)

Während der Entwicklung fiel insbesondere die Expression von *Eya3* in den Geweben der Extremitäten, der zukünftigen Wirbelsäule sowie im sich ausbildenden Gehirn und den Augen auf. In den Extremitäten erstreckte sich die Expression von *Eya3* sowohl auf proximale als auch auf distale Bereiche, aus denen sich die spätere Handplatte entwickelt. Bei der Ausbildung der Handplatte im Zeitraum zwischen E12.0 und E13.0 war deutlich zu beobachten, dass die Expression auf die sich entwickelnden Zehen selbst beschränkt ist. Dieses zeigte

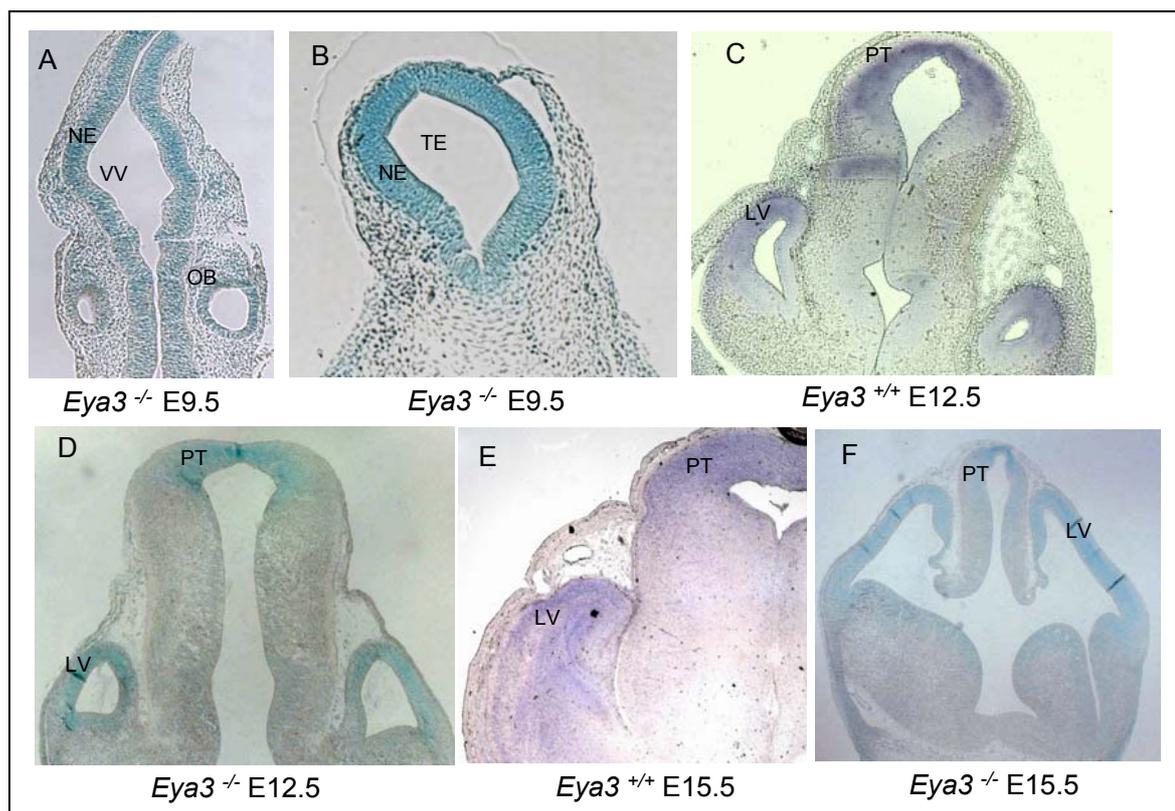
sowohl eine *in situ*-Hybridisierung mit Gewebeschnitten von Wildtyp-Embryonen als auch die *lacZ*-Färbung mit Gewebe von *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen (Abb. 3.24 A, B). *Eya3* wird somit nicht in den intermediären Bereichen der Handplatte exprimiert, die nachfolgend apoptotischen Prozessen unterworfen sind und damit die Bildung der Zehen ermöglichen. Die Expression von *Eya3* während der embryonalen Entwicklung in den Extremitäten war auch in späteren Stadien noch sichtbar, wie Gewebeschnitte des Stadiums E13.5 veranschaulichen konnten (vgl. Abb. 3.24 C und D).



**Abbildung 3.24** Analyse der *Eya3*-Expression in den Extremitäten und der sich entwickelnden Wirbelsäule durch *in situ*-Hybridisierung und *lacZ*-Färbung. Die Expression in den Extremitäten erfasst sowohl distale als auch proximale Bereiche und ist in der sich bildenden Handplatte auf die Bereiche der späteren Zehen beschränkt. Die dazwischen liegenden intermediären Bereiche weisen dagegen keine *Eya3*-Transkripte auf (A, B). Deutlich ist auch eine Expression in den hinteren Extremitäten zu erkennen (C, D) und in der sich bildenden Wirbelsäule (E, F). Sagittale Gewebeschnitte verdeutlichen die Expression in den Wirbelvorläufern. Eine Expression in der sich ausbildenden Wirbelsäule zeigt sich auch bei transversalen Schnitten. Zum einen in der den Zentralkanal umgebenden cervikalen Region im Stadium E13.5 von Wildtyp (G1) und Mutante (G2), zum anderen in der ventralen und dorsalen grauen Substanz des Rückenmarks im Stadium E15.5. (CR cervikale Region; DGS, dorsale graue Substanz; DIST, distaler Bereich der späteren Vorderextremitäten; DWG, Dorsalwurzelganglien; HE, hintere Extremitäten; HP, Handplatte; IB, intermediärer Bereich; NC, Notochord; PROX, proximaler Bereich der späteren Vorderextremitäten; SO, Somiten; VE, Vorderextremitäten; VGS ventrale graue Substanz; WV, Wirbelvorläufer; Z, Zehen; ZK, Zentralkanal)

Weiterhin auffällig war eine Expression von *Eya3* in der sich bildenden Wirbelsäule. Schon in den frühen embryonalen Entwicklungsstadien findet sich eine Expression in den Somiten (Abb. 3.24 E, F), die später die Wirbelkörper und die Körpermuskulatur bilden. Eine Expression in den Wirbelvorläufern zeigte sich in den Stadien E12.5 – E15.5 in der cervicalen den Zentralkanal umgebenden Region (E13.5) und im Vorder- und Hinterhorn des Rückenmarks im Stadium E15.5. In den Dorsalwurzelganglien konnte ebenfalls eine schwache Expression sichtbar gemacht werden (Abb. 3.24 G – H).

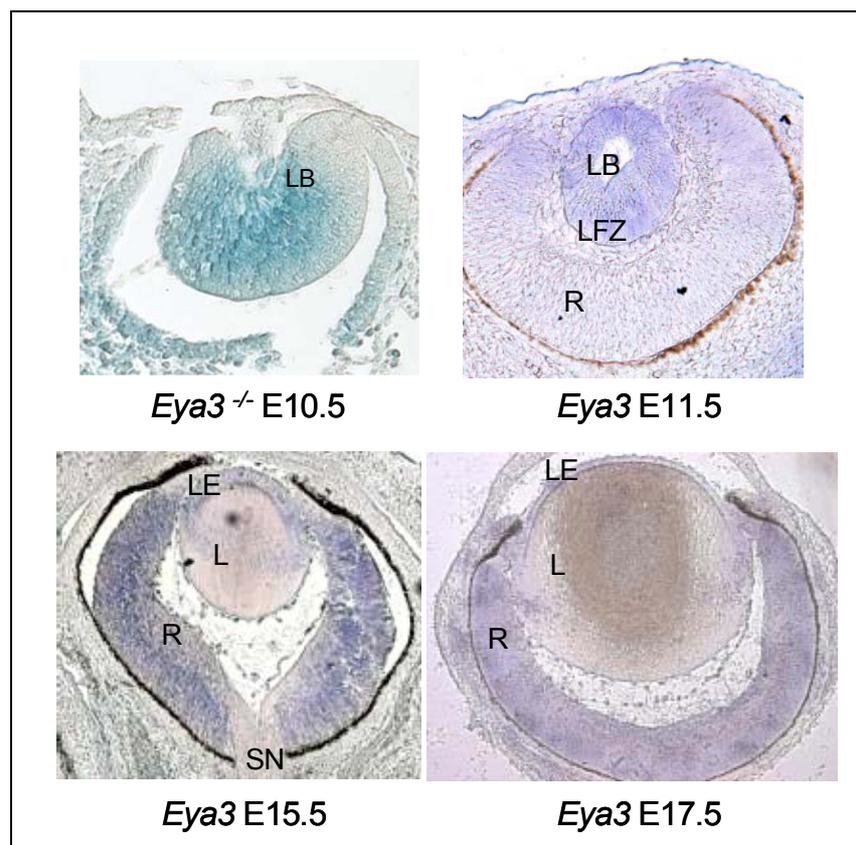
Neben der Expression von *Eya3* in den Extremitäten und in der sich ausbildenden Wirbelsäule waren auch Transkripte in den neuronalen Geweben des späteren Gehirns auffällig. Die schon in ganzen Embryonen während des frühen Stadiums E9.5 festgestellte Expression im Vorderhirn konnte auch in späteren Stadien auf Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Abb. 3.25). Hier zeigte sich eine



**Abbildung 3.25** Gewebeschnitte zur Veranschaulichung der Expression von *Eya3* in neuronalen Geweben. Im Gehirn kann schon in frühen Stadien (ab E9.5) eine Expression im Neuroepithel des Telencephalon sowie im Epithel des vierten Ventrikels beobachtet werden (A, B). Eine Expression im Epithel des Ohrbläschens ist ebenso sichtbar (A). In späteren Stadien (ab E 12.5) findet sich insbesondere eine Expression von *Eya3* in tektorialen Bereichen, aber auch in den lateralen Ventrikeln des Vorderhirns (C, D), die auch noch im Stadium E15.5 zu beobachten ist. (LV, laterale Ventrikel des Vorderhirn; PT, Prätektum; NE, Neuroepithel; OB, Ohrbläschen; TE, Telencephalon; VV, vierter Hirnventrikel)

Expression von *Eya3* im Neuroepithel des vierten Hirnventrikels sowie des Telencephalon (Abb. 3.25 A, B). Im Stadium E12.5 findet sich sowohl eine durch *in situ*-Hybridisierung als auch durch *lacZ*-Färbung nachweisbare Expression im Epithelium der lateralen Ventrikel des Telencephalon. Ferner kann die schon an ganzen Embryonen gezeigte Expression in den tektorialen Bereichen des Cortex beobachtet werden (Abb. 3.25 C, D). Diese Expression bestand auch im Stadium E15.5 noch fort (Abb. 3.25 E, F).

Weiterhin fiel im Rahmen der Expressionsanalysen die Anwesenheit von *Eya3*-Transkripten im Auge auf. Schon im Stadium E9.5 war eine Expression von *Eya3* im Augenbläschen des sich entwickelnden Embryos zu erkennen. Die Expression setzte sich im Stadium E10.5, in dem sich das Linsenbläschen vom Oberflächenektoderm ablöst, fort und konnte auch noch schwach in den primären Linsenfasern im Stadium E11.5 gezeigt werden (Abb. 3.26).



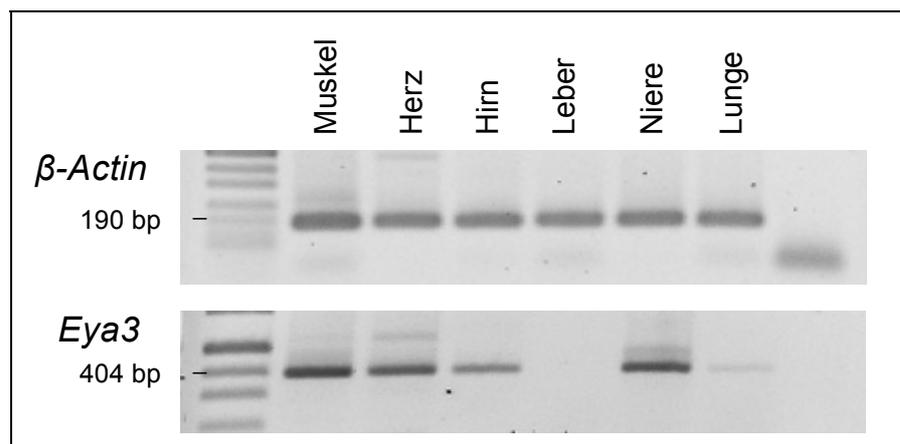
**Abbildung 3.26** Expression von *Eya3* in verschiedenen Stadien des sich entwickelnden Auges. Im Stadium E10.5 ist mittels *lacZ*-Färbung eine deutliche Färbung des Linsenbläschens zu erkennen gewesen. Durch *in situ*-Hybridisierung konnte im Stadium E11.5 eine leichte Expression in den primären Linsenfasern gezeigt werden. In den Stadien E15.5 - E17.5 war eine Expression von *Eya3* in der Retina sowie im Linsenepithel zu erkennen, nicht jedoch in der Linse selbst und im Sehnerv. (L, Linse; LB, Linsenbläschen; LE, Linsenepithel; LFZ, primäre Linsenfasern; R, Retina; SN, Sehnerv)

Im Stadium E12.5 war eine Expression von *Eya3* im Auge nicht zu erkennen. Ab dem Stadium E13.5 konnte eine leichte Expression von *Eya3* in der Retina beobachtet werden, die sich bis zum Stadium E17.5 fortsetzte. Darüber hinaus war eine Transkription von *Eya3* im Linsenepithel ab dem Stadium E15.5 sichtbar (Abb. 3.26). In der Linse selbst sowie im Sehnerv waren in diesen Stadien keine *Eya3*-Transkripte nachweisbar.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Expressionsanalysen ein breites Expressionsprofil für *Eya3* während der embryonalen Entwicklung, dass Schwerpunkte in den sich ausbildenden neuronalen Strukturen und Sinnesorganen sowie in den Anlagen der Extremitäten und der Wirbelsäule erkennen lässt.

### 3.2.2.2 Expression von *Eya3* im adulten Organismus

Das Expressionsprofil von *Eya3* im adulten Organismus wurde mittels RT-PCR bestimmt. Dabei konnten in verschiedenen Organen und Geweben *Eya3*-Transkripte nachgewiesen werden. So fanden sich Transkripte im Gehirn, im Herz, im Skelettmuskel, in der Niere und in geringem Maße in der Lunge. Dagegen konnte keine Expression von *Eya3* in der Leber aufgezeigt werden (Abb. 3.27).



**Abbildung 3.27** Analyse der Expression von *Eya3* in adultem Mausgewebe mittels RT-PCR. Transkripte konnten in verschiedenen Organen und Gewebe nachgewiesen werden, so z.B. im Skelettmuskel, im Herz, im Gehirn, in der Niere und in der Lunge. In der Leber waren dagegen keine *Eya3* Transkripte zu finden.

### 3.2.3 Untersuchungen zur Charakterisierung der *Eya3*-Mutante

Dem durch die Expressionsanalysen (Kapitel 3.2.2) erhaltenen Expressionsprofil von *Eya3* kam bei den weiteren Studien zur Aufklärung der Funktion eine wichtige Bedeutung zu, um mögliche phänotypische Veränderungen in den Mausmutanten identifizieren zu können. Es ist denkbar, dass *Eya3* im Zuge der Evolution neben der analog zu *Drosophila* vermuteten Funktion in der Augenentwicklung auch andere Aufgaben übernommen hat. Das komplexe Expressionsmuster von *Eya3* lässt hierfür eine ganze Reihe von möglichen Funktionen in Betracht kommen, die ohne weitergehende Analysen des Phänotyps spekulativ bleiben.

#### 3.2.3.1 Vorbereitung der Studien in der Deutschen Mauslinik

Im Rahmen einer Kollaboration mit der Deutschen Mauslinik (*German Mouse Clinic, GMC*) wurden die *Eya3*-Mutanten dort intensiv untersucht, wobei ein breites Spektrum von phänotypisierenden Methoden zur Anwendung kam (Gailus-Durner et al., 2005). In den Testverfahren wurde, um nur einige Beispiele zu nennen, das Verhalten, die Hörfunktion, die Stoffwechselfunktion, das Herzkreislaufsystem und die Muskelfunktion untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen für *Eya3* in der Deutschen Mauslinik sind im Anhang dargestellt (Kapitel 6.2).

Zur Vorbereitung der Studien im GMC war es notwendig, die Zahl der Zuchttiere stark zu erhöhen, um die erforderliche Zahl von gleichaltrigen Kontrollen und homozygoten Mutanten bereitstellen zu können. Eine Analyse von 150 Nachfahren aus heterozygoten Zuchtverpaarungen für das GMC ergab, dass 76 Tiere männlich (50,5 %) und 74 Tiere weiblich (49,5 %) waren, bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 5,2 Tieren. Die Verteilung der Genotypen dieser Tiere spiegelte eine normale mendelsche Verteilung wider: 35 Tiere waren Wildtypen (23 %), 85 Tiere waren heterozygot (57 %) und 30 Tiere waren homozygote Mutanten (20 %).

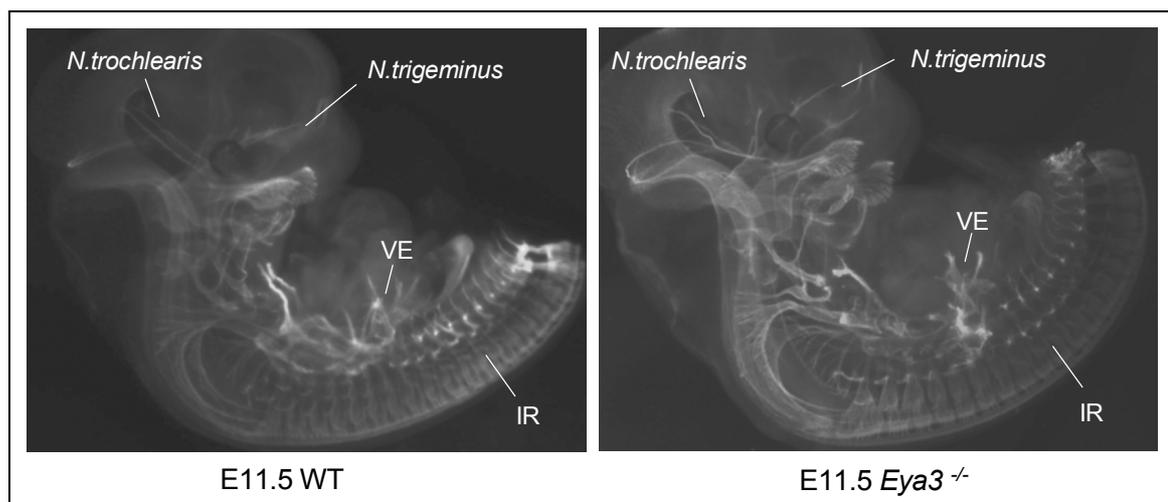
Für die beabsichtigten Untersuchungen in der Deutschen Mauslinik wurden 28 männliche (14 Wildtypen, 14 Homozygote) und 20 weibliche Tiere (10 Wildtypen, 10 Homozygote) ausgewählt. Bei den Tieren handelte es sich um

Wurfgeschwister, die einen maximalen Altersunterschied von 10 Tagen aufwiesen.

### 3.2.3.2 Einfluss von *Eya3* auf das neuronale Wachstum

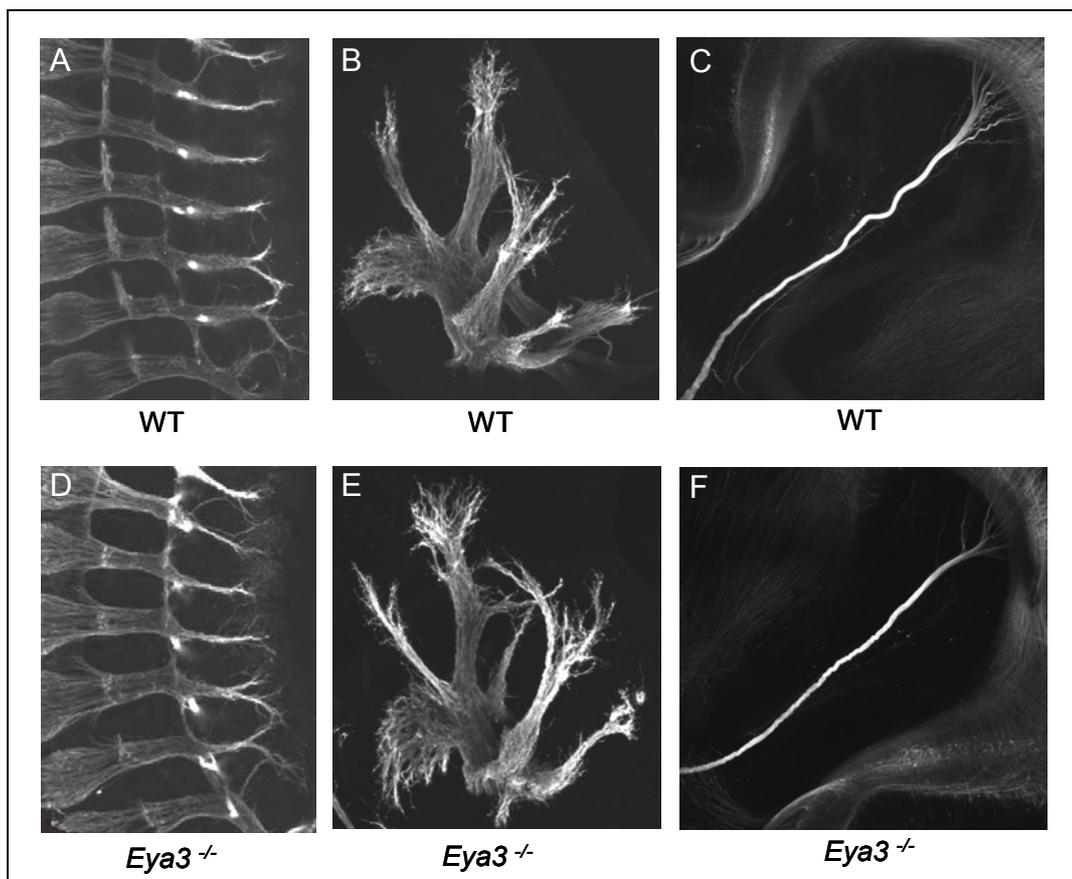
Schon aus Studien zu *Eya1* in Vertebraten (Zou et al., 2004) und *eyes absent* in *Drosophila* (Bonini et al., 1998; Miguel-Aliaga et al., 2004) ist die Übernahme von Aufgaben durch *Eya*-Gene in der Ausbildung neuronaler Strukturen bekannt. Daher könnten die bei der embryonalen Expressionsanalyse (Kapitel 3.2.2.1) erhaltenen Hinweise auf eine frühe Transkription von *Eya3* in den sich entwickelnden neuronalen Strukturen und in der grauen Substanz der sich ausbildenden Wirbelsäule ein Hinweis auf eine Rolle von *Eya3* bei der Ausbildung des Nervensystems sein. Denkbar wäre ein regulatorischer Einfluss von *Eya3* auf Gene aus Signalketten, die beim Wachstum bzw. bei der Migration bestimmter Nervenfasern eine Rolle spielen.

Um Hinweise auf einen Einfluss von *Eya3* auf das neuronale Wachstum z.B. durch eine beeinträchtigte Orientierung der Neuronen zu erhalten, wurde eine Färbung der Intermediärfilamente in den sich ausbildenden Neuronen durchgeführt (Neurofilamentfärbung). Da sich anhand der Übersichtsfärbung (Abb. 3.28) noch keine Aussagen zur Auswirkung einer gestörten *Eya3*-Expression auf das neuronale Wachstum machen ließen, wurden bestimmte



**Abbildung 3.28** Übersichtsfärbung. Die Intermediärfilamente der Neuronen wurden in Embryonen des Stadiums E11.5 durch Bindung eines fluoreszenzgekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht. (IR, intersomitische Region; VE, Vorderextremitäten)

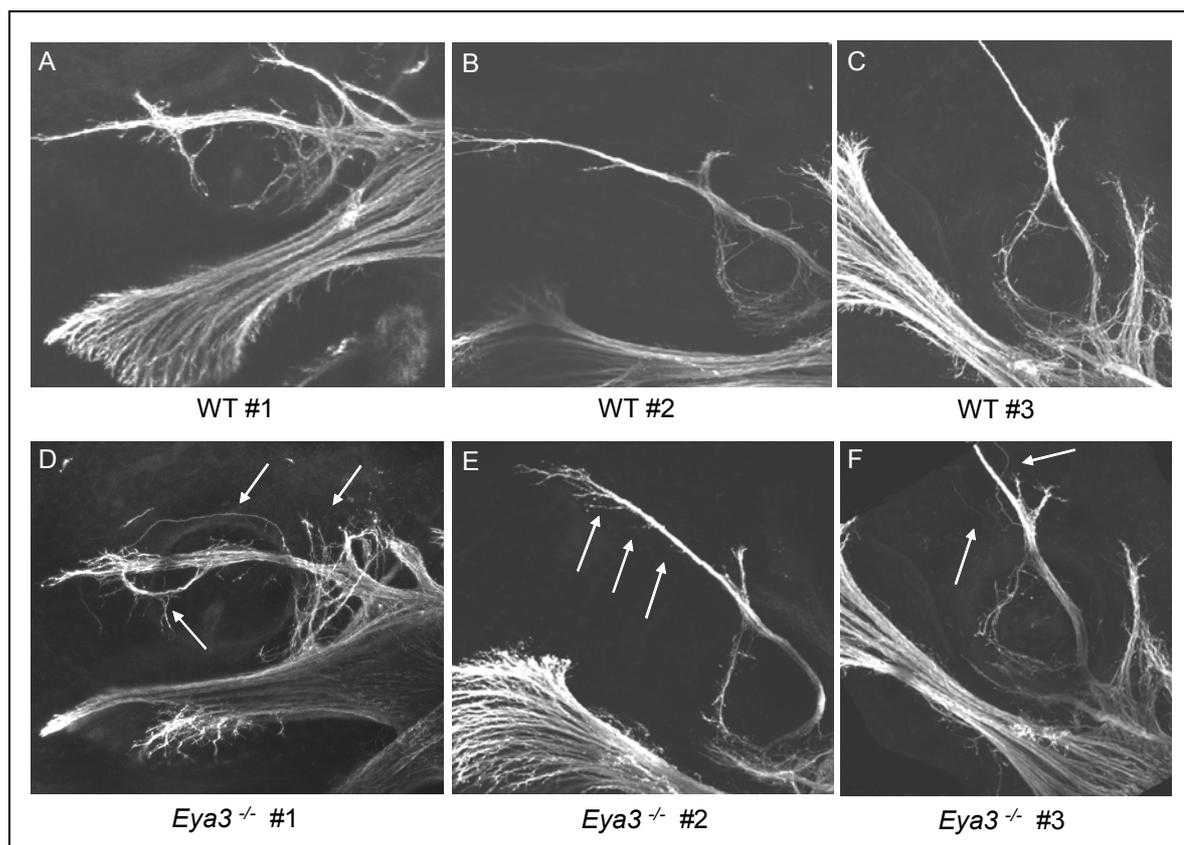
Bereiche für eine genauere Untersuchung unter dem konfokalen Mikroskop ausgewählt. Bestimmend für die Festlegung dieser Bereiche waren die Ergebnisse aus der Expressionsanalyse für *Eya3* während der embryonalen Entwicklung. Näher betrachtet wurden die Vorderextremitäten, die intersomitische Region sowie der *Nervus trigeminus* und der *Nervus trochlearis*. Eine genaue Betrachtung der intersomitischen Region unter dem konfokalen Mikroskop ergab keine Veränderungen des neuronalen Wachstums zwischen *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen und Kontrolltieren. Die intersomitischen Neuronen mit ihren baumähnlichen Strukturen waren in den Mutanten unbeeinträchtigt ausgebildet und ließen keinen Rückschluss auf durch die Mutation induzierte Defekte in der Entwicklung zu (Abb. 3.29 A, D). Gleiches gilt für die Innervierung der Vorderextremitäten. Auch hier zeigten die sich ausbildenden Neuronen in den Mutanten ein unbeeinträchtigt Wachstum gegenüber den Wurfgeschwistern mit dem Wildtyp-Allel des *Eya3*-Gens (Abb. 3.29 B, E).



**Abbildung 3.29** Analyse des neuronalen Wachstums für die intersomitische Region (A, D), die Vorderextremitäten (B, E) und den *Nervus trochlearis* (C, F) in Wildtypen und *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen (Embryonalstadium E11.5). Im Vergleich zwischen Wildtypen und Mutanten konnte für diese neuronalen Strukturen ein unverändertes Wachstum festgestellt werden.

Als einer der größten und damit am besten zu verfolgenden Hirnnerven wurde ferner der *Nervus trochlearis* analysiert. Die Projektion dieses Nervs zeigte keine Veränderung in ihrer Länge bzw. in ihrer Richtung zwischen Mutante und Wildtyp, was auf ein normales Wachstums dieses Nervs schließen lässt (Abb. 3.29 C, F).

Zusätzlich zu den bereits genannten Geweben wurde noch der *Nervus trigeminus* untersucht. Der fünfte Hirnnerv, der sich aus den drei Hauptästen *N. ophthalmicus*, *N. maxillaris* und *N. mandibularis* zusammensetzt, entsteht aus zwei Kiemenbogennerven und enthält sensorische Fasern, die vor allem Gesicht, Zunge und Zähne versorgen. Motorisch innerviert der *N. trigeminus* die Kaumuskulatur. Bei der Untersuchung dieses Hirnnervs fielen vor allem am *N. ophthalmicus* Veränderungen an der Struktur des Nervenfaserbündels auf (Abb. 3.30).



**Abbildung 3.30** Gezeigt ist die Untersuchung des neuronalen Wachstums für den *Nervus trigeminus* in je 3 Wildtyp- (A – C) und 3 *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen (D – F). In den homozygoten Mutanten sind Aberrationen des neuronalen Wachstums, insbesondere beim *N. ophthalmicus* zu erkennen. Einzelne Nervenfasern verlassen ungeordnet die Wachstumsrichtung des Hauptstrangs, um ungerichtet weiter zu wachsen, wobei z.T. ein bogenförmiges Wachstum zu erkennen ist. Die weißen Pfeile markieren beispielhaft Unregelmäßigkeiten im Wachstum der Nervenfasern in den homozygoten Embryonen.

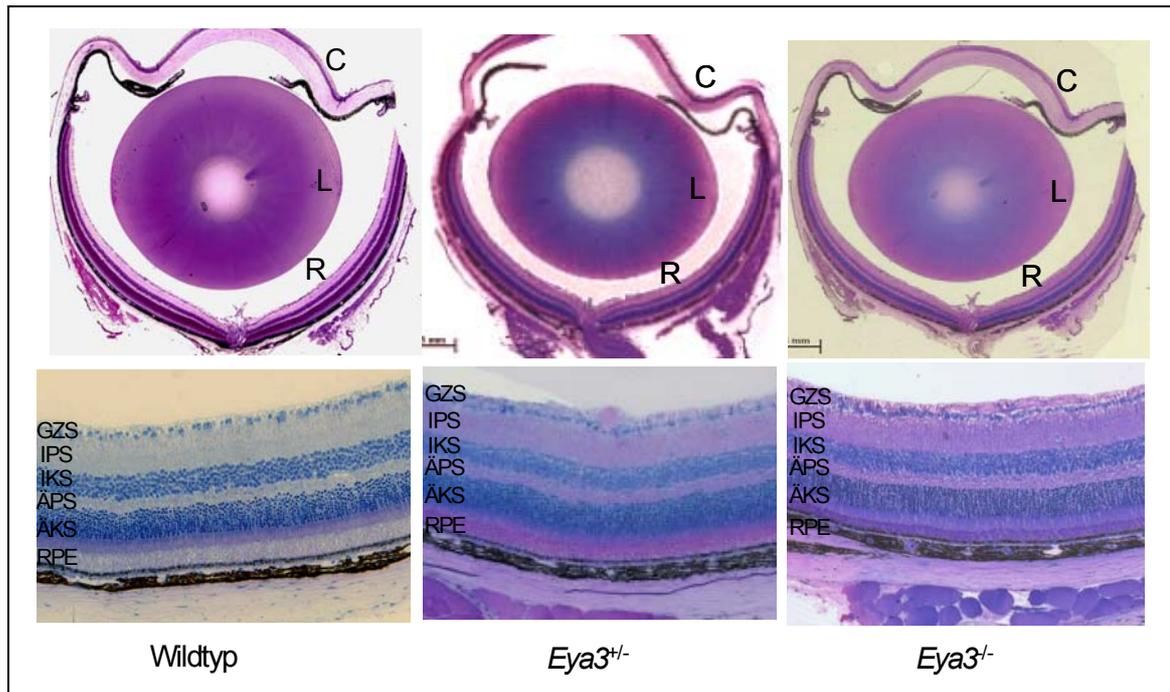
In *Eya3*<sup>-/-</sup>-Embryonen fielen einzelne unregelmäßig aus dem Hauptstrang austretende Nervenfasern auf, die die Wachstumsrichtung des Hauptstrangs ungeordnet verließen, um entweder in eine andere, fehlorientierte Richtung zu wachsen oder um nach der Beschreibung eines Bogens wieder in die Wachstumsrichtung des Hauptstrangs zurückzukehren (Abb. 3.30 D – F). Ferner konnte zumindest in einzelnen Fällen ein Fehlen oder ein reduziertes Wachstum kleinerer Nervenstränge beobachtet werden (Abb. 3.30 D). Die vorliegenden Resultate geben somit den Hinweis, dass *Eya3* ähnlich wie *Eya1* oder *eyes absent* an den Prozessen des neuronalen Wachstums beteiligt sein kann.

### 3.2.3.3 Untersuchungen am Auge

#### Histologie

Aufgrund der Bedeutung des Gens *eyes absent* für die Augenentwicklung in *Drosophila* kam der Untersuchung einer Einflussnahme von *Eya3* auf die Entwicklung und Funktion des Auges besondere Bedeutung zu. Die Expression von *Eya3* im Linsenbläschen und in den primären Linsenfaserzellen (E10.5, E11.5) sowie später in der Retina und im Linsenepithel des Auges (E15.5, E17.5) lässt vermuten, dass *Eya3* Funktionen bei der Entwicklung von Linse und Retina übernimmt. Um Aufschluss über eine mögliche Funktion zu gewinnen, wurde das Vorliegen von morphologischen Veränderungen mit Hilfe von histologischen Untersuchungen überprüft.

Die dargestellten Gewebeschnitte zeigen, dass sich keine histologisch sichtbaren Unterschiede zwischen den Mäusen mit verschiedenem Genotyp für *Eya3* ergeben. Die Linse der *Eya3*-Mutanten ist in Form und Größe gegenüber den Kontrolltieren vergleichbar entwickelt (Abb. 3.31 oben). Auch die Retina lässt keine strukturellen Veränderungen zwischen Wildtyp und Mutante erkennen. Die einzelnen retinalen Schichten sind in den Mutanten vorhanden und weisen keine morphologischen Unterschiede gegenüber den Kontrollen auf (Abb. 3.31 unten).



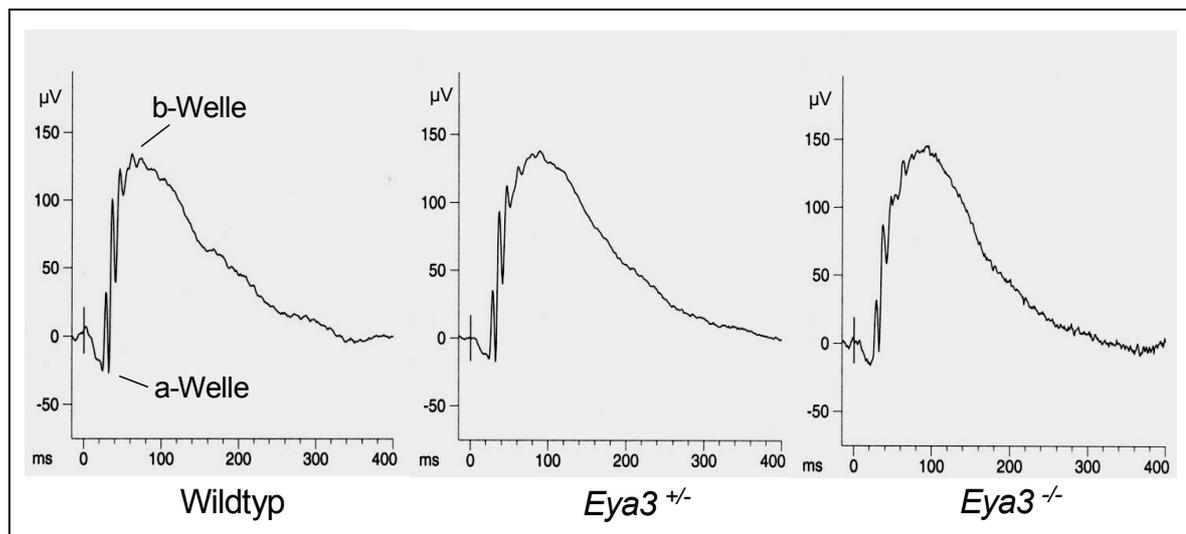
**Abbildung 3.31** Vergleich der Augen-Histologie von 11 Wochen alten Tieren (Wildtyp, *Eya3*<sup>+/-</sup>, *Eya3*<sup>-/-</sup>). Obere Abbildungen: Hornhaut, Linse und Retina sind normal entwickelt in *Eya3*-Mutanten. Untere Abbildungen: Kontrollen und Mutanten zeigen keine Divergenzen in der retinalen Schichtung und der Morphologie der einzelnen Schichten. (ÄKS äußere Körnerschicht; ÄPS äußere plexiforme Schicht; C, Cornea; GZS, Ganglienzellschicht; IPS, innere plexiforme Schicht; IKS, innere Körnerschicht; L, Linse; R, Retina; RPE, retinales Pigmentepithel).

Zusätzlich zur Histologie wurde die Morphologie des Auges noch mit drei weiteren Methoden analysiert. Die Untersuchung der Linse auf mögliche Veränderungen erfolgte mit der Spaltlampe und der Augenhintergrund wurde mit der Funduskopie überprüft. Außerdem wurden verschiedene Parameter der Augengröße mit der Laserinterferenzbiometrie gemessen. Da die genannten Untersuchungen nicht selbst durchgeführt wurden, befinden sich diese Ergebnisse im Anhang (Kapitel 6.1).

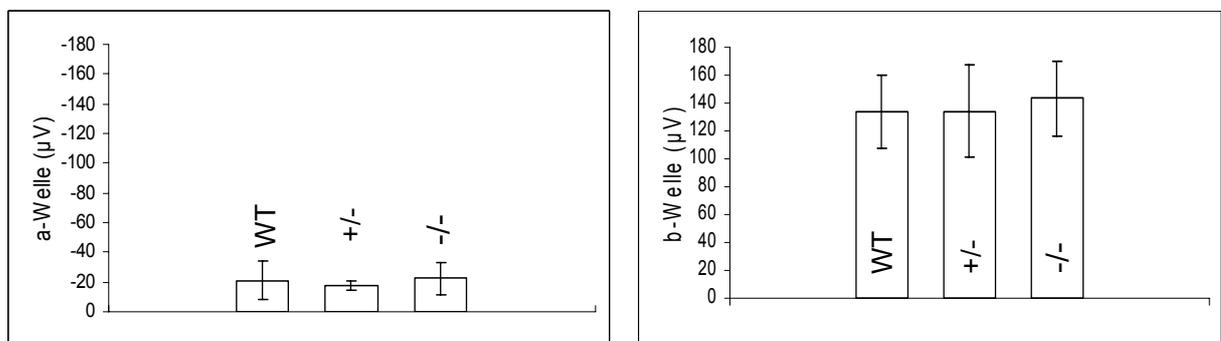
### Elektroretinographie (ERG)

Neben den morphologischen Untersuchungen des Auges wurden auch Analysen zur Feststellung einer funktionalen Störung durchgeführt. Eine Möglichkeit zur Aufdeckung funktionaler Störungen der Retina ist die Elektroretinographie (ERG) (Dalke et al., 2004). Hierbei wird die Reaktion der Photorezeptoren sowie der nachgeschalteten bipolaren Zellen auf einen Lichtimpuls gemessen und in einem Elektroretinogramm graphisch dargestellt. Die Antwort der Photorezeptoren auf den Lichtimpuls spiegelt sich in der a-Welle nieder, die Reaktion der bipolaren

Zellen wird mit der b-Welle erfasst. Weder der Verlauf der a- noch der Verlauf der b-Welle waren in den *Eya3*-Mutanten auffällig verändert (Abb. 3.32). Die statistische Auswertung der Daten bestätigte, dass bei den ermittelten Werten der a- und b-Welle keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0.05$ ) zwischen Mutanten und Kontrollen bestehen (Abb. 3.33).



**Abbildung 3.32** Elektoretinogramme von Wildtyp und *Eya3*-Mutanten. Die gemessenen Signale für a- und b-Welle zeigen keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (n=5).



**Abbildung 3.33** Die Auswertung der in der Elektoretinographie gemessenen Werte für a- und b-Welle ergibt keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0.05$ ) zwischen Wildtypen und *Eya3*-Mutanten (n=5; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an).

### Untersuchung in der optokinetischen Trommel

Um funktionale Veränderungen des zentralen visuellen Systems aufzudecken, wurden die Mutanten in der optokinetischen Trommel (*optokinetic drum*) analysiert. Hierbei veranlasst ein rotierendes Streifenmuster die im Zentrum der Trommel platzierte Maus zu einer wiederholten Kopfbewegung (*head-tracking*) in

Drehrichtung der Trommel, während das Ausbleiben einer Reaktion auf eine Beeinträchtigung des zentralen visuellen Systems hindeutet. Die Untersuchung von insgesamt 10 Tieren (5 Wildtypen, 5 homozygote Mutanten) im Alter von 14 Wochen offenbarte keine Einschränkung des zentralen visuellen Systems in *Eya3*-Mutanten. Alle getesteten Mutanten reagierten mit einer eindeutigen Kopfbewegung auf die sich drehende Trommel.

#### **3.2.3.4 Real-Time PCR: Validierung der Daten aus der differentiellen Gen-Expressionsanalyse für *Eya3***

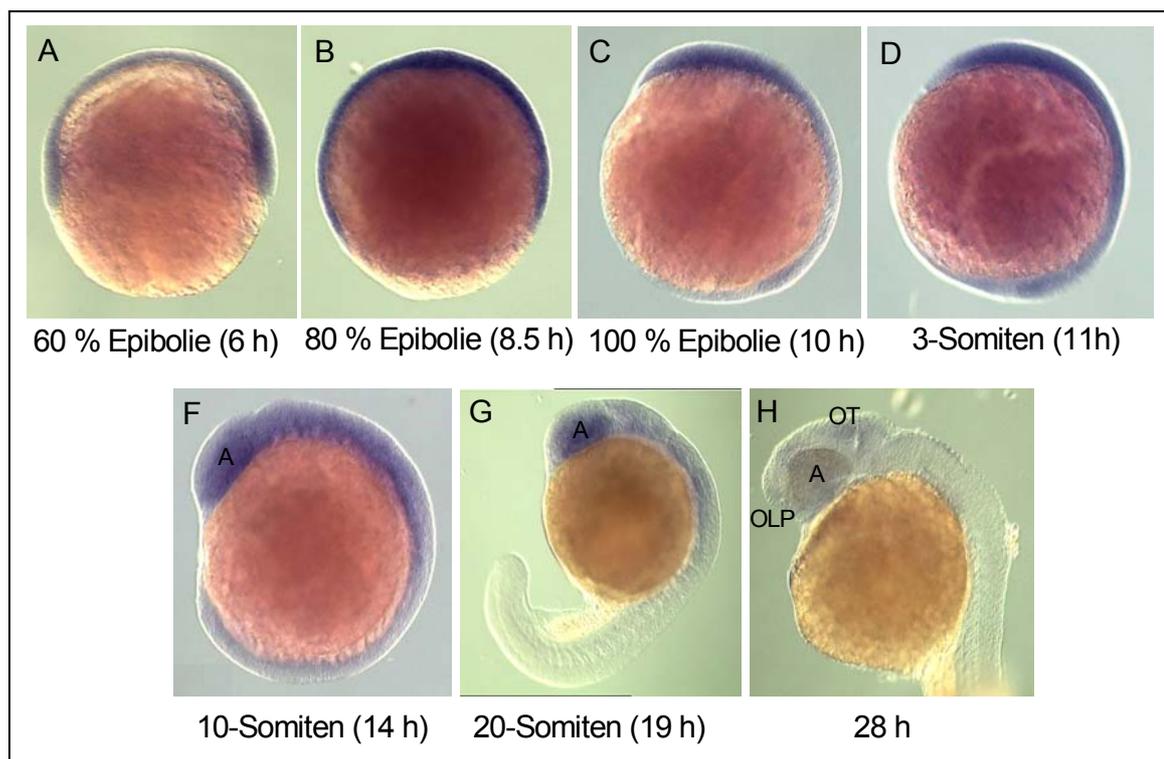
Im Rahmen der Untersuchungen in der Deutschen Mauslinik wurde auch eine differentielle Gen-Expressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Gewebe Skelettmuskel, Herz und Gehirn aus Mutanten und Kontrollen analysiert. Während in der Skelettmuskulatur keine regulierten Gene nachgewiesen wurden, konnten im Herz 17 Gene und im Gehirn 93 Gene mit veränderter Expression bestimmt werden (Daten im Anhang, Kapitel 6.3). Die regulierten Gene im Herz waren alle in ihrer Expression erniedrigt, im Gehirn waren 80 Gene geringer und 13 Gene verstärkt exprimiert. Drei der identifizierten Gene waren in Herz und Gehirn in ihrer Expression erniedrigt: *Hba-a1*, *1110017|16Rik* und *Nup155*. Die in *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren zur Regulation von *Nup155* (*Nucleoporin155*) in Herz und Gehirn gewonnenen Daten (Herz: - 2,1-fach / Gehirn: - 2,8-fach) konnten mit Hilfe der Real-Time PCR bestätigt werden. Die Auswertung mit der Software REST (Paffl et al., 2002) ergab eine Verringerung der Expression von *Nup155* für das Herz um den Faktor 1,6 (p<0.05) und für das Gehirn um den Faktor 2,2 (p<0.01).

### **3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Funktion von *Eya3* im Zebrafisch**

Zu den bereits dargestellten Studien in der Maus wurden auch vergleichende Untersuchungen zur Bedeutung von *eya3* in der Embryonalentwicklung des Zebrafisches (*Danio rerio*) unternommen.

### 3.3.1 *eya3*-Expression im Zebrafischembryo

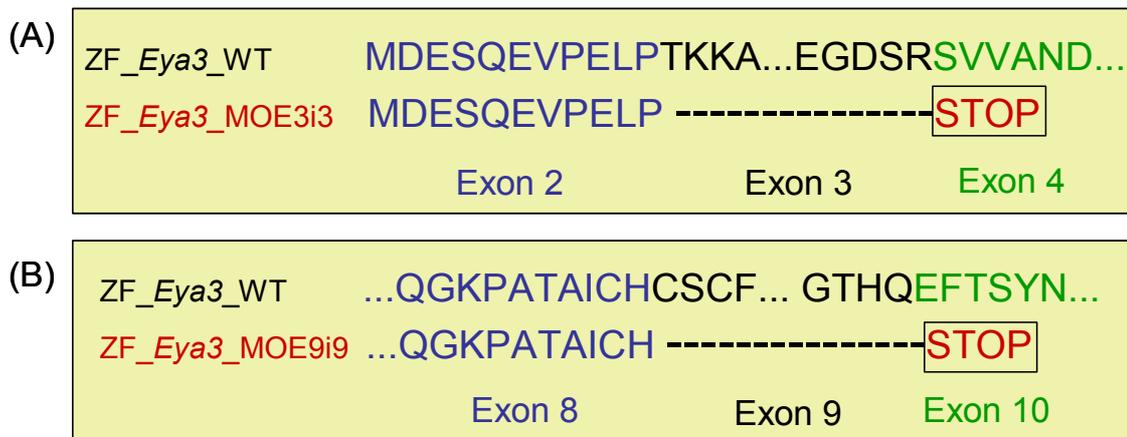
Vergleichend zu dem bereits gezeigten Expressionsmuster für *Eya3* in den frühen Entwicklungsstadien der Maus (Kapitel 3.2.2.1) wurde die Expression des *eya3*-Gens in der frühen Embryonalentwicklung des Zebrafisches untersucht. In den Stadien der Gastrulation und der frühen Somitenbildung (Abb. 3.34 A - D) zeigten die Zebrafischembryonen, ähnlich den frühen Mausembryonen, eine ubiquitäre Expression von *eya3*, die sich erst im 10-Somiten Stadium auf die anterioren Bereiche des sich entwickelnden Organismus konzentrierte (Abb. 3.34 E). Im 20-Somiten Stadium war die Expression von *eya3* besonders im Auge und in den Bereichen des zukünftigen Gehirns präsent. Mit Beginn des zweiten Embryonaltages ging die Expression von *eya3* zurück und es fanden sich nur noch geringe Mengen an Transkripten im Auge, der olfaktorischen Plakode und dem *Tectum opticum* (Abb. 3.34 G, H).



**Abbildung 3.34** *In situ*-Hybridisierung für *eya3* auf verschiedene embryonale Entwicklungsstadien im Zebrafisch. Bis einschließlich des 3-Somiten Stadiums findet sich eine ubiquitäre Expression (A-D). Erst ab dem 10-Somiten Stadium kommt es zu einer spezifischer werdenden Expression von *Eya3* in anterioren Bereichen des Embryos (F). In Embryonen des 20-Somiten Stadiums konzentriert sich die *eya3*-Expression auf das Auge und Bereiche des zukünftigen Gehirns (G). Am Anfang des zweiten Embryonaltages findet sich nur noch eine schwache Expression von *eya3*, die sich auf Bereiche des optischen Tektums, des Auges und der olfaktorischen Plakode beschränkt (H). (A, Auge; OLP, olfaktorische Plakode; OT, *Tectum opticum*)

### 3.3.2 Morpholino-knockdown für *eya3*

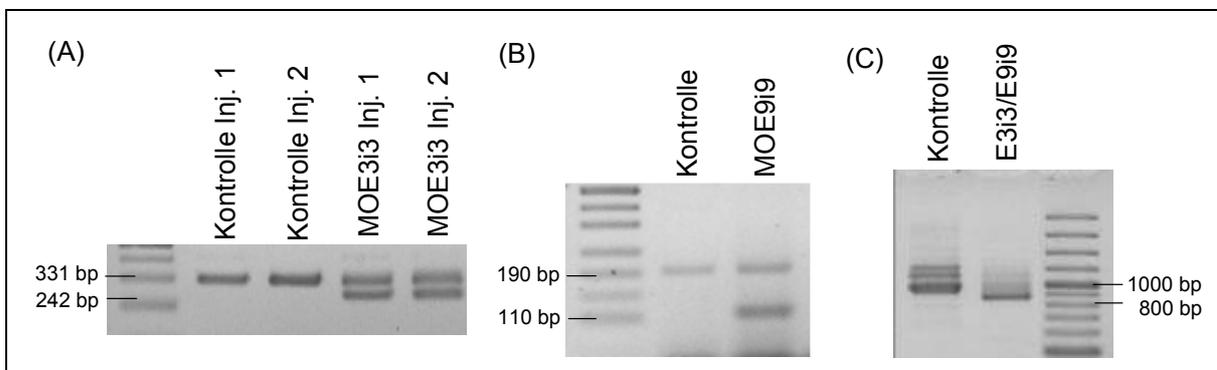
Zur Untersuchung der Folgen eines Verlustes der *eya3*-Expression in der frühen Embryonalentwicklung des Zebrafisches wurden Morpholino-Oligonukleotide injiziert, die komplementär zu Spleiß-Donor-Sequenzen von Exon 3 (MOE3i3) und Exon 9 (MOE9i9) in der *eya3*-mRNA waren. Hierdurch wurde ein fehlerhafter Spleißprozess der mRNA induziert, welcher zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zur Entstehung eines verfrühten Stop-Codons führt. Der dadurch erfolgende Abbruch der Translation resultiert in verkürzten Proteinen. Die Injektion von MOE3i3 hat ein Fehlen von Exon 3 in der mRNA zur Konsequenz, was zu einem stark verkürzten Protein mit lediglich 11 von 617 Aminosäuren führt (Abb. 3.35 A). Bei der Injektion von MOE9i9 kommt es zu einem Fehlen von Exon 9 und damit zu einem auf 202 Aminosäuren verkürzten Protein, das – vergleichbar der Situation in der Maus – durch einen Verlust der Eya-Domäne gekennzeichnet ist (Abb. 3.35 B).



**Abbildung 3.35** Grafische Darstellung der beabsichtigten Morpholino-induzierten Veränderungen an den *eya3*-Transkripten. (A) Die Injektion von MOE3i3 bewirkt einen Verlust von Exon 3. (B) Eine Injektion von MOE9i9 führt den Verlust von Exon 9 herbei. In beiden Fällen kommt es zur Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons, das in einem Abbruch der Translation und mithin in einem verkürzten Protein resultiert.

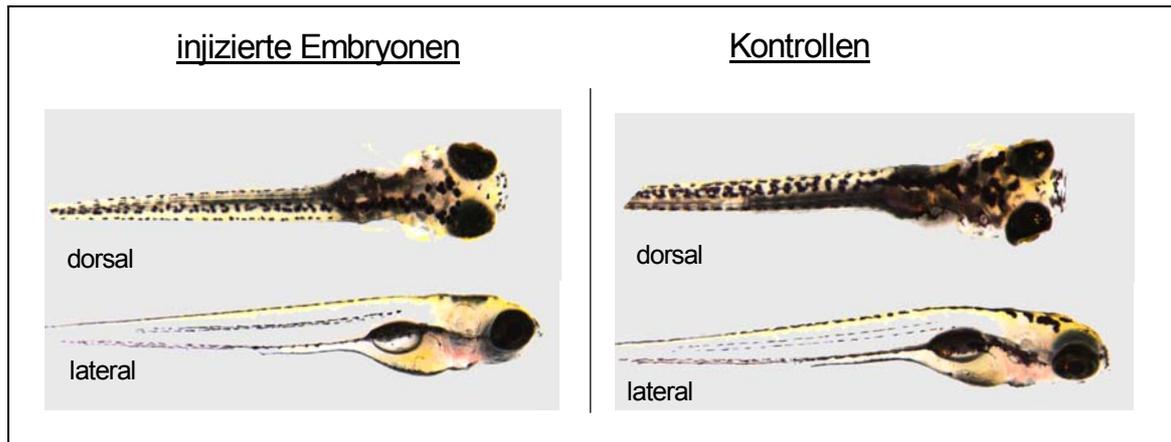
Die Injektion der Morpholinos erfolgte in Embryonen des Ein-Zell-Stadiums. Nach 24 Stunden wurde von einem Teil der Embryonen die Gesamt-RNA gewonnen und anschließend die Effizienz der Morpholino-Injektion durch eine RT-PCR überprüft. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten sowohl für die Injektion von MOE3i3 als auch für die Injektion von MOE9i9, dass noch immer nicht-verändert gespleißte Transkripte vorhanden waren (Abb. 3.36). Um alle korrekt gespleißten Transkripte zu eliminieren, wurden beide Morpholinos gemeinsam in

die Embryonen injiziert. In der nachfolgenden RT-PCR konnte kein *eya3*-Transkript mehr nachgewiesen werden, das der Wildtypform entsprach. Das in den injizierten Embryonen amplifizierte Fragment war deutlich kleiner als in den Kontrollen (Abb. 3.36 C). Nach Abschluss der eigenen Arbeiten durchgeführte weitere PCR-Experimente konnten eine zusätzliche alternative Spleißform ohne Exon 8 für *eya3* zeigen. Aber auch für diese Spleißform zeigte sich ein durch die Morpholinos induzierter veränderter Spleißvorgang, denn das in den injizierten Embryonen amplifizierte Fragment war ebenfalls deutlich kleiner (ca. -130 bp) als in den nicht-injizierten Kontrollen (Abb. 6.12)



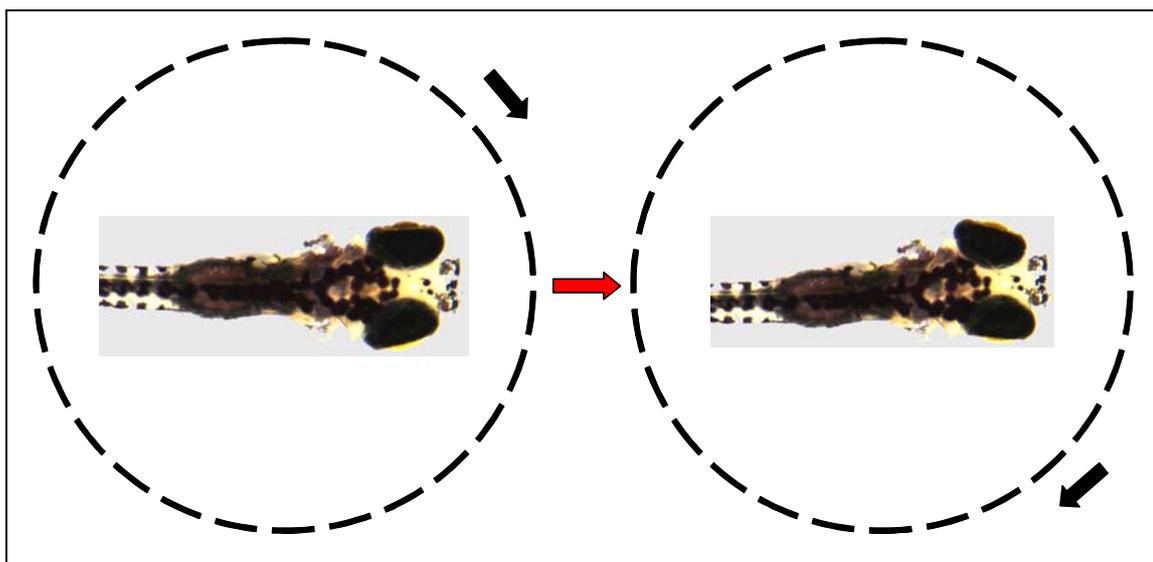
**Abbildung 3.36** RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Morpholino-injizierten Zebrafisch-Embryonen (Alter 24 h). Bei der alleinigen Injektion von MOE3i3 bzw. MOE9i9 zeigten sich zwei Banden, von denen die obere Bande identisch mit der im Wildtyp nachgewiesenen Spleißvariante war. Die untere Bande hingegen zeigte die durch den Morpholino induzierte aberrante Spleißform ohne Exon 3 bzw. Exon 9 (A, B). Durch Co-Injektion beider Morpholinos gelang es die Zahl der normal gespleißten *eya3*-Transkripte gänzlich zu eliminieren. Das in den injizierten Embryonen amplifizierte Fragment weist eine deutlich geringere Größe auf als in den Kontrollen (C).

Die Entwicklung der injizierten Embryonen wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt und mit den nicht injizierten Kontrollen unter dem Binokular verglichen. Die Morpholino-injizierten Embryonen zeigten dabei keine morphologischen Veränderungen, die auf eine Beeinträchtigung der Entwicklung schließen lassen könnten (Abb. 3.37). Insbesondere war die Entwicklung der aus der Neuralplatte hervorgehenden neuronalen Strukturen gegenüber den Kontrollen nicht verändert.



**Abbildung 3.37** Die Injektion der Morpholinos MOE3i3 und MOE9i9 gegen die Transkripte von *eya3* führte zu keinen morphologischen Veränderungen an den injizierten Embryonen. Vielmehr entsprach der Phänotyp der injizierten Tiere dem der nicht injizierten Kontrollen. Die Entwicklung der aus der Neuralplatte hervorgehenden neuronalen Strukturen war nicht beeinträchtigt.

Da die Expressionsanalysen gezeigt hatten, dass *eya3* in Bereichen des visuellen Systems exprimiert wird, wurde auch hier mittels einer einfachen optokinetischen Trommel die Funktion des zentralen visuellen Systems überprüft (Abb. 3.38). Für diese Untersuchung wurden je 5 Kontrollen bzw. 5 injizierte Embryonen im Alter von 7 Tagen in der Trommel getestet. Unabhängig von der Morpholino-Injektion zeigten alle Tiere eine Folgebewegung der Augen in Drehrichtung der Trommel, was eine korrekte Funktion des zentralen visuellen Systems auch in den injizierten Embryonen nahe legt.



**Abbildung 3.38** Untersuchung Morpholino injizierter und nicht-injizierter Zebrafischembryonen in einer einfachen optokinetischen Trommel zur Überprüfung der Funktion des zentralen visuellen Systems. Jeweils 5 Tiere wurden im Alter von 7 Tagen in der Trommel getestet. Alle Tiere zeigten eine Folgebewegung der Augen in Drehrichtung der Trommel (schwarze Pfeile).

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung der *Eya3*-Mutante

Die zu Beginn der Untersuchungen durchgeführten molekularen Analysen (Kapitel 3.1) zur Verifizierung der Vektorintegration sowie der genauen Lokalisierung der Insertion konnten zeigen, dass die durch den Gene Trap erzeugte murine *Eya3*-Mutante einen Verlust aller Exons nach Exon 7 aufweist. Die Kenntnis der Lage der Vektorintegration gab somit die Möglichkeit, Aussagen über die Folgen der Mutation auf Protein-Ebene machen zu können. Danach fehlt die durch die Exons 10 – 16 kodierte Eya-Domäne in den homozygoten Mutanten (Abb. 3.5), was durch Analysen mittels RT-PCR und Northern-Blot bestätigt werden konnte.

Die Eya-Domäne übernimmt essentielle Funktionen in den Eya-Proteinen (Kapitel 1.2.1, 1.3). Zum einen ist sie für die Interaktion mit den Proteinen der Gene *sine oculis* in *Drosophila* und *Six1*, *2*, *4* und *5* in Vertebraten notwendig (Pignoni et al., 1997; Ohto et al., 1999; Ikeda et al., 2002), zum anderen weist sie eine vermutlich regulatorisch bedeutsame Phosphatase-Aktivität auf (Tootle et al., 2003; Rayapureddi et al., 2003). Ein Wegfall der Eya-Domäne in den *Eya3*-Mutanten bedingt mithin den Verlust der Möglichkeit zur Protein-Protein-Interaktion sowie der Phosphatase-Aktivität. Untersuchungen an Eya1-Proteinen mit Mutationen in der Eya-Domäne konnten bereits zeigen, dass diese aufgrund der Mutationen ihre Bindeeigenschaft zu den Proteinen Six1 und Six2 verlieren (Buller et al., 2001; Ozaki et al., 2002). Ferner unterstreicht der Nachweis verschiedener Punktmutationen in der Eya-Domäne humaner Patienten mit *branchio-oto-renalem* (BOR)-Syndrom die Bedeutung dieser Domäne (Buller et al., 2001; Ikeda et al., 2002). In *Drosophila*-Mutanten führt der Verlust der Eya-Domäne zu einer Null-Mutation (Bonini et al., 1993; Bui et al., 2000). Die Deletion der Eya-Domäne bzw. von Teilen der Eya-Domäne wurde auch schon für die Erzeugung anderer Mutanten genutzt. So sind bei der Generierung der Mausmodelle für *Eya1* und *Eya4* jeweils Teile der Eya-Domäne (Xu et al., 1999; Depreux et al., 2008) deletiert worden. Der Verlust der Eya-Domäne in den *Eya3*-Mutanten führt demnach zum Verlust grundlegender Eigenschaften der

gebildeten Proteine. Entsprechende Auswirkungen eines solchen Funktionsverlustes auf den Phänotyp der Tiere sind somit zu erwarten.

Für eine mögliche Überlagerung der Effekte in den Mutanten durch eine veränderte Expression anderer Gene des retinalen Determinationsnetzwerkes (RDGN) konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden. Die Untersuchung der Auswirkung der *Eya3*-Mutation auf die Transkription der möglichen Interaktionspartner innerhalb des RDGN mittels RT-PCR-Analysen zeigte keine veränderte Expression der Gene *Six1-6* und *Dachshund1-2* in *Eya3*-defizienten Tieren. Ebenso waren keine offenkundigen kompensatorischen Effekte durch eine veränderte Expression der Gene *Eya1*, *Eya2* und *Eya4* (Tabelle 4.1) in den *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren ersichtlich (Kapitel 3.1.3).

**Tabelle 4.1** Übersicht des Expressionsmusters der Gene *Eya1*, *Eya2* und *Eya4* in Vertebraten

Gen	Expressionsmuster
<i>Eya1</i>	Gehirn, Somiten, Kiemenbögen, Auge, Extremitäten, Nieren, Barthaarfollikel, Skelettmuskulatur
<i>Eya2</i>	Gehirn, Somiten, Auge, Extremitäten, Dorsalwurzelganglien, Nieren
<i>Eya4</i>	Olfaktorische Plakode, otisches Bläschen, Kiemenbögen, Somiten, Dermamyotom, Trigeminus, Extremitäten, Herz, Cochlea, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Skelettmuskulatur

## 4.2 Studien zur transkriptionellen Regulation von *Eya3*

Die transkriptionelle Regulation von *Eya3* ist bisher noch unbekannt. Denkbar ist die Regulation von *Eya3* durch *Pax6* (Kapitel 1.4), wie sie sich aus der analogen Übertragung des RDGN von *Drosophila* auf die Maus ergibt (Wawersik, 2000). Daher war die Überprüfung des regulatorischen Einflusses von *Pax6* auf *Eya3* von besonderem Interesse. Die zunächst in den *Pax6*-defizienten Mauslinien *Aey11* und *ADD4802* (Graw et al., 2005) durchgeführten Analysen mittels RT-PCR zeigten keine veränderte Expression von *Eya3* in den *Pax6*-Mutanten (Kapitel 3.1.4.1), was gegen einen direkten Einfluss von *Pax6* auf *Eya3* spricht. Eine *in vivo* vorgenommene Überprüfung dieser Ergebnisse durch die Erzeugung von Doppelmutanten aus *Aey11*-Tieren und *Eya3*-Mutanten konnte

ebenfalls keinen Beleg für eine Kontrolle von *Eya3* durch *Pax6* liefern (Kapitel 3.1.4.1).

Interessanterweise offenbarte eine *in silico*-Analyse der *Eya3*-Promotorregion mit dem Programm MatInspector (Quandt et al., 1995) die Präsenz von drei *Pax6*-Transkriptionsfaktorbindestellen in der stromaufwärts vom *Eya3*-Transkriptionsstart gelegenen Sequenz. Zur Überprüfung eines Einflusses von *Pax6* auf *Eya3* über diese Bindestellen wurden daher Fragmente verschiedener Länge des *Eya3*-Promotors in einem Zellkulturtestsystem mit dem Transkriptionsfaktor *Pax6* co-transfiziert. Die in dem *in vitro*-Testsystem erzielten Ergebnisse konnten eine Reduzierung der Luciferaseaktivität für alle Promotorfragmente bei gleichzeitiger Transfektion von 0,6 µg *Pax6* offenbaren, die bei den Fragmenten 1 und 3 sogar Signifikanz erreichte (Kapitel 3.1.4.2). Die Abnahme der Aktivität für diese beiden Fragmente (ca. 17 %) zeigt, dass zumindest *in vitro* eine Beeinflussung der transkriptionellen Regulation von *Eya3* durch *Pax6* nachweisbar ist, obwohl bei den vorherigen *in vivo*-Untersuchungen keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Ursächlich hierfür kann sein, dass die viel komplexeren regulatorischen Beziehungen in einem lebenden Organismus kleinere Effekte, wie den oben dargestellten, leicht verdecken können und damit ein Erkennen der regulatorischen Mechanismen verhindern. So konnte z.B. eine *in vivo* Untersuchung in *Pax3*-Mutanten den zuvor *in vitro* aufgedeckten Einfluss von *Pax3* auf *Dach2* aufgrund von Überlagerungseffekten nicht zeigen (Heanue et al., 1999).

Ferner ließen Untersuchungen mit *Prox1*, einem weiteren wichtigen Faktor der Augenentwicklung, eine Beeinflussung der Transkription von *Eya3* erkennen. Die gleichzeitige Transfektion des ebenfalls im Auge und im zentralen Nervensystem exprimierten Transkriptionsfaktors *Prox1* (Tomarev et al., 1997) führte, wie schon die Co-Transfektion von *Pax6*, zu einer Veränderung der für die Promotorkonstrukte ermittelten Luciferaseaktivität. Insbesondere bei Fragment 2 zeigte sich eine Zunahme der Aktivität, die bei Co-Transfektion von Fragment 2 und 0,6 µg *Prox1* sogar Signifikanz erreichte. Mit zunehmender Länge der Promotorfragmente kam es zu einer Verschiebung von Aktivierung zu Inhibierung, wie die signifikante Abnahme der Aktivität für das Fragment 4 bei Co-Transfektion von 0,3 und 0,6 µg *Prox1* zeigte. Insgesamt legen die Ergebnisse für *Prox1* eine transkriptionelle Beeinflussung von *Eya3* nahe.

Obwohl in dieser Arbeit keine Belege für eine Aufgabe von *Eya3* im Auge gefunden werden konnten (Kapitel 3.2.3.3), ist ein regulatorischer Einfluss von *Prox1* auf *Eya3* gut vorstellbar. Denn für *Prox1* konnte wie auch schon für *Eya3* eine embryonale Expression im Gehirn, z.B. im Telencephalon, gezeigt werden (Lavado und Oliver, 2007). Möglich wäre eine Aktivierung von *Eya3* durch *Prox1* im Rahmen von Signalkaskaden die während der Neurogenese von Bedeutung sind.

Dagegen ergeben die Daten zur Co-Expression von *Six3* mit den Fragmenten des *Eya3*-Promotors keinen Hinweis auf einen transkriptionellen Einfluss. Die erhaltenen Resultate stehen insofern in Einklang mit den Ergebnissen für eine fehlende Interaktion von *Eya3* und *Six3* auf Proteinebene (Ohto et al., 1999). Ein regulatorischer Einfluss von *Six3* auf die Transkriptionsregulation von *Eya3* ist folglich unwahrscheinlich. Weiterhin konnte die Untersuchung der Expression von *Eya3* in *aphakia*-Mäusen keinen Hinweis auf eine Regulation von *Eya3* durch *Pitx3* liefern.

### 4.3 Funktionsbezogene Analysen zu *Eya3*

Im Fokus dieser Arbeit stand die Charakterisierung der Funktion des *Eya3*-Gens in Vertebraten. Über eine mögliche Aufgabe dieses Gens war bisher noch nichts bekannt (Kapitel 1.3). Einem Teil der Gene dieser Genfamilie konnte zumindest schon in einigen Vertebratenspezies eine Funktion zugewiesen werden. Die Tabelle 1.1 in Kapitel 1.3 gibt für die Gene *Eya1-4* einen Überblick über den Kenntnisstand einer möglichen Genfunktion anhand der derzeit bekannten pathologischen Phänotypen.

#### 4.3.1 *Eya3* – ein bedeutender Faktor in der Augenentwicklung?

Eine zu erwartende Funktion für das *Eya3*-Gen der Vertebraten ist eine Funktion im Auge. Diese Erwartung leitet sich aus der prominenten Rolle des orthologen Gens *eyes absent* in der Entwicklung des Facettenauges bei *Drosophila melanogaster* (Bonini et al., 1993) und dem hohen Grad an Sequenzhomologie (62%) in der C-terminal gelegenen Eya-Domäne zwischen *Eya3* und *eyes absent* ab (Zimmerman et al., 1997). Das hohe Maß an Konservierung ist auch eine Erklärung für die beobachtete funktionale Redundanz der kodierten

Proteine zwischen Maus und *Drosophila*. So kann die Expression muriner cDNA des Gens *Eya3* in den Vorläuferzellen des Facettenauges von *eya*-Mutanten aus *Drosophila* den Expressionsverlust ausgleichen und die Bildung eines vollständigen Auges hervorrufen (Bonini et al., 1997; Bui et al., 2000). Insofern besteht die Vermutung, dass das in den Vertebraten vorliegende orthologe Gen *Eya3* eine vergleichbar große Bedeutung bei der Entwicklung und Funktion des Linsenauges haben könnte.

Die für *Eya3* zunächst vorgenommene Analyse des Expressionsmusters im Auge offenbarte, dass *Eya3* während der Augenentwicklung zunächst im Linsenbläschen, sowie später im Linsenepithel und in der Retina exprimiert wird (Kapitel 3.2.2.1). Eine Expression im Auge der Vertebraten konnte auch schon für die Gene *Eya1* und *Eya2* gezeigt werden (Xu et al., 1997; Duncan et al., 1997), ebenso wie für andere Gene des RDGN, so z.B. für *Six1*, *Six3-6* (Oliver et al., 1995 a,b; Ohto et al., 1998; Sarkar et al., 2000; Jean et al., 1999) und *Dachshund1* (Davis et al., 2001).

Die histologische Untersuchung der Augen von *Eya3*-defizienten Mäusen (Kapitel 3.2.3.3) sowie die Überprüfung der Linse mit der Spaltlampe bzw. der Retina mit der Funduskopie (Kapitel 6.1) lieferte jedoch keinen Hinweis auf entscheidende Divergenzen in der Morphologie von Linse und Retina zwischen Mutanten und Kontrollen. Die Vermessung des Auges mit der Laserinterferenzbiometrie (Kapitel 6.1) bestätigte den aus der Histologie gewonnenen Eindruck, dass zwischen *Eya3*-Mutanten und Kontrollen keine signifikanten Größenunterschiede bestehen. Gleichermaßen ergaben die Elektroretinographie sowie die Untersuchung in der optokinetischen Trommel keinen Hinweis auf eine funktionale Beeinträchtigung der Retina oder des zentralen visuellen Systems (Kapitel 3.2.3.3). Trotz einer vorhandenen Expression kann dem Gen *Eya3* in der Maus anhand der vorliegenden Ergebnisse somit keine Funktion im Auge zugewiesen werden. Dieses Resultat wurde im Grundsatz durch den später am Zebrafisch durchgeführten Morpholino-Knockdown für *Eya3* bestätigt. Auch hier konnten keine Veränderungen bei der Ausbildung der Augen beobachtet werden (Kapitel 3.3.2).

Zunächst stellen diese Ergebnisse einen auffälligen Unterschied zu der festgestellten Bedeutung des Gens *eyes absent* in der Ausbildung des

Facettenauges in *Drosophila* dar. Bei näherer Betrachtung stehen sie jedoch in Einklang mit den Ergebnissen zur Funktion von *Eya1*, 2 und 4 sowie weiteren Genen des RDGN in Vertebraten. So konnte für die ebenfalls im Auge der Maus exprimierten Gene *Eya1* und *Eya2* in keiner der beiden Mutanten ein pathologischer Befund am Auge gezeigt werden (Xu et al., 1999; Grifone et al., 2006). Auch bei *Eya1/Eya2*-Doppelmutanten waren keine Veränderungen am Auge zu beobachten (Grifone et al., 2006). Für *Eya4*, dessen Expression als einziges Gen dieser Genfamilie bisher nicht im Auge nachgewiesen werden konnte (Borsani et al., 1999), wurden weder in der Maus (Depreux et al., 2008) noch im Menschen (Schönberger et al., 2004) Veränderungen am Auge beobachtet.

Den bisher einzigen Beleg für eine mögliche Funktion der *Eya*-Gene im Auge der Vertebraten lieferten Ergebnisse aus Studien am Menschen. Hier konnte bei Patienten mit einer Mutation im *EYA1*-Gen ein Zusammenhang mit der Bildung erblicher Anomalien des vorderen Augensegments, insbesondere der Ausbildung einer Katarakt, hergestellt werden (Azuma et al., 2000). Dieses fand sich jedoch nur in einigen wenigen Fällen, in anderen Fällen führten Mutationen im humanen *EYA1*-Gen nicht zu einem pathologischen Augenphänotyp (Vervoot et al., 2002). Auch die Tatsache, dass die schon angesprochene Expression von cDNA der murinen Gene *Eya1-3* in *eya*-Mutanten von *Drosophila* die Ausbildung von Augen bewirken konnte (Bonini et al., 1997; Bui et al., 2000), stellt für sich noch keinen ausreichenden Hinweis auf eine augenspezifische Funktion der *Eya*-Gene in Vertebraten dar (Donner und Maas, 2004).

In der Summe betrachtet, deuten alle Ergebnisse der bisher vorgenommenen Analysen am Auge daraufhin, dass *Eya3* kein entscheidender Faktor in der Augenentwicklung ist, sondern höchstwahrscheinlich nur eine bisher nicht entdeckte, unterschwellige Funktion im Auge innehat. In Verbindung mit den Resultaten der Studien an den Mausmodellen zu *Eya1*, *Eya2* und *Eya4* (Xu et al., 1999; Grifone et al., 2006; Depreux et al., 2008) ist damit gezeigt, dass die murinen *Eya*-Gene im Gegensatz zu *eyes absent* in *Drosophila* keine wichtige Rolle in der Morphogenese und Funktion des Auges wahrnehmen, sondern höchstwahrscheinlich andere Aufgaben im Organismus erfüllen.

Denkbar ist, dass die *Eya*-Gene, und hier im Besonderen *Eya3*, im Zuge der Evolution neue Funktionen in den Vertebraten hinzugewinnen konnten oder

andere Genfunktionen mehr Bedeutung erlangt haben. Einen wesentlichen Anteil an solchen Prozessen kann die Änderung der regulatorischen Kontrolle für ein Gen haben (Kawakami et al., 2000). In *Drosophila* wird *eyes absent* durch das Gen *eyeless* reguliert (Halder et al., 1998). Dagegen konnte in der Maus nur ein begrenzter Einfluss von *Pax6*, dem orthologen Gen zu *eyeless*, *in vitro* nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.4.2), nicht jedoch *in vivo* (Kapitel 3.1.4.1). Dieses kann als weiterer Hinweis auf eine Genfunktion von *Eya3* außerhalb des Auges in Vertebraten gewertet werden. Für die Übernahme von Aufgaben außerhalb der Augenentwicklung spricht auch das Vorkommen von orthologen Genen zu *eyes absent* in augenlosen Organismen. So finden sich zum Beispiel orthologe Gene im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Furuya et al., 2005) oder in der zu den Manteltieren gehörenden Art *Ciona intestinalis* (Mazet et al., 2005).

Eine abschließende Antwort auf die Frage nach einer augenspezifischen Funktion der Gene *Eya1-4* in Vertebraten kann jedoch aufgrund einer möglichen Redundanz erst mit dem gleichzeitigen Ausschalten aller vier Gene in einem Organismus gegeben werden.

### 4.3.2 Aufklärung einer Funktion von *Eya3* außerhalb des Auges

#### 4.3.2.1 Expressionsmuster von *Eya3*

Die schon in *Drosophila* bei einer Missexpression auffälligen Effekte außerhalb des Auges, wie z.B. in der Ausbildung des Nervensystems oder der Muskulatur (Bonini et al., 1993; Boyle et al., 1997; Bonini et al., 1998), verdeutlichen, dass schon *eyes absent* weitere Funktionen im Organismus wahrnimmt (Kapitel 1.3). Dieses zeigt sich auch für die orthologen Gene *Eya1*, *2* und *4* in Vertebraten (Kapitel 1.3, Tab. 1.1)

Erste Hinweise auf mögliche Funktionen für *Eya3* konnte das Expressionsprofil in der Maus geben. Die diesbezüglich vorgenommenen Analysen (Kapitel 3.2.2) haben gezeigt, dass *Eya3*, wie auch schon andere Gene des RDGN, ein breites Expressionsspektrum aufweist. Es ergaben sich jedoch innerhalb des erstellten Expressionsprofils von *Eya3* Schwerpunkte, die embryonal im Telencephalon, im Tectum sowie in den Anlagen der Extremitäten und der Wirbelsäule lagen und im adulten Organismus im Gehirn, im Herz, im Skelettmuskel und in der Niere zu

finden waren. Hinsichtlich des Expressionsmusters ergeben sich außerdem Übereinstimmungen mit den *Six*- und *Dachshund*-Genen des RDGN, was die Möglichkeit einer synergistischen Aktivität zwischen *Eya3* und diesen Genen nahe legt. Eine Interaktion der Gene ist in diesen Bereichen somit sehr gut vorstellbar. Die nachfolgende Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht der Gewebe, in denen die Gene *Six1-6* und *Dachshund1-2* exprimiert werden.

**Tabelle 4.2** Zusammenfassende Übersicht des Expressionsmusters der Gene *Six1-6* und *Dachshund1-2* in Vertebraten.

Gen	Expressionsmuster
<i>Six1</i>	Zentrales Nervensystem, Kiemenbögen, Muskel, Testis, Nieren, Notochord, otische und nasale Plakode, Somiten, Anlagen der Extremitäten und Extremitäten, Dorsalwurzelganglien, Handplatte
<i>Six2</i>	Kiemenbögen, Darm, Metanephros, Anlagen der Extremitäten , Handplatte, Somiten
<i>Six3</i>	Telencephalon, Auge
<i>Six4</i>	Otisches Bläschen, nasale Plakode, Somiten, Kiemenbögen, Dorsalwurzelganglien, Myotom, Extremitäten, Fingermesenchym, Notochord, Skelettmuskulatur, Somiten, Dermamyotom, Cochlea, Auge
<i>Six5</i>	Telencephalon, Cerebellum, Thalamus, Hypothalamus, Kiemenbögen, Somiten, Extremitätenanlagen, Auge, Herz, Leber, Skelettmuskel
<i>Six6</i>	Telencephalon, Auge
<i>Dach1</i>	Gehirn, Extremitäten, Auge, Handplatte
<i>Dach2</i>	Gehirn, Extremitäten, Auge

#### 4.3.2.2 *Eya3* - eine Funktion im neuronalen Wachstum ?

Die Expressionsanalyse konnte zeigen, dass *Eya3* schon früh in den sich entwickelnden neuronalen Strukturen des zentralen Nervensystems exprimiert wird (siehe Kapitel 3.2.2). Diese Beobachtung gab Anlass zu der Überlegung, ob *Eya3* während des Wachstums und der Migration eine regulatorische Funktion übernehmen und damit Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit oder die Orientierung der Nervenfasern hat. Ein solcher Einfluss auf das neuronale Wachstum ist schon für andere *Eya*-Gene bekannt. Untersuchungen an *Six1*<sup>-/-</sup>

und *Eya1*<sup>-/-</sup>-Embryonen haben gezeigt, dass es durch ein Ausschalten dieser Gene zu Störungen der neuronalen Differenzierung kommt und dadurch bedingt zu einer beeinträchtigten Projektion der Nervenfasern zu ihrem Zielort und sogar zu einem Verlust einzelner sensorischer Ganglien (Zou et al., 2004). Ebenso konnte in homozygoten *eya*-Mutanten von *Drosophila* eine desorganisierte Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems beobachtet werden (Bonini et al., 1998). Dabei scheint *eya* eine wichtige Rolle bei der Migration der Axone bestimmter Neuronentypen zu spielen (Miguel-Aliaga et al., 2004).

Die Untersuchung des neuronalen Wachstums in den Vorderextremitäten und der intersomitischen Region konnte keine Veränderungen des Wachstums der motorischen Neuronen in den *Eya3*-Mutanten aufzeigen. Aber ähnlich wie auch schon in *Six1*<sup>-/-</sup>- und *Eya1*<sup>-/-</sup>- Embryonen festgestellt (Zheng et al., 2003; Zou et al., 2004), ergaben sich Veränderungen an den sensorischen Neuronen. Der zum *Nervus trigeminus* gehörende *Nervus ophthalmicus* weist einzelne unregelmäßig und ungeordnet austretende Nervenfasern auf, die die Wachstumsrichtung des Hauptstrangs verlassen und dieser sogar teilweise entgegen gehen (Abb. 3.30). In wenigen Fällen scheinen sogar ganze Nervenfasern zu fehlen (Abb. 3.30 D). Eine Beeinträchtigung der Bildung und des Wachstums des V. Hirnnervs konnte auch in *Eya1*<sup>-/-</sup>- und *Six1*<sup>-/-</sup>-Embryonen beobachtet werden, bei denen das Wachstum des *N. trigeminus* reduziert ist (Zou et al., 2004). Die Beobachtung, dass andere Nerven, wie z.B. der *N. trochlearis*, keine Veränderungen in den homozygoten *Eya3*-Mutanten aufweisen, steht den getroffenen Feststellungen nicht entgegen. Denn auch in *Eya1*<sup>-/-</sup>-Embryonen sind nicht alle sensorischen Nervenstränge betroffen. Vielmehr ist denkbar, dass, ähnlich wie in *Eya1*-Mutanten, die Auswirkung des Verlustes von *Eya3* auf das Wachstum des Nervensystems nur bestimmte Bereiche wie den *N. trigeminus* betrifft, in denen *Eya3* auch exprimiert wird (Abb 3.22 E, F). *Eya3* könnte als Transkriptions-Cofaktor einen regulatorischen Einfluss auf Gene aus Signalketten haben, die beim Wachstum bzw. bei der Migration dieser Nervenfasern eine Rolle spielen.

#### 4.3.2.3 Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der *Eya3*-Mutante

Zur Aufklärung weiterer Aufgaben, die *Eya3* im Zuge der Entwicklung im Organismus übernommen haben könnte, wurde die Mausmutante umfassend in der Deutschen Mauslinik (*German Mouse Clinic, GMC*) untersucht. Im Rahmen dieser Analysen wurden 28 männliche (14 Wildtypen, 14 Homozygote) und 20 weibliche (10 Wildtypen, 10 Homozygote) Tiere miteinander verglichen (Kapitel 3.2.3.1). Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen befindet sich im Anhang (Kapitel 6.2).

Die initiale morphologische Untersuchung zeigte im Ergebnis ein verringertes Körpergewicht und eine verringerte Körperlänge in *Eya3*-Mutanten beiderlei Geschlechts, wobei die Werte bei den männlichen Tieren signifikant verringert waren (Anhang, Abb. 6.5). Diese Unterschiede suggerieren eine Beeinträchtigung der allgemeinen körperlichen Konstitution in den Mutanten, die zu einer Reduzierung des Größenwachstums führt. Ein Effekt auf das Körpergewicht ist auch in homozygoten *Eya4*-Mausmutanten zu beobachten, die ebenfalls eine Verringerung des Körpergewichts gegenüber den heterozygoten Mutanten und Wildtyp-Kontrollen aufweisen (Depreux et al., 2008). Die neben der Veränderung des Körpergewichts noch in 56 % der homozygoten *Eya3*-Mutanten auffallende geringere Größe des Kopfes und die abgeflachte Schnauze könnten ebenfalls auf das eingeschränkte Wachstum der Tiere zurückzuführen sein, die zu der Entstehung der „Kind“-ähnlichen Kopfform führen (Abb. 6.6).

Die auf den Metabolismus bezogenen Untersuchungen waren insbesondere im Hinblick auf eine Fehlfunktion der Nieren interessant, nachdem die Expressionsanalyse gezeigt hatte, dass *Eya3* in den Nieren der adulten Tiere exprimiert wird. Bei der Analyse der Stoffwechselfunktionen konnte jedoch keine Beeinträchtigung in den *Eya3*-Mutanten festgestellt werden. Dieses steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der pathologischen Untersuchung, bei der keine morphologischen Veränderungen der Nieren festgestellt werden konnten. Im Gegensatz zu anderen Genen des RDGN, namentlich *Eya1*, dessen Knockout bei Mäusen zu einem Verlust der Nieren führt (Xu et al., 1999) und *Six1*, dessen Ausfall ebenfalls schwere Nierendefekte bewirkt (Ozaki et al., 2004), hat *Eya3* keine entscheidende Aufgabe in den Stoffwechselorganen.

Hingegen konnte bei der Untersuchung der Lungenfunktion ein verringertes respiratorisches Volumen im Ruhezustand bei den *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren beobachtet werden (Kapitel 6.2). Unter Berücksichtigung des Körpergewichts, war die Verminderung des respiratorischen Volumens in den Mutanten sogar noch auffälliger. Auch wenn sich allein aus diesen Ergebnissen noch keine Verbindung zu den Symptomen des *branchio-oto-renal* (BOR)-Syndroms ziehen lässt, so könnte dieses jedoch ein weiterer Hinweis auf eine Beeinträchtigung der gesamtkörperlichen Konstitution in den *Eya3*-Mutanten sein.

Ein besonderes Augenmerk lag ferner auf den Ergebnissen aus dem auditiven Test mit dem das Hörvermögen der Mutanten analysiert wurde. Eine Störung auditiver Funktionen ist für einen Teil der Gene des RDGN durchaus charakteristisch. So kommt es in *Eya1*<sup>-/-</sup>- Mäusen zu einem gänzlichen Verlust des Außenohres und zu schweren Defekten des Mittel- und Innenohres (Xu et al., 1999). Während es in *Eya4*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu chronischen Entzündungen des Mittelohres aufgrund einer anatomischen Veränderung der Mittelohrhöhle kommt (Depreux et al., 2008). Eine Fehlfunktion des Gehörs findet sich auch bei Menschen mit einer Mutation im *EYA1*-Gen, die zusammen mit anderen klinischen Symptomen das BOR-Syndrom kennzeichnet. Bei humanen Patienten mit einer Mutation im *EYA4*-Gen findet sich ebenfalls ein Hörverlust. Eine Erklärung für diese Parallele zwischen *Eya1* und *Eya4* könnte der hohe Grad an Sequenzidentität in der Eya-Domäne zwischen *Eya1*- und *Eya4*-Proteinen bieten, der mit 90 % höher ist als mit anderen Eya-Proteinen in diesem Bereich. Die Eya-Domäne von *Eya4* und *Eya3* teilen beispielsweise eine Sequenzidentität von lediglich 72 %, was die Identität von *Eya4* zu *eya*-Proteinen aus *Drosophila* (70 %) kaum übersteigt (Borsani et al., 1999). Die Ermittlung des Hörvermögens bei *Eya3*-Mutanten ergab demnach auch keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Abb. 6.7) und zeigt, dass *Eya3* im Gegensatz zu *Eya1* oder *Eya4* keinen unmittelbaren Einfluss auf auditive Funktionen hat.

Interessanterweise finden sich in *Six1*-defizienten Mäusen neben den Nierendefekten auch die Beeinträchtigungen bei der Ausbildung des Gehörorgans wieder. Dieses Auftreten vergleichbarer Phänotypen bei verschiedenen Genen des RDGN kann als ein Hinweis auf ein synergistisches Wirken der einzelnen Gene dieses Netzwerkes bei bestimmten Aufgaben im

Organismus betrachtet werden. Dabei kommt es bei einem Ausfall der Genfunktion zu ähnlichen pathologischen Phänotypen. Gleichzeitig kann es aber auch zu kompensatorischen Effekten kommen, insbesondere innerhalb der gleichen Genfamilie (Klesert et al., 2000; Ozaki et al., 2001).

### **Analyse der Muskelkraft**

Ein synergistisches Zusammenwirken ist schon mehrfach für das aus den *Six*-, *Eya*- und *Dach*-Genen gebildete Netzwerk beschrieben worden, insbesondere auch für ein Zusammenwirken bei der Entwicklung und Funktion der Muskulatur. So zeigen *Eya1<sup>-/-</sup>/Eya2<sup>-/-</sup>*-Embryonen einen Verlust der Muskulatur in den vorderen und hinteren Extremitäten, den man in keiner der beiden Einzelmutanten findet (Grifone et al., 2006). Außerdem wirken *Eya2*, *Six1* und *Dach2* während der Myogenese im Hühnerembryo regulatorisch zusammen (Heanue et al., 1999). Auch in den *Eya3*-Mutanten konnte die Messung der Muskelkraft eine auffällige Veränderung gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe zeigen. Durch den Test der Muskelkraft in den vorderen Extremitäten (sog. „Grip strength“-Test) wurde belegt, dass diese in den homozygoten Mutanten beiderlei Geschlechts signifikant verringert ist (Kapitel 6.2, Abb. 6.9).

Eine potentielle muskuläre Funktion von *Eya3* passt zu Daten aus *in vitro*-Experimenten, die eine Funktion für *Eya3* in der Proliferation von kardialen Myoblasten des Zelltyps C2C12 der Maus zeigen konnten (Li et al., 2003). Hier verhinderte die Injektion von siRNAs gegen *Eya3* die Proliferation der C2C12-Zellen und zeigt somit eine Funktion für *Eya3* in muskelspezifischen Zellen. Für eine Aufgabe von *Eya3* in der Muskulatur spricht besonders, dass Studien am *Myogenin*-Promotor eine sehr deutliche Aktivierung bei gleichzeitiger Expression von *Eya3* mit *Six4* oder *Six5* zeigen konnten (Ohto et al., 1999). Dabei wurde eine stark erhöhte Konzentration des sonst cytoplasmatisch lokalisierten *Eya3*-Proteins im Nukleus beobachtet, was auf eine Interaktion und Komplexbildung zwischen den *Eya3*- und *Six4*- oder *Six5*-Proteinen hindeutet. Diese Komplexbildung konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden (Ohto et al., 1999). Wahrscheinlich ist, dass *Eya3*-Proteine in der Muskulatur mit Proteinen der Gene *Six1*, *Six4* oder *Six5* zusammenwirken (s. auch Abb. 4.1).

Wie in früheren Studien gezeigt, hängt die Expression von *Myogenin*, einem der wesentlichen Faktoren in der embryonalen Myogenese, maßgeblich vom Binden

der Six1-, Six4- oder Six5-Proteine an eine MEF3 (*myogenic enhancer factor 3*)-Transkriptionsfaktorbindestelle im *Myogenin*-Promotor ab (Spitz et al., 1998; Ohto et al., 1999; Laclef et al., 2003). Daher ist es nicht verwunderlich, dass pathologisch relevante muskuläre Phänotypen auch aus Untersuchungen an Six-Genen bekannt sind. So kommt es beim Ausschalten von *Six1* neben einer starken Beeinträchtigung der Entwicklung des Skeletts, der Ohren und der Nieren auch zu Störungen bei der Ausbildung der Muskulatur, insbesondere an den Vorderextremitäten (Li et al., 2003; Zheng et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Laclef et al., 2003), die durch einen Doppel-Knockout von *Six1* und *Six4* noch verstärkt werden (Grifone et al., 2004).

Dieses verdeutlicht, dass zumindest ein Teil der Eya- und Six-Proteine entscheidend in die Myogenese der Vertebraten eingebunden ist. Dabei lassen die für *Eya3* festgestellten Defizite in der Muskulatur der Vorderextremitäten auf eine mögliche coaktivierende Funktion von *Eya3* in der Myogenese schließen. Hierfür spricht neben dem aktivierenden Einfluss auf den *Myogenin*-Promotor auch die Überlappung der Expression von *Eya3* mit den Genen *Six1*, *4* und *5* während der Myogenese (Tab. 4.2). So z.B. in den Anlagen der Extremitäten, aber auch in den Somiten, aus denen im Laufe der embryonalen Entwicklung die für die Ausbildung der Skelettmuskulatur erforderlichen Myoblasten hervorgehen und in denen auch *Pax3*, *Six1* und *Six4* exprimiert werden.

### **Analyse der Herzfunktion**

Die Analyse der Herzfunktion in den *Eya3*-Mäusen offenbarte außerdem Hinweise auf eine Aufgabe für *Eya3* im Herzmuskel. Bei der Aufzeichnung der Erregungsleitung im Herzen durch das Elektrokardiogramm (EKG) (Abb. 6.10) konnte eine Verlängerung des PQ-Intervalls beobachtet werden (Abb. 6.10, 6.11). Hierbei handelt es sich um ein Maß für die atrioventrikuläre Überleitungszeit, d.h. für die Zeit zwischen der Entstehung des Aktionspotentials im Sinusknoten bis zur Erregung der Ventrikel. Ursächlich für eine Verlängerung dieser Phase kann ein atrioventrikulärer (AV)-Block I.Grades sein, der durch eine Verzögerung der Reizüberleitung im Atrio-Ventrikular-Knoten bedingt ist (Hick und Hick, 1999). Ebenso verlängert ist das JT-Intervall (Abb. 6.11), welches die ventrikuläre Repolarisierung kennzeichnet (Hlaing et al., 2005). Die verringerte Amplitude des QRS-Komplexes (Abb. 6.11), der die Depolarisierung der

Ventrikel darstellt, wurde vermutlich durch eine leichte Verschiebung der elektrischen Achse des Herzens hervorgerufen (A. Schrewe, persönliche Mitteilung). Auch wenn die beobachteten Effekte nicht auf eine schwere Funktionsstörung des Herzens in den homozygoten Mutanten schließen lassen, so zeigen diese doch eine Veränderung der normalen Herzfunktion, die als Signal für einen Einfluss von *Eya3* auf die Erregungsleitung im Herzen zu deuten ist. Ursächlich für eine solche Veränderung der Erregungsleitung kann dabei eine Verzögerung des Ionen-Transports im Herzen sein, der zu einem Anstieg der Zeit für die Erregungsüberleitung führt (Hick und Hick, 1999).

Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Erregungsleitung im Herzen, die sich vor allem in einer verlängerten atrioventrikulären Überleitung manifestierten, fanden sich auch in *Nkx2.5* transgenen Mäusen (Wakimoto et al., 2003). Auch im Menschen konnten Mutationen im Gen *Nkx2.5* mit vererbaren Erkrankungen des Herzens in Verbindung gebracht werden (Schott et al., 1998; McElhinney et al., 2003). *Nkx2.5* wird in den Vorläuferzellen des Herzens exprimiert und ist ein wichtiger Regulator in der Kardiogenese (Zhu et al., 2000). Interessanterweise finden sich im Promotor des *Eya3*-Gens zwei hochkonservierte *Nkx2.5*-Bindestellen (Kapitel 6.4), die die Möglichkeit der Regulation von *Eya3* durch *Nkx2.5* eröffnen (Abb. 4.1).

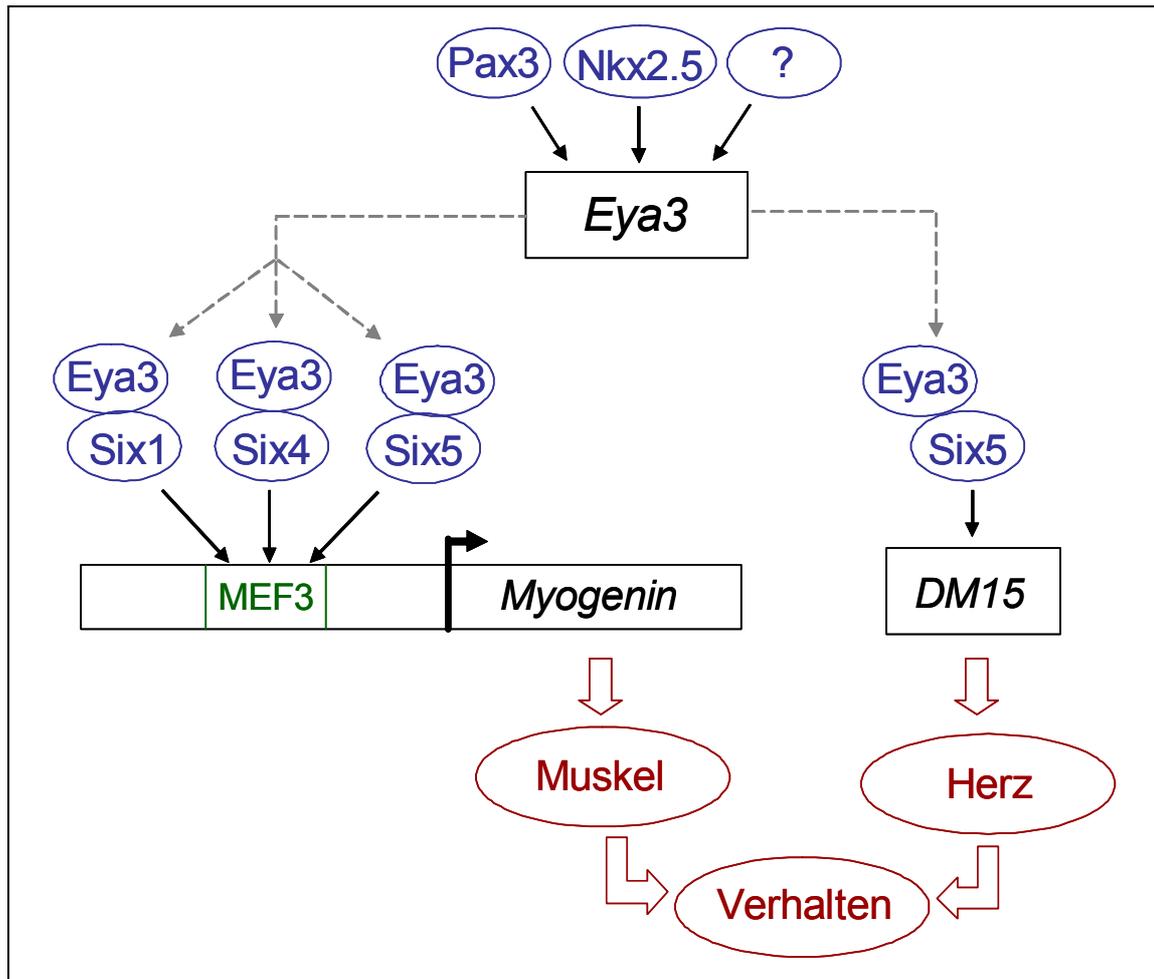
Eine Beteiligung der Gene aus dem RDGN an der Entwicklung und Funktion des Herzens ist schon aus anderen Studien bekannt. So zeigten Untersuchungen in Patienten, dass *EYA4* an der Herzfunktion beteiligt ist, indem Mutationen in diesem Gen zu einer Herzinsuffizienz führen (Schönberger et al., 2004). Ferner konnten Studien an Ratten zeigen, dass *Eya2* während des Prozesses der Rückbildung einer experimentell induzierten kardialen Hypertrophie deutlich hoch reguliert ist, was durch Untersuchungen in Gewebekultur bestätigt wurde (Yang et al., 2007). Überdies findet sich bei Patienten, die an der durch verschiedene Symptome gekennzeichneten Muskeldystrophie (DM) leiden, eine Beeinträchtigung der atrioventrikulären Erregungsleitung im Herzen als klinischer Phänotyp (Berul et al., 1999; Cho und Tapscott, 2007). Studien an *Six5*-defizienten Mäusen konnten zwar Defizite bei der Herzfunktion durch ein verlängertes QRS-Intervall zeigen, jedoch nicht den AV-Block der DM-Patienten nachahmen (Wakimoto et al., 2002). Allerdings zeigen *Six5*-defiziente Mäuse eine deutliche Abnahme der Expression von *DM15*, dem murinen Homolog des

ebenfalls an der Muskeldystrophie beteiligten *DMPK* (*myotonic dystrophy protein kinase*)-Gens (Sarkar et al., 2000). Diese Expressionsabnahme legt eine direkte Regulation von *DM15* durch *Six5* nahe (siehe auch Abb. 4.1).

*DM15*-defiziente Mäuse wiederum leiden, je nach Genotyp, an einem AV-Block unterschiedlichen Grades (Berul et al., 1999), was die Beteiligung von *DM15* an der Erregungsleitung des Herzens demonstriert. Bei der bereits nachgewiesenen Kooperation von *Eya3*- und *Six5*-Proteinen (Ohto et al., 1999), ist es denkbar, dass der Verlust der *Eya3*-Expression zu einer reduzierten Aktivierung des *DM15*-Gens führt und mithin zur Ausprägung eines AV-Blocks I.Grades in *Eya3*-Mutanten. Es wäre folglich erstrebenswert, mit Hilfe weiterer Experimente eine solche Aktivierung von *DM15* durch einen *Eya3/Six5*-Komplex zu bestätigen (siehe auch Abb. 4.1).

### **Verhaltensanalyse**

Die Beeinträchtigung der Herz- und Muskelleistung in *Eya3*-Mutanten ist auch eine mögliche Ursache für die bei der Verhaltensanalyse mit dem sog. modified Hole Board Test (Ohl et al., 2001; Kallnik et al., 2007) ermittelten Veränderungen beim spontanen Verhalten in einer neuen Umgebung. So konnte neben einem veränderten Explorationsverhalten vor allem eine Reduzierung der vorwärts gerichteten Lokomotion gezeigt werden. Diese Veränderung des lokomotorischen Verhaltens äußerte sich in der Abnahme der im Untersuchungszeitraum zurückgelegten Distanz und in einer reduzierten Bewegungsgeschwindigkeit der Tiere. Es liegt der Schluss nahe, dass sich die reduzierte Bewegungsaktivität der Tiere aus den zuvor dargestellten Beeinträchtigungen der Muskelkraft und der kardialen Erregungsleitung in den *Eya3*-Mutanten ergibt (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1** Zusammenfassende Darstellung der möglichen Beziehungen, die zur Ausbildung der beobachteten Veränderungen an Herz, Muskel und Verhalten in *Eya3*-Mutanten führen. *Eya3* wird durch Nkx2.5, Pax3 oder andere, noch unbekannte Transkriptionsfaktoren aktiviert und interagiert nachfolgend auf Proteinebene mit Six1, Six4 oder Six5. Durch die Ausbildung eines Proteinkomplexes werden muskelspezifische bzw. herzspezifische Gene wie *Myogenin* oder *DM15* aktiviert. In den Mutanten führt die fehlende Eya-Domäne zu einem Verlust der Interaktion mit Six1, 4 oder 5, und damit zur Ausbildung der beobachteten pathologischen Veränderungen an Muskel und Herz, die sich wiederum auf das lokomotorische Verhalten der Tiere auswirken. (Proteine und Proteinkomplexe sind blau dargestellt; schwarze, durchgezogene Pfeile deuten einen regulatorischen Einfluss an; rote Pfeile weisen auf die phänotypischen Veränderungen hin)

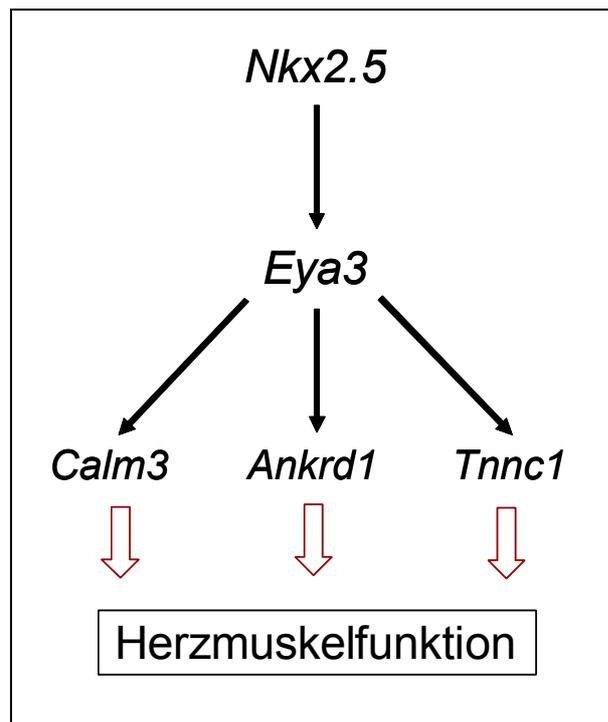
#### 4.3.2.4 Differentielle Genexpressionsanalyse in *Eya3*-Mutanten mittels cDNA-Microarray

Die Untersuchung einer veränderten Genexpression in den *Eya3*-Mutanten konnte eine Reihe von Möglichkeiten zur Funktion von *Eya3* innerhalb molekularer Netzwerke aufzeigen. So konnte die Analyse des Microarray-Chip eine Vielzahl von verändert exprimierten Genen in Herz und Gehirn der Mutanten ermitteln (Kapitel 6.3, Tab. 6.1 und 6.2), von denen das Gen

*Nucleoporin155 (Nup155)* besonders auffällig war, da dieses Gen in Herz und Gehirn der Mutanten gleichermaßen herunterreguliert ist. Eine Überprüfung der Ergebnisse mit der Real-Time PCR bestätigte die Resultate vom Microarray-Chip und lässt *Nup155* als einen interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen erscheinen. *Nup155*-Proteine sind Bestandteil der Kernporenkomplexe und haben eine wichtige Funktion beim Export von Makromolekülen wie mRNAs aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Außerdem ist *Nup155* an der Bildung der nuklearen Hülle während der Zellteilung beteiligt und hat daher einen wichtigen Einfluss auf die Zellproliferation. Ein Verlust von *Nup155* führt zum Fehlen der nuklearen Lamina und zu Defekten bei der Chromosomensegregation während der Anaphase (Franz et al., 2005). Für *Eya*-Gene werden unter anderem regulatorische Funktionen während der Zellproliferation vermutet (Kapitel 1.3). Hier besteht die Möglichkeit einer Verbindung zu *Nup155*. *Eya3* könnte während der Proliferation direkt oder indirekt auf die Transkription von *Nup155* einwirken.

Eine Analyse mit der Software *Bibliosphere Pathway Edition* (Genomatix, München) hinsichtlich der in den Datenbanken abgelegten funktionellen Annotationen zu den regulierten Genen in Gehirn und Herz auf eine Überrepräsentation bestimmter Funktionen konnte für die im Gehirn regulierten Gene eine Reihe von Hinweisen liefern. So waren Begriffe wie „Beteiligung an makromolekularen biosynthetischen Prozessen“ bzw. „struktureller Bestandteil des Cytoskeletts oder der Ribosomen“ überrepräsentiert. Außerdem waren einige der regulierten Gene mit Prozessen wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskaden oder Apoptose assoziiert. Eine ähnliche Analyse für die im Herz regulierten Gene scheiterte an der zu geringen Anzahl, aber viele der identifizierten Gene übernehmen speziell das Herz betreffende Funktionen. So ist das Gen *Troponin C (Tnnc1)* an der Herzmuskelkontraktion beteiligt, *Calmodulin3 (Calm3)* ist in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-transport eingebunden und *Ankyrin repeat domain1 (Ankrd1)* wird während der kardialen Myogenese benötigt (Gaborit et al., 2007; Zou et al., 1997). *Ankrd1*, teilweise auch als *Carp (cardiac ankyrin repeat protein)* bezeichnet, wird direkt oder indirekt von *Nkx2.5* reguliert, wie Studien in *Nkx2.5* transgenen Tieren und in Gewebekultur zeigen konnten (Zou et al., 1997). Hier ergibt sich eine interessante Verknüpfung zu den schon angesprochenen *Nkx2.5*-Bindestellen im *Eya3*-Promotor (Kapitel 4.3.2.3 und Kapitel 6.4). *Eya3*

könnte durch *Nkx2.5* reguliert werden und so Einfluss auf die Expression von *Ankrd1* nehmen. Ein Einfluss auf *Calm3* oder *Tnnc1* ist in der gleichen Art und Weise denkbar. Die verringerte Expression dieser Gene kann mit ursächlich für die beobachteten Beeinträchtigungen der Herzmuskelfunktion in den *Eya3*-Mutanten sein (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2** Die differentielle Genexpressionsanalyse konnte eine Vielzahl verändert exprimierter Gene im Herz und Gehirn der *Eya3*-Mutanten aufzeigen. *Calm3*, *Ankrd1* und *Tnnc1* sind drei im Herz von *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren verringert exprimierte Gene. *Ankrd1* wird direkt oder indirekt von *Nkx2.5* reguliert. Auch im *Eya3*-Promotor finden sich *Nkx2.5*-Bindestellen. Denkbar ist das *Eya3* durch Gene wie *Nkx2.5* reguliert wird und es so zu der verringerten Expression von *Ankrd1* oder auch *Calm3* sowie *Tnnc1* in den *Eya3*-Mutanten kommt. Dieses kann wiederum zu den beobachteten Beeinträchtigungen in der Herzmuskelfunktion beitragen.

#### 4.4 Vergleichende Studien zu *Eya3* im Zebrafisch

Als eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung möglicher Aufgaben von *Eya3* in Vertebraten wurde ein Interspeziesvergleich mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) genutzt. Die Methode des Interspeziesvergleiches zur Identifizierung der Aufgaben eines Gens kam in der Vergangenheit bereits häufig zur Anwendung. So gelang es mit dieser Vorgehensweise im Fall von *Pax6* ähnliche Expressionsmuster eines Gens mit vergleichbaren Funktionen zwischen verschiedenen Vertebratenspezies zu korrelieren (Halder et al., 1995; Grindley

et al., 1995). Auch wenn sich diese Methodik schon vielfach bewährt hat, kann es doch mit der Expansion eines Genoms und der damit einhergehenden Duplikation von Genen zum Erwerb neuer Genfunktionen oder zu einer Aufteilung vorhandener Funktionen kommen (Cañestro et al., 2007). Bezogen auf die *Eya*-Gene ist somit vorstellbar, dass mit der Duplikation einhergehend eine Aufteilung vorhandener regulatorischer Aufgaben erfolgte und sogar neue hinzugewonnen wurden, die zu unterschiedlichen Funktionen der *Eya*-Gene zwischen verschiedenen Vertebratenspezies geführt haben könnten. Um eben solche Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Spezies aufzuzeigen, wurden die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit auf die entfernt verwandte Vertebratenspezies des Zebrafisches ausgedehnt. So konnten die aus den Untersuchungen in der Maus gewonnenen Daten mit den Ergebnissen der Untersuchungen zu *Eya3* im Zebrafisch verglichen werden. Außerdem konnten die Daten auch in Bezug zu den vorhandenen Ergebnissen zum *Xenopus* Homolog *Xeya3* (Kriebel et al., 2007) gesetzt werden, die auf eine Funktion von *Xeya3* während der frühen Neurogenese schließen lassen.

Ein Vergleich von Maus, Zebrafisch und *Xenopus* offenbarte auffällige Unterschiede bei der Betrachtung der Expressionsmuster für *Eya3* in diesen Organismen. Im *Xenopus* findet sich eine spezifische Expression von *Xeya3*, die sich auf den vorderen Teil der Neuralplatte mit den Bereichen des zukünftigen Gehirns und der Augen beschränkt (Kriebel et al., 2007). Dagegen zeigen die Analysen aus Maus und Zebrafisch eine ubiquitäre Expression von *Eya3* in den frühen Phasen der embryonalen Entwicklung. Erst mit dem Ende der Neurulation kommt es zu einer Beschränkung auf distinkte Regionen wie das zukünftige Vorderhirn oder das Auge in der Maus bzw. auf das Auge und das optische Tektum im Zebrafisch (Abb. 3.21, 3.22 und 3.34). Die verschiedenen Expressionsmuster deuten schon an, dass die Möglichkeit unterschiedlicher Funktionen für *Eya3* in verschiedenen Vertebratenspezies besteht.

Dieser Eindruck bestätigte sich in den nachfolgenden funktionalen Untersuchungen. Weder in den Mausmutanten noch in den Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen ergaben sich Hinweise für eine Beteiligung von *Eya3* bei der frühen Genese neuronaler Strukturen wie der Neuralplatte und den daraus hervorgehenden Geweben. Dagegen scheint *Xeya3* einen starken Einfluss auf die Bildung der Neuralplatte und ihrer Derivate zu haben, wie die

---

Untersuchungen an Morpholino-injizierten *Xenopus*-Embryonen zeigen (Kriebel et al., 2007). Denn in den injizierten *Xenopus*-Embryonen waren Vorderhirn und Auge deutlich in der Größe reduziert oder die Ausbildung unterblieb sogar vollkommen. Hingegen offenbarten die Untersuchungen an Maus und Zebrafisch keine Größenreduzierung dieser Strukturen. Vielmehr waren die Augen in den murinen *Eya3*-Mutanten, wie schon für *Eya1*, *Eya2* oder *Eya4* berichtet (Xu et al., 1999; Grifone et al., 2006; Depreux et al., 2008), ohne histologischen oder funktionalen Befund (Kapitel 3.2.3.3 und 6.1). Auch die Augen in den mikroinjizierten Zebrafischembryonen entwickelten sich gleichermaßen wie in den nicht-injizierten Kontrolltieren (Kapitel 3.3.2), so dass vergleichbar dem Ausfall der Gene *eya1* oder *eya4* im Zebrafisch (Kozlowski et al., 2005; Schönberger et al., 2004) kein pathologischer Augenphänotyp festgestellt werden konnte. Ein direkter Einfluss von *Eya3* auf den Erhalt und die Proliferation der Vorläuferzellen der vorderen neuronalen Strukturen ist somit in den Mutanten für *Eya3* aus Maus oder Zebrafisch nicht ersichtlich.

Denkbar ist, dass die *Eya*-Gene im Zuge der Evolution verschiedene Funktionen in den Vertebraten übernommen haben und sich bei der Entwicklung des *Xenopus* beispielsweise spezifische Funktionen für *Xeya3* herausgebildet haben. Darauf lässt auch die Tatsache schließen, dass *Xeya3* als einziges Gen dieser Genfamilie im *Xenopus* spezifisch in den Strukturen der vorderen Neuralplatte exprimiert wird (Kriebel et al., 2007). Für eine Übernahme unterschiedlicher Funktionen seitens *Eya3* in verschiedenen Organismen der Vertebraten spricht auch das Ergebnis einer vergleichenden Analyse der *Eya3*-Promotorregion mit mVISTA zwischen Maus und Zebrafisch bzw. zwischen Maus und *Xenopus* (Kapitel 3.1.4.2). Das Resultat dieser Untersuchung zeigt, dass zwischen Maus und Zebrafisch (13 konservierte Abschnitte; 1325 bp mit 52,9 % konserviert) deutlich mehr und größere Abschnitte des untersuchten Bereichs konserviert sind als zwischen Maus und *Xenopus* (1 konservierte Region; 78 bp zu 50 % konserviert). Dieses lässt darauf schließen, dass eine Veränderung der auf *Eya3* einwirkenden regulatorischen Kontrolle zu einer Veränderung der Funktion von *Eya3* zwischen diesen verschiedenen Organismen geführt hat.

## 4.5 Ausblick

Die Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des *Eya3*-Gens konnten wichtige Hinweise zu Aufgaben von *Eya3* in den Vertebraten liefern. Es hat sich gezeigt, dass *Eya3* in Übereinstimmung mit dem komplexen Expressionsmuster des Gens während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus eine Vielzahl von Aufgaben übernimmt. Die Beobachtung verschiedener funktionaler Beeinträchtigungen in den *Eya3*-defizienten Mäusen, zeigt dass das Gen *Eya3* Einfluss auf unterschiedliche Körperfunktionen besitzt und mithin ein Beispiel für pleiotrope Genwirkungen darstellt. Die Auswirkungen manifestieren sich in verschiedenen Organen und Geweben, wie im Herz und in der Muskulatur aber auch in Teilen des Nervensystems und können als die gesamte körperliche Konstitution betreffende Veränderungen sichtbar werden, wie in dem veränderten lokomotorischen Verhalten und dem verringerten Größenwachstum der Mutanten zu erkennen ist. Insofern könnten weitere Untersuchungen noch unentdeckte Phänotypen aufzeigen, wobei es von besonderem Interesse wäre in zukünftige Untersuchungen auch die Analyse älterer Tiere einzuschließen, um altersabhängige Effekte besser darstellen zu können.

Dabei müssen die beobachteten Auswirkungen nicht notwendigerweise einheitlich zwischen verschiedenen Vertebratenspezies sein, wie die vorgenommenen Untersuchungen in Maus und Zebrafisch im Vergleich zum *Xenopus* zeigen. Vielmehr sind individuelle Analysen für eine funktionelle Bestimmung des *Eya3*-Gens in den einzelnen Spezies der Vertebraten notwendig. Deshalb liegt eine zukünftige Aufgabe in der Bestimmung der Funktion von *Eya3* in bisher nicht untersuchten Spezies.

Ein Schlüssel zur Erklärung der unterschiedlichen Funktionen von *Eya3* liegt in der Aufdeckung der regulatorischen Kontrolle des Gens. Zumindest die Ergebnisse aus den *in vitro*-Analysen in der Zellkultur haben Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von *Pax6* auf *Eya3* gegeben. Denkbar ist aber auch eine Vielzahl anderer Möglichkeiten zur regulatorischen Kontrolle von *Eya3*, wie schon die Ergebnisse zu *Prox1* andeuten. Deren Aufdeckung ist für das Verständnis der Genfunktion, von großer Bedeutung. Dabei kann aufgrund der unterschiedlichen pathologischen Phänotypen davon ausgegangen werden, dass *Eya3* unter der Kontrolle verschiedener Signalwege steht, die *Eya3*

---

gewebespezifisch aktivieren. Eine Möglichkeit wäre die indirekte Kontrolle durch *Pax3*, das eine wesentliche Rolle in der Steuerung der muskulären Entwicklung spielt. Aber auch andere Signalwege, insbesondere die für die Herzfunktion spezifischen Signalwege über *Nkx2.5*, könnten *Eya3* kontrollieren. Um dieses zu überprüfen und gleichzeitig mögliche Zielgene für *Eya3* zu identifizieren, über die bisher noch keine profunden Erkenntnisse bestehen, wären weitere *in vitro*-Analysen z.B. in einem Zellkulturtestsystem notwendig.

Für eine vielfältige Wirkung von *Eya3*, ohne dabei einen deutlichen klinischen Phänotyp hervorzurufen, spricht auch die Tatsache, dass beim Menschen bisher kein Krankheitsbild einer Mutation im *Eya3*-Gen zugeordnet werden konnte. Hierin liegt sicherlich eine ganz wesentliche Aufgabe für die Zukunft. Dabei können die Ergebnisse dieser Studie helfen, die Suche nach humanen Erkrankungen, die durch Mutationen im *Eya3*-Gen bedingt sein könnten, voranzutreiben.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Levi-Acobas F, Cruaud C, Le Merrer M, Mathieu M, König R, Vigneron J, Weissenbach J, Petit C, Weil D. 1997. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (*eyaHR*) of *EYA1*. *Hum Mol Genet* 6: 2247-2255.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Ashery-Padan R, Zhou X, Marquardt T, Herrera P, Toubé L, Berry A, Gruss P. 2004. Conditional inactivation of *Pax6* in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269: 479-488.
- Azuma N, Hirakiyama A, Inoue T, Asaka A, Yamada M. 2000. Mutations of a human homologue of the *Drosophila eyes absent* gene (*EYA1*) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum Mol Genet* 9: 363-366.
- Bai J, Montell D. 2002. *Eyes absent*, a key repressor of polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development* 129: 5377-5388.
- Baonza A und Freeman M. 2002. Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling. *Development* 129: 5313-5322.
- Berger J, Berger S, Tuoc TC, D'Amelio M, Cecconi F, Gorski JA, Jones KR, Gruss P, Stoykova A. 2007. Conditional activation of *Pax6* in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Development* 134: 1311-1322.
- Berul CI, Maguire CT, Aronovitz MJ, Greenwood J, Miller C, Gehrmann J, Housman D, Mendelsohn ME, Reddy S. 1999. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103: R1-R7.
- Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S. 1993. The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72: 379-395.
- Bonini NM, Bui QT, Gray-Board GL, Warrick JM. 1997. The *Drosophila eyes absent* gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124: 4819-4826.
- Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S. 1998. Multiple roles of the *eyes absent* gene in *Drosophila*. *Dev Biol* 196: 42-57.

- 
- Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A, Bulfone A, Bernard L, Banfi S, Gattuso C, Mariani M, Dixon M, Donnai D, Metcalfe K, Winter R, Robertson M, Axton R, Brown A, van Heningen V, Hanson I. 1999. *Eya4*, a novel vertebrate gene related to *Drosophila eyes absent*. Hum Mol Genet 8: 11-23.
- Boyle M, Bonini NM, DiNardo S. 1997. Expression and function of *clift* in the development of somatic gonadal precursors within the *Drosophila* mesoderm. Development 124: 971-982.
- Bui QT, Zimmermann JE, Liu H, Bonini NM. 2000. Molecular analysis of *Drosophila* *eyes absent* mutants reveals features of the conserved *Eya* domain. Genetics 155: 709-720.
- Buller C, Xu X, Marquis V, Schwanke R, Xu PX. 2001. Molecular effects of *Eya1* domain mutations causing organ defects in BOR syndrome. Hum Mol Genet 24: 2775-2781.
- Cañestro C, Yokoi H, Postlethwait JH. 2007. Evolutionary developmental biology and genomics. Nat Genet 8: 932-942.
- Cerf ME. 2006. Transcription factors regulating  $\beta$ -cell function. Europ J Endocrinol 155: 671-679.
- Chang EH, Menezes M, Meyer NC, Cucci RA, Vervoort VS, Schwartz CE, Smith RJ. 2004. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in *EYA1* and its phenotypic consequences. Hum Mutat 23: 582-589.
- Chen R, Amoui M, Zhang Z, Mardon G. 1997. Dachshund and Eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. Cell 81: 893-904.
- Chen R, Halder G, Zhang Z, Mardon G. 1999. Signalling by the TGF-beta homolog *decapentaplegic* functions reiteratively within the network of genes controlling retinal cell fate determination in *Drosophila*. Development 126: 935-943.
- Chi N, Epstein JA. 2002. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. Trends Genet 18: 41-48.
- Cho DH, Tapscott SJ. 2007. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. Biochim Biophys Acta. 1772: 195-204.
- Clark SW, Fee BE, Cleveland JL. 2002. Misexpression of the *Eyes absent* family triggers the apoptotic program. J Biol Chem. 277: 3560-3567.
- Clark IBN, Boyd J, Hamilton G, Finnegan DJ, Jarman AP. 2006. *D-six4* plays a key role in patterning cell identities deriving from the *Drosophila* mesoderm. Dev Biol 294: 220-231.

- Curtiss und Mlodzik. 2000. Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* 127: 1325-1336.
- Dalke C, Löster J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Soewarto D, Favor J, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W, Gekeler F, Shinoda K, Zrenner E, Meitinger T, Hrabé de Angelis M, Graw J. 2004. Electroretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice. *IOVS* 45: 601-609.
- Davis RJ, Shen W, Sandler YI, Amoui M, Purcell P, Maas R, Ou CN, Vogel H, Beaudet AL, Mardon G. 2001. *Dach1* mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 21: 1484-1490.
- Davis RJ, Pesah YI, Harding M, Paylor R, Mardon G. 2006. Mouse *Dach2* mutants do not exhibit gross defects in eye development or brain function. *Genesis* 44: 84-92.
- Depreux FF, Darrow K, Conner DA, Eavey RD, Liberman MC, Seidman CE, Seidman JG. 2008. *Eya4*-deficient mice are a model for heritable *otitis media*. *J Clin Inv* 118: 651-658.
- Donner AL, Maas RL. 2004. Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* 48: 743-753.
- Duncan MK, Kos Lidia, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Tomarev SI. 1997. *Eyes absent*: a gene family found in several metazoan phyla. *Mamm Genome* 8: 479-485.
- Franz C, Askjaer P, Antonin W, Iglesias CL, Haselmann U, Schelder M, de Marco A, Wilm M, Antony C, Mattaj IW. 2005. Nup155 regulates nuclear envelope and nuclear pore complex formation in nematodes and vertebrates. *EMBO J* 24: 3519-3531.
- Furuya M, Qadota H, Chisholm AD, Sugimoto A. The *C. elegans eyes absent* ortholog *Eya1* is required for tissue differentiation and plays partially redundant roles with *Pax6*. *Dev Biol* 286: 452-463.
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 582: 675-693.
- Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, et al. 2005. Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Meth* 2:404.
- Götz M, Stoykova A, Gruss P. 1998. *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21: 1031-1044.

- 
- Gong KQ, Yallowitz AR, Sun H, Dressler GR, Wellik DM. 2007. A Hox-Eya-Pax complex regulates early kidney developmental gene expression. *Mol Cell Biol* 27: 7661-7668.
- Goudreau G, Petros P, Renecker LW, Graw J, Gruss P. 2002. Mutually regulated expression of *Pax6* and *Six3* and its implications for the *Pax6* haploinsufficient lens phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8719-8724.
- Graw J, Löster J, Puk O, Münster D, Haubst N, Soewarto D, Fuchs H, Meyer B, Nürnberg P, Pretsch W, Selby P, Favor J, Wolf E, Hrabé de Angelis M. 2005. Three novel *Pax6* alleles in the mouse leading to the same small-eye phenotype caused by different consequences at target promoters. *IOVS* 46: 4671-4684.
- Grifone R, Laclef C, Spitz F, Lopez S, Demignon J, Guidotti JE, Kawakami K, Xu PX, Kelly R, Petrof BJ, Daegelen D, Concorde JP, Maire P. 2004. *Six1* and *Eya1* expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype. *Mol Cell Biol* 24: 6253-6267.
- Grifone R, Demignon J, Giordani J, Niro C, Souil E, Bertin F, Laclef C, Xu PX, Maire P. 2006. *Eya1* and *Eya2* proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Dev Biol* 302: 602-616.
- Grimm C, Chatterjee B, Favor J, Immervoll T, Löster J, Klopp N, Sandulache R, Graw J. 1998. 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: 299-316.
- Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. 1995. The role of *Pax6* in eye and nasal development. *Development* 121: 1433-1442.
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792.
- Halder G, Callaerts P, Flister S, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. 1998. *Eyeless* initiates the expression of both *sine oculis* and *eyes absent* during *Drosophila* compound eye development. *Development* 125 : 2181-2191.
- Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Mardon G, Oliver G, Tomarev S, Lassar AB, Tabin CJ. 1999. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2* and *Six1*, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 13: 3231-3243.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Götz M. 2002. Glia cells generate neurons: the role of the transcription factor *Pax6*. *Nat Neurosci* 5: 308-315.
- Hick C, Hick A. 2000. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Urban & Fischer Verlag, München.

- 
- Hill RE, Favor J, Hogan BLM, Ton CCT, Sauders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V. 1991. Mouse *small eye* results from mutations in a *paired*-like homeobox containing gene. *Nature* 354: 522-525.
- Hirsch N, Harris WA. 1997. Xenopus Pax6 and retinal development. *J Neurobiol* 32: 45-61.
- Hlaing T, DiMino T, Kowey PR, Yan GX. 2005. ECG repolarization waves: their genesis and clinical implications. *ANE* 10: 211-223.
- Hsiao FC, Williams A, Davies EL, Rebay I. 2001. Eyes absent mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Developmental Cell* 1: 51-61.
- Ikeda K, Watanabe Y, Ohto H, Kawakami K. 2002. Molecular interaction and synergistic activation of a promoter by Six, Eya and Dach protein mediated through CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 22: 6759-6766.
- Jean D, Bernier G, Gruss P. 1999. *Six6 (Optx2)* is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech Dev* 84:31-40.
- Jemc J, Rebay I. 2007a. The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu Rev Biochem* 76: 513-538.
- Jemc J, Rebay I. 2007b. Identification of transcriptional targets of the dual-function transcription factor/phosphatase eyes absent. *Dev Biol* 310: 416-429.
- Kallnik M, Elvert R, Ehrhardt N, Kissling D, Mahabir E, Welzl G, Faus-Kessler T, Hrabé de Angelis M, Wurst W, Schmidt J, Hölter SM. 2007. Impact of IVC housing on emotionality and fear learning in male C3HeB/FeJ and C57BL/6J mice. *Mamm Genome* 18: 173-186.
- Kamachi Y, Kondoh H. 1993. Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol* 13: 5206-5215.
- Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K. 2000. *Six* family genes – structure and function as transcription factors and their roles in development. *BioEssays* 22: 616-626.
- Klesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, Yuen EC, Soriano P, Tapscott SJ. 2000. Mice deficient in *Six5* develop cataracts : implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25: 105-109.
- Kozlowski DJ, Whitfield TT, Hukriede NA, Lam WK, Weinberg ES. 2005. The zebrafish *dog-eared* mutations disrupt *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line. *Dev Biol* 277: 27-41.

- 
- Kriebel M, Müller F, Hollemann T. 2007. *Xeya3* regulates survival and proliferation of neural progenitor cells within the anterior neural plate of *Xenopus* embryos. *Dev Dyn* 236: 1526-1534.
- Kumar P, Moses K. 2001. EGF receptor and Notch signaling act upstream of *Eyeless/Pax6* to control eye specification. *Cell* 104, 687-697.
- Laclef C, Souil E, Demignon J, Maire P. 2003. Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in *Six1* deficient mice. *Mech Dev* 120: 669-679.
- Lavado A, Oliver G. 2007. *Prox1* expression patterns in the developing and adult murine brain. *Dev Dyn* 236: 518-524.
- Lazaridis E, Saunders JC. 2008. Can you hear me now? A genetic model of *otitis media* with effusion. *J Clin Inv* 118: 471-474.
- Li X, Oghi KA, Zhang J, Krones A, Bush KT, Glass CK, Nigamm SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. 2003. Eya protein phosphatase activity regulates *Six1*-*Dach*-*Eya* transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426: 247-265.
- Makishima T, Madeo AC, Brewer CC, Zalewski CK, Butman JA, Sachdev V, Arai AE, Holbrook BM, Rosing DR, Griffith AJ. 2007. Nonsyndromic hearing loss DFNA10 and a novel mutation of *EYA4*. *Am J Med Gen* 143A: 1592-1598.
- Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, Pachter LS, Dubchak I. 2000. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 16: 1046-1047.
- Mazet F, Hutt JA, Milloz J, Millard J, Graham A, Shimeld SM. 2005. Molecular evidence from *Ciona intestinalis* for the evolutionary origin of vertebrate sensory placodes. *Dev Biol* 282: 494-508.
- McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. 2003. *Nkx2.5* mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 42: 1650-1655.
- Melnick M, Bixler D, Nance WE, Silk K, Yune H. 1976. Familial branchio-oto-renal dysplasia: a new addition to the branchial arch syndromes. *Clin Genet* 9: 25-34.
- Miguel-Aliaga I, Allan DW, Thor S. 2004. Independent roles of the *dachshund* and *eyes absent* genes in BMP signaling, axon pathfinding and neuronal specification. *Development* 131: 5837-5848.
- Nica G, Herzog W, Sonntag C, Nowak M, Schwarz H, Zapata A, Hammerschmidt M. 2006. *Eya1* is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Dev Biol* 292: 189-204.

- 
- Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME, Holsboer F. 2001. Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J Psychiatr Res* 35: 147-154.
- Ohto H, Takizawa T, Saito T, Kobayashi M, Ikeda K, Kawakami K. 1998. Tissue and developmental distribution of *Six* family gene products. *Int J Dev Biol* 42: 141-148.
- Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, Kawakami K. 1999. Cooperation of *Six* and *Eya* in activation of their target genes through nuclear translocation of *Eya*. *Mol Cell Biol* 19: 6815–6824.
- Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA. 1995a. *Six3*, a murine homologue of the *sine oculis* gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121: 4045-4055.
- Oliver G, Wehr R, Jenkins NA, Copeland NG, Cheyette BN, Hartenstein V, Zipursky L, Gruss P. 1995b. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development* 121: 693-705.
- Orten DJ, Fischer SM, Sorensen JL, Radhakrishna U, Cremers CW, Marres HA, Van Camp G, Welch KO, Smith RJ, Kimberling WJ. 2008. Branchio-oto-renal syndrome (BOR): novel mutations in the *Eya1* gene, and a review of the mutational genetics of BOR. *Hum Mutat* 29: 537-544.
- Ozaki H, Watanabe Y, Takahashi K, Kitamura K, Tanaka A, Urase K, Momoi T, Sudo K, Sakagami J, Asano M, Iwakura Y, Kawakami K. 2001. *Six4*, a putative *myogenin* gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol Cell Biol* 21: 3343-3350.
- Ozaki H, Watanabe Y, Ikeda K, Kawakami K. 2002. Impaired interactions between mouse *Eya1* harboring mutations found in patients with branchio-oto-renal syndrome and *Six*, *Dach*, and *G* proteins. *J Hum Genet* 47: 107–116.
- Ozaki H, Nakamura K, Funahashi JI, Ikeda K, Yamada G, Tokano H, Okamura HO, Kitamura K, Muto S, Kotaki H, Sudi K, Horai R, Iwakura Y, Kawakami K. 2004. *Six1* controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development* 131: 551-562.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: 36.
- Pfister M, Toth T, Thiele H, Haack B, Blin N, Zenner HP, Sziklai I, Mumberg P, Kupka S. 2002. A 4-bp insertion in the *eya*-homologous region (*eyaHR*) of *EYA4* causes hearing impairment in a Hungarian family linked to DFNA10. *Mol Med* 8: 607-611
- Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL. 1997. The eye-specification proteins *So* and *Eya* form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* 91: 881–891.

- 
- Puk O, Dalke C, Favor J, Hrabé de Angelis M, Graw J. 2006. Variations of eye size parameters among different strains of mice. *Mamm Genome* 17: 851-857.
- Puk O, Dalke C, Hrabé de Angelis M, Graw J. 2008. Variation of the response to the optokinetic drum among various strains of mice. *Front Bioscience*, in Druck.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector – new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research* 23: 4878-4884
- Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, Hegde RS. 2003. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* 426: 295-298.
- Rayapureddi JP, Kattamuri C, Chan FH, Hegde RS. 2005. Characterization of a plant, tyrosine-specific phosphatase of the aspartyl class. *Biochemistry* 44: 751-758.
- Rayapureddi PJ, Hegde RS. 2006. Branchio-oto-renal syndrome associated mutations in *Eyes absent 1* results in loss of phosphatase activity. *FEBS Letters* 580: 3853-3859.
- Rebay I, Silver SJ, Tootle TL. 2005. New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet* 21: 163-171.
- Ruf RG, Xu PX, Silviu D, Otto EA, Beekmann F, Muerb U, Kumar S, Neuhaus TJ, Kemper MJ, Raymond RM, Brophy PD, Berkman J, Gattas M, Hyland V, Ruf EM, Schwartz C, Chang EH, Smith RJ, Stratakis CA, Weil D, Petit C, Hildebrandt F. 2004. Six1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of Eya1-Six1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8090-8095.
- Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, Chai Y, Stout JT, Reddy S. 2000. Heterozygous loss of *Six5* in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25: 110-114.
- Schmahl W, Knoedlseder M, Favor J, Davidson D. 1993. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax6-locus. *Acta Neuropathol* 86: 126-135.
- Schönberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux F, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, MacRae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE. 2005. Mutation in the transcriptional coactivator *Eya4* causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 37: 418-422.
- Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. 1998. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2.5. *Science* 281: 108-111.

- 
- Silver SJ, Davies EL, Doyon L, Rebay I. 2003. Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol Cell Biol* 23: 5989-5999.
- Silver SJ, Rebay I. 2005. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* 132: 3-13.
- Spitz F, Demignon J, Porteu A, Kahn A, Concordet JP, Daegelen D, Maire P. 1998. Expression of *myogenin* during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14220-14225.
- Stoykova A, Treichel D, Hallonet M, Gruss P. 2000. *Pax6* modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* 20: 8042-8050.
- Takeda Y, Hatano S, Sentoku N, Matsuoka M. 1999. Homologs of animal eyes *absent (eya)* genes are found in higher plants. *Mol Gen Genet* 262: 131-138.
- Tomarev SI. 1997. *Pax6*, *Eyes absent* and *Prox1* in eye development. *Int J Dev Biol* 41: 835-842.
- Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I. 2003. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 426: 299-302.
- Treisman, JE. 1999. A conserved blueprint for the eye? *BioEssays* 21: 843-850.
- Vervoot VS, Smith RJ, O'Brien J, Schroet R, Abbott A, Stevenson RE, Schwartz CE. 2002. Genomic rearrangements of *EYA1* account for a large fraction of families with BOR syndrome. *Eur J Hum Genet* 10: 757-766.
- Wakimoto H, Maguire CT, Sherwood MC, Vargas MM, Sarkar PS, Han J, Reddy S, Berul CI. 2002. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of *Six5* gene. *J Intervent Cardiac Electrophys* 7: 127-135.
- Wakimoto H, Kasahara H, Maguire CT, Moskowitz IPG, Izumo S, Berul CI. 2003. Cardiac electrophysiological phenotypes in postnatal expression of *Nkx2.5* transgenic mice. *Genesis* 37: 144-150.
- Wawersik S, Maas RL. 2000. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9: 917-925.
- Wayne S, Robertson NG, Declau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjarg L, Morton C, Ryan AF, van Camp G, Smith RJH. 2001. Mutations in the transcriptional activator *EYA4* cause late-onset deafness at the *DFNA10* locus. *Hum Mol Genet* 10: 195-200.

- 
- Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJ, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nusslein-Volhard C. 1996. Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123:241-254.
- Wiles MV, Vauti F, Otte J, Füchtbauer EM, Ruiz P, Füchtbauer A, Arnold HH, Lehrach H, Metz T, von Melchner H, Wurst W. 2000. Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat Genet* 24: 13-14.
- Wurst W, Gossler A. 2000. Gene trap strategies in ES cells. in: *Gene Targeting, a practical approach*, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press.
- Xu PX, Woo IW, Her H, Beier DR, Maas RL. 1997a. Mouse *Eya* homologues of the *Drosophila eyes absent* gene require *Pax6* for expression in lens and nasal placode. *Development* 124: 219-231.
- Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL. 1997b. Mouse *Eya* genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11974-11979.
- Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas RL. 1999. *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23: 113-117.
- Xu PX, Zheng W, Laclef C, Maire P, Maas RL, Peters H, Xu X. 2002. *Eya1* is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* 3033-3044.
- Xu PX, Zheng W, Huang L, Maire P, Laclef C, Silvius D. 2003. *Six1* is required for early organogenesis of mammalian kidney. *Development* 3085-3094.
- Yang DK, Choi BY, Lee YH, Kim YG, Cho MC, Hong SE, Kim DH, Hajjar RJ, Park WJ. 2007. Gene profiling during regression of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics* 30: 1-7.
- Zhang Y, Knosp BM, Maconochie M, Friedman RA, Smith RJH. 2004. A comparative study of *Eya1* and *Eya4* protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *JARO* 5: 295-304.
- Zhang L, Yang N, Huang J, Buckanovich RJ, Liang S, Barchetti A, Vezzani C, O'Brien-Jenkins A, Wang J, Ward MR, Courreges MC, Fracchioli S, Medina A, Katsaros D, Weber BL, Coukos G. 2005. Transcriptional coactivator *Drosophila eyes absent* homologue 2 is up-regulated in epithelial ovarian cancer and promotes tumor growth. *Cancer Res* 65: 925-932.
- Zheng W, Huang L, Wei ZB, Silvius D, Tang B, Xu PX. 2003. The role of *Six1* in mammalian auditory system development. *Development* 130: 3989-4000.

- 
- Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Akazawa H, Mizukami M, Toko H, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2000. Functional analyses of three *Csx/Nkx2.5* mutations that cause human congenital heart disease. *J Biol Chem* 275: 35291-35296.
- Zimmerman JE, Bui QT, Steingrimsson E, Nagle DL, Genin A, Spinner NB, Copeland NG, Jenkins NA, Bucan M, Bonini NM. 1997. Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the *Drosophila eyes absent* gene. *Genome Res* 7: 128-141.
- Zou D, Silvius D, Fritsch B, Xu PX. 2004. *Eya1* and *Six1* are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development* 131: 5561-5572.
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the *Nkx2-5* homeobox gene pathway. *Development* 124: 793-804.

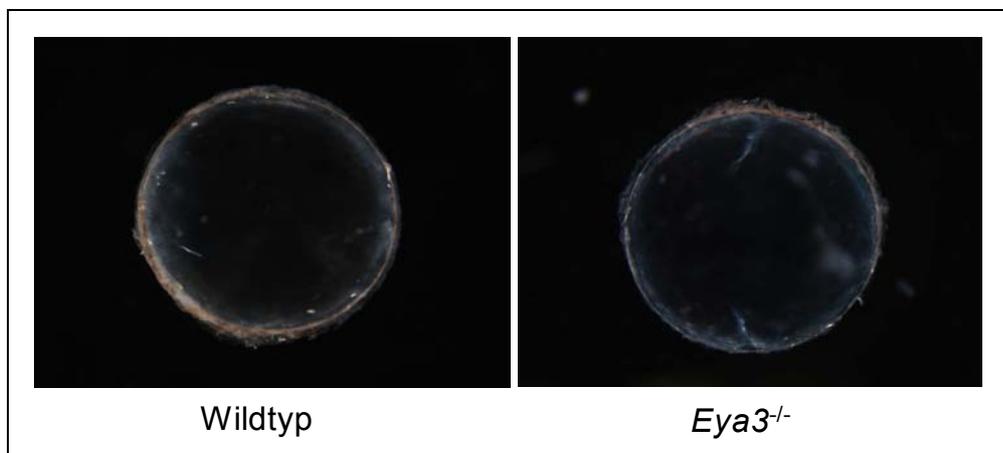
## 6 Anhang

### 6.1 Ergänzende Daten zu den Untersuchungen am Auge

#### Funduskopie und Spaltlampe

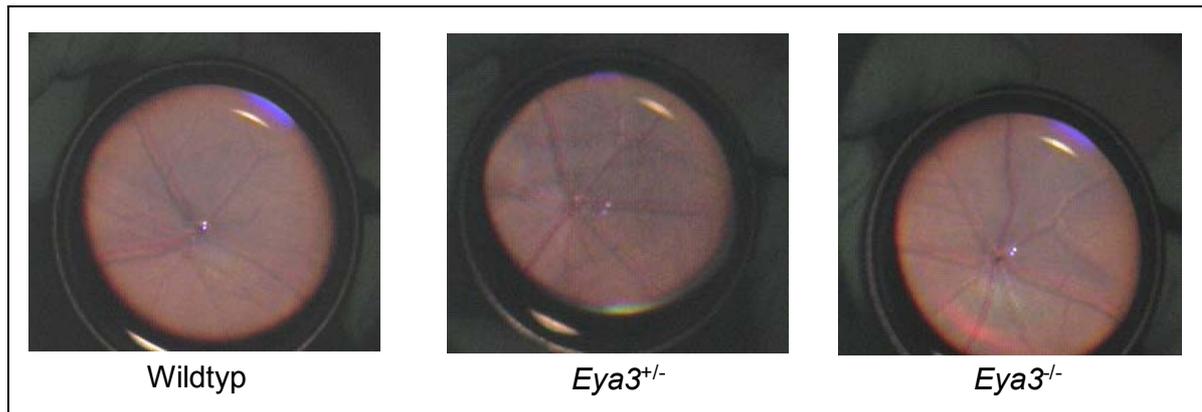
Zusätzlich zu den im Kapitel 3.2.1 schon angesprochenen morphologischen und funktionalen Untersuchungen wurden die folgenden Analysen durch andere Personen durchgeführt.

Eine Untersuchung der Linse mit der Spaltlampe am lebenden Tier sowie die Präparation und Mikroskopie der Linsen unter dem Binokular sollten zeigen, ob es in den Linsen der Mutanten zu Veränderungen, wie z.B. Trübungen, gekommen ist. Die Untersuchung mit der Spaltlampe verschiedener Genotypen und Altersstadien konnte keine Unterschiede zwischen den Linsen der Kontrollen und der *Eya3*-Mutanten aufzeigen. Auch in den präparierten Linsen war kein linsenspezifischen Phänotyp zu erkennen (Abb. 6.1).



**Abbildung 6.1** Augenlinsen von Wildtyp und homozygoter *Eya3*-Mutante. Es sind keine auffälligen Veränderungen der Linse zu erkennen.

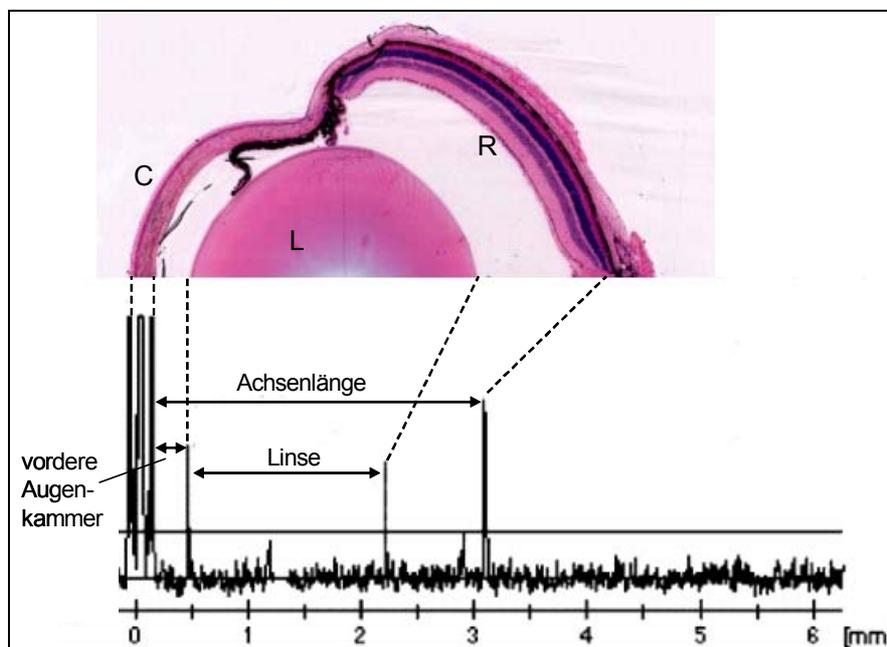
Neben der Kontrolle der Linse wurde außerdem der Augenhintergrund mit der Funduskopie auf mögliche Veränderungen untersucht. Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Funduskopie von Wildtypen mit *Eya3*<sup>+/-</sup>- bzw. *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren zeigt einen normalen Phänotyp des Augenhintergrundes in den Mutanten. Die Retina wies keine unregelmäßigen Strukturen auf, die auf abnorme Veränderungen, wie z.B. eine partielle Degeneration, hinweisen könnten (Abb. 6.2).



**Abbildung 6.2** Funduskopie der Augen von Wildtyp, heterozygoter und homozygoter *Eya3*-Mutante. Der Augenhintergrund der *Eya3*-Mutanten ist gleichmäßig strukturiert und ohne auffällige Merkmale, die auf eine Veränderung der Retina hindeuten könnten.

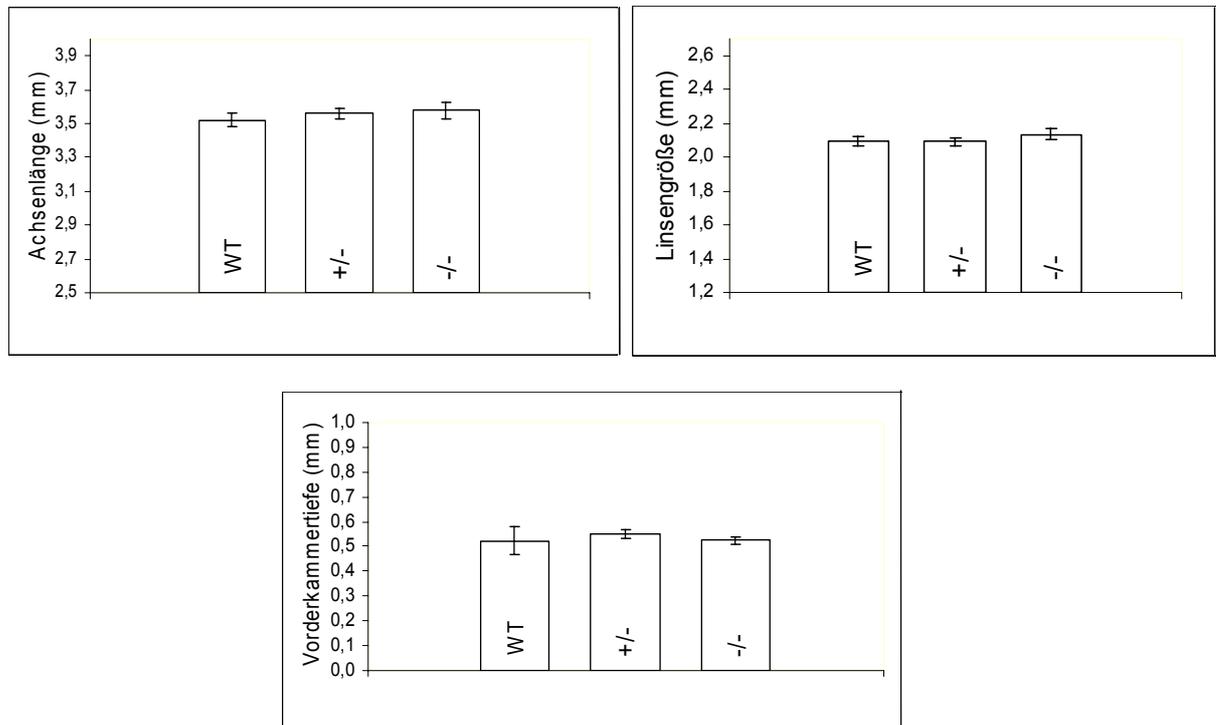
### Laserinterferenzbiometrie

Um mögliche Variationen in der Augengröße zwischen Kontrollen und *Eya3*-Mutanten entdecken zu können, wurde die Methode der Laserinterferenzbiometrie angewandt. Mit dieser Methode können biometrische Daten des Auges gewonnen werden, wie z.B. die Achsenlänge, die Größe der Linse und die Vorderkammertiefe (Puk et al., 2006) (Abb. 6.3).



**Abbildung 6.3** Schematische Darstellung der bei der Laserinterferenzbiometrie erfassten Parameter. Eine Bestimmung der Achsenlänge, der Linsengröße und der Vorderkammertiefe wurde für die *Eya3*-Mutanten durchgeführt.

Die Auswertung der mit der Laserinterferenzbiometrie erfassten Daten ergab, dass keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0.05$ ) in der Achsenlänge, der Linsengröße und der Tiefe der Vorderkammer zwischen Wildtypen und *Eya3*-Mutanten bestehen (Abb. 6.4).



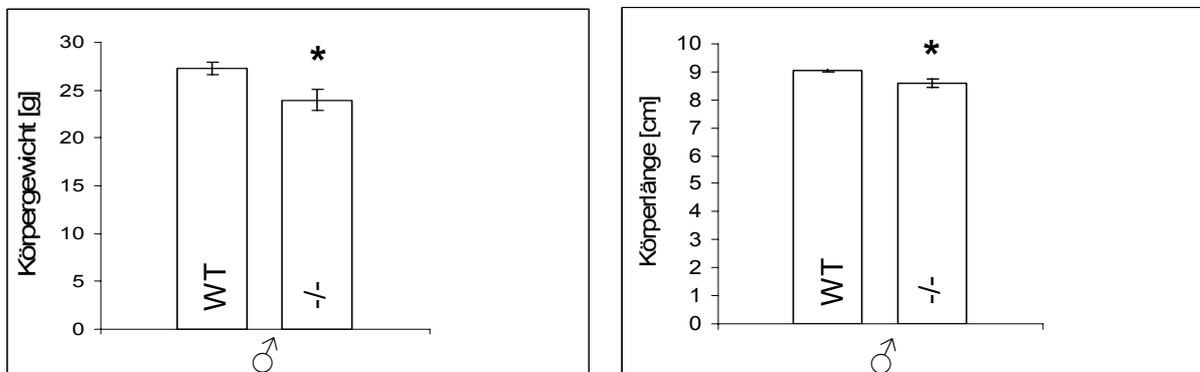
**Abbildung 6.4** Bestimmung der Augengröße mit der Laserinterferenzbiometrie. Die gezeigten Diagramme stellen die erhaltenen Messergebnisse für die Achsenlänge, die Linsengröße und die Vorderkammertiefe grafisch dar. Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen ( $p > 0.05$ ) zwischen Wildtypen und heterozygoten bzw. homozygoten Mutanten (Alter der Tiere: 13 Wochen;  $n=6$ ; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an).

## 6.2 Allgemeine Charakterisierung der *Eya3*-Mutante in der Deutschen Mauslinik (German Mouse Clinic, GMC)

Im Rahmen einer Kollaboration mit der Deutschen Mauslinik (*German Mouse Clinic, GMC*) wurden 28 männliche (14 Wildtypen, 14 Homozygote) und 20 weibliche Tiere (10 Wildtypen, 10 Homozygote) in einer extensiven Studie umfassend analysiert. Bei den ausgewählten Tieren handelte es sich um Wurfgeschwister, die einen maximalen Altersunterschied von 10 Tagen aufwiesen. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der einzelnen Tests dargestellt.

### Morphologische Untersuchungen

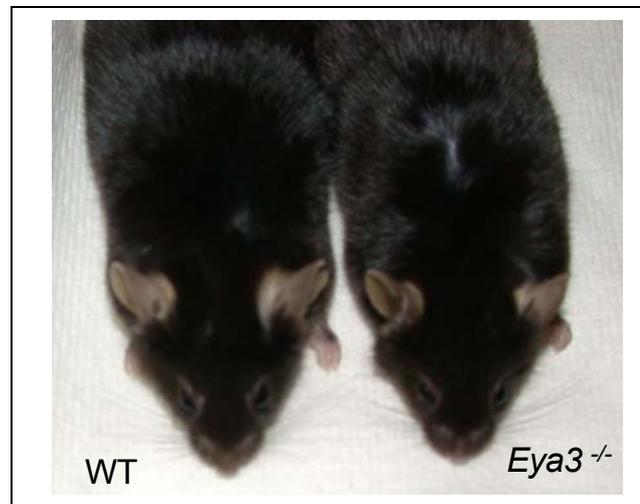
Ein Vergleich von morphologischen Merkmalen zwischen homozygoten *Eya3*-Mutanten und Kontrolltieren zeigte ein signifikant ( $p < 0.05$ ) geringeres Körpergewicht und eine verringerte Körperlänge in den männlichen *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren (Abb. 6.5). Die weiblichen Mutanten waren ebenfalls kleiner und leichter als die Kontrollen, jedoch ohne statistisch signifikante Werte zu erreichen.



**Abbildung 6.5** Körpergewicht und Körperlänge sind signifikant ( $p < 0.05$ ) verringert in männlichen *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den Kontrolltieren (Alter: 15 Wochen). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (♂: +/+ n=14, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=14; ♀: +/+ n=10, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=10)

Desweiteren war im Alter von 9 Wochen in 14 von 24 Mutanten (56 %) eine Anomalie des Kopfes festzustellen, die sich aber auch in 3 von 24 Kontrolltieren (12 %) zeigte. Auffällig im Vergleich zu den Wildtypen waren die geringere Größe des Kopfes und eine abgeflachte Schnauze (Abb. 6.6). Auch zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung konnte diese morphologische Auffälligkeit noch

festgestellt werden, war aber im Alter von 16 Wochen bei der radiologischen Untersuchung weder optisch noch auf dem Röntgenbild nachweisbar.



**Abbildung 6.6** In 56 % der *Eya3*-Mutanten wurde im Alter von 9 Wochen eine Anomalie der Kopfform festgestellt.

### Metabolische Funktionen

Eine Untersuchung der metabolischen Funktionen im Rahmen der klinisch-chemischen Analyse der Mäuse zeigte keine auffälligen Veränderungen im Stoffwechsel der Mutanten, die auf eine Beeinträchtigung der am Stoffwechsel beteiligten Organe hindeuten könnten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem Befund aus der pathologischen Untersuchung der Nieren, bei denen keine morphologischen Veränderungen an den Organen festgestellt werden konnten.

### Histologische Untersuchung der Testes

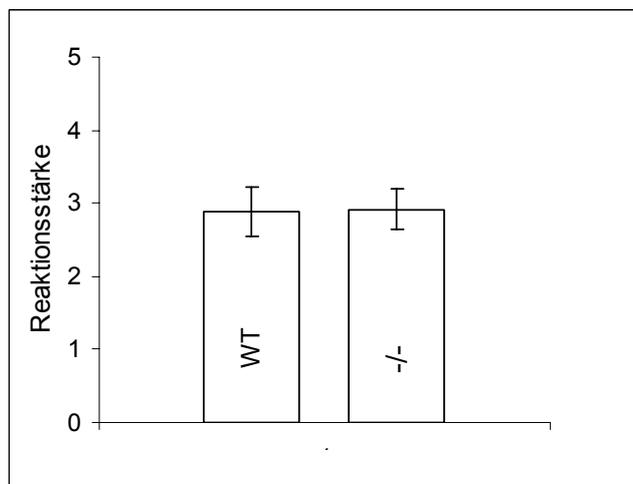
In sieben von neun männlichen Mutanten fand sich eine leichte partielle Degeneration der Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*), die durch vakuolisierte oder nekrotische spermatogene Zellen gekennzeichnet war, so dass in den betroffenen Tubuli nahezu keine Keimzellen vorhanden waren. Dieser Phänotyp ist signifikant ( $p=0.02$ ), da sich ein ähnlicher Phänotyp nur in einem Tier der Kontrollgruppe wiederfand.

## Analyse der Lungenfunktion

Eine Untersuchung der Lungenfunktion konnte ein verringertes respiratorisches Volumen im Ruhezustand bei den *Eya3*-Mutanten offenbaren. Das Volumen war in den Mutanten (n=4) signifikant ( $p < 0.05$ ) gegenüber den Kontrollen (n=5) reduziert (+/+ =  $0,25 \pm 0,01$  ml; *Eya3*<sup>-/-</sup> =  $0,22 \pm 0,01$  ml). Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Körpergewichts erreichte die Signifikanz sogar einen noch höheren Wert von  $p < 0.02$  (+/+ =  $10,1 \pm 0,3$   $\mu$ l/g; *Eya3*<sup>-/-</sup> =  $8,7 \pm 0,3$   $\mu$ l/g).

## Auditives Testverfahren: Click-box-Test

Der sog. Click-box Test bietet die Möglichkeit zu einer groben Einschätzung des Hörvermögens durch Beobachtung der Reaktion einer Maus auf ein künstlich erzeugtes Geräusch. Bei dem erzeugten 20 kHz-Ton zeigten die *Eya3*-Mutanten eine dem Wildtyp vergleichbare, normale Reaktion auf diesen Laut, was ein normales Hörvermögen der *Eya3*-Mäuse nahe legt (Abb. 6.7).

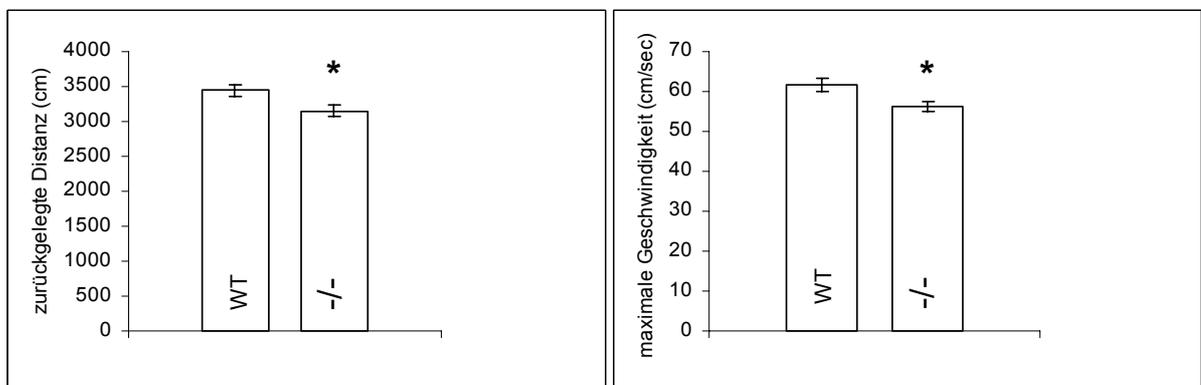


**Abbildung 6.7** Ergebnisse aus dem Click-box Test. Die Reaktion der Mäuse auf ein 20 kHz-Signal wurde mit den Werten 0 (= keine Reaktion) bis 6 (= sehr starke Reaktion) kategorisiert. Dabei zeigten die für die *Eya3*-Tiere erhaltenen Werte nur eine sehr geringe Abweichung zu den Werten der Wildtypen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (♂: +/+ n=14, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=14; ♀: +/+ n=10, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=10)

## Verhaltensanalyse

Im Alter von 8 Wochen erfolgte eine Verhaltensanalyse mit dem sog. modified Hole Board Test. Hierbei zeigten die *Eya3*-Mutanten eine signifikante Veränderung des vorwärts gerichteten lokomotorischen Verhaltens und des

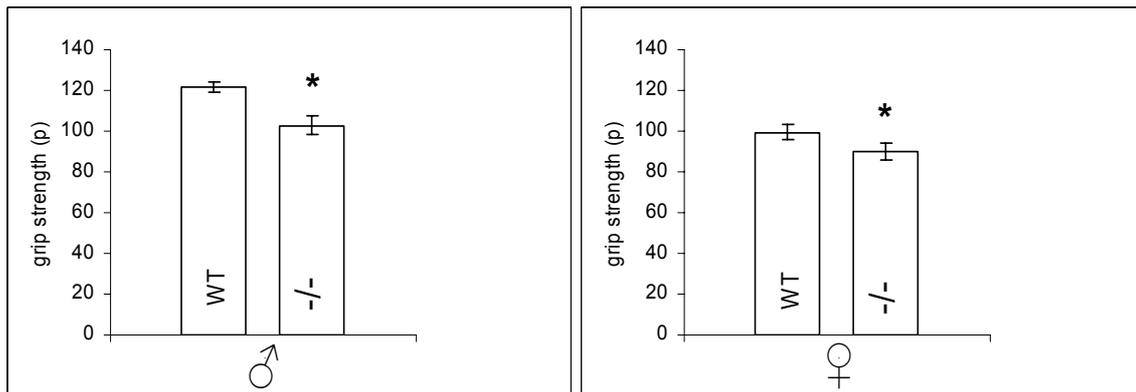
Explorationsverhaltens. Die Veränderung im lokomotorischen Verhalten manifestierte sich bei Mutanten beiderlei Geschlechts in einer Abnahme der im Untersuchungszeitraum zurückgelegten Distanz sowie in einer reduzierten Bewegungsgeschwindigkeit (Abbildung 6.8). Hinsichtlich ihres Explorationsverhaltens fielen sowohl männliche als auch weibliche *Eya3*<sup>-/-</sup> Mäuse durch eine verstärkte vertikale Exploration (häufigeres Aufrichten) auf. Ferner inspizierten die männlichen Mutanten signifikant ( $p < 0.05$ ) mehr Löcher in der Testarena, was als eine Zunahme der direkten Exploration gegenüber den Kontrolltieren zu bewerten ist.



**Abbildung 6.8** Ergebnisse aus der Verhaltensanalyse mit dem modified Hole Board Test. Die Mäuse mit der Mutation des *Eya3*-Gens zeigten eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Reduktion der in der Testphase zurückgelegten Distanz sowie eine Abnahme der maximalen Geschwindigkeit. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (♂: +/+ n=14, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=14; ♀: +/+ n=10, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=10)

### Test der Muskelkraft in den vorderen Extremitäten

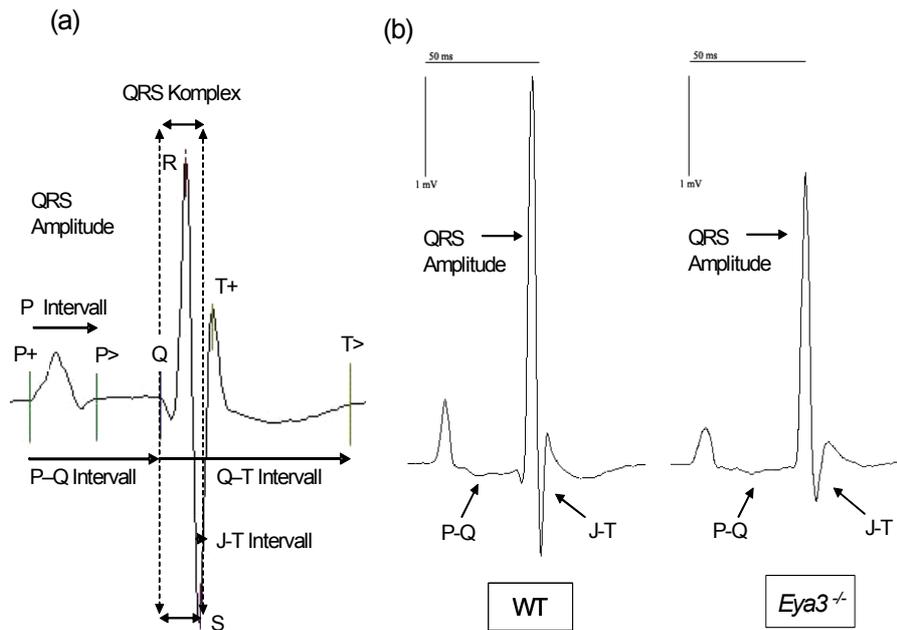
Mit dem sog. „Grip strength“-Test konnte unter Ausnutzen des Greifreflexes eine Untersuchung der Muskelkraft in den vorderen Extremitäten durchgeführt werden. Dieses Testsystem ergab, dass in *Eya3*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Muskelkraft in den vorderen Extremitäten signifikant ( $p < 0.05$ ) geringer ist als in der Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 6.9). Eine statistische Analyse (*fitting linear mixed effect models*, nach Pinheiro und Bates, 2000) konnte dabei verdeutlichen, dass die Reduktion der Muskelkraft signifikant ( $p < 0.01$ ) vom Genotyp der analysierten Tiere abhängt. Ein Test der grundlegenden neurologischen Funktionen mit dem Rotarod zeigte zwar keine signifikante Abweichung in den Mutanten, jedoch war auch hier die Leistung der Mutanten gegenüber den Wildtypen verringert.



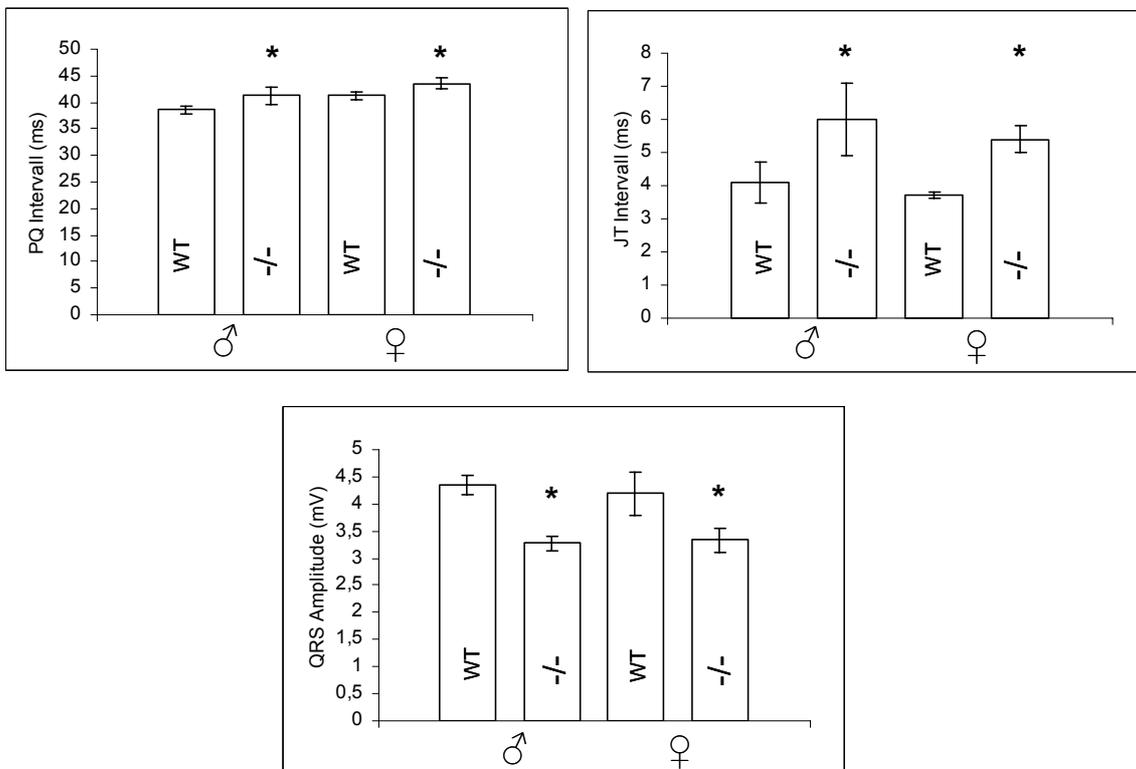
**Abbildung 6.9** Ergebnisse aus dem Grip strength Test. Ein Vergleich der Muskelkraft in den vorderen Extremitäten offenbart eine signifikant ( $p < 0.05$ ) verringerte Muskelkraft in den Vorderextremitäten der *Eya3*-Mutanten gegenüber den Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (♂: +/+  $n=14$ , *Eya3*<sup>-/-</sup>  $n=14$ ; ♀: +/+  $n=10$ , *Eya3*<sup>-/-</sup>  $n=10$ )

### Kardiovaskuläre Funktion

Eine kardiovaskuläre Untersuchung der Tiere fand im Alter von 12-15 Wochen statt. Hierzu wurde der Blutdruck gemessen und ein Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG) durchgeführt. Während die Messung des Blutdrucks keine spezifischen Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Mutanten ergab, konnte die elektrophysiologische Analyse mit Hilfe des Oberflächen-EKGs mehrere auffällige Unterschiede im Vergleich von Mutante und Wildtyp aufzeigen (Abb. 6.10). Das PQ-Intervall, welches die Zeit zwischen der Induktion des elektrischen Impulses im sinu-atrial Knoten und der ventrikulären Depolarisation wiedergibt, war in den Mutanten signifikant ( $p < 0.05$ ) verlängert. Ebenso war das JT-Intervall, welches die Zeitspanne zwischen der ventrikulären Depolarisation bis zur Repolarisation widerspiegelt, in den *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren verlängert ( $p < 0.05$ ). Dagegen war die Amplitude des QRS-Komplexes, welcher die ventrikuläre Depolarisation erfasst, in den Mutanten hoch signifikant verringert ( $p < 0.001$ ) (siehe auch Abb. 6.11).



**Abbildung 6.10** (a) Schematische Darstellung der mit dem Elektrokardiogramm gemessenen Parameter. (b) Vergleich zweier EKG-Diagramme: In der homozygoten *Eya3*-Mutante sind PQ- und JT-Intervall gegenüber dem Wildtyp verlängert, während die Amplitude des QRS-Komplexes verringert ist (Veränderungen durch schwarze Pfeile markiert). (♂: +/+ n=9, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=10; ♀: +/+ n=9, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=9)



**Abbildung 6.11** Auswertung der durch das Oberflächen-EKG erhaltenen Messdaten. Das PQ-Intervall ist ebenso wie das JT-Intervall in *Eya3*<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant ( $p < 0.05$ ) verlängert, während die Amplitude des QRS-Komplexes in den Mutanten hoch signifikant ( $p < 0.001$ ) verringert ist. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (♂: +/+ n=9, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=10; ♀: +/+ n=9, *Eya3*<sup>-/-</sup> n=9)

### 6.3 Genexpressionsanalyse: cDNA-Microarray

Zur Durchführung einer Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Microarray wurden insgesamt 9 männlichen Tieren (5 +/+, 4 *Eya3*<sup>-/-</sup>) Skelettmuskel, Herz und Gehirn entnommen. Die nachfolgende Analyse konnte eine Vielzahl regulierter Gene in den Mutanten identifizieren. Während in der Skelettmuskulatur keine regulierten Gene nachgewiesen wurden, konnten im Herz 17 Gene und im Gehirn 93 Gene mit veränderter Expression bestimmt werden. Die regulierten Gene im Herz waren alle in ihrer Expression erniedrigt, im Gehirn waren 80 Gene geringer und 13 Gene verstärkt exprimiert. Drei der identifizierten Gene waren in Herz und Gehirn in ihrer Expression erniedrigt: *Hba-a1*, 1110017|16Rik und *Nup155*. Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Chip-Genexpressionsanalyse findet sich in Tabelle 6.1 und 6.2.

**Tabelle 6.1** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analyse für im Herz von *Eya3*-Mutanten verändert exprimierte Gene.

Mean ratio	-1.0				ArrayTAG ID	Gene symbol	Comment
	A	B	C	D			
-3.46					MG-4-145j12	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3.30					MG-68-143l7	<i>CR518113</i>	
-2.67					MG-14-3i19	<i>Pgm2</i>	Phosphoglucomutase 2
-2.64					MG-13-32l8	<i>Rbms2</i>	RNA binding motif, interacting protein 2
-2.59					MG-4-146i20	<i>Clptm1</i>	Cleft lip associated transmembrane 1
-2.58					MG-13-32k20	<i>Ankrd1</i>	Ankyrin repeat domain 1
-2.57					MG-8-17b4	<i>Tnnc1</i>	Troponin C
-2.46					MG-8-86g2	1110017 16Rik	
-2.35					MG-8-64o9	<i>Calm3</i>	Calmodulin 3
-2.22					MG-8-42b9	<i>H3f3a</i>	H3 histone, family 3A
-2.21					MG-4-6d16	<i>Tap1</i>	Transporter 1, ATP-binding cassette
-2.19					MG-4-5j21	<i>Il6st</i>	Interleukin 6 signal transducer
-2.18					MG-8-71j2	<i>Nup155</i>	Nucleoporin 155
-2.16					MG-6-19n14	<i>Abr</i>	Active BCR-related gene
-2.15					MG-3-37d17	<i>Hspb7</i>	Heat shock protein family, member 7
-2.15					MG-4-148e3	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-2.11					MG-47-1h17	<i>Hbb-bh1</i>	Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain

**Tabelle 6.2** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Microarray-Analyse für im Gehirn von *Eya3*-Mutanten verändert exprimierte Gene.

Mean ratio	-1.0 <span style="color: red;">█</span> <span style="color: green;">█</span> 1.0				ArrayTAG ID	Gene symbol	Comment
	A	B	C	D			
3,72					MG-3-169b8	<i>Rbm11</i>	RNA binding motif protein 11
3,73					MG-3-52a20	<i>Ap1gbp1</i>	AP1 gamma subunit binding protein 1
3,99					MG-8-117f2	<i>Commd3</i>	COMM domain containing 3
4,22					MG-8-1m3	<i>Ass1</i>	Argininosuccinate synthetase 1
4,33					MG-3-23c1	<i>Jub</i>	Ajuba
4,44					MG-6-29i19	<i>Odz4</i>	Odd Oz/ten-m homolog 4
4,49					MG-6-92i20	<i>Ugcg11</i>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1
4,62					MG-6-28n4	<i>CR515399</i>	
4,67					MG-8-117d3	<i>Hdlbp</i>	High density lipoprotein (HDL) binding protein
4,81					MG-14-129o10	<i>BX638808</i>	
5,07					MG-8-117j15	<i>Pdlim4</i>	PDZ and LIM domain 4
6,60					MG-8-117d11	<i>Glul</i>	glutamate-ammonia ligase
7,38					MG-8-118g23	<i>CR522214</i>	
-5,64					MG-4-86f7	<i>Hb2-a2</i>	hemoglobin alpha, adult chain 2
-4,86					MG-15-96a15	<i>Gorasp1</i>	golgi reassembly stacking protein 1
-4,56					MG-4-3k1	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-4,48					MG-4-148e12	<i>Hba-2a</i>	hemoglobin alpha, adult chain 2
-4,40					MG-3-12j20	<i>Ubc</i>	Ubiquitin C
-4,24					MG-13-3c23	<i>Rbm3</i>	RNA binding motif protein 3
-4,22					MG-3-25i14	<i>Sparc</i>	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein
-4,20					MG-6-25k12	<i>Atp2b2</i>	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 2
-4,11					MG-4-146e19	<i>Cdca8</i>	Cell division cycle associated 8
-4,07					MG-4-145f7	<i>Slc43a2</i>	solute carrier family 43, member 2
-3,96					MG-4-148e3	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3,86					MG-6-3d7	<i>Wdr22</i>	WD repeat domain 22
-3,84					Fbxo32	<i>Fbxo32</i>	F-box only protein 32
-3,78					MG-4-4h13	<i>Grrp1</i>	glycine/arginine rich protein 1
-3,73					MG-8-13m24	<i>Eef2</i>	Eukaryotic translation elongation factor 2
-3,73					MG-8-86g2	<i>1110017116Rik</i>	
-3,72					MG-15-136d2	<i>Hps6</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 6
-3,71					MG-15-214i1	<i>Rhob</i>	Ras homolog gene family, member B
-3,66					MG-8-40d4	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3,65					MG-12-228k24	<i>Eif3s8</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8

-3,64		MG-12-147c15	<i>Lamr1</i>	Laminin receptor 1
-3,61		MG-4-3k8	1300018/05Rik	
-3,61		MG-4-147o3	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3,59		MG-4-2e20	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3,52		MG-16-239p7	<i>Actr3</i>	ARP3 actin-related protein 3 homolog
-3,49		MG-11-1e9	<i>Ttr</i>	Transthyretin
-3,48		MG-13-4p13	<i>Rps15</i>	Ribosomal protein S15
-3,46		MG-14-107i21	<i>Apg12l</i>	Autophagy 12-like
-3,44		MG-8-51k21	<i>Krt1-16</i>	Keratin complex 1, acidic, gene 16
-3,43		MG-3-69i14	<i>Mkm1</i>	Makorin, ring finger protein, 1
-3,42		MG-4-145i14	<i>Actr3</i>	ARP3 actin-related protein 3 homolog
-3,36		MG-15-131g17	<i>Sparcl1</i>	SPARC-like 1
-3,32		MG-6-70o16	<i>Ncald</i>	Neurocalcin delta
-3,31		MG-6-47j7	<i>Kcna1</i>	Potassium voltage-gated channel
-3,28		MG-3-136g8	<i>Actg1</i>	actin, gamma, cytoplasmic 1
-3,28		MG-3-45k11	<i>H3f3b</i>	H3 histone, family 3B
-3,26		MG-16-235h23	<i>Sfrs5</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 5
-3,25		MG-14-103c17	<i>Crhr1</i>	Corticotropin releasing hormone receptor 1
-3,23		<i>Fos</i>	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma related oncogene
-3,20		MG-8-35o20	<i>Rpl4</i>	Ribosomal protein L4
-3,20		MG-4-145j12	<i>Hba-a1</i>	Hemoglobin alpha, adult chain 1
-3,18		MG-14-129l18	<i>Ier3ip1</i>	immediate early response 3 interacting protein 1
-3,18		MG-6-23e8	6720456B07Rik	
-3,18		MG-6-4f14	<i>Uba52</i>	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein product 1
-3,17		MG-26-276o2	<i>Aldoa</i>	Aldolase 1, A isoform
-3,17		<i>Serpine1</i>	<i>Serpine1</i>	serine peptidase inhibitor, clade E, member 1
-3,16		MG-3-102p7	<i>Eif4a2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4A2
-3,16		MG-14-29j24	<i>Ubl5</i>	Ubiquitin-like 5
-3,16		MG-8-118i19	<i>Got2</i>	Glutamate oxaloacetate transaminase 2
-3,14		<i>Adcyap1r1</i>	<i>Adcyap1r1</i>	Adenylate cyclase activating polypeptide 1
-3,13		MG-6-26k12	<i>Slc29a1</i>	Solute carrier family 29, member 1
-3,13		MG-16-78n13	<i>Fkbp1a</i>	FK506 binding protein 1a
-3,12		MG-14-39l16	<i>Adra2a</i>	Adrenergic receptor, alpha 2a
-3,11		MG-4-146d10	<i>Tysnd1</i>	Trypsin domain containing 1
-3,10		MG-3-45c6	<i>Nsg1</i>	Neuron specific gene family member 1
-3,07		MG-6-23g12	<i>Vamp2</i>	Vesicle-associated membrane protein 2
-3,07		MG-15-133g11	<i>Pgrmc1</i>	Progesterone receptor membrane component 1

## 6.4 Ergebnisse aus MatInspector

Die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen in der *Eya3*-Promotorregion mit der Anwendung MatInspector für Auge, Nervensystem und Herz konnte eine Vielzahl von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ermitteln. Aufgrund der großen Zahl von über 150 möglichen Bindestellen ist in der Tabelle 6.3 eine Auswahl an mehrfach auftretenden und / oder besonders hochkonservierten Bindesequenzen aufgeführt.

**Tabelle 6.3** Ausgewählte Ergebnisse der Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen in der murinen *Eya3*-Promotorregion für die Gewebe Auge, Nervensystem und Herz im Bereich bis zu 1500 bp vor dem Transkriptionsstart (TSS).

Transkriptionsfaktor	Gewebe	Position (bp)
Barx2	Auge	-748
Brn2	Auge / Nervensystem	-500, -1039, -1043
c-Ets1	Nervensystem	-19
EKLF	Herz	-44, -614
FoxA2a	Auge	-398, -1157, -1444
FOXO	Auge	-561, -581
GATA Bindefaktor	Herz	-320, -491, -685, -977
HMG-protein I	Nervensystem	-499,
HNF3	Auge	-1040
MEF2	Herz	-1143
Nanog	Auge / Nervensystem / Herz	-831, -1346
Neurogenin	Nervensystem / Herz	-949
Nkx2.5	Nervensystem / Herz	-462, -770
Nkx5.1	Nervensystem	-1158, -1212, -1215
Nkx5.2	Nervensystem / Herz	-642, -683, -730, -735
Otx-like homeobox gene	Auge / Nervensystem	-1405
<b>Pax6</b>	Auge / Nervensystem	-747, -830, -865
Pitx1	Auge / Nervensystem / Herz	-101
Sox5	Auge / Nervensystem	-41, -557,
Willms Tumor Supressor	Nervensystem	-613,

## 6.5 Untersuchungen im Zebrafisch

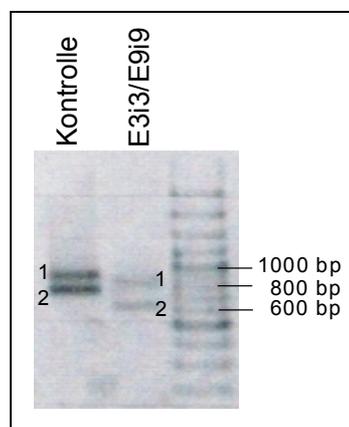
### Sequenz der *eya3*-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung

Zur Erstellung der *eya3*-Sonde kam ein cDNA-Klon (zur Verfügung gestellt von G. Nica, LMU München) zum Einsatz, dessen Sequenzierung mit SP6 die folgende mit dem *eya3*-Gen des Zebrafisches übereinstimmende Sequenz zeigte:

```
TTGGAGCAGAATTGATGATGTGCACAATAAAATAAAATGCATACAGCCTCCTGGAACAGAGCATTTCAG
AAATGTCATATAAAGATAGAGATTAATGAAACTGAATCTATGCTAAACCCTGCAGATACCATCTGAAAA
CAAATATTAACAGGCCACGACTGTCATCCATCTAAAAAAGGATGGTTTACCCAAAAAACATGTATGAT
TAATTCACCTTCAGGCCATCCAAGATGTAGATGACTTTTTTTCTTTAACAAAACTTTAAAGGCAAATATC
ACTAACATCAACAAATATAATTACTACCTATGATATTTAAGGACTTATTAAGCTCTGAGCAAGAATCTGAA
TATTACTTCTAACATTGCAGAGCCAATGGACTAGGTAATGTTGTAATCATGTTTCATTTTCTTGACACAGA
CCTCTCTATGTATCATCAGAAGCCACAGGGTTTTTTGGAATTCTTTGTAGTCATTATTTAAGGATGGTTT
TGGCTAGAAAACTTCAATAATGCTCAACTGAACAAAATTTAAAAATGTGTAAACCTTGATGGACTTCG
AAAAAGTTGAATTACATTTTGGGGTGGACTGTCCTTTTAAGAACAGAAATCAGCATTGGTCTGAGCCTTC
TAATGAATGCAACCTGCTATTTTCAGATATAAGAACAAAAATCCTGACCTTTGGAATGAGTGCAAATCAA
ATGACCCCAAATTTCTCTCTAGCCATTAATAAAGAAAAAGAATGCTAAATAAAAAATGAAAAAGACAGAG
CTTCAACAAACTGCCNAGTTTCTGTGCCAGTGCAGACCTTTGGTCATGAGTTGTTCTTTGGTGAATCC
NGTTACGTTGAAGATGGTACAGCTACATCCNATTTCCGAGAGAAAGATGCANTGANA
```

### RT-PCR zur Kontrolle der Injektion des Morpholinos E3i3/E9i9

Weitere nach Abschluss der eigenen Arbeiten durchgeführte PCR-Experimente konnten eine zusätzliche alternative Spleißform ohne Exon 8 für *eya3* zeigen (Abb 6.12, Transkript 2). Auch für diese Spleißform zeigte sich, dass das in den injizierten Embryonen amplifizierte Fragment (Abb. 6.12, Transkript 2 E3i3/E9i9) deutlich kleiner war als in den nicht-injizierten Kontrollen, so dass keine dem Wildtyp entsprechenden Transkripte in den injizierten Embryonen vorliegen.



**Abbildung 6.12** Die RT-PCR veranschaulicht, dass auch das zusätzliche Transkript in den injizierten Embryonen verändert gespleißt wird und keine dem Wildtyp entsprechenden Transkripte mehr vorliegen. (Bande 1 = Transkript mit Exon 8, Bande 2 = Transkript ohne Exon 8)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ANOVA	(engl.) analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BO	Branchio-oto Syndrom
BOR	Branchio-oto-renales Syndrom
bp	Basenpaar
BSA	(engl.) bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cm	Zentimeter
cDNA	(engl.) copy desoxyribonucleic acid
<i>Dach1-2</i>	orthologe Gene in Vertebraten zu <i>dachshund</i> ( <i>Drosophila</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	(engl.) Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(engl.) desoxyribonucleic acid
dsDNA	(engl.) double stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eya1-4</i>	orthologe Gene in Vertebraten zu <i>eyes absent</i> ( <i>Drosophila</i> )
ED	Eya-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GGTC	(engl.) German Gene Trap Consortium
GMC	(engl.) German Mouse Clinic
gr	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin

---

IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mol
MAPK	(engl.) mitogen activated protein kinase
Mb	Megabasen
MKS	multiple Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site)
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-N-morpholino-propansulfonsäure
mRNA	(engl.) messenger ribonucleic acid
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PBS	(engl.) phosphate buffered saline
PCR	(engl.) polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonz.
pmol	Pikomol
RACE	(engl.) rapid amplification of cDNA ends
RLU	(engl.) relative light units
RNA	(engl.) ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	(engl.) reverse transcription-polymerase chain reaction
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>Six1-6</i>	orthologe Gene in Vertebraten zu <i>sine oculis</i> ( <i>Drosophila</i> )
ssDNA	(engl.) single stranded DNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TB	(engl.) Terrific-Broth

---

TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	(engl.) transfer RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
TFB	Transkriptionsfaktorbindestelle(n)
U	(engl.) units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte terminale Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

## Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Entwicklungsgenetik (Helmholtz Zentrum München) in der Arbeitsgruppe für Molekulare Augenentwicklung unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jochen Graw angefertigt, dem ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die fortwährende Unterstützung bei der Bearbeitung danken möchte. Ferner möchte ich dem GGTC vertreten durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst und Herrn Dr. Thomas Floss für die Überlassung der *Eya3*-Mausmutante danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Angehörigen meiner Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeiten bedanken. Namentlich hervorgehoben seien hier: Claudia, der ich für ihre herzliche Art und die vielen Tipps zum Thema GMC danke, Oli, dem ich für die nette Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Mittagessen danke, Erika, Monika, Maria und Mareike, denen ich für manche Hilfe im Labor, abgenommene Schwanzspitzen und Kuchen danke sowie Koustav, Minxuan, Frau Dr. Santhiya, Anke, Sebastian, Robert, Nils und Daniela.

Ein weiterer Dank gilt allen Leitern und Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen des Instituts, mit denen ich im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit zusammenarbeiten konnte. Insbesondere seien hier die Arbeitsgruppen von Frau Dr. Laure Bally-Cuif, Frau Dr. Andrea Huber-Brösamle und Herrn Dr. Thomas Floss erwähnt. Ausdrücklich möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal bei Steffi und Christian für ihre Hilfe bei den Zebrafischexperimenten bedanken. Ferner möchte ich den Mitarbeitern der Deutschen Mauslinik (GMC) für die Zusammenarbeit danken.

Ein letzter, aber ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, sowie meiner Frau Katharina, die mir mit ihrer liebevollen Art über so manche Hürde geholfen hat und bereit war, einen mehrjährigen Bahnmarathon zwischen München und Bonn auf sich zu nehmen.