

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Die Identifizierung X-chromosomaler Gene
mit Einfluss auf die Embryonalentwicklung und die
Entstehung humaner Krankheiten

Marion Vollmer

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. K. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
2. Priv.-Doz. Dr. J. Beckers

Die Dissertation wurde am 03.05.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.09.2010 angenommen.

„As many truths as men.

Occasionally, I glimpse a truer Truth,

hiding in imperfect simulacrum of itself,

but as I approach, it bestirs itself &

moves deeper into the thorny swamp of dissent.“

aus „Cloud Atlas“ von David Mitchell

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Zusammenfassung..... | 11 |
| 2 Einleitung..... | 13 |
| 2.1 Die Embryonalentwicklung der Maus..... | 13 |
| 2.1.1 Die frühe Embryonalentwicklung..... | 13 |
| 2.1.2 Die Gastrulation..... | 15 |
| 2.1.3 Die frühe Organogenese..... | 17 |
| 2.1.3.1 Die Entwicklung der Mesodermderivate..... | 17 |
| 2.1.3.2 Die Entstehung des Nervensystems: Neurulation..... | 18 |
| 2.1.3.3 Die Entwicklung der Entodermderivate..... | 19 |
| 2.1.4 Die Entwicklung des Herzens..... | 20 |
| 2.1.5 Die Entwicklung der glatten Muskulatur..... | 23 |
| 2.2 Die Grundlagen der Zellbewegung: Das Zytoskelett..... | 25 |
| 2.2.1 Die Proteinfamilie der Formins..... | 26 |
| 2.2.2 Die Diaphanous-related Formins | 27 |
| 2.2.2.1 Die Funktionen von mDia1 und mDia2..... | 28 |
| 2.2.2.2 Die Funktionen von mDia3..... | 30 |
| 2.3 Das X-Chromosom..... | 31 |
| 2.4 Der X-chromosomale Erbgang..... | 31 |
| 2.5 Die zufallsbedingte Mutation von Genen: die Genfalle..... | 32 |
| 2.6 Die Tetraploide Aggregation..... | 33 |
| 2.7 Zielsetzung der Arbeit..... | 34 |
| 3 Ergebnisse..... | 35 |
| 3.1 Die Identifizierung potentieller Krankheitsgene auf dem X-Chromosom..... | 35 |
| 3.1.1 Der phänotypen-basierte, hemizygoter Screen..... | 35 |
| 3.1.2 Die Selektion geeigneter ES-Klone für den Phänotypen-basierten Screen..... | 37 |
| 3.1.3 Die gezielte Auswahl von mutierten, X-chromosomalen Genen führt zu einer Verzerrung der Statistik..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.1.4 Die Einteilung der embryonalen Phänotypen in verschiedene Klassen..... | 39 |
| 3.1.4.1 Gastrulationsphänotypen..... | 39 |
| 3.1.4.2 Neurulationsphänotypen..... | 42 |
| 3.1.4.3 Organogenese Phänotypen..... | 47 |
| 3.1.4.4 Wildtypische Phänotypen..... | 48 |
| 3.1.5 Die Rettung des Nono-GT-Phänotypen durch Inversion der GT-Kassette..... | 51 |
| 3.2 Untersuchungen zur Expression und embryonalen Funktion von mDia3..... | 54 |
| 3.2.1 Generierung einer mDia3-GT Mauslinie..... | 54 |
| 3.2.2 Die molekulare Charakterisierung des mDia3-GT Klons E093H03 | 55 |
| 3.2.3 Die Lokalisation von mDia3 auf subzellulärer Ebene..... | 57 |
| 3.2.4 Die embryonale Expression des LacZ-Reporters..... | 60 |
| 3.2.5 Die adulte Expression des LacZ-Reporters..... | 62 |
| 3.2.6 Die Expression von mDia3 in Wildtyp-Embryonen stimmt mit dem LacZ-Muster weitgehend überein..... | 64 |
| 3.2.7 mDia3-GT Embryonen zeigen Defekte in der Entwicklung des Herzens, des Gehirns und der Schwanzregion..... | 65 |
| 3.2.8 Während der Herzentwicklung zeigen sich Links-Rechts-Defekte..... | 67 |
| 3.2.9 mDia3-GT ist spezifisch in kardialen Neuralleistenzellen exprimiert..... | 68 |
| 3.2.10 Die Mutation von mDia3 führt zur abnormen Remodellierung der Branchialbogenarterien..... | 70 |
| 3.2.11 mDia3-GT Neuralleistenzellen migrieren nicht in den Ausflußtrakt..... | 71 |
| 4 Diskussion..... | 73 |
| 4.1 Der Phänotypen-basierte Screen bietet auf schnellem Weg eine verlässliche Basis für weitere Analysen..... | 73 |
| 4.1.1 GT-Klone können als Mausmodell für X-chromosomale Krankheiten dienen..... | 73 |
| 4.1.2 Die Identifizierung neuer X-chromosomaler Krankheitsgene | 75 |
| 4.2 Der kardiovaskuläre mDia3-GT Phänotyp wird durch die Interaktion verschiedener Entwicklungsprozesse verursacht..... | 76 |
| 4.2.1 Die Entstehung kardiovaskulärer Phänotypen aufgrund von NC-Defekten..... | 77 |
| 4.2.1.1 Die abnorme Remodellierung der Branchialbogenarterien..... | 77 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1.2 Defekte in der Entwicklung des Ausflußtraktes..... | 78 |
| 4.2.2 Die Rolle des sekundären Herzfeldes bei der Entstehung von kardiovaskulären Phänotypen..... | 79 |
| 4.2.3 Pitx2 als Überträger der Links-Rechts-Achse auf asymmetrische Organe..... | 80 |
| 4.2.4 Die Interaktion zwischen Links-Rechts-Markern, dem zweiten Herzfeld und NC-Zellen | 81 |
| 4.3 Die Redundanz zwischen den mDia-Isoformen..... | 83 |
| 4.4 Die Lokalisation und Funktion von mDia3 auf zellulärer Ebene..... | 84 |
| 4.4.1 Die Kolokalisation von mDia3 und kleinen GTPasen..... | 84 |
| 4.4.2 Die Funktion von mDia3 in der Ziliogenese..... | 84 |
| 5 Material und Methoden..... | 87 |
| 5.1 Material..... | 87 |
| 5.1.1 Ausstattung..... | 87 |
| 5.1.2 Verbrauchsmaterial..... | 89 |
| 5.1.3 Reaktionssysteme (Kits)..... | 89 |
| 5.1.4 Chemikalien..... | 90 |
| 5.1.5 Puffer und Lösungen..... | 92 |
| 5.1.5.1 Isolierung genomischer DNA..... | 92 |
| 5.1.5.2 DNA/RNA-Agarosegele | 92 |
| 5.1.5.3 Western Blot | 92 |
| 5.1.5.4 LacZ-Färbung..... | 93 |
| 5.1.5.5 Immunhistochemische Färbung..... | 93 |
| 5.1.6 Enzyme und Reaktionssysteme..... | 93 |
| 5.1.7 Antikörper und Seren..... | 94 |
| 5.1.7.1 Primäre Antikörper..... | 94 |
| 5.1.7.2 Sekundäre Antikörper..... | 94 |
| 5.1.7.3 Seren..... | 94 |
| 5.1.8 Plasmide..... | 94 |
| 5.1.9 Oligonukleotide..... | 95 |
| 5.1.10 Molekulargewicht-Marker..... | 96 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.11 Bakterien und Kulturmedien..... | 96 |
| 5.1.11.1 Bakterien..... | 96 |
| 5.1.11.2 Kulturmedien..... | 96 |
| 5.1.12 Zelllinien, Kulturmedien und Zellkulturlösungen..... | 96 |
| 5.1.12.1 Zelllinien..... | 96 |
| 5.1.12.2 Kulturmedien..... | 96 |
| 5.1.12.3 Zellkulturlösungen..... | 97 |
| 5.1.13 Mauslinien..... | 97 |
| 5.2 Methoden..... | 99 |
| 5.2.1 Zellkultur..... | 99 |
| 5.2.1.1 Auftauen von ES-Zellen..... | 99 |
| 5.2.1.2 Passagieren von ES-Zellen..... | 99 |
| 5.2.1.3 Einfrieren von ES-Zellen..... | 99 |
| 5.2.1.4 Transfektion von ES-Zellen..... | 99 |
| 5.2.1.5 Picken von Einzelklonen..... | 100 |
| 5.2.1.6 Herstellung von Mausfibroblasten | 100 |
| 5.2.1.7 Herstellung von Feederzellen und Behandlung mit Mitomycin..... | 101 |
| 5.2.1.8 Immundetektion auf Zellen..... | 101 |
| 5.2.2 Molekularbiologie..... | 101 |
| 5.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 101 |
| 5.2.2.2 Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese | 101 |
| 5.2.2.3 DNA-Präparation aus Mausschwänzen und ES-Zellen..... | 102 |
| 5.2.2.4 Plasmidpräparation mit dem Qiagen-Kit..... | 102 |
| 5.2.2.5 RNA-Präparation aus ES-Zellen..... | 102 |
| 5.2.2.6 Herstellung von cDNA mittel reverser Transkription..... | 103 |
| 5.2.2.7 Polymerasekettenreaktion..... | 103 |
| 5.2.2.8 Chemische Transformation von Bakterien..... | 103 |
| 5.2.2.9 Sequenzierreaktion..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.2.10 Herstellung von Sonden für die In Situ-Hybridisierung..... | 104 |
| 5.2.3 Biochemie..... | 106 |
| 5.2.3.1 Western Blot..... | 106 |
| 5.2.4 Embryologie..... | 107 |
| 5.2.4.1 Herstellung tetraploider Embryonen..... | 107 |
| 5.2.4.2 Herstellung von Chimären aus ES-Zell/tetraploiden Embryo-Aggregaten..... | 107 |
| 5.2.4.3 Isolierung von Mäuseembryonen..... | 108 |
| 5.2.4.4 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside) Färbung..... | 108 |
| 5.2.4.5 In Situ-Hybridisierung mit ganzen Embryonen..... | 108 |
| 5.2.4.6 Injektion von Tinte in das Gefäßsystem..... | 109 |
| 5.2.4.7 Klären von Embryonen..... | 110 |
| 5.2.4.8 Immundetektion auf ganzen Embryonen..... | 110 |
| 5.2.5 Histologie..... | 110 |
| 5.2.5.1 Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten..... | 110 |
| 5.2.5.2 Herstellung von Cryoschnitten..... | 111 |
| 5.2.5.3 Immundetektion auf Cryoschnitten..... | 111 |
| 5.2.6 Der hemizygote, phänotypen-basierte Screen..... | 111 |
| 5.2.6.1 Durchführung des Screens..... | 111 |
| 5.2.6.2 Bestätigung der GT-Integrationsstelle..... | 112 |
| 6 Ergänzende Abbildungen..... | 113 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 123 |
| 8 Anhang..... | 137 |
| 8.1 Abkürzungsverzeichnis..... | 137 |
| 8.2 Abbildungsverzeichnis..... | 139 |
| 9 Publikationen..... | 147 |
| 10 Danksagung..... | 149 |

1 Zusammenfassung

Nach Mendel vererbte Krankheiten werden oft mit dem X-Chromosom (XC) assoziiert. Dies liegt daran, dass Männer nur ein XC besitzen und deshalb für dessen Gene hemizygot sind. Eine Mutation des XCs führt deshalb in Männern öfter zur Ausbildung eines abnormalen Phänotyps, als die Mutation eines Autosoms. Um neue potentielle Krankheitsgene auf dem XC der Maus zu identifizieren wurde der Phänotypen-basierte Screen entworfen. Dabei wurden tetraploide Wildtyp-Embryonen im Zweizellstadium mit männlichen (XY) embryonalen Stammzellen (ES) aggregiert, die eine Genfallen-Insertion (GT) auf dem XC besitzen. Nach dem Retransfer in eine Leihmutter wurden die resultierenden Embryonen am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung (E9.5) auf einen mutanten Phänotyp untersucht. Zu diesem Zeitpunkt laufen wichtige Prozesse der Embryonalentwicklung ab, so dass die Analyse dieses Stadiums besonders aufschlußreiche Ergebnisse lieferte. Insgesamt wurden 17 X-chromosomale Gene untersucht, wobei für einige Gene mehrere GT-ES-Klone gewählt wurden, um die Verlässlichkeit des Screens zu zeigen. Zusätzlich wurde exemplarisch für das Gen *Nono* der mutante Phänotyp gerettet. Dies erfolgte durch die Inversion der Mutationskassette und somit deren Stilllegung. Dieses Experiment sowie *Nono*-Expressionsanalysen zeigten, dass die Entstehung des mutanten Phänotyps kein technisches Artefakt, sondern die Folge der *Nono*-GT Mutation war. Von den 17 Genen zeigten 65% einen mutanten Phänotyp. Diese wurden nach dem zeitlichen Auftreten in Gastrulations-, Neurulations- und Organogenese-Phänotypen klassifiziert. Die Zusammenlegung der in dieser Arbeit gezeigten Daten mit den Daten eines kanadischen Labors, das ebenfalls den Phänotypen-basierten Screen durchführte, ergab, dass insgesamt 33% der GT-Mutationen zu einem mutanten Phänotyp führten. Insgesamt lieferten die Daten des Phänotypen-basierten Screens auf schnelle und kostengünstige Weise eine gute Grundlage für weitere detaillierte Analysen gezielter X-chromosomaler Gene. Um dies zu demonstrieren wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die embryonale Funktion des Gens *mDia3* untersucht. Dieses kodiert für ein Protein, das bei der Remodellierung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt. Die detaillierte Analyse der *mDia3*-GT Embryonen nach der Aggregation mit tetraploiden Embryonen zeigte, dass die GT-Mutation von *mDia3* zu einer Störung in der Ausbildung der Links-Rechts-Achse sowie in den Neuralleistenzellen führt und die Embryonen aufgrund eines Ausflußtraktdefekts des Herzens versterben. Bei diesem Defekt handelt es sich um einen persistierenden Truncus Arteriosus (PTA), einem Defekt, der auch im Menschen als kongenitaler Herzdefekt bekannt ist. Dies zeigt, dass mit Hilfe der Genfalle und der Aggregationstechnik neue X-chromosomale Krankheitsgene identifiziert werden und die resultierenden Embryonen sogar als Mausmodell für humane Krankheiten dienen können.

2 Einleitung

2.1 Die Embryonalentwicklung der Maus

2.1.1 Die frühe Embryonalentwicklung

Die Embryonalentwicklung der Maus beginnt mit der Verschmelzung von Oozyte und Spermium (Gametogonie) und deren beider Zellkerne (Karyogamie). Durch die vorangegangene Meiose sind beide Gameten haploid und bilden nun die diploide Zygote. Diese bildet den Ursprung des neuen Organismus und beginnt ihre Wanderung durch den Eileiter zum Uterus.

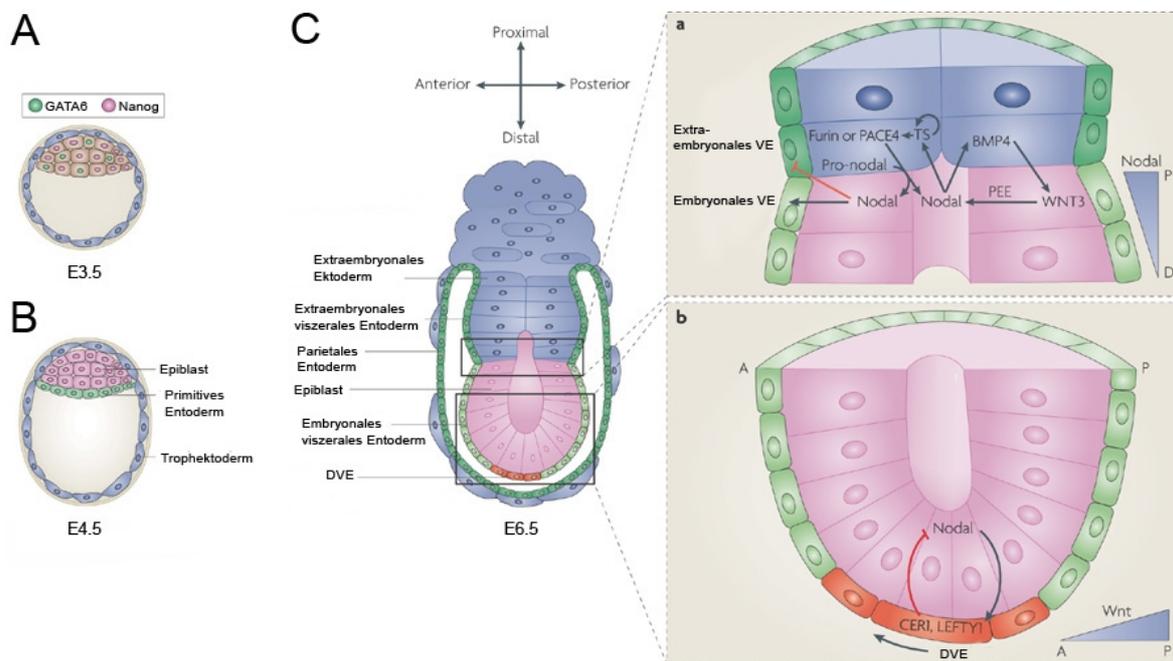


Abbildung 1: A, B) Die Bildung primärer Gewebetypen. Die Blastozyste an E3.5 besteht aus Trophektoderm und innerer Zellmasse (A). Deren Zellen bilden noch vor der Implantation an E4.5 entweder Nanog-positive Epiblastzellen oder GATA6-positive, primitive Entodermzellen (B). **C) Die Ausbildung der proximodistalen Achse.** Durch den Aufbau eines Nodal-Signalgradienten entsteht die Festlegung der proximodistalen Achse. Der Gradient wird durch zwei unabhängige Rückkoppelungsschleifen gestärkt: a) Pro-Nodal wird am Übergang von extraembryonalem zu embryonalem Gewebe von Furin oder PACE4 gespalten und aktiviert. Nodal im Epiblasten führt zur Hochregulierung von Bmp4 im extraembryonalen Gewebe, was wiederum die Wnt3-Expression im Epiblasten erhöht. Dieses aktiviert den Nodal-Proximal-Epiblast Enhancer (PEE) und erhöht so nochmals die Nodal-Expression. b) Einige Zellen an der Spitze des Embryos bilden das distale viszerale Entoderm (DVE) und exprimieren die Wnt- und Nodal-Inhibitoren Cerberus-like 1 (Cer1) und Lefty1. Dadurch wird die distale Nodal-Expression inhibiert und der Nodal-Gradient nochmals gestärkt. Modifiziert nach Arnold und Robertson, 2009.

Währenddessen teilt sie sich bis sie schließlich die kugelförmige Morula bildet, die aus 8-16 kompakten Zellen besteht. Mit der Ankunft im Uterus nach 3,5 Tagen sind auch die ersten äußerlichen Anzeichen von Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen sichtbar, die mit der Ausbildung der Blastozyste einhergehen (Abbildung 1).

Durch die Ansammlung von Flüssigkeit in den Interzellulärspalten der Morula bildet sich die Blastozystenöhle, deren Lage auf einer Seite des Embryos bereits jetzt indirekt die erste Körperachse festlegt (Abbildung 1A). Die innen liegenden Zellen, innere Zellmasse (ICM) genannt, bilden erst den Epiblasten und später alle Gewebetypen des eigentlichen Embryos. Sie sind pluripotent und exprimieren den Marker *Oct3/4*, der zum Erhalt der Pluripotenz essentiell ist (Rosner et al., 1990). Aufgrund dieses Potentials werden sie auch zur Herstellung von embryonalen Stammzellen verwendet (Martin, 1981). An der Bildung des extraembryonalen Gewebes sind zwei verschiedene Zelltypen beteiligt: das Trophektoderm umgibt die ICM äußerlich und bildet später den Hauptteil der fetalen Plazenta. Das primitive Entoderm (PE) bildet die äußerste Zellschicht des ICM, die in Kontakt zur Blastozystenöhle steht und später als parietales Entoderm die innere Oberfläche des Trophektoderm auskleidet und als viszerales Entoderm das extraembryonale Ektoderm sowie den Epiblasten umgibt (1B). Somit findet auch in der ICM selbst die Differenzierung in den embryonalen Epiblasten und das extraembryonale primitive Entoderm statt. Molekular unterscheiden sich die beiden Zelltypen durch die Expression von *Nanog*, einem Pluripotenzmarker im Epiblasten, und *GATA-6*, welches im PE detektierbar ist (Abbildung 1A,B). Von der Befruchtung bis zu diesem Stadium ist der Embryo von der Zona Pellucida umgeben, einer an Glykoproteinen reichen Schutzhülle. Zwischen E3.5 und E4.5 löst sich der Embryo von der Zona Pellucida und nistet sich in die Gebärmutter ein, so dass man ab dem Zeitpunkt E5.5 von der Postimplantationsphase spricht. In dieser Phase erfolgen schwerwiegende strukturelle Veränderungen: Zunächst bilden die Zellen der inneren Zellmasse den Epiblasten, eine verlängerte epitheliale Struktur, die die Form eines Kelches besitzt (Abbildung 1C). In diesem Stadium sind die Epiblastzellen noch pluripotent, können also sämtliche Zelltypen des späteren Embryos bilden, und exprimieren unter anderem die Pluripotenzmarker *Nanog*, *Oct3/4* und *Sox2*. Zur Gebärmutter hin bilden sich aus den Trophektodermzellen das extraembryonale Ektoderm sowie der ektoplazentale Keigel. Bevor es zur Bildung der drei endgültigen Körperachsen (anterioposterior = AP, dorsoventral = DV, links/rechts = LR) kommt, gibt es im Epiblast die transiente proximodistale Achse (= PD), wobei der distale Teil die Spitze des Epiblasten bildet (1C). Entlang dieser Achse entstehen zunächst molekulare Unterschiede: Zuerst kommt es zur Ausbildung des distalen viszeralen Entoderms (DVE), einem Signalzentrum an der distalen Seite des Embryos. Im DVE werden *Lefty-1*, *Cer1* und *Dkk-1* exprimiert. *Lefty-1* und *Cer1* sind Antagonisten von *Nodal*, während *Dkk-1* antagonistisch auf den Wnt-Signalweg wirkt. Diese Antagonisten bewirken, dass sowohl

Nodal, als auch der Wnt-Signalweg nur noch proximal aktiv sind und der Epiblast eine distal-proximale Polarität aufweist (Abbildung 1C a,b). Die Zellen des DVE wandern nun aktiv nach vorne und bilden dort das anteriore viszerale Entoderms (AVE). Dabei handelt es sich um eine wichtige Organisatorregion, die später für die Ausbildung der Kopfstrukturen essentiell ist (Überblick in Beddington und Robertson, 1998; Srinivas, 2006). Durch die Migration der distalen Zellen nach anterior kommt es zur Konvertierung der proximodistalen Achse in die anterioposteriore Achse, auch wenn diese noch nicht morphologisch sichtbar ist. Die Expression der *Nodal*-Antagonisten *Cer1* und *Lefty-1* im AVE reduziert die ursprüngliche *Nodal*-Expression vom proximalen Epiblast auf den posterioren Epiblasten. Auch *Wnt* ist nur posterior exprimiert. Zusammen mit *Nodal* und den inhibitorischen Faktoren im anterioren Epiblast induziert es die Bildung des Primitivstreifens im posterioren Bereich und somit den Beginn der Gastrulation (Brennan et al., 2001; Überblick in Lu et al., 2001; Pfister et al., 2007; Rossant und Tam, 2009).

2.1.2 Die Gastrulation

Unter dem Begriff Gastrulation versteht man die Bildung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Mit Beginn der Gastrulation ändert sich auch die Morphologie des Embryos und die AP-Achse ist zum ersten Mal deutlich sichtbar. Aus dem proximalen, posterioren Bereich des Epiblasten wandern Zellen aus und bilden zwischen Epiblast und PE den Primitivstreifen, der Vorläuferzellen von Mesoderm und Entoderm enthält. Die Epiblastzellen befinden sich in einem epithelialen Verband, deshalb müssen sie vor der Migration in den Primitivstreifen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen (Abbildung 2A). Diese Transition ist unter anderem vom Fgf-Signalweg abhängig, welcher auch indirekt die Expression von *Brachyury* (*T*) im Primitivstreifen reguliert. *T* ist einer der ersten mesodermalen Marker, die im Embryo nachweisbar sind. Für die Induktion des Mesoderms sind die *Nodal*- und *Wnt*-Signalwege im Epiblasten sowie *Bmp*-Signale vom extraembryonalen Ektoderm essentiell. Durch ihre regionalisierte Expression sorgen sie unter anderem dafür, dass der Primitivstreifen ausschließlich im posterioren Bereich des Embryos gebildet wird. Während der folgenden 36 Stunden verlängert sich der Primitivstreifen bis zur distalen Spitze des Embryos. Je nach Zeit und Ort ihrer Wanderung durch den Primitivstreifen kann den Mesodermzellen ein bestimmtes Schicksal zugeordnet werden: Die zuerst gebildeten und somit am weitesten posterior gebildeten Mesodermzellen entstehen unter dem Einfluß von extraembryonal exprimiertem *Bmp4*. Sie differenzieren zu extraembryonalem Gewebe einschließlich der Blutinseln, die die Grundlage für den späteren fötalen Blutkreislauf bilden. Die Mesodermzellen des mittleren und vorderen Primitivstreifens bilden das Seitenplattenmesoderm sowie das paraxiale und das kardiale Mesoderm. Die am meisten anterior gelegenen Zellen des Primitivstreifens (APS) haben unterschiedliche Schicksale: als

Organisatoren der frühen und mittleren Gastrulation sowie später als Primitivknoten tragen sie zur Bildung wichtiger Strukturen bei. Während der frühen Gastrulation bilden sie das vordere axiale Mesentoderm und die am meisten anterior gelegenen Entodermzellen. Während der mittleren Gastrulation tragen die Zellen des APS zum axialen Mesentoderm sowie zum anterioren definitiven Entoderm (ADE) bei und bilden an der distalen Spitze des Embryos schließlich den Primitivknoten, der zum axialen Mesoderm und der Bodenplatte des posterioren Embryos beiträgt (Kinder et al., 2001). Der Primitivknoten hat eine ganz besondere Eigenschaft und Funktion: Er besteht aus einer Einstülpung mit monoziliären Zellen.

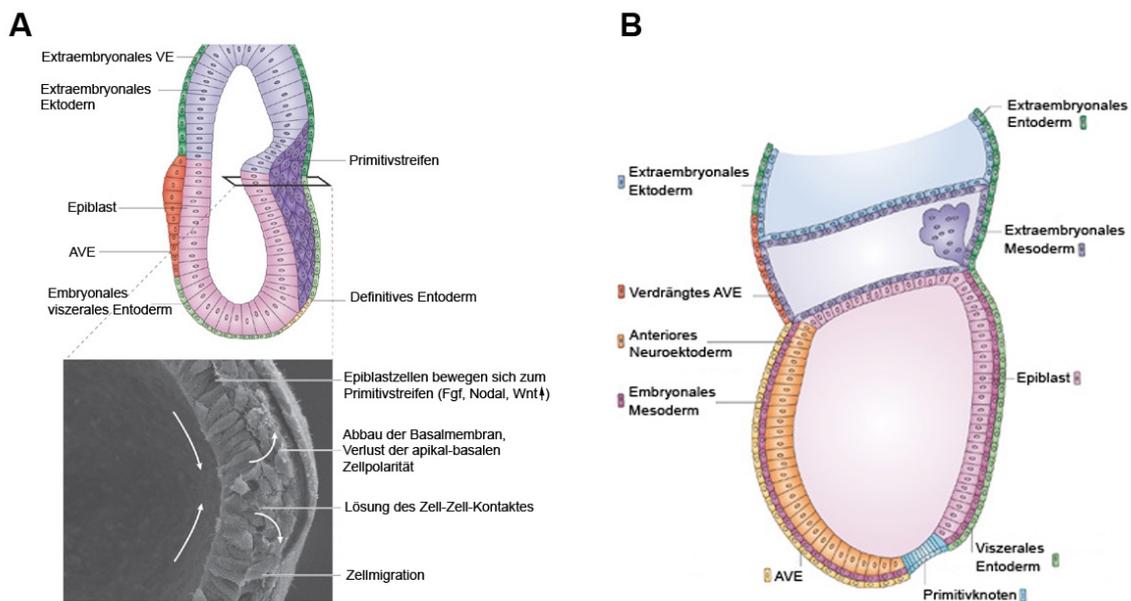


Abbildung 2: A) Die epithelial-mesenchymale Transition am Primitivstreifen. Epiblastzellen nähern sich dem Primitivstreifen, wo sie von den erhöhten Konzentrationen an *Wnt3*, *Fgf8* und *Nodal* beeinflusst werden. Die Zellen lösen sich von der Basalmembran und verlieren ihre Zellpolarität. Bestehende Zell-Zell-Kontakte werden aufgelöst und die Zelle kann ihre Wanderung entlang des Primitivstreifens beginnen. **B) Die Bildung verschiedener Zelltypen während der Gastrulation.** Die Bildung des embryonalen Mesoderms während der Gastrulation macht morphologisch die anteroposterior Achse deutlich. Während sich posterior der Primitivstreifen bildet, hat anterior das definitive Entoderm das viszerale Entoderm ersetzt. Die verbliebenen Epiblastzellen bilden das Neuroektoderm. Distal bildet sich ein wichtiger Organisator, der Primitivknoten. Modifiziert nach Arnold und Robertson, 2009.

Deren Zilien rotieren im Uhrzeigersinn und verursachen damit den sogenannten „Nodal Flow“, der signalgebende Moleküle wie z.B. Nodal auf die linke Seite des Embryos befördert und somit die Bildung der Links-Rechts-Achse bewirkt (Überblick in Lee und Anderson, 2008). Die Zellen des definitiven Entoderms beginnen ab E6.5 an die Oberfläche zu wandern und in das viszerale Entoderm zu interkalieren, um es schließlich vollständig zu ersetzen. Während der Entodermentwicklung spielt der Transkriptionsfaktor *Foxa2* eine entscheidende Rolle. In Knockout-Modellen konnte gezeigt werden, dass ohne *Foxa2* kein definitives Entoderm

gebildet wird. Der entodermale Marker *Foxa2* und der mesodermale Marker *T* werden beide im axialen Mesentoderm exprimiert, das als Mittellinie von anterior nach distal sichtbar ist. Während Mesoderm und Entoderm von Zellen gebildet werden, die aus dem Epiblasten durch den Primitivstreifen auswandern, bilden die verbleibenden epithelialen Zellen des Epiblasten das Ektoderm. Um eine vollständige Differenzierung des Epiblasten in Mesoderm zu verhindern exprimieren die Zellen des APS und des AVE die *Nodal*-Antagonisten *Lefty-1* und *Cer1*, den Wnt-Antagonisten *Dkk1* sowie die Bmp-Antagonisten *Chordin* und *Noggin*. Der Embryo besteht nun aus drei Keimblättern (Abbildung 2B), die die somatischen Zellen bilden. Um den Fortbestand der eigenen Gattung zu gewährleisten werden zusätzlich Keimzellen angelegt. Sie werden posterior durch Bmp-Signale des extraembryonalen Ektoderms induziert und wandern später durch den Hinterdarm in die Genitalleiste ein. Sie unterscheiden sich von somatischen Zellen dadurch, dass sie epigenetisch reprogrammiert werden und die Pluripotenzmarker *Oct3/4*, *Nanog* und *Sox2* exprimieren, während somatische Gene wie z.B. *Hoxa1* und *Hoxb1* reprimiert werden (Überblick in Arnold und Robertson, 2009).

2.1.3 Die frühe Organogenese

2.1.3.1 Die Entwicklung der Mesodermdervate

Wie bereits beschrieben bilden die Zellen des Primitivstreifens verschiedene Mesodermdervate, die unterschiedliche Schicksale haben (Abbildung 3). Aus dem axialen Mesoderm bildet sich am Ende der Gastrulation im Kopfbereich die Prächordalplatte. Sie bildet das Kopfmesenchym und differenziert sich später in das Bindegewebe und die Muskulatur des Kopfes. Weiter posterior von der Prächordalplatte wird das Notochord ausgebildet. Dieses induziert die Bildung der dorsal gelegenen Neuralplatte und bestimmt dadurch zum einen den Startpunkt der Neurulation und etabliert zum anderen die dorsale Lage des Rückenmarks und der Wirbelsäule.

Direkt neben dem axialen Mesoderm liegt das paraxiale Mesoderm. Es ist zunächst unsegmentiertes Mesoderm, bildet jedoch ab E8.0 die Somiten aus. Bei den Somiten handelt es sich um transiente epitheliale Strukturen, durch die die Segmentierung von Wirbeltieren festgelegt wird. Sie enthalten Vorläufer für Knochen (Sklerotom), Muskeln (Myotom) und Haut (Dermatom). Die Besonderheit bei der Somitogenese besteht darin, dass sie periodisch abläuft. So wird z.B. in der Maus alle 120 Minuten ein Somitenpaar lateral des Neuralrohrs von anterior nach posterior angelegt. Es konnte gezeigt werden, dass oszillierende Signalmoleküle der Notch- und Fgf-Signalwege abwechselnd zu Molekülen des Wnt-Signalwegs agieren und über eine komplexe Regulierung mit negativen Rückkoppelungsschleifen die Periodizität der sogenannten Somitenuhr erzeugen (Überblick in Dequéant und Pourquié, 2008).

Als weitere Mesodermderivate sind noch das intermediäre Mesoderm, das das Urogenitalsystem bildet, sowie das Seitenplattenmesoderm zu unterscheiden. Dieses bildet dorsal als somatisches Mesoderm die zukünftige Körperwand und ventral als splanchnisches Mesoderm den Blutkreislauf und die Darmwand.

2.1.3.2 Die Entstehung des Nervensystems: Neurulation

Die Neurulation wird durch das ventral liegende Notochord induziert. Die ektodermalen Zellen über dem Notochord, auch Neuroektoderm genannt, bilden ab E7.5 zunächst anterior vom Primitivstreifen die Neuralplatte, die sich dann weiter nach posterior verlängert. Die seitlichen Ränder der Neuralplatte falten sich anschließend nach innen zur Neuralfalte und fusionieren ab E8.0 dorsal in Höhe der vierten und fünften Somiten. Die Fusion setzt sich in Richtung Kopf (rostral) und Schwanz (kaudal) fort, so dass es zur Bildung des Neuralrohrs kommt, welches sich später in Gehirn und Rückenmark differenziert. Die ventral gelegenen Zellen des Neuralrohrs werden Bodenplatte genannt. In der Bodenplatte sowie im Notochord ist eine hohe *Shh*-Expression detektierbar, während in der Dachplatte, dem dorsalen Teil des Neuralrohrs, vermehrt *Bmps* exprimiert werden (Abbildung 3). Diese regionalisierte Expression ist für die Festlegung der dorsoventralen Achse des Neuralrohr verantwortlich, die für die Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen maßgebend ist (Überblick in Tabata, 2001). Am dorsalen Rand des Neuralrohrs, wo die Seiten der Neuralplatte fusioniert sind, bildet sich zwischen E8.5 und E10.5 die Neuralleiste. Deren Zellen wandern zu unterschiedlichen Stellen des Organismus, wo sie Signale erhalten, die zu ihrer weiteren Differenzierung führen. Die Neuralleistenzellen bilden Neurone und Gliazellen des autonomen und sensorischen Nervensystems, sowie neurosekretorische Zellen. Ein Teil der Neuralleistenzellen ist auch an der Ausbildung nichtneuronaler Strukturen beteiligt, wie z.B. der glatten Muskulatur des Ausflußtraktes des Herzens, Pigmentzellen, Knochen und Knorpel.

Die Fusion des Neuralrohrs im vorderen Teil des Embryos ist an E9.0 abgeschlossen. Dieser Schritt der Neurulation wird als primäre Neurulation bezeichnet. Im Gegensatz dazu gibt es die anschließende sekundäre Neurulation. Sie bezieht sich auf die Bildung des Neuralrohrs im kaudalen Teil, also in Höhe der späteren Sakral- und Steißwirbel, die unter anderem den Schwanz der Maus bilden. Es ist zwar schon lange bekannt, dass dieser Teil des Neuralrohrs durch einen eigenen Mechanismus gebildet wird, jedoch wurde erst 2002 gezeigt, dass die Stammzellpopulation für diesen Bereich in der sogenannten Chordoneuralen Verbindung in der Schwanzknospe, dem Nachkommen des Primitivstreifens, sitzt. Ursprünglich stammen diese Stammzellen von der Grenze von Primitivknoten und Primitivstreifen ab und wandern in die Chordoneurale Verbindung ein. Dort bilden sie Neuroektoderm, Somiten und Notochord und führen die Neuralrohrbildung weiter (Cambray und Wilson, 2002 und 2007). Wenn diese vollständig abgeschlossen ist, kommt es zur weiteren Regionalisierung des Neuralrohres in

Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn und Rückenmark (Überblick in Wurst und Bally-Cuif, 2001; Copp et al., 2003).

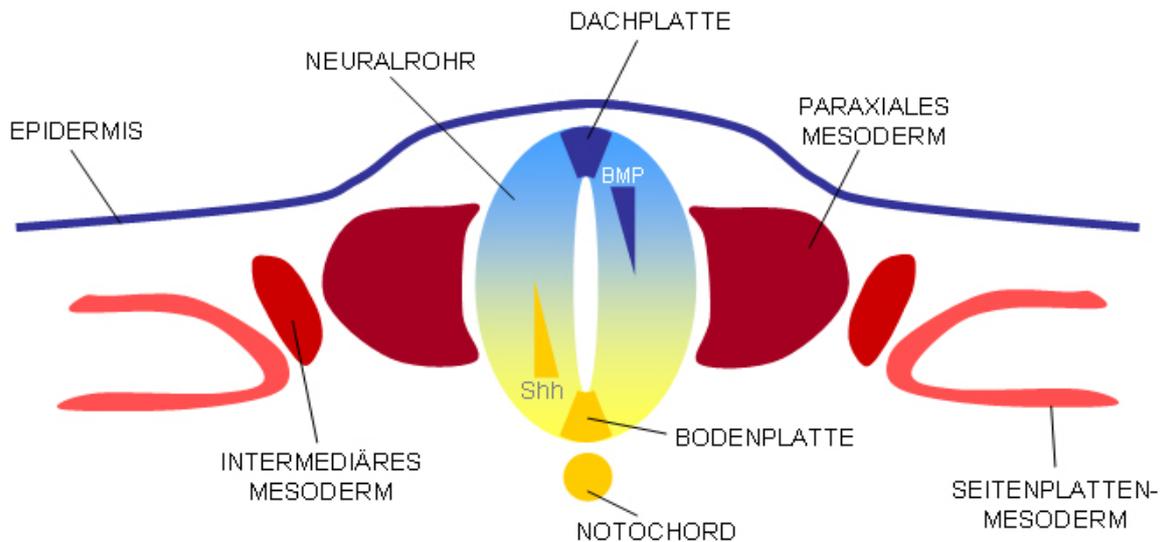


Abbildung 3: Die Derivate des Mesoderms und Ektoderms. Das axiale Mesoderm differenziert sich in das Notochord, welches die Neurulation induziert. Shh- und Bmp-Gradienten legen die dorsoventrale Achse im Neuralrohr fest. Das paraxiale Mesoderm bildet später die Somiten aus. Intermediäres und Seitenplattenmesoderm bilden Urogenitalsystem bzw. Körperwand und Blutkreislauf.

2.1.3.3 Die Entwicklung der Entodermderivate

Nach der Gastrulation liegt das definitive Entoderm als Plattenepithel an der Oberfläche des Embryos. Die Ausbildung des primitiven Darms beginnt zunächst mit einer Einstülpung anterior unter der Neuralfalte, der sogenannten Vorderdarntasche. Sie dehnt sich zunächst nach rostral aus und verlängert sich dann nach posterior und bildet so den Vorderdarm. Sechs bis acht Stunden später bildet sich nach dem gleichen Schema auch die Hinterdarntasche, die sich dann als Hinter- und Mitteldarm nach anterior verlängert und schließlich im Bereich des Allantoisganges auf den Vorderdarm trifft. Während der Verlängerung von Vorder- und Hinterdarm fusionieren die seitlichen Wände des primitiven Darms, so dass es zur Ausbildung des geschlossenen Darmrohres kommt. Vom Darmrohr knospen sich im weiteren Verlauf die einzelnen Entodermderivate, wie z.B. die Leber, der Pankreas und die Lunge ab (Überblick in Lewis und Tam, 2006).

2.1.4 Die Entwicklung des Herzens

Die Entwicklung des Herzens ist eine präzise Aneinanderreihung von molekularen und morphologischen Ereignissen. Bereits kleine Veränderungen in dem genau durchorganisierten Bauplan des Herzens können katastrophale Auswirkungen haben, die sich in angeborenen und möglicherweise letalen Herzfehlern äußern. Angeborene Herzfehler bei Kindern sind die häufigste Diagnose unter allen angeborenen Fehlbildungen. Etwa neun Kinder von 1.000 werden mit einer Fehlbildung des Herzens geboren (Quelle: American Heart Association). Bei Frühgeborenen ist die Wahrscheinlichkeit eines Herzfehlers sogar doppelt so hoch, und auch bei Totgeburten ist die Anzahl der Herzfehler um das 3-7-fache erhöht. Obwohl seit Jahren an der Entstehung von angeborenen Herzfehlern geforscht wird, ist bis heute nur sehr wenig über die auslösenden Gene bekannt. Deshalb ist es notwendig weitere herzspezifische Gene zu identifizieren und deren Rolle in der Herzentwicklung zu charakterisieren.

Das Herz gehört zum Blutkreislauf und ist somit ein Organ mesodermalen Ursprungs. Seine Induktion erfolgt durch Bmps, Wnt-Inhibitoren (z.B. Dkk1) sowie Fgf8, die vom umgebenden Entoderm, Ektoderm und extraembryonalem Gewebe exprimiert werden. In einer ersten Migrationswelle wandern mesodermale Zellen des Primitivknotens in die Kopfreion lateral und kranial der Vorderdarntasche. Dort sind sie ab E7.75 als sichelförmiges Epithel sichtbar und exprimieren herzspezifische Transkriptionsfaktoren, wie Nkx2.5, Gata4/5/6, Mef2b/2c, Hand1/2 und Tbx5/20, die die Kardiomyozytendifferenzierung einleiten. In einer zweiten Migrationswelle wandern die Herzvorläufer zur ventralen Mittellinie, um das aus Endothel und myokardialem Epithel bestehende Herzrohr mit kranialem Ausfluß- und kaudalem Einflußtrakt zu bilden. Noch bevor sich das Herzrohr komplett nach kaudal verlängert hat, kommt es schon zum Beginn der Herzdrehung, welche von der LR-Musterbildung abhängt. Diese ist dafür verantwortlich, dass aus einem initialen Rohr ein komplexes Herz mit zwei Kammern und zwei Vorhöfen entsteht. Ausgehend vom Herzrohr an E8.25 lässt sich die Herzdrehung in vier Schritte einteilen (Abbildung 4). Beim ersten Schritt wölbt sich das gerade Herzrohr (Abbildung 4A) nach ventral, so dass eine ventrale große Krümmung und eine dorsale kleine Krümmung entstehen (Abbildung 4B). Diese Wölbung wird wahrscheinlich durch mechanische Kräfte im Herzen verursacht. Im zweiten Schritt kommt es zu einer Rechtsdrehung um die kraniokaudale Achse, welche das Herzrohr in eine helikal gewundene Schleife verwandelt (Abbildung 4C). Hier zeigen sich die ersten Anzeichen von LR-Asymmetrie des Herzens. Bei Mutanten, die einen Defekt in der LR-Achse haben, kann es zu einer Drehung in die andere Richtung, und somit zu einer Inversion des Herzens, kommen. Bereits jetzt zeichnen sich die zukünftigen Ventrikel als ballonförmige Erweiterungen ab, wobei der rechte Ventrikel ventral und dextrokranial zum linken Ventrikel liegt. Der Atrioventrikularkanal (AV-Kanal), der die beiden definitiven Atrioventrikularkanäle bildet, liegt nach wie vor kaudal zu den zukünftigen

Ventrikeln. Im dritten Schritt der Herzdrehung werden diese Positionen zueinander durch weitere Torsion geändert: der ganze ventrikuläre Teil verschiebt sich nach kaudal, so dass der AV-Kanal nun kranial neben dem Ausflußtrakt liegt (Abbildung 4D). Bereits jetzt sind die beiden Vorhöfe morphologisch sichtbar, jedoch noch miteinander verbunden. Im vierten Schritt zwischen E9.5 und E11.0 wird das Herz wieder entwunden: die Ventrikel erhalten ihre finalen Positionen nebeneinander, der Atrioventrikularkanal und die beiden Vorhöfe werden nach rechts verschoben, während sich der Ausflußtrakt nach ventral und links verschiebt (Abbildung 4E).

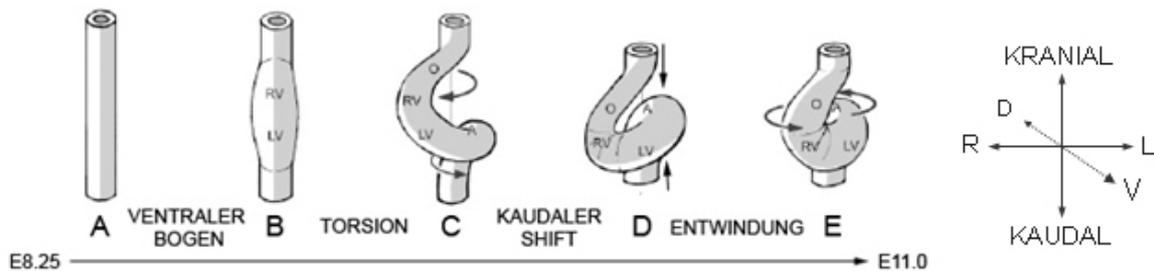


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Herzdrehung. A) Eine ventrale Biegung formt aus dem geraden Herzschlauch einen gebogenen Schlauch mit ventraler Krümmung. B) Die Torsion um die kranio-kaudale Achse führt zu einer helikal gewundenen Schleife. C) Der kaudale Shift erfolgt wahrscheinlich aufgrund der Stauchung zwischen kaudalem und kranialem Ende. D) Charakteristisch für die Entwindung sind 1. der Shift des Ausflußtraktes nach links und ventral, 2. der ventrale Shift des primitiven rechten Ventrikels, 3. der Shift des Atrioventrikularkanal nach rechts. Modifiziert nach Männer, 2009.

Während der Entwindung des Herzens kommt es auch zu schwerwiegenden Veränderungen im Ausflußtrakt, welcher einen proximalen und einen distalen Teil besitzt. Zu Beginn der Entwindung verlängert sich der proximale Teil. Er ist kranial am Aortensack an der dorsalen Mittellinie und kaudal am rechten Ventrikel befestigt. Der kaudale Teil ist beweglich und folgt den morphologischen Veränderungen des Ventrikels. Er verändert im Laufe der Herzdrehung seine Links-Rechts-Achse in die dorsoventrale Achse. Der distale Ausflußtrakt ist am kranial des proximalen Teils befestigt. Zum Ende der Herzentwindung verlängert er sich ohne seine ursprüngliche Links-Rechts-Achse zu ändern. Dies führt zu einer leichten Biegung am Übergang vom proximalen zum distalen Ausflußtrakt (Überblick in Männer, 2009). In den folgenden Entwicklungsstadien wird das Herz remodelliert. Zwischen den beiden Ventrikeln bzw. den beiden Vorhöfen bilden sich Septen, so dass es zur Bildung der geschlossenen vier Herzkammern kommt (Abbildung 5D). Zudem entstehen in den Übergängen von den Vorhöfen zu den Ventrikeln die Mitralklappen. Im Ausflußtrakt bildet sich ein helikales Septum, das zur Ausbildung der Pulmonalarterie und des Aortenbogens führt.

Der Ursprung der herzbildenden Zellen wurde lange diskutiert. An E7.75 können das sichelförmige Epithel sowie das umgebende Gewebe in das primäre und sekundäre Herzfeld

eingeteilt werden (Abbildung 5A, Überblick in Buckingham et al., 2005). Dabei handelt es sich um zwei dynamische Regionen mit unterschiedlichem Entwicklungspotential, die sowohl Herzvorläuferzellen als auch regulatorische Komponenten enthalten. Während die Zellen des primären Herzfeldes den linken Ventrikel bilden sowie zum rechten Ventrikel und den beiden Vorhöfen beitragen, bildet das sekundäre Herzfeld den Ausflußtrakt mit anschließenden Branchialbögen und trägt ebenfalls zum rechten Ventrikel sowie den Vorhöfen bei (Abbildung 5B-D). Später während der Remodellierung des Herzens wandern Zellen von der Neuralleiste zunächst in die Branchialbögen und später in den Vorläufer des Septums im Ausflußtrakt ein (5C,D; Überblick in Snarr et al., 2008; Stennard und Harvey, 2005; Srivastava, 2006).

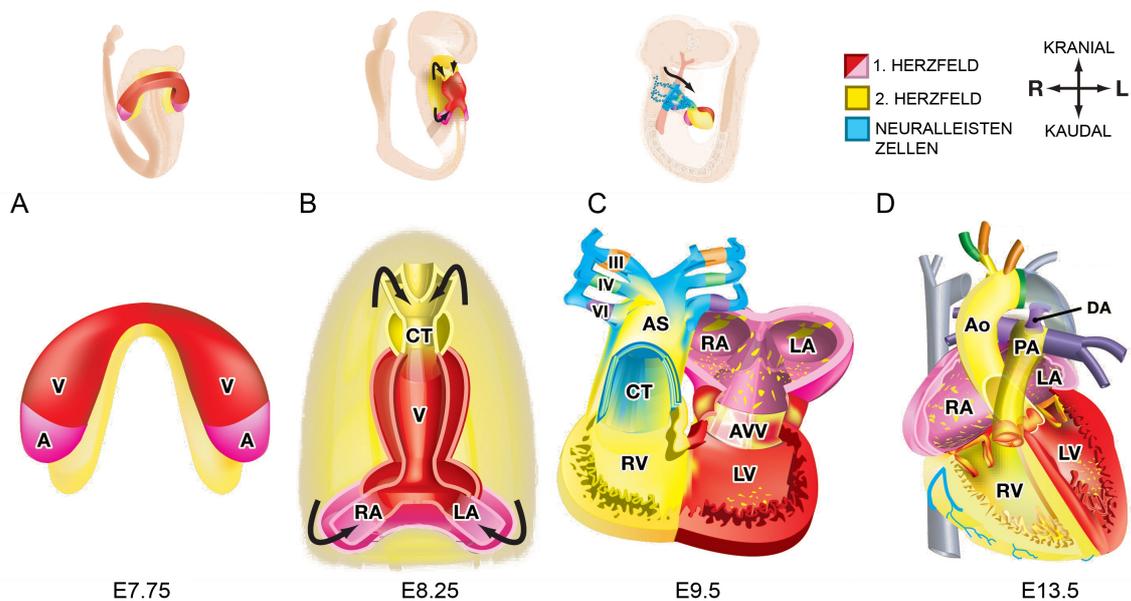


Abbildung 5: Ursprung der Zellpopulationen des Herzens. A) Das primäre Herzfeld ist an E7.75 als halbmondförmige Leiste detektierbar. Dorsal dazu liegen die Zellen des zweiten Herzfeldes. B) An E8.25 bildet das erste Herzfeld den geraden Herzschlauch. Die Zellen des zweiten Herzfeldes bilden die Vorläufer des rechten Ventrikels und des Ausflußtraktes (Conotruncus, CT). C) Die Herzdrehung führt dazu, dass Ein- und Ausflußtrakt an E9.5 nebeneinander liegen. Während der Herzdrehung wandern Neuralleistenzellen in den Ausflußtrakt und bilden dort das Septum. Zudem wandern Neuralleistenzellen in die bilateral symmetrischen Arterien der Branchialbögen. D) An E13.5 sind das Herz sowie die Branchialbogenarterien fertig remodelliert. Das Herz besitzt nun zwei Vorhöfe und zwei Ventrikel, die jeweils durch Septen getrennt sind. V, Ventrikel; A, Atrium; CT, Conus Trunkertiosus; RA, rechtes Atrium; LA, linkes Atrium; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; AS, Aortensack; AVV, Atrioventrikularklappe; Ao, Aorta; PA, Pulmonararterie; DA, Ductus Arteriosus. Modifiziert nach Srivastava, 2006.

2.1.5 Die Entwicklung der glatten Muskulatur

In Säugetieren findet man drei verschiedene Arten von Muskulatur, die sich sowohl histologisch als auch funktionell unterscheiden. Die willkürlich steuerbare Skelettmuskulatur des Bewegungsapparates weist histologisch eine Querstreifung auf, die durch die gleichmäßige Anordnung der Muskelfasern zustande kommt. Im Gegensatz dazu gibt es die Herzmuskulatur, die zwar ebenfalls quergestreift ist, jedoch nicht willkürlich gesteuert werden kann. Sie bekommt ihre Signale vom Erregungsleitungssystem des Herzens. Die dritte Muskelart ist die glatte Muskulatur (Smooth Muscle - SM), deren Zellen keine Querstreifung zeigen und die genauso wie die Herzmuskelzellen nicht willkürlich beeinflusst werden können. Die glatte Muskulatur umkleidet große Teile der inneren Organe sowie des Gefäßsystems. Ihre Steuerung erfolgt durch das vegetative Nervensystem, das dadurch unter anderem die Peristaltik des Darms sowie den Blutdruck kontrolliert. Verschiedene SM-Zellen zeigen Zelllinien-spezifisches Verhalten, je nach Ursprung im Embryo. Allein für die vaskulären SM-Zellen konnten bis zu sieben Ursprungsorte identifiziert werden (Abbildung 6; Überblick in Majesky, 2007). So kann ein Blutgefäß aus unterschiedlichen SM-Populationen bestehen, wobei die Grenzen der einzelnen Populationen meistens sehr scharf sind und nur wenig oder keine Durchmischung zulassen. Die erste vaskuläre SM-Linie wurde bei dem Versuch das Schicksal verschiedener Neuralleistenregionen zu untersuchen entdeckt. Dabei konnte im Huhn gezeigt werden, dass kraniale Neuralleistenzellen zum einen die Wände der Branchialbogenarterien auskleiden und zum anderen im Ausflußtrakt bei dessen Septierung in die Aorta und die Pulmonalarterie mitwirken. Untersuchungen in der Maus ergaben, dass die kranialen Neuralleistenzellen zudem zur Bildung der aufsteigenden Aorta, dem Aortenbogen sowie den angeschlossenen großen Arterien beitragen. Entgegen der Erwartungen bilden sich die von der Aorta abzweigenden Koronararterien nicht als deren Auswüchse sondern entstehen unabhängig und wachsen dann in die Aorta ein. Dies erklärt, warum sie von einer anderen SM-Population besiedelt werden, denn die SM-Zellen der Koronararterien stammen aus dem Proepikard im Herzen selbst. Dabei handelt es sich um ein transientes Primordium, das sich aus dem Mesenchym des Septum Transversus bildet. Es bildet nicht nur die SM-Zellen der Koronararterien, sondern auch deren Endothel, sowie das Epikard des Herzens. Ein ebenfalls für den Ausflußtrakt wichtiger Ursprungsort von vaskulären SM-Zellen ist das zweite Herzfeld. In einer ersten Welle wandern Herzleistenzellen in den Ausflußtrakt und bilden dort zunächst Herzmuskelzellen. Während einer zweiten Migrationswelle bilden die Herzleistenzellen die glatte Muskulatur an der Basis des Ausflußtrakts. Während diese drei Ursprungsorte die SM-Zellen im Bereich des Herzens bilden, gibt es noch weitere Ursprungsorte, die das Gefäßsystem im ganzen Körper mit SM-Zellen auskleiden. Dazu gehören das Sklerotom der Somiten, die Mesothelien der Organe, das splanchnische Mesoderm, der Mesangioblast in der Aorta sowie verschiedene Stammzellen.

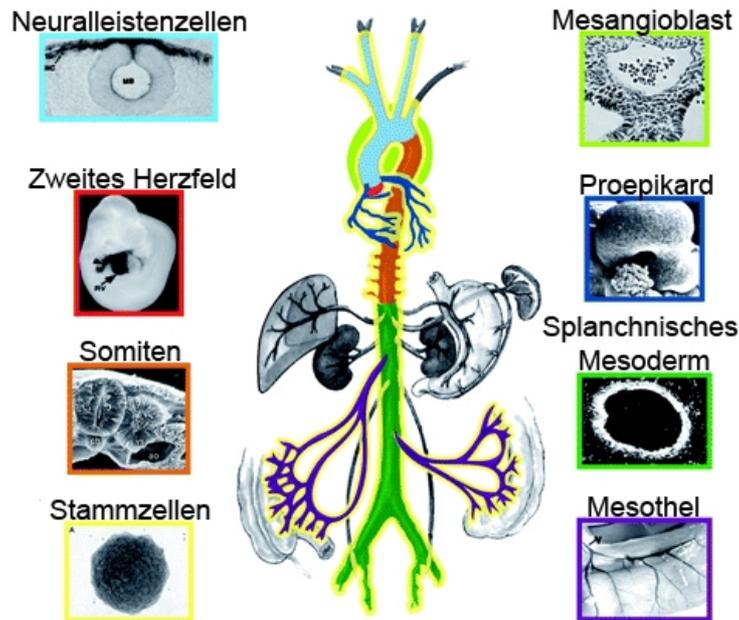


Abbildung 6: Ursprungsorte der vaskulären glatten Muskulatur. Verschiedene Farben repräsentieren unterschiedliche embryonale Ursprungsorte der glatten Muskelzellen. Modifiziert nach Majesky, 2007.

Die nicht-vaskuläre glatte Muskulatur entwickelt sich durch die lokale Anhäufung von mesenchymalen Zellen und wird vor der vaskulären glatten Muskulatur gebildet. Es wurde gezeigt, dass dabei in den Luftwegen sowohl morphogenetische Faktoren vom umgebenden Epithelium sowie mechanische Kräfte eine große Rolle spielen. Letztere entstehen durch die Flüssigkeitsansammlung im Gewebe und den Blutgefäßen (Überblick in Badri et al., 2007).

Molekular wird die Differenzierung in SM-Zellen vor allem durch den Transkriptionsfaktor SRF (Serum Response Factor) und seine Kofaktoren Myocardin sowie die Myocardin-verwandten Transkriptionsfaktoren MRTF-A und MRTF-B (Myocardin-Related Transcription Factors) beeinflusst (Überblick in Wang und Olson, 2004). Ihre Aktivierung erfolgt aufgrund extrazellulärer Signale vermittelt durch eine MAP-Kinase-Kaskade (Mitogen Activated Protein) oder durch Änderungen im Aktin Zytoskelett. SRF bindet dann mit Myocardin oder MRTF-A/B in der Promoterregion SM-spezifischer Gene, wie z.B. *SM α -Aktin*, *SM22* und *Calponin*. Dies führt zur Aktivierung deren Transkription und somit zur Differenzierung der betroffenen Zelle in eine SM-Zelle.

2.2 Die Grundlagen der Zellbewegung: Das Zytoskelett

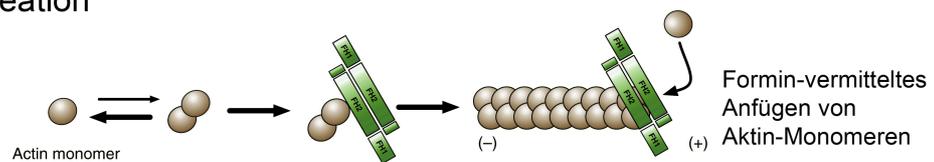
Ein Organismus ist von der Bewegung und morphologischen Veränderung von Zellen abhängig. Gerade in der Embryonalentwicklung wandern Zellen von ihrem Ursprungsort zum Bestimmungsort und legen dort den Grundstein für die Organsysteme. Ein anderes Beispiel bilden die Zellen des Immunsystems, die den gesamten Organismus durchwandern und direkt vor Ort eindringende Erreger bekämpfen. Aber auch Zellen im Verband sind zu beträchtlichen morphologischen Veränderungen fähig. Dabei kann es sich um die Kontraktion von ganzen Zellen oder auch um intrazelluläre Prozesse, wie die Trennung der Chromosomen, handeln. Bewegung ist mechanische Arbeit und verbraucht Energie, welche in der Zelle durch die Hydrolyse von ATP zu ADP+P_i erzeugt wird. Der Zellbewegung liegt ein dynamisches Gerüst, das Zytoskelett, zugrunde. Es besteht aus verschiedenen Arten von Filamenten, den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Intermediärfilamente spielen jedoch keine Rolle bei Bewegungsabläufen und dienen eher der Stärkung der Plasmamembran. Unter den Mikrofilamenten versteht man das Aktin-Zytoskelett. Aktin kann in monomerer Form als G-Aktin vorliegen und unter Hydrolyse von ATP zu filamentösem, helikal gewundenem F-Aktin polymerisieren. Bei der Zellmigration kann die Zelle mit Hilfe des Aktin-Zytosketts verschiedene Strukturen ausbilden, die zur Fortbewegung dienen. Migrierende Zellen können beispielsweise ein Lamellopodium ausbilden, bei der es sich um eine große Membranausstülpung am vorderen Ende der Zelle handelt. Hinter dieser Ausstülpung nimmt die Zelle mit dem Boden Kontakt auf, indem sie fokale Adhäsionsplaques bildet. Durch schnelles Ab- und Aufbauen von Aktinfilamenten im hinteren bzw. vorderen Bereich der Zelle kann sich diese am Adhäsionsplaque nach vorne ziehen. Das Aktin-Zytoskelett spielt jedoch nicht nur bei der Zellmigration eine große Rolle, auch Prozesse wie Zellteilung und vesikulärer Transport sind davon abhängig. Bei der Zellteilung bildet sich beispielsweise ein Aktinring aus, der zur Einschnürung des Zytoplasmas und damit zu dessen Aufteilung auf die Tochterzellen führt.

Ähnlich wie Aktin, bestehen auch Mikrotubuli aus Filamenten. Diese bilden sich jedoch aus α - und β -Tubulin-Untereinheiten zusammen, die zu zylindrischen Rohren angeordnet sind. Es gibt dynamische, kurzlebige Mikrotubuli, die dort zu finden sind, wo ein schneller Umbau erfolgt, beispielsweise in den transienten Strukturen der Mitose. Im Gegensatz dazu gibt es stabile, langlebige Mikrotubuli. Man findet sie hauptsächlich in nicht mehr replizierenden Zellen, wo sie stabile Mikrotubulistrukturen, wie z.B. die Geißel des Spermiums bilden. Ihren Ursprung finden Mikrotubuli meistens in Mikrotubuliorganisationszentren (MTOC), zu denen auch Zentrosomen und Basalkörper gehören und die häufig in der Nähe des Golgi Apparates liegen, so dass von dort aus die Zellorganellen organisiert werden können.

2.2.1 Die Proteinfamilie der Formins

Das Aktin-Zytoskelett der eukaryotischen Zelle ist ein dynamischer Komplex, der für ihre Form, Adhäsion, Zytokinese und Motilität essentiell ist. Die Grundlage des Aktin-Zytoskeletts besteht aus den F-Aktin Filamenten, die aus einzelnen Bausteinen, dem globulären G-Aktin generiert werden. Zwar ist die Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin kinetisch begünstigt, dennoch benötigt die Zelle Proteine, die diese Reaktion regulieren und gegebenenfalls beschleunigen oder inhibieren. Generell ist der limitierende Faktor bei dieser Polymerisationsreaktion die Aktin-Nukleation (Abbildung 7A), d.h. das aktive Anfügen der G-Aktin-Monomere. Dafür ist unter anderen die Proteinfamilie der Formins zuständig.

A Aktin Nukleation



B Mikrotubuli Stabilisierung

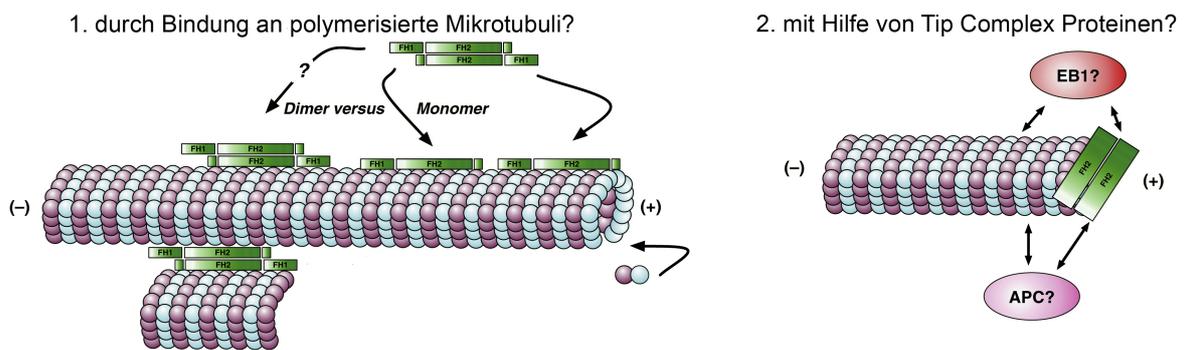


Abbildung 7: Die Funktionen von Formins. A) Formins wirken als Aktin Nukleatoren indem sie Aktin-Monomere binden und an das positive Ende von F-Aktin anfügen. B) Die Stabilisierung von Mikrotubuli durch Formins kann potentiell auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen: 1. Durch Anlagerung von Formins an die Seiten von polymerisierten Mikrotubuli. 2. Durch Stabilisierung der Mikrotubuli-Enden mit Hilfe von Tip-Complex-Proteinen, wie z.B. EB1 oder APC. Modifiziert nach De Ward und Alberts, 2008.

Ihren Namen erhielten die Formins durch die Mutation des Limb Deformity Locus, welche zu abnormalen Extremitäten in der Maus führt. Zunächst wurde angenommen, dass die Mutation eines Formin-Gens in diesem Locus für diesen Phänotyp verantwortlich ist, was zwar in nachfolgenden Studien widerlegt wurde, jedoch den Formins zufällig einen passenden Namen bescherte. Generell handelt es sich um eine sehr vielfältige Familie mit zwei hochkonservierten Proteindomänen: die FH1-Domäne (Formin-Homology Domäne) bindet mit niedriger Affinität an Profilin eines Profilin-Aktin-Komplexes, übernimmt von diesem die ATP-G-Aktin-Untereinheit und überträgt sie auf die benachbarte FH2-Domäne. Diese spielt bei der Herstellung von filamentösem Aktin eine wichtige Rolle, indem sie das G-Aktin Monomer an

das spitze Ende („barbed end“) des F-Aktins anfügt, das so entstandene Aktin-Dimer stabilisiert und durch lockere Bindung an das entstehende F-Aktin die Bindung von „Capping“-Proteinen verhindert, was die Möglichkeit für weitere Polymerisation bietet (Abbildung 7A; Überblick in Faix und Grosse, 2006). Eine weitere Rolle der Formins wurde in der Stabilisierung von Mikrotubuli (MT) vermutet. Diese kann entweder durch die seitliche Anlagerung von Formins an polymerisierte MT oder an die Bindung an MT-Enden erfolgen (Abbildung 7B; Überblick in De Ward und Alberts, 2008).

2.2.2 Die Diaphanous-related Formins

Die Unterfamilie der Diaphanous-related Formins (DRFs) unterscheidet sich durch die allgemeinen, ubiquitär exprimierten Formins durch ihre Aufgabe als Effektoren von Rho-GTPasen. Bei den Rho-GTPasen handelt es sich um kleine Moleküle, die in den Signaltransduktionswegen als molekulare Schalter agieren. Aufgrund von extrazellulären Signalen verursacht der Faktor GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) den Austausch des an Rho gebundenen GDP zu GTP. Dies ermöglicht die Interaktion von Rho mit seinen Effektoren und führt dadurch zur Weiterleitung des extrazellulären Signals. Der Faktor GAP (GTPase Activating Proteins) beschleunigt die GTPase Aktivität von Rho und fördert somit die Spaltung von GTP zu GDP+P_i, was in der Inaktivierung von Rho resultiert (Abbildung 8; Überblick in Heasman und Ridley, 2008).

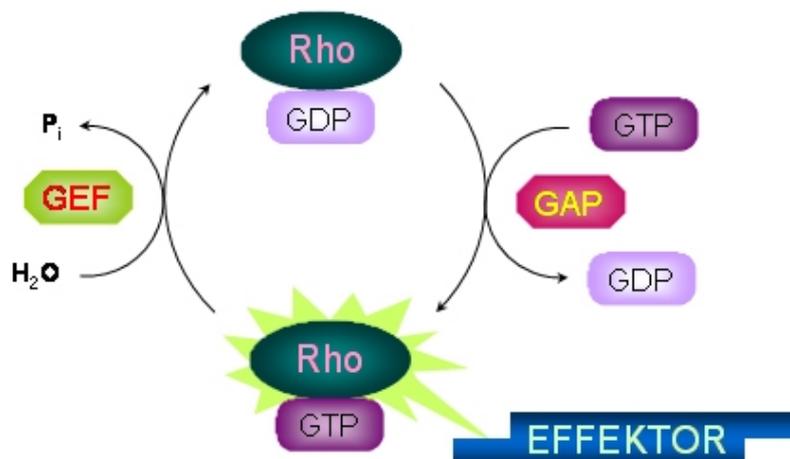


Abbildung 8: Die Regulierung von Rho-GTPasen. Rho-GDP ist inaktiv. Durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) wird GDP gegen GTP ausgetauscht, was Rho in den aktiven Status versetzt. Aktives Rho kann nun mit seinem Effektor interagieren. Der Guanin-Nukleotid Exchange Faktor (GEF) beschleunigt die Spaltung von GTP zu GDP+P_i, so dass Rho wieder inaktiviert wird.

Die Aktivierung der DRFs durch Rho-GTPasen ermöglicht eine komplexe Regulierung dieser Proteinfamilie (Abbildung 9). Im Gegensatz zu ihren ubiquitär exprimierten Verwandten, den allgemeinen Formins, werden DRFs nur in bestimmten Situationen, wie z.B. Migration und

Zytokinese benötigt. Deshalb müssen sie teilweise in einem inaktiven Status vorliegen, den sie durch Autoregulation erreichen. Dafür besitzen sie eine C-terminale autoregulatorische Domäne (Diaphanous Autoregulatory Domain – DAD), die an eine weiter N-terminal gelegene inhibitorische Domäne (Diaphanous Inhibitory Domain - DID) bindet. Die dadurch entstehende Faltung des Proteins verhindert, dass das Protein seine Funktion ausüben kann und inaktiviert es somit. Durch die Bindung von Rho-GTP an die Rho-Bindedomäne (RBD) wird die Faltung aufgehoben, so dass die FH1- und FH2-Domänen frei vorliegen und ihre Funktionen ausführen können.

Bei einer genaueren Untersuchung des Mechanismus der Autoregulation wurde gezeigt, dass das DRF mDia1 in inaktivem Status oligomer vorliegt und auch mit anderen DRFs interagieren kann, wobei DID und DAD in *trans* wirken können.

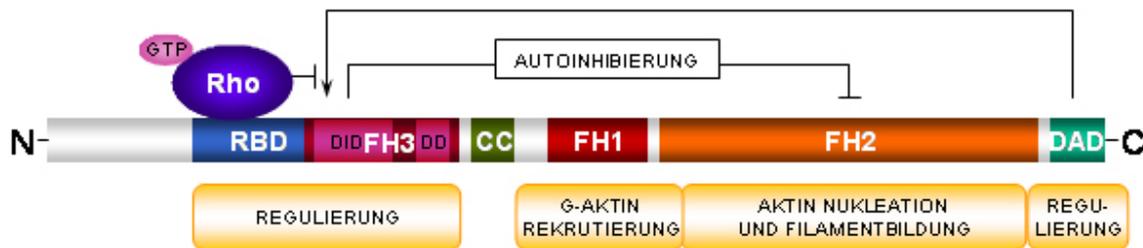


Abbildung 9: Die Proteinstruktur der Diaphanous-related Formins (DRFs). DRFs weisen drei Formin-Homologiedomänen (FH) auf. Die Diaphanous-Autoregulationsdomäne (DAD) bringt die FH2-Domäne in die Nähe der Diaphanous-Inhibierungsdomäne (DID). Es kommt zur Faltung des Proteins und somit zur Hemmung seiner Funktion. Durch die Bindung von Rho-GTP an die Rho-Bindedomäne (RBD) wird die Autoinhibierung aufgehoben und das DRF kann seine Funktion ausüben. CC – Coiled Coil-Domäne.

Ebenfalls wurde die Rolle einer weiteren Domäne, der Dimerisierungsdomäne (DD) analysiert: Sie ist zum einen für eine Rho-unabhängige Lokalisation von mDia1 zur Plasmamembran verantwortlich. Zudem wird sie für die Autoregulation *in vivo* benötigt und kann im Gegensatz zu DID und DAD nur die Homooligomerisierung vermitteln (Copeland et al., 2007).

2.2.2.1 Die Funktionen von *mDia1* und *mDia2*

Unter den Diaphanous-related Formins sind mDia1 (mammalier Diaphanous) und mDia2 die am besten untersuchten Proteine. Wie die anderen DRFs auch spielen mDia1 und mDia2 eine wichtige Rolle bei der Aktin-Nukleation. Konkrete Auswirkungen hat diese Funktion auf die Differenzierung von glatten Muskelzellen. Wie bereits oben beschrieben ist der Transkriptionsfaktor SRF sowie seine Kofaktoren dafür essentiell. In umfassenden Studien konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre Signale Rho durch Bindung von GTP aktivieren und dieses dann mit seinen Effektoren mDia1 und mDia2 interagieren kann. mDia hilft bei der

Bildung von F-Aktin und reduziert dadurch die Menge an G-Aktin im Zytoplasma. Diese Verkleinerung des G-Aktin Pools führt dazu, dass die SRF-Kofaktoren MRTF-A und MRTF-B in den Zellkern transportiert werden und dort gemeinsam mit SRF spezifische Gene der glatten Muskulatur aktivieren (Abbildung 10; Staus et al., 2006). Neben der Funktion in der Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts wurden noch weitere Funktionen von mDia1 und mDia2 entschlüsselt. So wurde unter anderem gezeigt, dass mDia1 in migrierenden Fibroblasten die Ausrichtung des Mikrotubuli-Netzwerkes induziert und dass Mikrotubuli sowie Aktin-Filamente in mDia1-angereicherten Zellausläufern terminieren (Ishizaki et al., 2001). In vielen migrierenden und differenzierten Zellen bilden sich neben dem üblichen Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett noch stabile Mikrotubuli-Fasern. Palazzo et al. zeigten, dass mDia2 für die Generierung und Orientierung dieser stabilen Mikrotubuli wichtig ist, während mDia1 durch Bindung an EB1 und APC zu deren Stabilisierung beiträgt (Abbildung 7B; Palazzo et al, 2001; Wen et al., 2004). Zudem tragen mDia1 und mDia2 beide zur Bildung der Lamella und fokaler Adhäsionen bei (Yamana et al., 2006; Gupton et al., 2007) und sind deshalb für die Polarisierung und Migration von Zellen entscheidend.

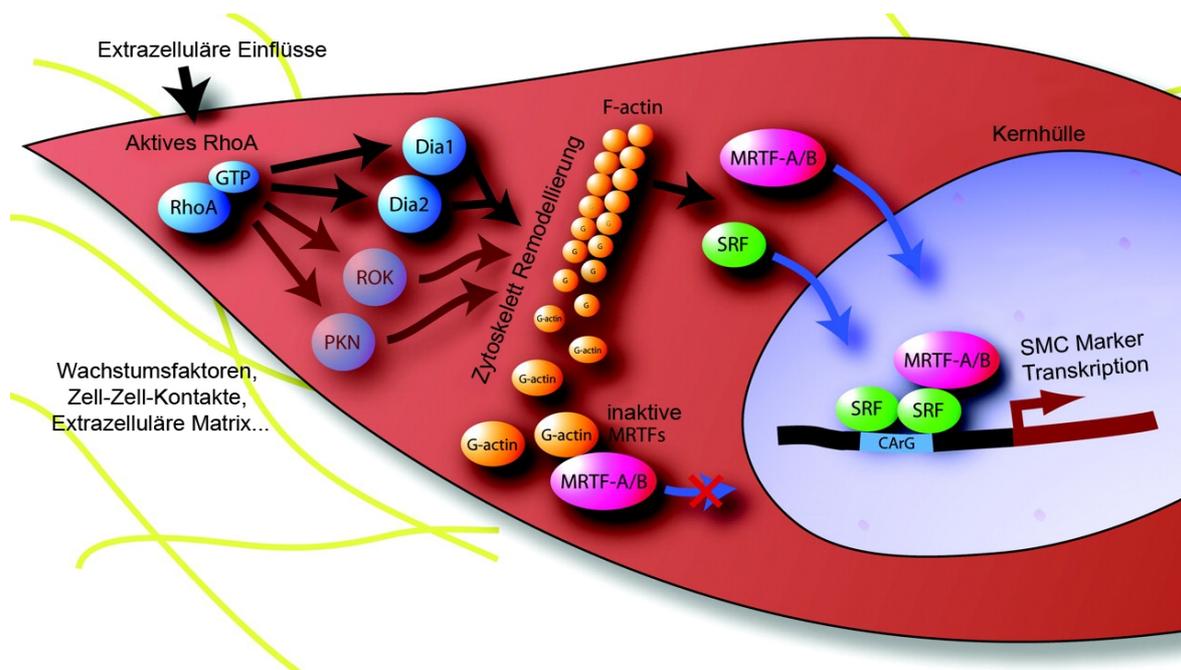


Abbildung 10: Die Aktivierung SMC-spezifischer Gene. Extrazelluläre Einflüsse führen zur Aktivierung von RhoA. Der RhoA Effektor Dia1/2 remodelliert das Zytoskelett und verringert den G-Aktin Pool im Zytoplasma, was zur Freisetzung von MRTF-A/B führt. MRTF-A/B werden mit SRF in den Zellkern transportiert und aktivieren dort die Transkription von Genen, die spezifisch für die glatte Muskulatur (SMC) sind. Modifiziert nach Larsson et al., 2007.

Um die Funktion von mDia1 *in vivo* zu untersuchen generierten Peng et al. ein Konstrukt für den *mDia1*-Knockout in murinen embryonalen Stammzellen und zeigten unter anderem, dass die Expression von *mDia2* nach Differenzierung dieser ES-Zellen in Embryoid Bodies (EB) erhöht ist (Peng et al., 2003). Eisenmann et al. publizierten später, dass die aus der oben

genannten Zelllinie generierten Mäuse lebensfähig sind und einen Proliferationsdefekt in T Zellen aufweisen (Eisenmann et al., 2007). Im Menschen wurde eine Mutation des humanen *mDia1*-Gens (*DIAPH1*) beschrieben, die zur Taubheit führt. Da jedoch bei dieser Mutation nur der C-terminale Teil des Proteins betroffen ist, handelt es sich wahrscheinlich lediglich um einen partiellen Verlust der Proteinfunktion und somit um ein Hypomorph (Lynch et al., 1997). Für *mDia2* wurde weder ein Knockout in der Maus hergestellt, noch wurden Mutationen im humanen Gen (*DIAPH3*) gefunden. Allerdings deuten Morpholino Experimente im Zebrafisch darauf hin, dass *mDia2* durch seine Funktion in der Bildung von Zellausläufern die Zellmigration während der Gastrulation maßgeblich beeinflusst (Lai et al., 2008).

2.2.2.2 Die Funktionen von *mDia3*

Während *mDia1* und *mDia2* bereits Objekte zahlreicher Studien waren, ist über *mDia3* nur wenig bekannt. Yasuda et al. konnten zeigen, dass *mDia3* bei der Chromosomensegregation in der Mitose als Effektor der GTPase Cdc42 wirkt. Während der Mitose bildet sich die mitotische Spindel, eine bipolare Struktur aus Mikrotubuli (MT) und Motorproteinen, die nacheinander jeweils das Zentrosom eines Schwesterchromatiden mit dem Kinetochors eines Zentromers verbindet. Dadurch ist die gleichmäßige Verteilung der Schwesterchromatiden auf die entstehenden Tochterzellen garantiert. *mDia3* wird bereits vor der Ausbildung der mitotischen Spindel von Cdc42 an den Kinetochorkomplex lokalisiert. In Zellen mit gestörtem Cdc42-*mDia3* Signalweg wird zwar zumeist die MT Verbindung zwischen Kinetochor und dem ersten Chromatid gebildet, jedoch bleibt die stabilisierende Bindung des zweiten Chromatids aus. Dies führt dazu, dass die meisten Zellen in dieser Phase der Mitose arretieren (Yasuda et al., 2004). Eine vollkommen andere Rolle wurde für die humane Isoform *hDia2C* beschrieben, die mit *mDia3* eine 70% Homologie aufweist. *hDia2C* interagiert spezifisch mit aktivem RhoD und lokalisiert an die Membran von frühen Endosomen. Dort stabilisieren RhoD und *hDia2C* die Assoziation der Endosomen mit dem Aktin Zytoskelett und reduzieren dadurch deren Motilität (Gasman et al., 2003). Bione et al. entdeckten in einer Familie mit Premature Ovarian Failure (POF) eine Mutation im humanen *mDia3*-Gen (*DIAPH2*). Bei dieser Krankheit handelt es sich um einen Defekt in der Entwicklung der Ovarien, der zur Amenorrhöe mit erhöhten Serum-Gonadotropinen oder zum verfrühten Eintreten der Menopause führt (Bione et al., 1998).

2.3 Das X-Chromosom

Bereits die Entdeckung des X-Chromosoms (XC) 1891 durch Hermann Henking, der es zunächst als "X-Faktor", also als unbekanntem Faktor bezeichnete, deutet an, dass es eine einzigartige Rolle unter den Chromosomen einnimmt (Henking, 1891). So ist es als Gonosom gemeinsam mit dem Y-Chromosom für die Geschlechtsbestimmung von Säugetieren verantwortlich. Zudem ist zwar heute bekannt, dass das XC mit seinen 1098 vermuteten Genen für ca. 4% der Gene des menschlichen Genoms kodiert und sogar 10% (307 von 3199) der bekannten nach Mendel vererbten Krankheiten auf Mutationen des XC zurückzuführen sind. Bisher konnten allerdings nur 168 dieser X-chromosomalen Erkrankungen molekular aufgeklärt werden (OMIM, Stand 2009). Dies zeigt deutlich, dass das XC noch immer nicht den Status des unbekanntem Faktors abgelegt hat und ein weites Feld für weitere Untersuchungen bietet.

2.4 Der X-chromosomale Erbgang

Im Gegensatz zu Autosomen, von denen jeweils ein homologes Paar weitervererbt wird, bestimmt die Weitergabe von X- und Y-Chromosomen das Geschlecht des entstehenden menschlichen Organismus. Kommt es zur Vererbung von zwei XC ist das Geschlecht weiblich, bei der Weitergabe eines X und eines Y-Chromosoms ist das Geschlecht männlich. Dieses Ungleichgewicht in der Anzahl an X-chromosomalen Genen im weiblichen Organismus erfordert einen Mechanismus der Dosiskompensation, den man X-Inaktivierung nennt und der bereits in der frühen Embryonalentwicklung abläuft. Untersuchungen in der Maus zeigten, dass bereits im 4-Zell Stadium eine erste Welle der X-Inaktivierung beginnt, in der ausschließlich das paternale XC inaktiviert wird (Takagi und Sasaki, 1975). Diese Welle der Inaktivierung ist somit genetisch geprägt (sogenanntes „Imprinting“). Ab dem späten Blastozystenstadium wird in der inneren Zellmasse, die später den eigentlich Embryo bildet, das paternale XC reaktiviert, um eine unmittelbar darauffolgende zweite Welle der zufälligen X-Inaktivierung zu ermöglichen (Okamoto et al., 2004; Mak et al., 2004). Während also in den embryonalen Zellen entweder das maternale oder das paternale XC zufällig inaktiviert wird, ist in den extraembryonalen Zellen stets das paternale XC inaktiv. Molekular erfolgt die X-Inaktivierung zum einen durch allgemeine epigenetische Repressionsmechanismen, wie z.B. die DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung. Zum anderen sind aber auch spezifische Repressionsmechanismen nötig. Beispielsweise führt die Bindung der Xist-RNA an das inaktivierte XC zur Stabilisierung des inaktiven Status (Übersicht in Heard und Disteche, 2006; Kalantry et al., 2009). Insgesamt kommt es zur Bildung von Heterochromatin, wobei der Status des jeweiligen XC an die Tochterzellen weitervererbt wird. Der sich formende weibliche Organismus ist demzufolge ein Mosaik und kann eventuell schädigende Mutationen auf dem

XC kompensieren. In extremen Fällen erfolgt dies durch das sogenannte sekundäre „Skewing“, wobei aufgrund von Zell-Selektion stets dasselbe XC inaktiviert wird (Übersicht in Clerc und Avner, 2006). Der männliche Organismus mit dem Genotyp XY hat diese Möglichkeit nicht, er ist für alle X-chromosomalen Gene hemizygot. Eine schädigende X-chromosomale Mutation entfaltet somit gänzlich ihre Wirkung und zeigt sich unter Umständen in einem mutanten Phänotyp bis hin zur embryonalen Letalität.

2.5 Die zufallsbedingte Mutation von Genen: die Genfalle

Bei der sogenannten Genfalle („Gene Trapping“ - GT) handelt es sich um eine Methode, bei der Gene zufallsbedingt durch Insertion einer GT-Kassette mutiert werden (Abbildung 11). Das dazu benötigte Konstrukt wird entweder zunächst in retrovirale Partikel verpackt und anschließend durch Infektion oder direkt durch Elektroporation stabil in ES-Zellen eingebracht, wobei die Integration der Kasette zufällig an einer beliebigen Stelle des Genoms erfolgt.

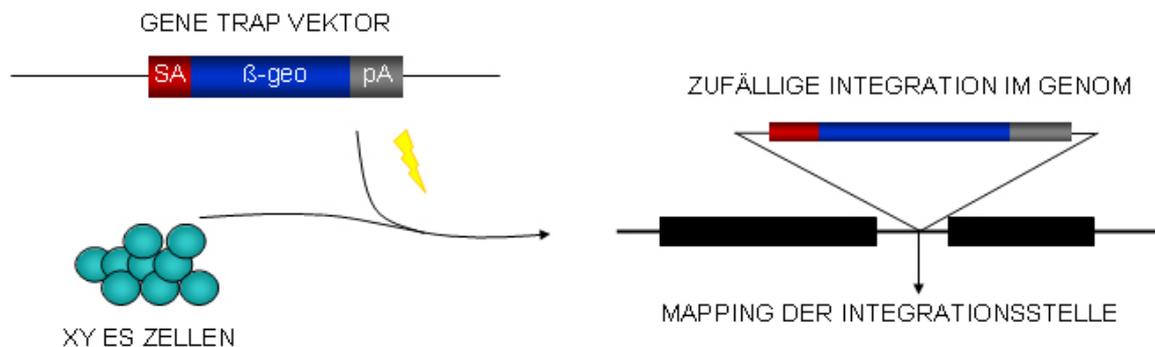


Abbildung 11: Prinzip der Genfalle. XY-ES-Zellen werden mit einem GT-Vektor transfiziert, welcher zufällig in das Genom integriert. Diese Integrationsstelle wird anschließend identifiziert.

Die Integrationsstelle kann mittels RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends – Schnelle Amplifikation der cDNA-Enden) oder Splinkerette-PCR (Beschreibung in Horn et al., 2007) und anschließender Sequenzierung ermittelt werden (sogenanntes „Mapping“). Die GT-Kassette besteht aus einer Spleißakzeptorstelle, einem β -Geo-Gen (β -Galaktosidase-Neomycinresistenz-Gen) sowie einem poly(A)-Schwanz (Poly-Adenin). Das β -Geo-Gen wiederum enthält ein Neomycin-Resistenzgen, welches der Selektion von ES-Zellen mit GT-Insertion dient, sowie einem β -Galaktosidase-Reportergen. Die Spleißakzeptorstelle ermöglicht das Spleißen des stromaufwärtsgelegenen Exons des gefangenen Gens an das β -Geo-Gen, dessen Expression somit der Kontrolle des endogenen Promoters des betreffenden Gens unterliegt. Dies hat den Vorteil, dass mit Hilfe der β -Galaktosidase Aktivität das Expressionsmuster des gefangenen Gens untersucht werden kann. Die Poly(A)-Schwanz führt zu einem Translationsstopp nach dem β -Geo-Gen, so dass die stromabwärtsgelegenen Exons des betreffenden Gens nicht mehr exprimiert werden und es unter Umständen zu

einem Funktionsverlust des entstehenden Proteins kommt. Folglich ist die Insertion der GT-Kassette umso mutagener, je weiter stromaufwärts sie erfolgt. Gegebenenfalls kann mit Hilfe dieser ES-Zellen ein Mausmodell hergestellt und eine Funktionsverlust-Studie („Loss-of-Function“-Studie) durchgeführt werden (Hansen et al., 2003).

Zusätzlich zu den o.g. Komponenten besitzen einige GT-Konstrukte eine Kombination aus *frt*- und *loxP*-Stellen. Bei den *cre/loxP*- und *Flp/frt*- Systemen handelt es sich um Rekombinationssysteme, die das Invertieren oder Rekombinieren von DNA-Fragmenten erlauben (Sauer und Henderson, 1988; Zhu und Sadowski, 1995). Diese DNA-Fragmente, in diesem Fall die GT-Kassette, sind durch *loxP*- oder *frt*-Stellen flankiert, die als Rekombinationsstellen für die jeweilige Rekombinase dienen. Durch die initiale Inversion der GT-Kassette durch die *Flp*-Rekombinase wird die Mutation stillgelegt, da die Spleißakzeptorstelle nicht mehr berücksichtigt werden kann und deswegen die GT-Kassette aus der mRNA herausgespleißt wird. Erst durch erneute Inversion mit Hilfe der *cre*-Rekombinase wird die Mutation wieder in ihren ursprünglichen Zustand versetzt und somit wieder aktiviert (Schnütgen et al., 2005). Im Mausmodell bedeutet dies, dass je nach Expressionsmuster und -zeitraum der *cre*-Rekombinase die GT-Mutation nur in bestimmten Geweben aktiv ist. Auf diese einfache Weise ist es möglich sonst sehr komplex herzustellende konditionelle Mutationsallele zu generieren.

2.6 Die Tetraploide Aggregation

Diese Methode ermöglicht die direkte Herstellung von Mäuseembryonen aus wildtypischen oder gentechnisch veränderten embryonalen Stammzellen (Nagy et al., 1993). ES-Zellen wurden ursprünglich aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, die ihr Schicksal auf die embryonale Linie festgelegt hat und können deshalb nur noch zu embryonalen Gewebe beitragen (Nagy et al., 1990). Zur Bildung des extraembryonalen Teils werden tetraploide Wildtyp-Embryonen an E1.5 genutzt. Aufgrund der Verdrängung der tetraploiden Blastomere durch die ES-Zellen können diese nur noch extraembryonales Gewebe, wie die Plazenta und den Dottersack bilden. Nur in seltenen Fällen kommt es zum Beitrag von tetraploiden Zellen zum Embryo, wenn beispielsweise die ES-Zellen aufgrund der Mutation nicht in der Lage sind eine bestimmte Zelllinie zu bilden und diese Nischen von tetraploiden Zellen besetzt werden. Die Rettung des Embryos durch tetraploide Zellen lässt sich jedoch mit Hilfe der Fluoreszenzmarker YFP und dsRed in den tetraploiden Zellen nachweisen (Hadjantonakis et al., 2002; Vintersten et al., 2004).

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen auf dem XC führen häufiger zur Ausbildung eines mutanten Phänotyps als die Mutation von Autosomen, da Männer nur ein XC besitzen. Mit Hilfe des eigens dafür entworfenen Phänotypen-basierten, hemizygoten Screens sollten auf schnellem und kostengünstigem Weg neue potentielle humane Krankheitsgene bzw. für die Embryonalentwicklung wichtige Gene auf dem XC identifiziert werden. Die Ergebnisse des Phänotypen-basierten Screens sollten als Grundlage für weitere molekulare und funktionelle Analysen dienen. Eines der identifizierten X-chromosomalen Gene wurde im Laufe dieser Arbeit auf seine Funktion sowie sein Expressionsmuster *in vivo* untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Die Identifizierung potentieller Krankheitsgene auf dem X-Chromosom

Das X-Chromosom (XC) spielt in vielerlei Hinsicht eine Sonderrolle. Bereits 1973 stellte Ohno fest, dass dies auch evolutionär gesehen der Fall ist¹. Er deutet an, dass das XC das am besten konservierte Säugetier-Chromosom ist. Daher liegt es Nahe die Mitwirkung X-chromosomaler Gene an der Bildung von Krankheiten und embryonaler Letalität anhand eines Säugetiermodells wie der Maus zu untersuchen (Ohno, 1973). Durch Kombination verschiedener entwicklungsbiologischer Techniken wurde dazu der Phänotypen-basierte, hemizygote Screen entworfen (Abbildung 12).

3.1.1 Der phänotypen-basierte, hemizygote Screen

Mittels der Genfalle (Gene Trap - GT) können sowohl autosomale, als auch gonosomale Gene mutiert werden. Dazu wird ein GT-Konstrukt durch Infektion in ES-Zellen eingebracht. Die Insertion des Konstruktes erfolgt zwar zufällig in ein Gen, die genaue Insertionsstelle kann jedoch anschließend schnell und einfach identifiziert werden (Schnütgen et al., 2005). Neben der Mutation eines Gens kann mit Hilfe der Genfalle auch noch das endogene Expressionsmuster des betroffenen Gens untersucht werden. Dies wird durch den in der GT-Kassette enthaltenen LacZ-Reporter ermöglicht, der sich stromabwärts der Spleißakzeptorstelle befindet und somit eine Fusion mit Teilen des betroffenen Gens bildet.

Bei der zweiten Technik des Phänotypen-basierten Screens handelt es sich um die Aggregation von ES-Zellen mit tetraploiden Embryonen im 2-Zell-Stadium. Auf diese Weise können schnell und effizient Embryonen, die komplett von ES-Zellen abstammen, generiert werden ohne Keimbahntransmission zu benötigen (Abbildung 12A).

Für den Screen wurden ES-Klone mit Insertion auf dem XC gewählt. ES-Zellen sind stets männlich und besitzen nur ein XC. Die Mutation eines X-chromosomalen Gens kann folglich dazu führen, dass die aus den ES-Zellen generierten Embryonen während der Embryonalentwicklung einen mutanten Phänotyp zeigen und gegebenenfalls sogar sterben (Abbildung 12B).

¹ „there seems to be no better example of a frozen accident than the mammalian X-linkage group“

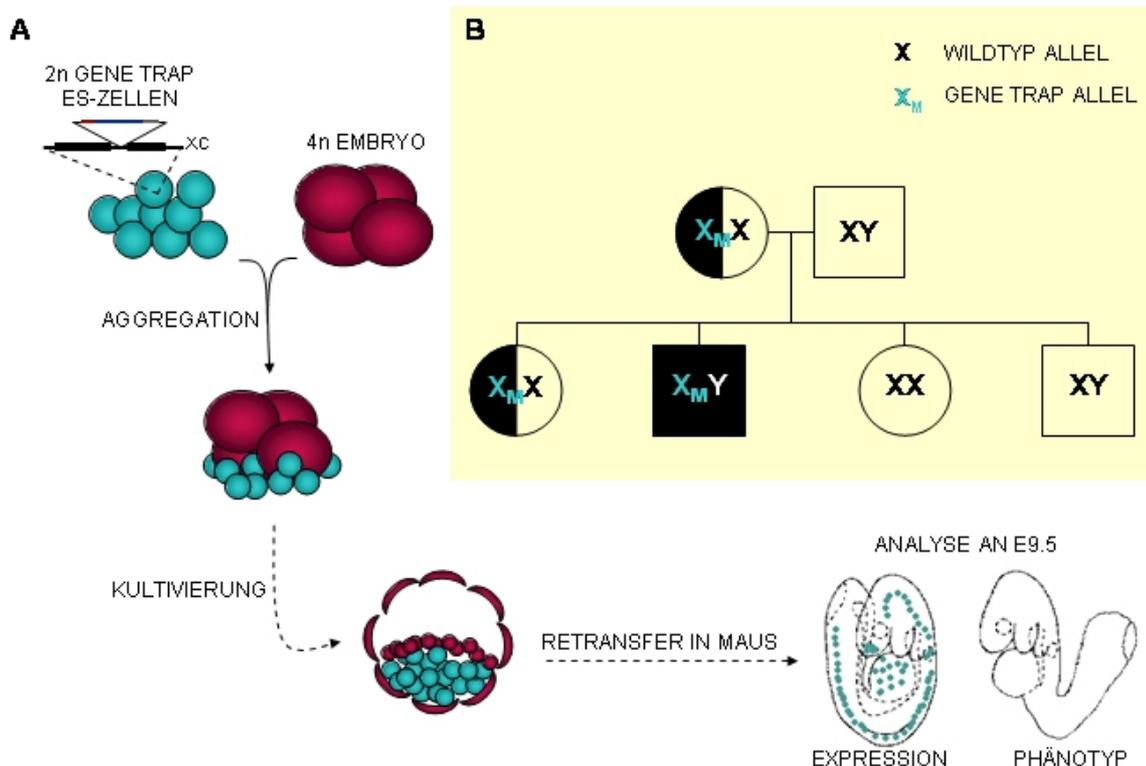


Abbildung 12: A) Der phänotypen-basierte, hemizygoter Screen. GT-ES-Zellen mit X-chromosomaler (XC) Integration werden mit tetraploiden Embryonen aggregiert. Der entstehende Embryo wird kultiviert und in eine scheinchwangere Maus retransferiert. Phänotyp und LacZ-Expressionsmuster der resultierenden Embryonen werden an E9.5 untersucht. **B) Vererbungsschema X-chromosomaler Gene.** Segregiert das mutierte XC (X_M) einer Mutter an die Tochter ist diese nur bedingt betroffen, da sie aufgrund der X-Inaktivierung ein Mosaik ist. Die Vererbung an einen Sohn kann aufgrund der Hemizygotie zu einem mutanten Phänotyp führen. Kreis: Weibchen, Quadrat: Männchen; hell: wildtypischer Phänotyp; dunkel: mutanter Phänotyp.

Insgesamt wurden 25 ES-Klone auf einen embryonalen Phänotyp bis zum Stadium E9.5 untersucht (Abbildung 13B). Davon führten 72% zu einem embryonalen Phänotyp, während 28% einen wildtypischen Phänotyp zeigten. Um die Verlässlichkeit des Screens zu testen, wurden für einige Gene mehrere Klone ausgewählt, so dass insgesamt 17 Gene auf ihre Funktion in der Embryonalentwicklung untersucht wurden (Abbildung 13C). Davon führten 65% zur embryonalen Letalität und 35% zu einem wildtypischen Phänotyp. Die Auswahl zu untersuchender X-chromosomaler Gene deckt das XC in seiner vollen Länge ab. Abbildung 13A zeigt eine Übersicht über die mutierten Mausgene und deren Homologe im Menschen sowie die Expression des LacZ-Reporters der Aggregationsexperimente. Insgesamt zeigt sich, dass die Methode des Phänotypen-basierten Screens eine verlässliche, schnelle und kostengünstige Vorgehensweise ist, um eine Vorauswahl an X-chromosomalen Kandidatengenen zu erhalten, die dann in detaillierten Untersuchungen auf ihre Funktion in der Embryonalentwicklung und bei der Entstehung humaner Krankheiten untersucht werden können.

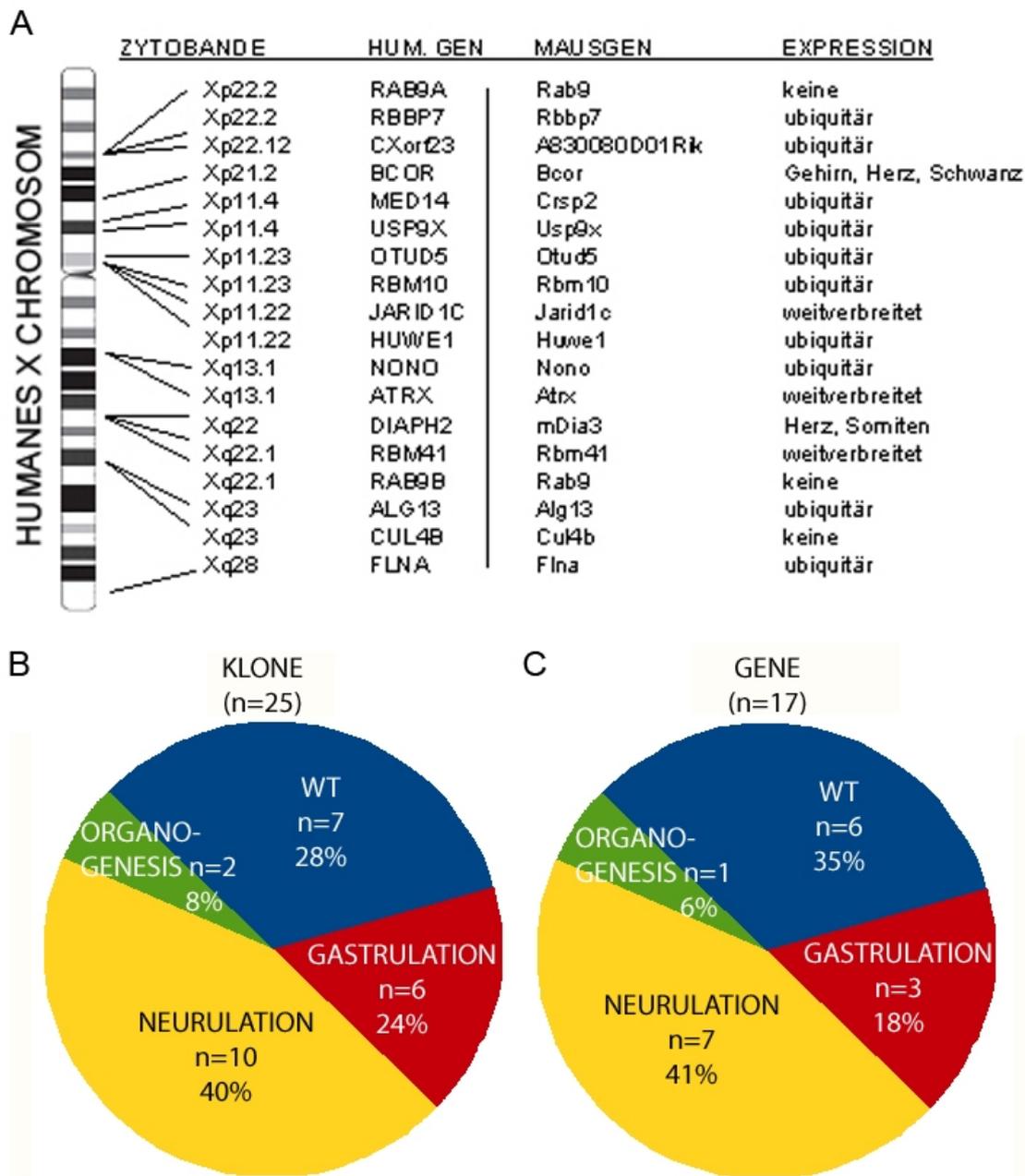


Abbildung 13: Statistik des Phänotypen-basierten Screens. A) Darstellung des humanen XC mit den humanen Homologen der untersuchten Mausgene. Rechts sind die β -Galaktosidase-Expressionsmuster der Aggregationsexperimente angegeben. B,C) Statistik der Phänotypenverteilung der untersuchten Klone (B) bzw. Gene (C).

3.1.2 Die Selektion geeigneter ES-Klone für den Phänotypen-basierten Screen

Das Arbeiten mit der Genfalle ermöglicht die Präselektion der zu untersuchenden Gene, da im Gegensatz zu anderen randomisierten Mutationsverfahren, wie z.B. dem ENU-Screen (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea; Überblick in Kile und Hilton, 2005), die Lokalisation der Mutation bekannt ist. Die Vorauswahl der GT-ES-Klone erfolgte nach unterschiedlichen Kriterien. Zunächst sollte die Mutation ein X-chromosomales Gen mit interessanter Funktion betreffen. Dazu zählen

Gene mit interessanten molekularen Funktionen, wie z.B. die Funktion als E3 Ubiquitin-Ligase (*Huwe1*, *Cul4b*) oder in der Regulierung des Zytoskeletts (*mDia3*). Um die Verlässlichkeit des Screens zu testen wurden auch Gene mit bekannter Assoziation zu humanen Krankheiten gewählt (*Atrx*, *BcoR*). Da für viele Gene mehrere GT-ES-Klone existieren, wurde meistens derjenige Klon gewählt, der die GT-Kassette so weit wie möglich im 5'-Bereich des gewünschten Gens eingefügt hatte. Die dadurch inhibierte Transkription der stromabwärts gelegenen Exons erhöht die Wahrscheinlichkeit eines kompletten Ausschaltens des Gens. Dennoch besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass durch alternatives Spleißen ganz bzw. partiell funktionierende Protein-Isoformen gebildet werden. In diesem Fall würde es sich um ein hypomorphes oder sogar ein dominant-negatives Allel handeln. Zur Testung der Reproduzierbarkeit wurden für einige Gene (z.B. *Nono*, *BcoR*) mehrere ES-Klone ausgewählt und die embryonalen Phänotypen und Expressionsmuster verglichen. Um zu gewährleisten, dass die Insertion der GT-Kassette auch wirklich in dem vom GGTC angegebenen Gen liegt wurden alle Insertionsstellen nochmals überprüft. Bei vielen Klonen der ES-Zelllinie E14 erfolgte dies durch das GGTC mittels Splinkerette-PCR. Für die anderen Klone wurden spezifische RT-PCRs durchgeführt und die entstehenden Banden sequenziert.

3.1.3 Die gezielte Auswahl von mutierten, X-chromosomalen Genen führt zu einer Verzerrung der Statistik

Der Phänotypen-basierte Screen wurde nicht nur in unserem Labor am Helmholtz Zentrum

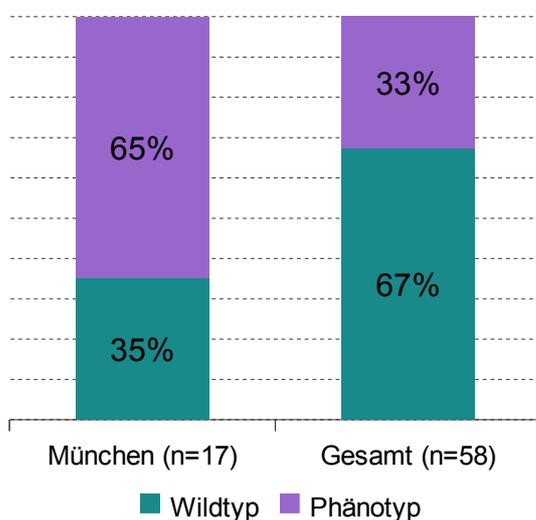


Abbildung 14: Das Phänotyp/Wildtyp-Verhältnis der untersuchten Gene. Gezeigt sind die Verhältnisse des Münchner sowie des gesamten (München + Toronto) Phänotypen-basierten Screens.

München durchgeführt. Gleichzeitig wurden weitere X-chromosomale Gene mittels GT-ES-Zellen und einer Technik, die man verspätete diploide Aggregation nennt und die ebenfalls komplett ES-Zell-abstammende Embryonen generiert, im Labor von Janet Rossant am Hospital for Sick Children in Toronto (Kanada) untersucht. Während im Screen in München für viele Gene mehrere ES-Klone gewählt wurden und so die Verlässlichkeit des Screens analysiert wurde, wurde in Kanada für jedes Gen meistens nur ein ES-Klon gewählt, was die Analyse von sehr viel mehr Genen ermöglichte. Die Ergebnisse beider Screendaten wurden zu einer Publikation zusammengefasst (Cox, Vollmer, Tamplin et

al.; 2010). Wenn man das Phänotyp/Wildtyp-Verhältnis des Münchner Screens mit dem gesamten Screen-Ergebnissen vergleicht, fällt auf, dass im Münchner Screen 66% der

Genmutationen in einem mutanten Phänotyp resultieren, während dies für den gesamten Screen nur bei 33% der Fälle ist (Abbildung 14).

Durch die geringe Anzahl untersuchter Gene in München und die Auswahl zahlreicher Gene mit bekannter Assoziation zu humanen Krankheiten (6/18) kommt es zu einer Verzerrung der Statistik. Bei früheren Studien, die ebenfalls auf dem Prinzip der Genfalle beruhten und die den Anteil Phänotypen-verursachender Gene auf Autosomen untersuchten, führten 33% bzw. 37% der Genmutationen zu einem mutanten Phänotyp (Mitchell et al., 2001; Friedrich et al., 1991). Dies entspricht dem Ergebnis des gesamten Phänotypen-basierten, hemizygoten Screens.

3.1.4 Die Einteilung der embryonalen Phänotypen in verschiedene Klassen

Die Einteilung der Phänotypen erfolgte in vier verschiedene Klassen nach dem Zeitpunkt des Todes bzw. morphologisch sichtbaren Auftreten eines Phänotyps. Zunächst wurden alle Embryonen an E9.5 untersucht. Da diese jedoch bei vielen Aggregationsexperimenten bereits resorbiert waren, wurden die Aggregationsexperimente wiederholt und die Embryonen zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt analysiert. Insgesamt wurden Embryonen in den Stadien E7.5-E10.5 untersucht. Im Anhang befinden sich ergänzende Abbildungen, die die Gen- und Proteinstrukturen der zu untersuchenden Gene zeigen sowie die jeweiligen Insertionen der GT-Kassetten (Abbildungen 36-52, Seiten 113-121).

3.1.4.1 Gastrulationsphänotypen

Die früheste Phänotypenklasse bilden die Embryonen mit einer Letalität im Gastrulationsstadium (E6.0-E8.5). Diese Klasse macht insgesamt 17% der untersuchten Gene aus. Dazu gehören die Gene *BcoR*, *Nono* und *Huwe1*, von denen jeweils zwei GT-Klone aggregiert wurden. Tabelle 1 gibt an, wieviele Dezydus und Embryonen erhalten wurden. Wurden mehr Dezydus als Embryonen erhalten, zeigt dies, dass einige Embryonen resorbiert waren.

Der *Bcl6* Corepressor (*BcoR*) assoziiert mit dem Repressor und Onkogen *Bcl6* und wirkt somit als transkriptioneller Repressor. Mechanistisch geschieht dies vermutlich über die Vermittlung von Histondeacetylasen (Huynh et al., 2000). Wamstad et al. konnten zeigen, dass *BcoR* für die Differenzierung von ES-Zellen in Ektoderm und Mesoderm notwendig ist. Ebenso zeigten sie in einer Expressionsstudie, dass *BcoR* zunächst hauptsächlich im extraembryonalen Gewebe und erst nach der axialen Drehung auch in verschiedenen Bereichen des Embryos, wie den Branchialbögen und der Schwanzknospe, exprimiert wird (Wamstad et al., 2007 und 2008). In verschiedenen Familien mit X-chromosomalem Oculofaciocardiodentalem Syndrom (OFCD) konnten Mutationen von *BcoR* als Ursache identifiziert werden (Ng et al., 2004; Horn et al., 2005; Oberoi et al., 2005). Diese Krankheit tritt stets nur in weiblichen

Familienmitgliedern auf und lässt deshalb auf einen embryonal letalen Ausgang bei männlichen Mitgliedern schließen. Die Aggregation der *BcoR*-GT Klone W096D07 (Abbildung 15B) und A20062 (Abbildung 15C) mit tetraploiden Embryonen führt zum Arrest während der Gastrulation mit gänzlichem Fehlen der Musterbildung. In den Stadien E8.5 und E9.5 können nur wenige, mutante Embryonen isoliert werden (Tabelle 1). Die Expression des LacZ-Reporters ist ubiquitär.

| Gen | Klon-ID | Stadium | Deziduas | Wildtyp | Phänotyp | Sonstiges |
|-------|---------|---------|----------|---------|----------|------------|
| BcoR | W096D07 | E8.5 | 12 | 0 | 2 | |
| | | E9.5 | 14 | 0 | 1 | |
| | A20062 | E8.5 | 4 | 0 | 4 | |
| | | E9.5 | 4 | 0 | 0 | |
| | P101H07 | E7.5 | 15 | 10 | 0 | |
| | | E8.5 | 12 | 11 | 0 | |
| E9.5 | | 12 | 11 | 0 | | |
| Nono | E086B07 | E6.5 | 20 | 10 | 8 | |
| | | E7.5 | 16 | 0 | 6 | |
| | E086G04 | E6.5 | 16 | 8 | 3 | |
| | | E7.5 | 63 | 0 | 51 | |
| | | E8.5 | 34 | 0 | 15 | |
| Huwe1 | P036B01 | E7.5 | 38 | 0 | 21 | 4n Beitrag |
| | | E8.5 | 31 | 0 | 27 | 4n Beitrag |
| | | E9.5 | 17 | 0 | 8 | 4n Beitrag |
| | P125E01 | E7.5 | 8 | 0 | 2 | 4n Beitrag |
| | | E8.5 | 24 | 0 | 16 | 4n Beitrag |
| | | E10.5 | 8 | 0 | 2 | 4n Beitrag |

Tabelle 1: Aggregationsexperimente mit Phänotypen während der Gastrulation. Anzahl erhaltener Deziduas und Embryonen nach den Aggregationsexperimenten mit dem jeweiligen GT-Klon. 4n Beitrag: tetraploide WT-Zellen waren an der Bildung des embryonalen Gewebes beteiligt.

Bei *Nono* (Non-POU-Oktamer-Bindeprotein; Synonym: *p54nrb*) handelt es sich um ein Protein mit RNA-Bindemotiv, das sowohl defekte RNA bindet, als auch beim Spleißen eine Rolle spielt (Shav-Tal und Zipori, 2002; Kameoka et al., 2004). Zudem wurde *Nono* eine Funktion bei der Reparatur von DNA-Brüchen zugeschrieben (Bladen et al., 2005). In *Drosophila melanogaster* und Säugetieren konnte eine Assoziation mit PER1, einem Protein das für den zirkadianen Rhythmus verantwortlich ist, detektiert werden (Brown et al., 2005). Für *Nono* wurden die GT-Klone E086B07 (Abbildung 15D) und E089G04 (Abbildung 15E) ausgewählt und mit tetraploiden Embryonen aggregiert. An E6.5 zeigen die meisten Embryonen einen Wildtyp-Phänotyp. Einige Embryonen sind bereits zu diesem Zeitpunkt stark retardiert. Spätestens an E7.5 zeigen jedoch alle Embryonen einen Arrest während der Gastrulation. Einige wenige Embryonen die sich bis E8.5 entwickeln zeigen schwerwiegende Defekte in der Musterbildung, wie z.B. eine Duplikation der Mittellinie. Die Expression des LacZ-Reporters ist in den untersuchten Entwicklungsstadien ubiquitär. Die Integration der GT-Kassette erfolgte in beiden *Nono*-GT Klonen in Intron 2 (Abbildung 37, Seite 113). Die Analyse der *Nono*-GT-

Mutation wird detailliert in Abschnitt 3.1.5 beschrieben.

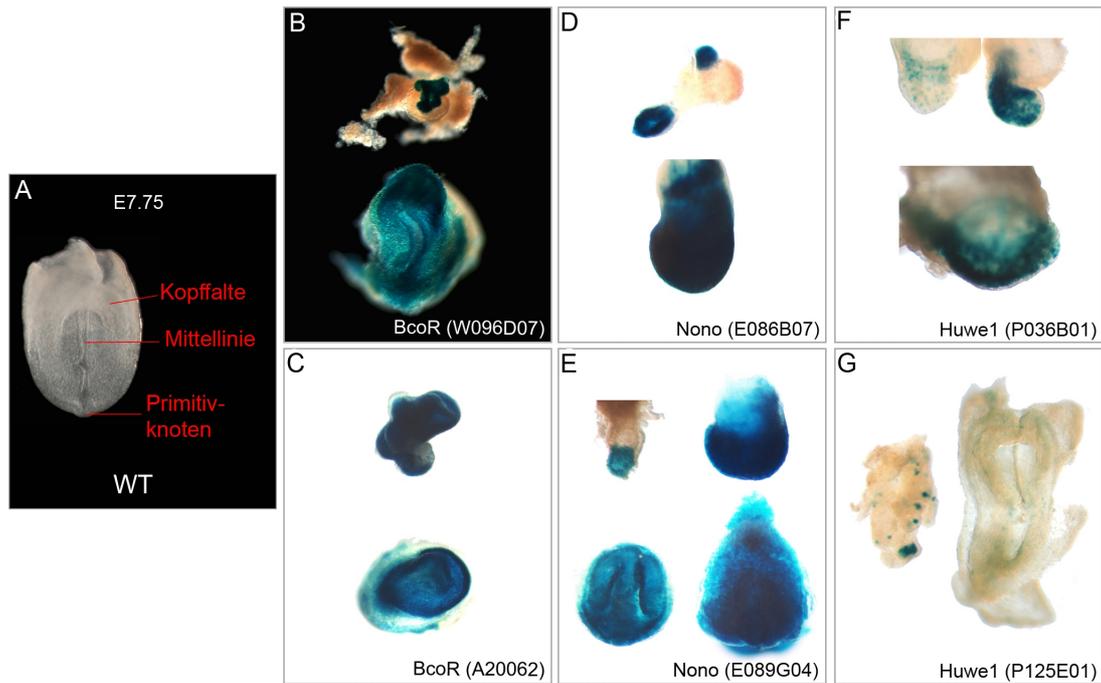


Abbildung 15: Embryonen mit Defekten während der Gastrulation. A) Wildtyp-Embryo mit wichtigen embryonalen Strukturen. B-G) GT-Klone drei verschiedener Gene führen zu einem Phänotyp während der Gastrulation. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.

Huwe1 (Synonyme: ARF-BP1, Mule, Lasu1, Ureb1) besitzt die Funktion einer E3 Ubiquitin-Ligase. Dies sind Proteine, die andere Proteine polyubiquitinieren und dadurch deren Abbau veranlassen. Dazu wird Ubiquitin zunächst an das E1 Ubiquitin-aktivierende Enzym gebunden, welches Ubiquitin auf das E2 Ubiquitin-konjugierende Enzym überträgt. Die Bindung von E2 sowie des Substrates an die E3 Ubiquitin-Ligase führt zur räumlichen Nähe von Ubiquitin mit seinem Zielprotein. Es kommt zur Anheftung mehrerer Ubiquitinmoleküle und zur Bildung einer Polyubiquitinkette, die das Protein für den Abbau im Proteasom markiert. *Huwe1* wurde vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs genauer untersucht. Beispielsweise wirkt *Huwe1* durch die Ubiquitinierung des Tumorsuppressors p53 anti-apoptotisch, während der Ubiquitinierung von Mcl1 durch *Huwe1* ein pro-apoptotischen Effekt zugeschrieben wurde. Insofern ist die Rolle von *Huwe1* bei der Krebsentstehung bzw. -proliferation noch nicht geklärt (Überblick in Shmueli und Oren, 2005). Die Expression von *Huwe1* wurde bisher nur während der Spermatogenese beschrieben und deutet auf eine Funktion bei der Keimzellenbildung hin (Liu et al., 2007). Zytogenetisch konnte in sechs unabhängigen Familien das Auftreten von X-chromosomalen mentalen Retardationssyndromen des Turner-Typs mit Mutationen in *Huwe1* assoziiert werden (Froyen et al., 2008). Die *Huwe1*-GT Embryonen der zwei ES-Klone P036B01 (Abbildung 15F) und P125E01 (Abbildung 15G) entwickeln sich maximal bis E10.5, zeigen aber bereits während der Gastrulation schwere Defekten in der Musterbildung. Ihr LacZ-Muster erscheint chimär

und ist sehr heterogen, von fast ubiquitär bis kaum vorhanden und die Entwicklung der Embryonen arretiert in unterschiedlichen Stadien. Dies deutet darauf hin, dass nicht alle Zellen der Embryonen von den GT-Embryonen abstammen, sondern dass es eine Rettung des Embryos durch tetraploide Zellen gibt. Dies zeigt auch die Untersuchung mit den fluoreszierenden Markern, die ergab, dass keine der Embryonen vollständig aus *Huwe1*-GT ES-Zellen entstanden. Die Rettung der Embryonen durch tetraploide Zellen war nur bei den beiden *Huwe1*-GT Klonen zu beobachten und deutet auf eine Funktion von *Huwe1* in der Regulierung apoptotischer Vorgänge hin. Bei *Huwe1* handelt es sich mit 81 Exons um ein sehr großes Gen. Die Insertion der GT-Kassette erfolgte bei beiden *Huwe1*-GT Klonen in Intron 1 und somit vor den funktionellen Proteindomänen (Abbildung 38, Seite 114). Dies deutet darauf hin, dass beide Klone möglicherweise den embryonalen Phänotypen eines *Huwe1*-Knockouts widerspiegeln. Eine zweite bekannte *Huwe1*-Isoform ist durch die GT-Insertion nicht betroffen, besitzt jedoch auch nicht die wichtige E3 Ubiquitin-Ligase Funktion.

3.1.4.2 Neurulationsphänotypen

Bei der zweiten Phänotypenklasse handelt es sich um Embryonen mit Letalität im Neurulationsstadium. Diese Klasse umfasst Phänotypen unterschiedlichster Art, da in diesem Stadium nicht nur die Bildung des Nervengewebes, sondern auch die axiale Drehung, die Somitogenese sowie wichtige Schritte in der Ausbildung des Herz-Kreislaufsystems stattfinden. Deshalb zeigen sich die meisten letalen Phänotypen (44%) während dieses Stadiums. Insgesamt führte die Mutation von acht verschiedenen Genen zu einem Phänotyp während dieser Entwicklungsstadien. Tabelle 2 fasst die Anzahl erhaltener Deziduas bzw. Embryonen im Neurulationsstadium zusammen.

Zu einem mutanten Phänotyp während der Neurulationsstadien führte die Mutation von *Atrx* (Alpha-Thalassämie, mentale Retardation, X-chromosomal). Bei *Atrx* handelt es sich um eine ATPase/Helikase der SNF2-Familie (Stayton et al. 1994; Picketts et al., 1996). Sie ist in der Lage durch die Remodellierung von Chromatin die Expression verschiedener Zielgene zu beeinflussen. Bei der Mutation von *Atrx* sind diese Zielgene runterreguliert und es kommt zur Ausbildung des ATRX-Syndroms, das mit psychomotorischer Retardierung, charakteristischen Gesichtszügen, Abnormalitäten der Genitalien sowie alpha-Thalassämie einhergeht (Gibbons et al., 1995). Die Aggregation des *Atrx*-GT Klons P034D09 führt an E9.5 und E10.5 stets zu Embryonen mit schweren Herzdefekten, abnormer axialer Drehung sowie unvollständiger Fusion des Neuralrohrs. Die Expression des LacZ-Reporters ist sehr spezifisch im Herzen, im Mittelhirn, in den Somiten und der Mittellinie detektierbar (Abbildung 16B). Sowohl Expressionsmuster als auch Phänotyp passen gut zu den Symptomen des ATRX-Syndroms, vor allem in der Hirnregion. Die GT-Insertion befindet sich in Intron 1 des *Atrx*-Gens und trifft somit sämtliche bekannte Isoformen (Abbildung 39, Seite 115). Möglicherweise handelt es

sich bei diesem *Atrx*-GT Klon um ein Mausmodell für das ATRX-Syndrom, dies müsste allerdings in weiteren Analysen bestätigt werden.

| Gen | Klon-ID | Stadium | Deziduas | Wildtyp | Phänotyp |
|---------|---------|---------|----------|---------|----------|
| ATRX | P034D09 | E9.5 | 19 | 0 | 18 |
| | | E10.5 | 16 | 0 | 12 |
| Alg13 | P035H04 | E6.5 | 3 | 2 | 0 |
| | | E7.5 | 21 | 9 | 8 |
| | | E8.5 | 9 | 0 | 9 |
| | | E9.5 | 23 | 0 | 12 |
| | P088H08 | E6.5 | 5 | 3 | 0 |
| | | E7.5 | 17 | 10 | 7 |
| Cul4b | M119G06 | E9.5 | 6 | 0 | 6 |
| | | E10.5 | 14 | 0 | 5 |
| Otud5 | A021B07 | E8.5 | 13 | 0 | 8 |
| Jarid1c | E008C01 | E8.5 | 13 | 9 | 0 |
| | | E9.5 | 32 | 17 | 0 |
| | | E10.5 | 13 | 2 | 3 |
| | P026G11 | E8.5 | 11 | 7 | 2 |
| | | E9.5 | 46 | 9 | 17 |
| | | E10.5 | 20 | 3 | 14 |
| Rbm41 | W007A05 | E8.5 | 23 | 10 | 0 |
| | | E9.5 | 15 | 2 | 11 |
| Rbbp7 | Q017B06 | E9.5 | 9 | 0 | 8 |

Tabelle 2: Aggregationsexperimente mit Phänotypen während der Neurulation. Anzahl erhaltener Deziduas und Embryonen nach den Aggregationsexperimenten mit dem jeweiligen GT-Klon.

Der Korepressor BcoR wurde bereits im Gastrulationsabschnitt beschrieben. Bei dem *BcoR*-GT Klon P101H07 zeigen sich jedoch erst während der Neurulation Abnormalitäten (Abbildung 16C). Die Embryonen vollführen die axiale Drehung nur unvollständig und es kommt nur teilweise zur Schließung des Neuralrohrs. Allerdings ist auch bei diesem Klon die Expression des LacZ-Reporters ubiquitär. Dieser *BcoR*-GT Klon P101H07 mit spätem Phänotyp weist die Insertion der GT-Kassette in Intron 1 auf, während bei den anderen beiden *BcoR*-GT Klonen mit Gastrulationsphänotyp die Insertion in Intron 5 erfolgte (Abbildung 36, Seite 113). Die unterschiedlichen Insertionsstellen der GT-Kassette scheinen die Funktion von BcoR auf verschiedene Weise zu beeinträchtigen.

Zu einem besonders interessanten Phänotyp führte die Aggregation von *Alg13*-GT ES-Klonen. Bei *Alg13* handelt es sich um eine Untereinheit einer UDP-GlcNac Transferase. Diese katalysiert die Asparagin N-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Averbeck et al., 2007). Die Glykosylierung ist eine wichtige Form der Proteinmodifikation, die sowohl Proteinstruktur als auch -funktion beeinflusst. Die Funktion von *Alg13 in vivo* ist bisher nicht bekannt. Die Aggregation des *Alg13*-GT Klones P035H04 führt zur Bildung einer Cardia Bifida (Abbildung 16D). Dazu kommt es, wenn die Vorläufer des ersten Herzfeldes nicht in der Mitte fusionieren und anstatt einem Herzrohr, zwei Herzrohre bilden (Abbildung 17). Die Folge ist

die Entstehung von zwei Herzen (Abbildung 17 unten). Der zweite *Alg13*-GT Klon P088H08 führt an E7.5 teilweise zu Defekten in der Musterbildung (Abbildung 16E).

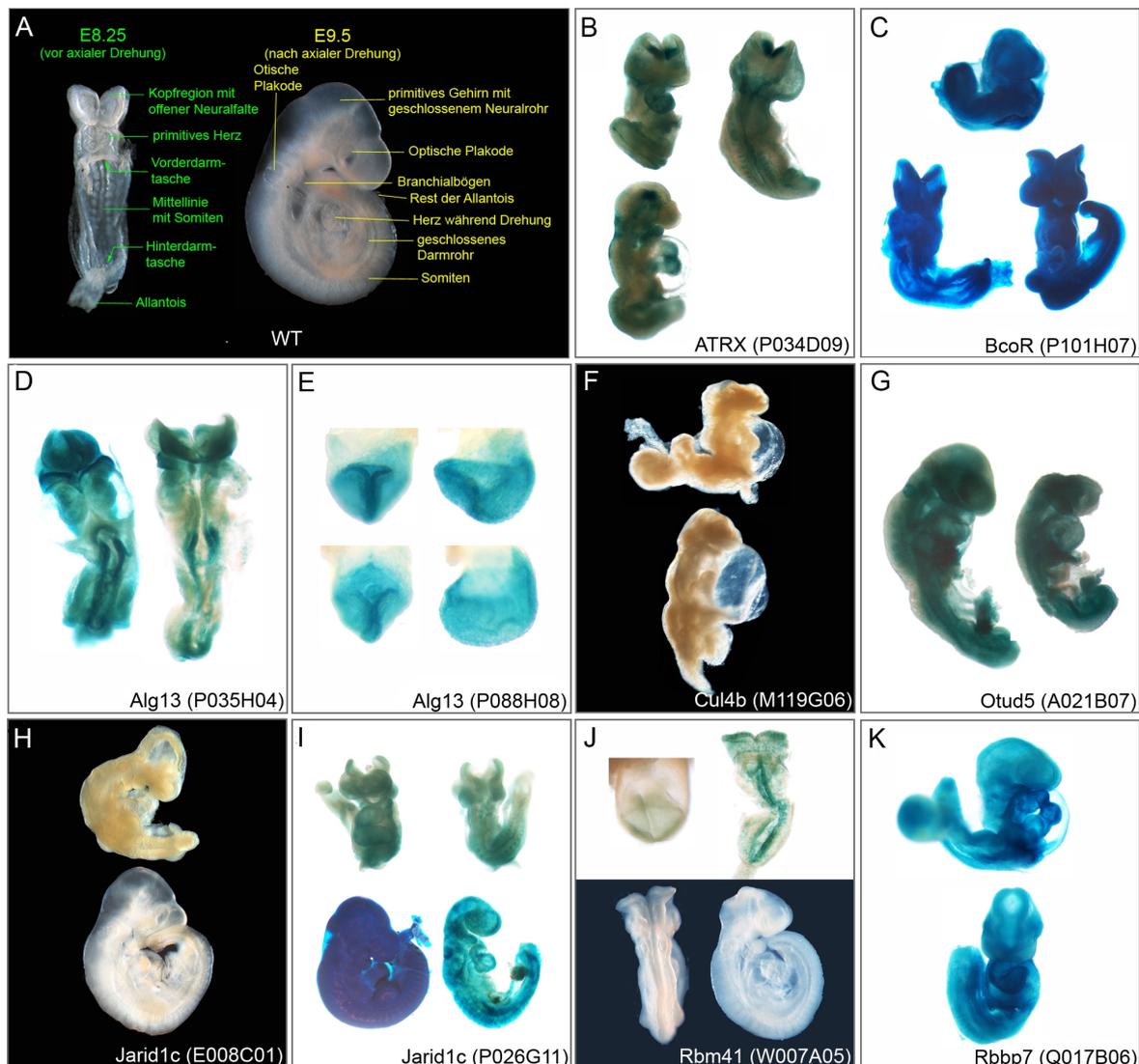


Abbildung 16: Embryonen mit Defekten während der Neurulation. A) Wildtyp-Embryonen mit Kennzeichnung embryonaler Strukturen. B-K) GT-Klone acht verschiedener Gene führen zu einem Phänotyp während der Neurulation. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.

Leider waren weitere Aggregationsexperimente mit diesem Klon aus technischen Gründen nicht möglich. Jedoch zeigen einige der Embryonen des Klones P035H04 an E7.5 einen ähnlichen Defekt, so dass der Klon P088H08 durchaus auch eine Cardia Bifida entwickeln könnte. Zudem befindet sich die GT-Insertion bei beiden *Alg13*-GT Klone in Intron 3, so dass es wahrscheinlich in beiden Klone zum Fehlen wichtiger Proteindomänen von *Alg13* kommt und es sich hier um Knockout-Allele handeln könnte (Abbildung 40, Seite 115). Die Expression des LacZ-Reporters in *Alg13*-GT Embryonen ist zunächst ubiquitär, es kommt jedoch später ab E8.5 zu einer Runterregulierung des LacZ-Reporters im Herzen und anderen Mesodermderivaten.

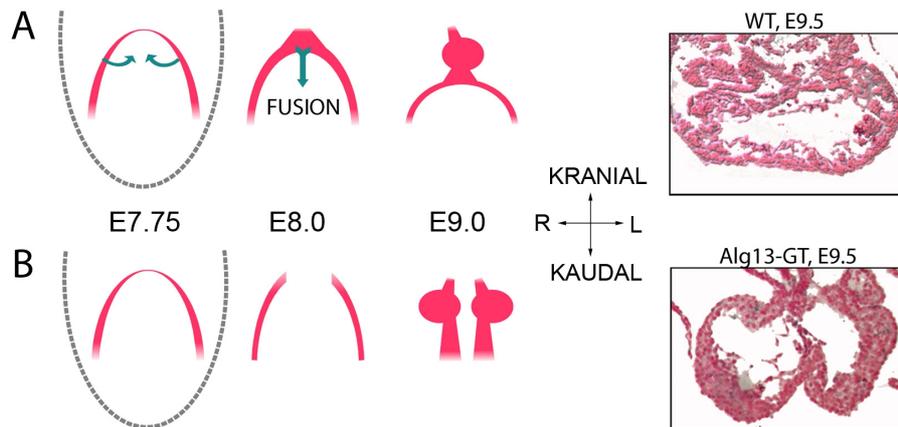


Abbildung 17: Die Entstehung einer Cardia Bifida in Alg13-GT Embryonen. A) Die Herzvorläufer-Zellen des ersten Herzfeldes (rot) fusionieren in der Mitte und bilden einen Herzschlauch, aus dem sich später das Herz mit vier getrennten Kammern entwickelt. B) Bei Alg13-GT Embryonen kommt es nicht zur Fusion der Herzvorläufer. Deshalb entstehen aus den Herzvorläufern der rechten und linken Körperseite jeweils ein Herzschlauch. Histologie: Man sieht im Wildtyp an E9.5 (oben) einen primitiven Ventrikel. Alg13-GT Embryonen weisen an E9.5 zwei primitive Ventrikel nebeneinander auf (unten). Paraffinschnitte, Gegenfärbung mit Kernechtrot.

Cul4b (*Cullin4b*) gehört zu der Proteinfamilie der Cullins, die als Gerüst für E3 Ubiquitin-Ligasen dienen. Im Komplex mit dem Dioxin-Rezeptor (AHR) markiert *Cul4b* z.B. die Sexualhormon-Rezeptoren für deren Abbau (Ohtake et al., 2007). Mutationen von *Cul4b* verursachen unter anderem das Cabezas Syndrom. Dieses beinhaltet mentale Retardierung, Hypogonadismus, geringe Körpergröße, zentrale Fettleibigkeit, Aggressivität, Tremor und Fußmißbildungen (Cabezas et al., 2000; Tarpey et al., 2007). Auch mentale Retardierung ohne die restlichen Symptome des Cabezas Syndroms wurde mit Mutationen in *Cul4b* assoziiert (Wei et al., 1993; Zou et al., 2007). Die Aggregation des *Cul4b*-GT ES-Klons M119G06 führten zu einem stark abnormalen Phänotyp. Die Embryonen haben die axiale Drehung nicht vollführt und zeigen deutliche Defekte in der Musterbildung des Rumpfes (Abbildung 16F). Dies ist vor allem in der Schwanzregion sichtbar. Das Perikardium des Herzens ist stark dilatiert, während sich das Herz teilweise noch im Stadium des Herzschlauch befindet. Partiiell erfolgt die Fusionierung des Neuralrohrs nur unvollständig. In diesen Embryonen ist zu diesem Entwicklungsstadium keine LacZ-Reporteraktivität nachweisbar. Dies schließt jedoch nicht aus, dass der Reporter an einem früheren, entwicklungsbiologischen Zeitpunkt oder Ort exprimiert wird und durch diese frühe Expression der hier beobachtete Phänotyp zustande kommt. Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 2, welches von Exon 2 und 3 flankiert wird (Abbildung 41, Seite 116). Für *Cul4b* wurden Isoformen beschrieben, bei denen Exon 2 und 3 bereits im translatierten Bereich liegen. Bei einer anderen Isoform liegen Exon 2 und 3 noch in der untranslatierten Region und stromaufwärts regulatorischer Sequenzen. Es ist durchaus möglich, dass an E9.5 und E10.5 diese letzte Isoform aktiv ist und deshalb keine Expression nachgewiesen werden kann, während in ES-Zellen eine andere *Cul4b*-Isoform aktiv ist, die die GT-Insertion umschließt.

Otud5 (Synonym: Duba) gehört zu den Deubiquitinierenden Enzymen, die die Gegenspieler der E3 Ubiquitin-Ligasen darstellen. Kayagaki et al. identifizierten Otud5 in einem siRNA Screen als negativen Regulator von Interferon 1, welches ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität ist. Für die Interferon-Antwort ist das Adaptermolekül TRAF3 essentiell. Dabei handelt es sich um eine E3 Ubiquitin-Ligase, an die Otud5 bindet und die daran gebundene Polyubiquitinkette spaltet (Kayagaki et al., 2007). *Otud5*-GT Embryonen des Klons A021B07 (Abbildung 16G) zeigen ubiquitäre Expression des LacZ-Reporters und vollführen die axiale Drehung nicht vollständig. In einigen Embryonen ist zudem eine Deletion des Vorderhirns detektierbar. Der *Otud5*-GT Klon besitzt möglicherweise ein hypomorphes Allel, da die Insertion der GT-Kassette in Intron 2 erfolgte und einige Proteindomänen, wie z.B. Teile eines Dopamin-Rezeptors, in der Fusion enthalten und somit noch funktionell sein könnten (Abbildung 42, Seite 116).

Bei *Jarid1c* (Synonyme: *Smcx*, *Kdm5c*) handelt es sich um eine Histontridemethylase, die als transkriptioneller Repressor fungiert (Tahiliani et al., 2007). *Jarid1c* ist eines derjenigen Gene, die partiell die X-Inaktivierung des zweiten maternalen XC umgehen. Dies konnte für Hamster/Mensch-Hybridzellen sowie für die Maus gezeigt werden (Agulnik et al., 1994; Sheardown et al., 1996). Zudem existiert auf dem Y-Chromosom das Homolog *Jarid1d*. Allerdings werden *Jarid1c* und *Jarid1d* im Gehirn der Maus Geschlechts-spezifisch exprimiert, so dass vermutet wird, dass diese beiden Homologe funktionell nicht äquivalent sind (Xu et al., 2002; Jensen et al., 2005). Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass die Mutation des humanen *JARID1c* zur Ausbildung von XC-assoziiierter mentaler Retardation und Epilepsie führt (Jensen et al., 2005; Abidi et al., 2008). Im Phänotypen-basierten Screen wurden zwei *Jarid1c*-GT Klone untersucht (Abbildung 16H,I). Auffällig ist, dass die Embryonen beider Klone einen heterogenen Phänotyp zeigen, d.h. dass einige Embryonen einen mutanten Phänotyp ausbilden, während andere Embryonen noch an E10.5 wildtypisch sind. Die mutanten Embryonen beider Klone zeigen Herzdefekte, Probleme bei der axialen Drehung sowie entweder Hirnabnormalitäten (Abbildung 16H) oder fehlende Fusion des Neuralrohrs (Abbildung 16I). Während der *Jarid1c*-GT Klon E008C01 (Abbildung 16H) keinerlei LacZ-Reporteraktivität aufweist, ist die Expression des LacZ-Reporters in Klon P026G11 (Abbildung 16I) in wildtypischen Embryonen ubiquitär. Erstaunlicherweise nimmt die Reporteraktivität mit zunehmender Schwere des mutanten Phänotyps ab. Bei beiden *Jarid1c*-GT Klonen erfolgte die Insertion der GT-Kassette in Intron 1 (Abbildung 43 Seite 117). Vermutlich sind verschiedene regulatorische Bereiche durch die Insertion betroffen, so dass es zu den unterschiedlichen Ergebnissen in der Expression kommt. Der heterogene Phänotyp lässt sich möglicherweise durch die Existenz von *Jarid1d* erklären, welches das Fehlen von *Jaridc* in den einzelnen Embryonen unterschiedlich kompensieren kann.

Rbm41 ist ein Protein mit RNA-Bindemotiv, desweiteren ist nichts darüber bekannt. *Rbm41*-GT Embryonen des Klons W007A05 zeigen an E9.5 einen Defekt in der Fusion des

Neuralrohrs, was zu diesem Zeitpunkt nicht letal ist (Abbildung 16J). Möglicherweise kommt es später zur Ausbildung eines starken neuralen Phänotyps, auch möglich ist jedoch lediglich die verspätete Schließung des Neuralrohrs. Spätere Stadien dieser Embryonen wurden im Rahmen des Phänotypen-basierten Screens nicht untersucht. Interessant ist die Expression des LacZ-Reporters. Die Expression ist schwach ubiquitär während der Gastrulation, nimmt dann spezifisch in der Mittellinie und der Kopfreion zu und wird anschließend komplett runterreguliert, so dass an E9.5 keine Expression detektierbar ist. Die Insertion des GT-Kassette erfolgte bei diesem Klon in Intron 4 (Abbildung 44, Seite 117). Zwar werden noch ca. 190 aa von Rbm41 in das Fusionsprotein integriert, diese beinhalten jedoch keine bisher bekannten, funktionell wichtigen Proteindomänen. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Allel um einen funktionellen Knockout.

Rbbp7 (Synonym: RbAp46) wurde als Bindeprotein des Tumorsuppressors Rb1 (Retinoblastoma 1) entdeckt (Qian et al., 1993). Mittlerweile ist bekannt, dass Rbbp7 eine Untereinheit des Mi-2/NuRD-Komplexes darstellt (Zhang et al., 1999). Dieser Komplex enthält Histondeacetylasen sowie Nukleosomen-Remodellierungs-Einheiten und agiert dadurch als transkriptioneller Repressor (Überblick in Bowen et al., 2004). Durch die Interaktion zwischen dem Brustkrebs-spezifischen Tumorsuppressor BRCA1 mit Rbbp7 konnte eine Assoziation von Rbbp7 und der Entstehung von Krebs gezeigt werden (Yarden und Brody, 1999) In der Maus wurde ubiquitäre *Rbbp7*-Expression nachgewiesen (Qian et al., 1995). Auch die *Rbbp7*-GT Embryonen des Klons Q017B06 zeigen eine ubiquitäre LacZ-Expression (Abbildung 16K). Die Mutation führt zu starken Herzmißbildungen sowie Defekten in der axialen Drehung. Die GT-Insertion erfolgte bei diesem Klon in Intron 1 und betrifft alle bekannten *Rbbp7*-Isoformen (Abbildung 45, Seite 118). Wahrscheinlich handelt es sich deshalb um ein Allel mit komplettem Funktionsverlust.

3.1.4.3 Organogenese Phänotypen

| Gen | Klon-ID | Stadium | Deziduas | Wildtyp | Phänotyp |
|-------|---------|---------|----------|---------|----------|
| mDia3 | W005C03 | E9.5 | 3 | 0 | 3 |
| | | E10.5 | 11 | 0 | 7 |
| | | E11.5 | 4 | 0 | 0 |
| | E093H03 | E7.5 | 37 | 7 | 23 |
| | | E9.5 | 44 | 5 | 15 |
| | | E10.5 | 134 | 13 | 41 |
| | | E11.5 | 31 | 3 | 7 |
| | | E12.5 | 18 | 6 | 4 |

Table 3: Aggregationsexperimente für die mDia3-GT Klone.
Anzahl erhaltener Deziduas und Embryonen nach den Aggregationsexperimenten mit dem jeweiligen GT-Klon.

Da die Embryonen des Phänotypen-basierten Screens eigentlich an E9.5 untersucht wurden enthält die Klasse der Phänotypen während der Organogenese (E10.5-E11.5) nur das Gen

mDia3 und macht daher im Screen nur 6% aus. Die Anzahl der in Aggregationsexperimenten erhaltenen Embryonen ist in Tabelle 3 beschrieben. Obwohl die Insertion der beiden *mDia3*-GT Klone E093H03 (Abbildung 18B) und W005C03 (Abbildung 18C) an unterschiedlichen Stellen des *mDia3* Gens erfolgte (Intron 5 bzw. 16) zeigen die Embryonen ähnliche Phänotypen und Expressionsmuster (Abbildung 46, Seite 118). Die Expression beginnt an E9.5 spezifisch im Herzen. Ab E10.5 zeigen die Embryonen einen deutlichen Phänotyp mit hoher Letalitätsrate. Expressionsmuster und Phänotyp des *mDia3*-GT Klons E093H03 wurden detailliert analysiert und werden deshalb ab Kapitel 3.2 weiter behandelt.

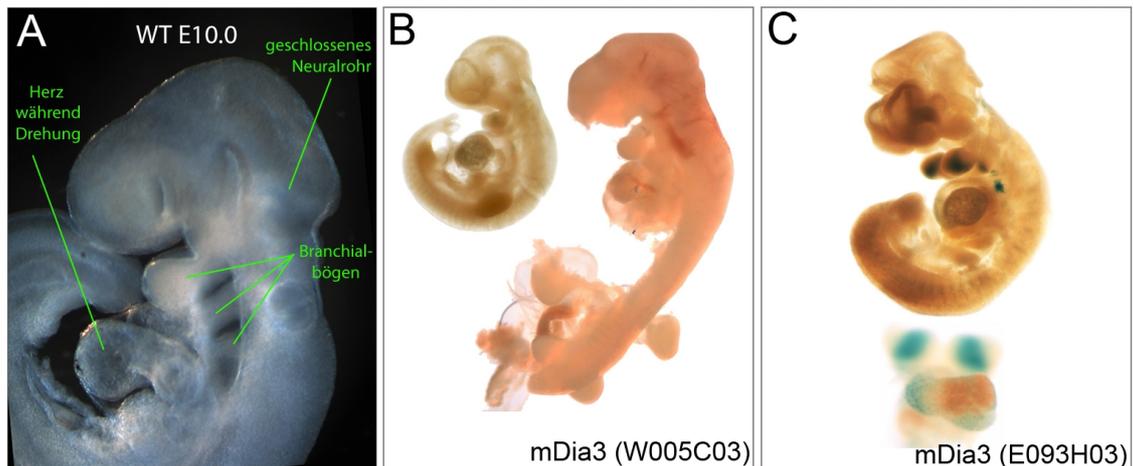


Abbildung 18: Embryonen mit Defekten während der Organogenese. Betroffen ist in diesem Fall nur *mDia3*. A) Vergrößerter WT-Embryo von lateral. B,C) *mDia3*-GT Embryonen von lateral. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der *mDia3*-GT Fusion.

3.1.4.4 Wildtypische Phänotypen

Da nicht alle Embryonen auf Defekte in der Organogenese untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass Embryonen, die im Screen als wildtypisch klassifiziert wurden, in späteren Entwicklungsstadien oder in der adulten Maus einen mutanten Phänotyp zeigen. Insgesamt führen 33% der im Screen untersuchten Gene nach Mutation zu keinem Phänotyp bis zum Stadium E9.5. Die Anzahl analysierter Embryonen ist in Tabelle 4 dargestellt.

| Gen | Klon-ID | Stadium | Deziduas | Wildtyp |
|---------------|---------|---------|----------|---------|
| A830080D01Rik | P078F05 | E8.5 | 16 | 6 |
| | W069B04 | E8.5 | 9 | 6 |
| | | E9.5 | 6 | 6 |
| Usp9x | W059E04 | E9.5 | 8 | 8 |
| Flna | F015B06 | E9.5 | 2 | 2 |
| Rbm10 | W081D04 | E10.5 | 33 | 22 |
| Rab9 | W255B06 | E9.5 | 9 | 6 |
| Med14 | A055C04 | E9.5 | 11 | 5 |
| | | E10.5 | 8 | 3 |

Tabelle 4: Aggregationsexperimente mit Wildtyp-Phänotyp. Anzahl erhaltener Deziduas und Embryonen nach den Aggregationsexperimenten mit dem jeweiligen GT-Klon.

Über den RIKEN-Klon *A830080D01* ist bisher nichts bekannt. Die Embryonen des *A830080D01*-GT ES-Klons P078F05 zeigen ubiquitäre Expression des LacZ-Reporters (Abbildung 19A), während die LacZ-Expression des zweiten Klons W069B04 eher spezifisch im Neuralrohr, der Mittellinie und im Darm zu finden ist (Abbildung 19B). Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 2 (P078F05) bzw. Intron 5 (W069B04) (Abbildung 47, Seite 119). Da die Proteinstruktur von *A830080D01* noch nicht bekannt ist, lässt sich nichts über die Mutagenität der GT-Insertionen aussagen.

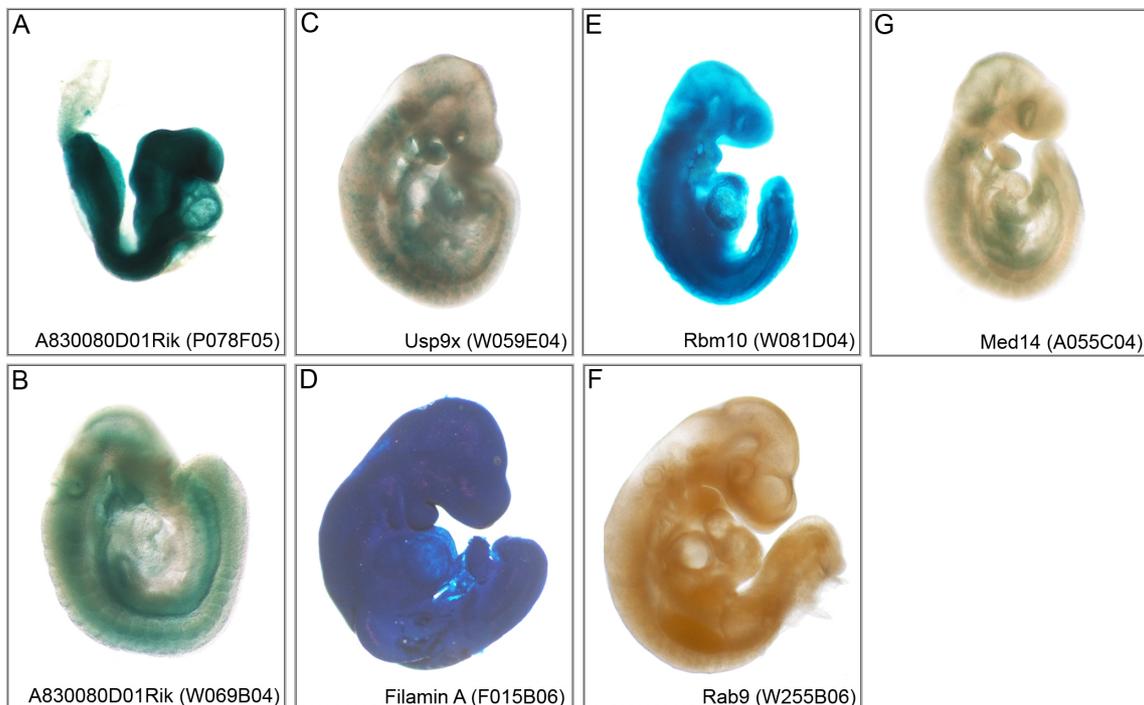


Abbildung 19: Embryonen mit Wildtyp-Phänotyp. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.

Bei Usp9X handelt es sich um eine Ubiquitin-spezifische Protease, die z.B. während der

Chromosomensegregation eine Rolle spielt (Vong et al., 2005). Da es zu *Usp9X* auf dem Y-Chromosom das Homolog *Usp9Y* gibt, ist es wahrscheinlich, dass das Fehlen von *Usp9X* in den Embryonen von *Usp9Y* kompensiert wird. Die Expression des LacZ-Reporters in den *Usp9X*-GT Embryonen kann als weitverbreitet bezeichnet werden, wobei zwar alle Bereiche des Embryos, jedoch nicht alle Zellen LacZ-positiv sind (Abbildung 19C). Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 13, betrifft jedoch alle bekannten Proteindomänen (Abbildung 48, Seite 119). Deshalb kann man davon ausgehen, dass es sich um ein Allel mit Funktionsverlust handelt und *Usp9X* bis zum Stadium E9.5 keine entscheidende Rolle spielt bzw. sein Fehlen ausgeglichen werden kann.

Filamin A (Flna) ist für die Vernetzung von Aktin-Filamenten wichtig und spielt deshalb bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine Rolle. Dementsprechend ist es auch nicht verwunderlich, dass *Filamin A*-GT Embryonen eine hohe, ubiquitäre LacZ-Reporteraktivität aufweisen (Abbildung 19D). Eine Mutation in *FLNA* wurde beim Menschen mit periventrikulärer Heterotropie assoziiert. Frauen mit dieser Mutation zeigen Epilepsie und Herzanomalien, während betroffene Männer bereits vor der Geburt sterben (Fox et al., 1998). *Filamin A*-GT Embryonen des Klons F015B06 zeigen an E9.5 einen wildtypischen Phänotyp, es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es in der weiteren Entwicklung zur Ausbildung eines mutanten Phänotyps kommt. Da die Insertion der GT-Kassette jedoch in Intron 44 erfolgte und somit große Teile des Proteins in der Fusion enthalten sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass die GT-Mutation die Funktion von Filamin A nicht beeinträchtigt (Abbildung 49, Seite 120).

Bei *Rbm10* handelt es sich wie bei dem vorher bereits beschriebenen *Rbm41* um ein RNA-Bindeprotein mit bisher ungeklärter Funktion. *Rbm10*-GT Embryonen des Klons W081D04 zeigen eine ubiquitäre LacZ-Expression (Abbildung 19E). Vermutlich kann die RNA-spezifische Funktion von *Rbm10* von anderen *Rbm*-Familienmitgliedern kompensiert werden, da die Insertion der GT-Kassette in Intron 2 zum Fehlen der RNA-Bindedomänen führt (Abbildung 50, Seite 120). Es gibt zwei kleinere Isoformen von *Rbm10*, die durch die GT-Mutation nicht betroffen sind, jedoch auch keine RNA-Bindedomänen aufweisen.

Rab9 gehört zu der Proteinfamilie der kleinen GTPasen und spielt eine Rolle beim vesikulären Transport. *Rab9*-GT Embryonen des Klons W255B06 zeigen keinerlei LacZ-Reporteraktivität (Abbildung 19F). Dies bedeutet, dass entweder die Funktion von *Rab9* durch andere GTPasen übernommen wird, was zur Runterregulierung des *Rab9*-GT Fusionsproteins führt oder dass *Rab9* bis zu diesem Entwicklungsstadium nicht exprimiert wird, was eher unwahrscheinlich ist. Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 1 und führt zum Fehlen sämtlicher Proteindomänen, es handelt sich also vermutlich um ein *Rab9*-Knockout Allel (Abbildung 51, Seite 121).

Für *Med14* ist bekannt, dass es mit dem Glukokorticoidrezeptor interagiert und dessen

transkriptionelle Aktivität erhöht (Hittelman et al., 1999). Die Expression des LacZ-Reporters ist in *Med14*-GT Embryonen des Klons A055C04 vor allem in den Entodermderivaten und dem Neuralrohr detektierbar (Abbildung 19G). Die Insertion der GT-Kassette in Intron 1 führt zum Verlust sämtlicher Proteindomänen (Abbildung 52, Seite 121).

3.1.5 Die Rettung des *Nono*-GT-Phänotypen durch Inversion der GT-Kassette

Die vom GGTC verwendete GT-Kassette ist ein komplexes Konstrukt mit zueinander gerichteten LoxP- und Frt- Stellen, die eine Inversion der Kassette mit Hilfe der Cre- bzw. Flip-Rekombinase erlauben (Schnütgen et al., 2005). Um zu zeigen, dass der mutante Phänotyp nach der tetraploiden Embryo-ES-Zell-Aggregation kein technisches Artefakt ist, sondern tatsächlich durch die GT-Mutation verursacht wird, wurde eine Rettung des *Nono*-GT Phänotyps durch die Inversion der GT-Kassette vorgenommen (Abbildung 20).

Dies erfordert folgendes experimentelles Vorgehen:

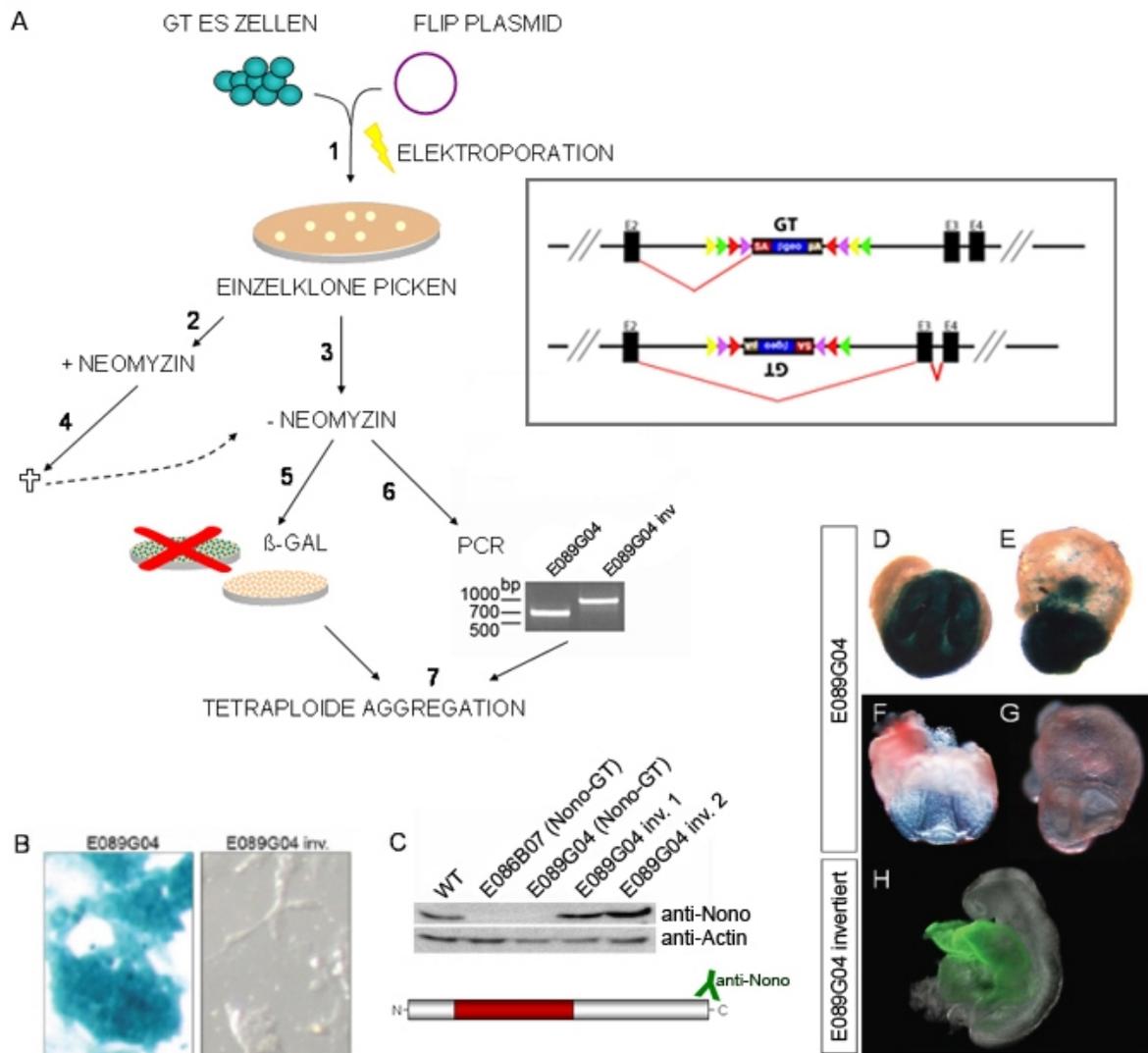


Abbildung 20: Rettung des Nono-Phänotyps durch Inversion der GT-Kassette.
A,B) Die Flip-Rekombinase wird durch Elektroporation transient in die Nono-GT ES-Zellen eingebracht und invertiert die GT-Kassette (Kasten). Dies führt dazu, dass die ES-Zellen kein LacZ mehr exprimieren (B) und Neomycin-sensitiv sind. Die positiv invertierten ES-Zellen werden für die tetraploide Aggregation eingesetzt. C) Der Western Blot zeigt, dass ein den C-Terminus von Nono erkennender Antikörper kein Nono-Protein in GT-Zellen detektieren kann. Dieser Effekt ist nach Inversion der GT-Kassette aufgehoben. Als Ladekontrolle dient Aktin. D-G) Nono-GT Embryonen zeigen Defekte in der Gastrulation (D-G). Die Embryonen exprimieren ubiquitär LacZ (D,E), während das extraembryonale Gewebe von den tetraploiden Embryonen abstammt und dsRed exprimiert (F,G). H) Die Embryonen des Nono-GT Klons mit invertierter GT-Kassette zeigen an E8.5 einen Wildtyp-Phänotyp. Die Expression von YFP zeigt, dass nur das extraembryonale Gewebe von tetraploiden Zellen gebildet wurde.

Zunächst wurde der Nono-GT ES-Klon E089G04 mit einem für die Flip-Rekombinase kodierenden Plasmid transfiziert (Abbildung 20A). Die transiente Expression der Flip-Rekombinase verursachte die Inversion der GT-Kassette. Nach der Inversion kann das Nono-Transkript nicht mehr an die GT-Kassette gespleißt werden, da die Spleißakzeptorstelle nun

auf dem Gegenstrang kodiert (Abbildung 20, Kasten). Die Inversion führte demnach zur Stilllegung der Mutation. Es wurde erwartet, dass die derart „geretteten“ *Nono*-GT Klone nun Neomycin-sensitiv und LacZ-negativ sind (Abbildung 20B). Um dies zu überprüfen wurden Einzelklone isoliert, auf zwei Platten verteilt und auf einer Platte auf Neomycin-Sensitivität getestet. Neomycin-sensitive Klone wurden auf der anderen Platte expandiert und mittels LacZ-Färbung verifiziert. Eine zweite Verifizierung der invertierten Klone erfolgte durch eine PCR, die spezifisch für LoxP- und Frt-Stellen ist und deren Fragmentgröße die Richtung der GT-Kassette angibt.

Nach der Generierung der invertierten ES-Klone wurden diese mit tetraploiden Embryonen aggregiert und die resultierenden Embryonen an den Stadien E8.5-E9.5 untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die invertierten *Nono*-GT Klone einen Wildtyp-Phänotyp, während die ursprünglichen *Nono*-GT Klone einen Defekt in der Gastrulation aufweisen und zu diesen Stadien entweder schon tot sind oder einen abnormalen Phänotyp zeigen (Abbildung 20D-H).

Dieser Versuch zeigt deutlich, dass der mutante Phänotyp in den *Nono*-GT Klonen durch die GT-Insertion im *Nono*-Gen verursacht wurde. Dies ist der beispielhafte Beweis, dass das Prinzip des Phänotypen-basierten Screens funktioniert und die resultierenden Phänotypen keine Artefakte sind.

Zusätzlich zu dem oben genannten Experiment erfolgte auch eine Charakterisierung der ursprünglichen sowie invertierten *Nono*-GT Klone mittels Western Blot (Abbildung 20C). Ein *Nono*-Antikörper, der den C-Terminus von *Nono* erkennt, weist in WT-ES-Zellen eine deutliche *Nono*-Expression nach, die durch die GT-Insertion aufgehoben wird. Dies deutet darauf hin dass es sich bei den *Nono*-GT Allel um ein Allel mit vollem Funktionsverlust handelt. Im Gegenzug dazu ist *Nono* in den invertierten GT-Zellen deutlich nachweisbar. Auch dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem beobachteten Phänotyp um eine Folge der Mutation von *Nono* handelt und bestätigt nochmals die Verlässlichkeit des Phänotypen-basierten Screens.

3.2 Untersuchungen zur Expression und embryonalen Funktion von *mDia3*

3.2.1 Generierung einer *mDia3*-GT Mauslinie

Um die Funktion von *mDia3* genauer zu untersuchen wurde aus dem *mDia3*-GT Klon E093H03 eine Mauslinie generiert. Dazu wurden die *mDia3*-GT ES-Zellen mit diploiden Wildtyp-Embryonen aggregiert und die entstehenden Embryonen in eine Leihmutter retransferiert, die man werfen ließ. Bei den so generierten Tieren handelt es sich um Chimären, da die Wildtyp-Zellen sowohl zum embryonalen als auch zum extraembryonalen Gewebe beitragen können. Anhand der Fellfarbe konnte der Chimerismus abgeschätzt werden, welcher im Fall der männlichen *mDia3*-GT Chimäre nur ca. 30% betrug. Dennoch trugen die *mDia3*-GT ES-Zellen zu den Keimzellen bei, so dass diese Chimäre das *mDia3*-GT Allel an seine Nachkommen weitervererben konnte. Bei dem *mDia3*-GT

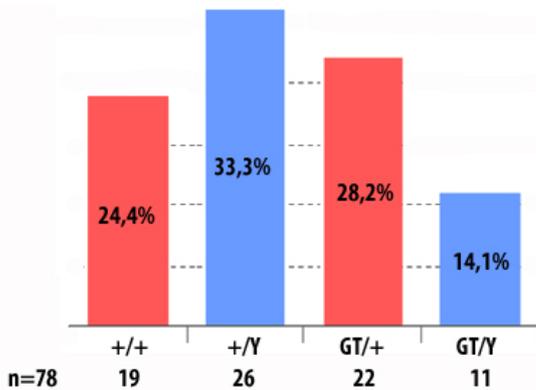


Abbildung 21: Statistik der Genotypenverteilung der *mDia3*-GT Mauslinie. Die Statistik beinhaltet Mäuse der 5. und 6. Rückkreuzungs-Generations auf den Bl6-Mausstamm. Die Genotypisierung erfolgte drei Wochen nach der Geburt. Signifikanz nach Chi-Quadrat: $p=0,33$.

Klon handelt es sich um Inzucht-ES-Zellen der Linie E14Tg2A, die von einer Mauslinie mit dem genetischen Hintergrund 129/Ola abstammen. Da sich dieser Mausstamm jedoch aufgrund sehr kleiner Wurfgrößen nicht gut zur Analyse eines embryonalen Phänotyps eignet wurde die *mDia3*-GT Mauslinie auf den Bl6-Stamm zurückgekreuzt. Bei diesem Stamm handelt es sich ebenfalls um einen Inzuchtstamm, d.h. dass die Tiere dieses Stammes für jedes Allel homozygot sind. Generell erhöht sich durch die Homozygotie die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation eines Allels zu einem abnormen Phänotyp führt.

Die *mDia3*-GT Mauslinie bildet keinen mutanten Phänotyp mit voller Penetranz aus. Laut der Verteilung nach Mendel werden 25% hemizygoten *mDia3*-GT Männchen erwartet. Zum Zeitpunkt der Genotypisierung drei Wochen nach der Geburt besitzen 14,1% der Tiere aus den Rückkreuzungsgenerationen 5 und 6 diesen Genotyp (Abbildung 21). Dieses Ergebnis ist nach dem Chi-Quadrat-Test signifikant, da $p=0,33$ und somit $p<0,5$. Auch bei der Aggregation von *mDia3*-GT ES Zellen mit tetraploiden Embryonen findet man an E12.5 noch Embryonen mit einem Wildtyp-Phänotyp (Tabelle 3, Seite 47). Die Mutation von *mDia3* führt also unabhängig vom genetischen Hintergrund nicht zwingendermaßen zur embryonalen Letalität.

Da die Rückkreuzung der *mDia3*-GT Mauslinie sehr viel Zeit beanspruchte, wurden für die

Analyse des embryonalen Phänotyps ausschließlich Embryonen aus Aggregationsexperimenten verwendet. Die Analyse des embryonalen bzw. perinatalen Phänotyps der *mDia3*-GT Mauslinie war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Expressionsanalyse wiederum wurde mit Hilfe von Würfeln der *mDia3*-GT Mauslinie vorgenommen.

3.2.2 Die molekulare Charakterisierung des *mDia3*-GT Klons E093H03

Vor der genaueren Analyse des *mDia3*-GT Phänotyps wurde der verwendete GT-ES-Klon E093H03 genauer analysiert (Abbildung 22). Die Analyse des GGTC ergab, dass die Insertion der GT-Kassette in Intron 5 von *mDia3* stattgefunden hatte (Abbildung 22A). Dies wurde mittels RT-PCR verifiziert (Abbildung 22B). Dazu wurden Primer für die GT-Kassette sowie für die flankierenden Exons 5 und 6 verwendet. Während sich in WT-ES-Zellen ein Transkript von Exon 5 und 6 nachweisen ließ war dieses in *mDia3*-GT-ES Zellen nicht mehr vorhanden. Stattdessen ließ sich ein Fusionstranskript aus Exon 5 und der GT-Kassette detektieren. Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts ergab, dass es sich dabei tatsächlich um *mDia3* handelte. Um herauszufinden, ob dennoch die letzten Exons durch alternatives Spleißen transkribiert werden und es sich eventuell nur um ein hypomorphes Allel handelt, wurde auch die Transkription von Exon 25-27 überprüft. Wieder ist die Transkription in WT-ES-Zellen nachweisbar, während sie in den *mDia3*-GT Zellen fehlt. Um die Anwesenheit von mDia3 auf der Protein-Ebene zu untersuchen wurde ein mDia3-Antikörper verwendet, der den C-Terminus von *mDia3* erkennt (Abbildung 22C). Da die Expression von mDia3 in ES-Zellen generell nur gering ist wurden Proteinlysate aus adulten Herzen der *mDia3*-GT Mäuse hergestellt. Hier zeigt sich in WT-Herzen eine eindeutige mDia3-Expression, die in hemizygoten *mDia3*-GT Herzen nicht nachweisbar ist (Abbildung 22D). Zwar wird der N-Terminus von mDia3 mit partieller Rho-Bindedomäne noch hergestellt (Abbildung 22C), jedoch wurde von Lammers et al. in einer detaillierten Strukturanalyse gezeigt, dass die Aminosäuren 165 und 345 für die Bindung von Rho essentiell sind (Lammers et al., 2008). Da jedoch die Aminosäuren 148-1098 im *mDia3*-GT Allel fehlen, kann Rho vermutlich nicht an das *mDia3*-GT Fragment binden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass der Klon E093H03 ein *mDia3*-Allel mit vollständigem Funktionsverlust besitzt. Um die Mäuse der *mDia3*-GT Linie mit genomischer DNA genotypisieren zu können wurde zudem eine PCR auf genomischer Ebene entwickelt (Abbildung 22E). Zusätzlich wurde bei Embryonen auf das Y-Chromosom genotypisiert (Papaioannou und Behringer, 2005), da die Bestimmung des Geschlechts für die Analyse eines X-chromosomalen Phänotyps unerlässlich ist.

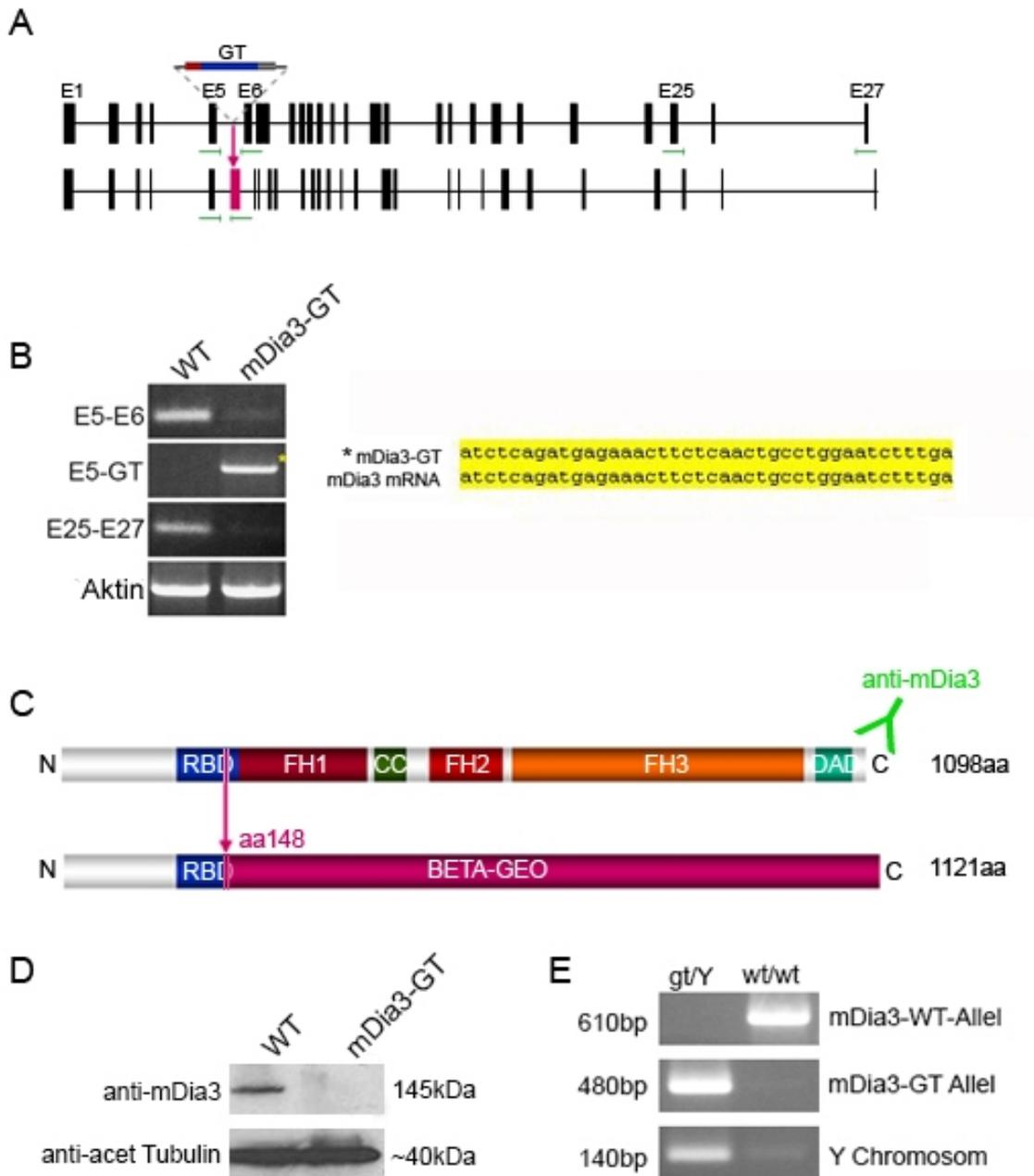


Abbildung 22: Charakterisierung des mDia3-GT Klonen E093H03. A) Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 5 des 27 Exons umfassenden mDia3-Gens. In grün sind die für die RT-PCR verwendeten Primer dargestellt. B) RT-PCR zum Nachweis verschiedener Wildtyp-mDia3-Transkripte sowie des mDia3-GT-Fusionstranskripts, welches sequenziert und mit der bekannten mDia3-mRNA-Sequenz verglichen wurde (*). C) Die Insertion der GT-Kassette in die Rho-Bindedomäne (RBD) führt zur Deletion der stromabwärtsgelegenen Proteindomänen. D) Western Blot mit Gesamtzellextrakten von WT- bzw. mDia3-GT-Herzen. Der mDia3-Antikörper bindet C-terminal (s. Schema in C). Als Ladekontrolle diente acetyliertes Tubulin. E) Genotypisierungsstrategie für mDia3-GT Embryonen. Nachweis des WT- und mDia3-GT Allels sowie des Y-Chromosoms zur Geschlechtsbestimmung. E = Exon.

3.2.3 Die Lokalisation von mDia3 auf subzellulärer Ebene

Die Analyse der endogenen mDia3 Lokalisation wird durch das in der GT-Kassette enthaltene LacZ-Reportergen ermöglicht. Da in der GT-Kassette kein eigener Promotor, sondern eine Spleißakzeptorstelle enthalten ist, entsteht ein Fusionsprotein aus dem stromaufwärtsgelegenen Exon 5 und der GT-Kassette. D.h. dass das gesamte Konstrukt unter Kontrolle des *mDia3*-Promotors steht und das entstehende LacZ-Muster einen Hinweis auf die endogene *mDia3*-Lokalisation und -Expression gibt.

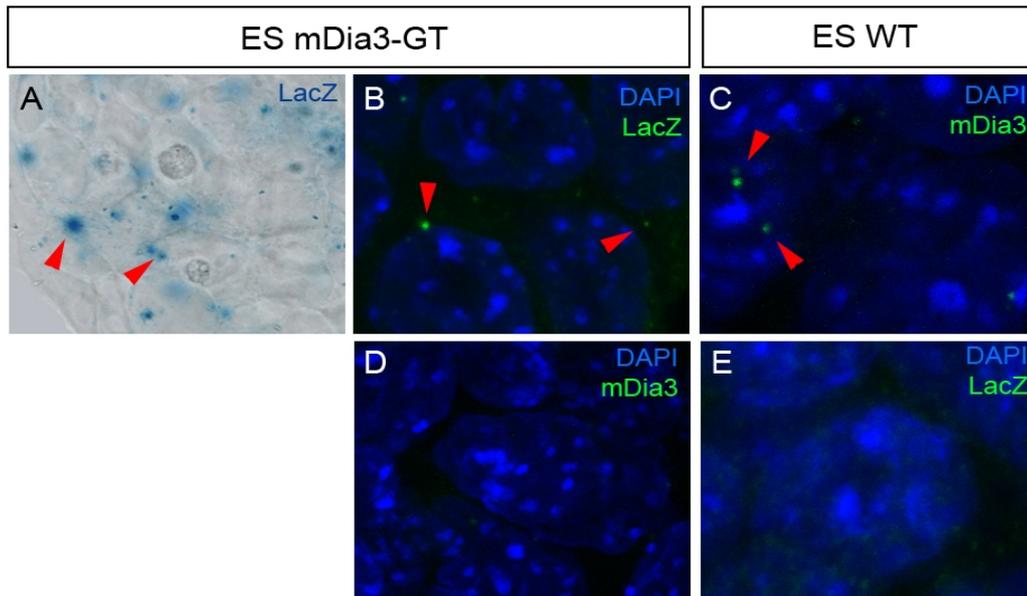


Abbildung 23: Die Expression des LacZ-Reporters und von endogenem mDia3 in ES-Zellen. A) LacZ-Färbung auf *mDia3*-GT ES-Zellen. B,D) In *mDia3*-GT ES-Zellen wurde das LacZ-Fusionsprotein (B) bzw. endogenes *mDia3* (D) detektiert. C,E) In WT-ES-Zellen wurde endogenes *mDia3* (C) bzw. das LacZ-Fusionsprotein (E) detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Pfeilköpfe markieren die Lokalisation von *mDia3* bzw. LacZ.

Die LacZ-Färbung auf *mDia3*-GT ES-Zellen zeigt, dass das *mDia3*-GT Fusionsprotein in punktförmigen Strukturen lokalisiert ist (Abbildung 23A). Dies bestätigen sowohl die Färbung von *mDia3*-GT ES-Zellen mit einem LacZ-Antikörper (Abbildung 23B) zur Detektion des Fusionsproteins sowie die Färbung von WT-ES-Zellen mit einem *mDia3*-Antikörper, der die Lokalisation von endogenem *mDia3* anzeigt (Abbildung 23C). Zudem ergibt die Kofärbung des Zellkerns mit DAPI, dass sich die punktförmigen Strukturen im Zytoplasma befinden. Um zu überprüfen, ob es sich bei den gefärbten Strukturen auch tatsächlich um die Lokalisation von *mDia3* und nicht um vom Antikörper verursachter Hintergrund handelt, wurden zur Kontrolle *mDia3*-GT ES-Zellen mit dem *mDia3*-Antikörper angefärbt. Da bereits der Western Blot in Abbildung 22 zeigte, dass keine endogene Expression von *mDia3* in *mDia3*-GT Zellen stattfindet, wurden hier keine gefärbten Strukturen erwartet. Dieses Ergebnis zeigte auch die Immunfärbung (Abbildung 23D). Zudem wurden WT-ES-Zellen mit dem LacZ-Antikörper angefärbt und auch hier konnten keine punktförmigen Strukturen beobachtet werden

(Abbildung 23E). Dies zeigt, dass der LacZ-Antikörper spezifisch das *mDia3*-GT Fusionsprotein detektiert und dessen Lokalisation wahrscheinlich mit der Lokalisation von endogenem *mDia3* übereinstimmt. Da die Integration der GT-Kassette in Intron 5 des *mDia3*-Gens stattfand, enthält das *mDia3*-GT Fusionsprotein die Proteindomänen, für die Exon 1-5 kodieren. Diese könnten durchaus für die Lokalisation von endogenem *mDia3* verantwortlich sein. Das würde erklären, warum die *mDia3*-GT Fusion dieselbe subzelluläre Lokalisation wie endogenes *mDia3* aufweist.

Um die genauer subzelluläre Lokalisation von *mDia3* zu klären, wurden Immunfärbungen mit verschiedenen subzellulären Markern angefertigt.

Rab-Proteine sind kleine GTPase, die verschiedene Funktionen während des vesikulären Transports übernehmen. Beispielsweise markiert Rab11A wiederverwertbare Endosomen (Recycling Endosomes). Bei diesen Endosomen handelt es sich um bestimmte Vesikel, die Membrankomponenten an die Oberfläche der Zelle transportieren, wenn diese reorganisiert wird (Überblick in van Ijzendoorn, 2006). Diese Änderungen umfassen auch das Aktin-Zytoskelett. Eine Kofärbung von Rab11A und LacZ auf *mDia3*-GT ES-Zellen zeigt eine deutliche Kolo-kalisation der beiden Proteine (Abbildung 24A). Aus technischen Gründen konnte der Versuch leider nicht in Kombination mit dem *mDia3*-Antikörper durchgeführt werden.

Rab6 ist ein Marker für den vesikulären Transport vom Golgi Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum und in die Peripherie (White et al., 1999). Während die Kofärbung von *mDia3* und Rab6 auf WT-ES-Zellen eine starke Kolo-kalisation beider Proteine zeigt (Abbildung 24C), ist keine Kolo-kalisation von Rab6 mit der LacZ-Fusion in *mDia3*-GT ES-Zellen detektierbar (Abbildung 24B). Das heisst, dass die Mutation von *mDia3* entweder zur falschen Lokalisation in der Zelle oder zur Inhibierung der Bindung an Rab6 führt. Dies müsste durch molekulare Analysen geklärt werden.

Der perizentrioläre Marker γ -Tubulin markiert die Zentrosomen einer Zelle, die eine wichtige Rolle bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts sowie der Mitose spielen. Sowohl in *mDia3*-GT ES-Zellen sowie in WT-ES-Zellen lässt sich keine Kolo-kalisation von γ -Tubulin und LacZ bzw. *mDia3* feststellen (Abbildung 24D). Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Kofärbung von *mDia3* und dem Zilienmarker Arl13b (Caspary et al., 2007) (Abbildung 24E). Verlässt eine Zelle den Zellzyklus und geht in die G_0 -Phase, bildet sie ein Zilium aus. Defekte in der Ziliogenese, sogenannte Ciliopathien, können verschiedene embryonale Defekte, einschließlic Herzfehlern, verursachen. *mDia3* ist zwar nicht am Zilium lokalisiert, dennoch kann ein indirekter Einfluss von *mDia3* auf die Ziliogenese nicht ausgeschlossen werden. Schließlich könnte beispielsweise eine abnormale Struktur des Zytoskeletts indirekt zu Defekten in der Ziliogenese führen. Um dies herauszufinden müssten *mDia3*-GT Zellen auf Störungen in der Ziliogenese untersucht werden.

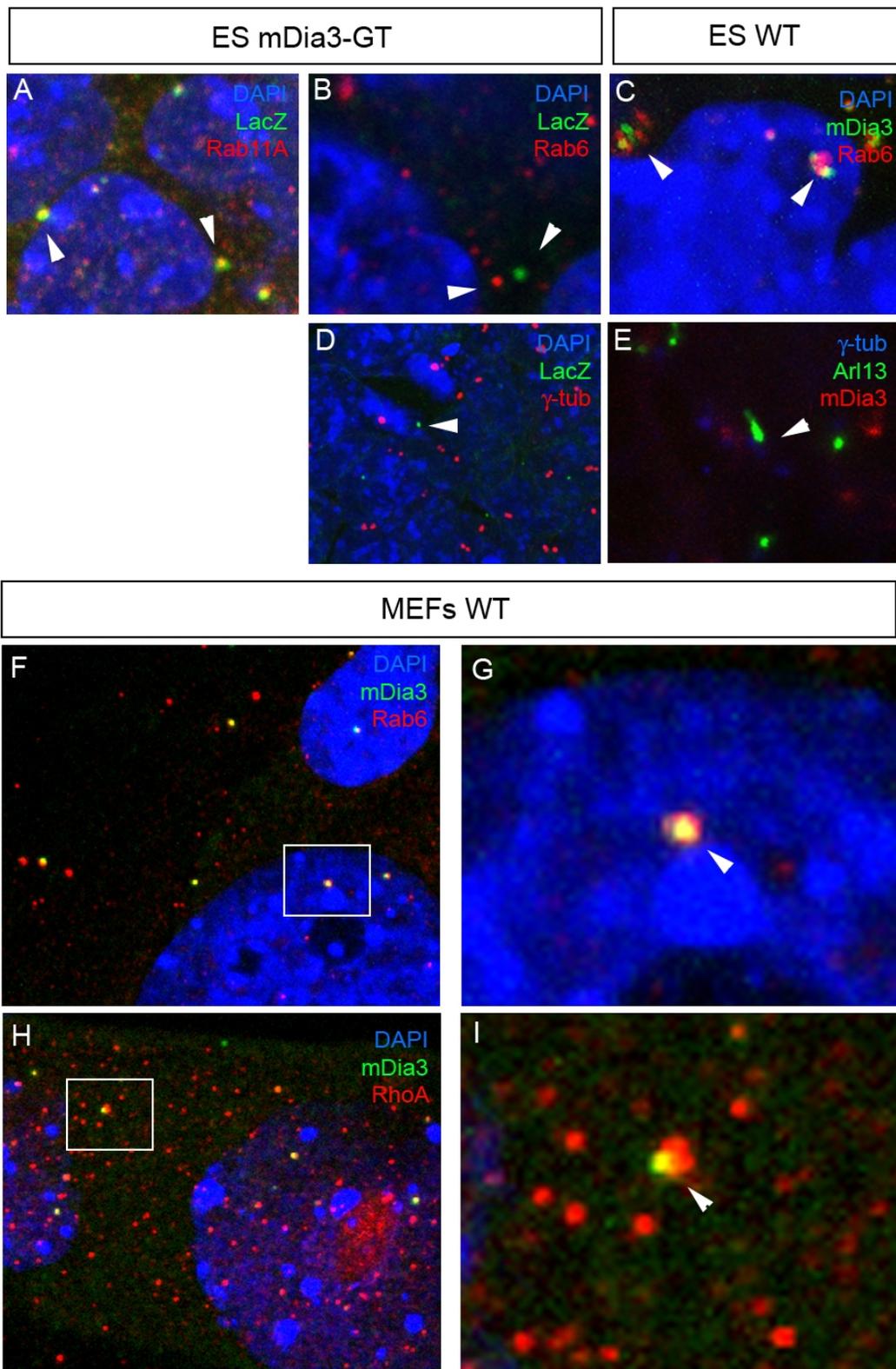


Abbildung 24: Die Kolokalisation von mDia3 mit verschiedenen subzellulären Markern. mDia3-GT und WT-ES-Zellen (A-E) bzw. WT-MEFs (F-H) wurden mit den jeweiligen Markern gefärbt. G und I zeigen Ausschnitte aus F und H. Pfeilköpfe markieren die Lokalisation.

Da bereits bekannt ist, dass *mDia3* ein Effektor von RhoA ist, wurde zusätzlich die Lokalisation von endogenem *mDia3* und RhoA in Mausfibroblasten (MEFs) untersucht. Diese sind deutlich kolokalisiert, was darauf hindeutet, dass es sich bei den punktförmigen Strukturen tatsächlich um endogenes *mDia3* handelt (Abbildung 24H,I). Zusätzlich zu RhoA wurde auch in den MEFs die Kolokalisation mit Rab6 untersucht, welche sich auch hier bestätigt (Abbildung 24F,G). Des öfteren ließen sich sowohl für RhoA als auch Rab6 mit *mDia3* eindeutige Ring-Punkt-Strukturen ausmachen, die auf die Lokalisation in Vesikeln hindeuten (Abbildung 24G,I).

Yasuda et al. beschreiben die Lokalisation von *mDia3* in punktförmigen Strukturen im Kern von HeLa-Zellen in der Interphase sowie als Akkumulierung am Kinetochorkomplex während der Mitose. Der Kinetochorkomplex ist für die Ausbildung des Spindelapparates wichtig und siRNA Experimente zeigen, dass das Fehlen von *mDia3* zu einem Stagnieren während der Mitose führt (Yasuda et al., 2004). Die Lokalisation im Zellkern konnte weder für endogenes, noch für die *mDia3*-GT-Fusion detektiert werden. Auch konnten die Defekte während der Mitose in den *mDia3*-GT ES-Zellen nicht bestätigt werden.

3.2.4 Die embryonale Expression des LacZ-Reporters

Mit Hilfe des LacZ-Reporters konnte die Expression der unter Kontrolle des *mDia3*-Promotors stehenden *mDia3*-GT Fusion untersucht werden. Dabei zeigt sich ab E7.5 eine erste Expression im posterioren Bereich an der Basis der Allantois, wo sich die primordialen Keimzellen befinden. Im weiteren Verlauf läßt sich an E8.0 eine spezifische Expression in der Region des Primitivknotens detektieren, welcher jeweils rechts und links von einem Bogen LacZ-positiver Zellen eingefasst wird. Vermutlich handelt es sich bei den LacZ-positiven Zellen um die sogenannten „Crown“-Zellen. Dieser Zelltyp umgibt die monoziliären „Pit“-Zellen, die im Primitivknoten den „Nodal Flow“ erzeugen. Durch diesen wird in den „Crown“-Zellen die linksseitige Nodal-Expression induziert. Folglich sind sowohl die „Pit“- als auch die „Crown“-Zellen für die Festlegung der Links-Rechts-Achse essentiell. Ab E8.5 beginnt die Expression stärker zu werden. Zu diesem Zeitpunkt ist sie zunächst im Bereich des Hinterdarms detektierbar. Ab E9.5 ist die LacZ-Expression eindeutig in den intersomitischen Gefäßen und den Branchialbögen zu erkennen. Die Branchialbögen sind embryonale Strukturen, die die Muskeln, Knochen und Gefäße des zukünftigen Pharynx sowie des Kiefers bilden.

An E10.5 ist dann eine starke, sehr spezifische Expression in den Branchialbögen, im Herzen und den intersomitischen Gefäßen nachweisbar. Dieses Expressionsmuster lässt sich nur in einem bestimmten Zeitfenster beobachten und deutet auf eine spezielle Funktion von *mDia3* in diesem Bereich hin.

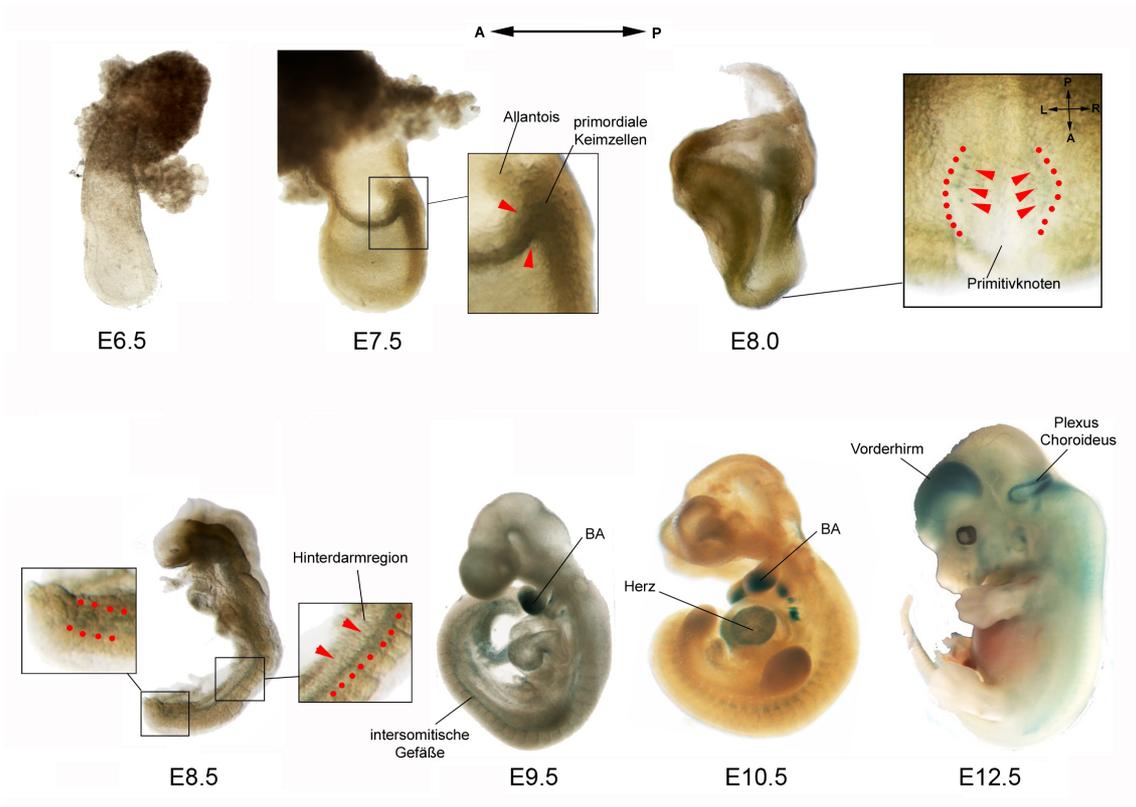


Abbildung 25: Die Expression des LacZ-Reporters in mDia3-GT Embryonen. Für die Stadien E6.5-8.0 ist die Orientierung anterior (A) ↔ posterior (P) angegeben. Die Stadien E8.5-12.5 sind von lateral abgebildet. Die Pfeile deuten auf LacZ-positive Zellen. Gestrichelte Linien deuten den Primitivknoten (oben) bzw. den Verlauf des Hinterdarmes (unten) an. BA – Branchialbögen.

Zwei Tage später zeigt sich ein stark verändertes Expressionsmuster, wiederum mit sehr spezifischen Domänen, die in Abbildung 26 histologisch dargestellt sind. Zunächst findet sich eine spezifische Expression im Plexus Choroideus, einer Region im Zentralen Nervensystems (ZNS). Bei dem Plexus Choroideus handelt es sich um eine verzweigtes Geflecht, das durch Filtration des Blutes Flüssigkeit in die Hirnventrikel abgibt und somit den Austausch der Gehirnflüssigkeit ermöglicht. Des weiteren ist eine deutliche LacZ-Färbungen im Auge und im Vomeronasalen Organ, welches für den ausgeprägten Geruchssinn der Maus verantwortlich ist, sichtbar. Auch Bereiche des Peripheren Nervensystems (PNS) zeigen eindeutige LacZ-Expression: im Rückenmark ist vor allem auf Höhe der Extremitäten eine deutliche Expression im Bereich der dorsalen Wurzelganglia detektierbar. Weitere Expressionsdomänen finden sich in den Zahnprimordien, dem Herzen sowie in Teilen des Urogenitaltrakts, wie dem Urogenitalsinus, welcher sich später zur Harnblase entwickelt, und dem Mesonephros, einem Vorläufer der Niere.

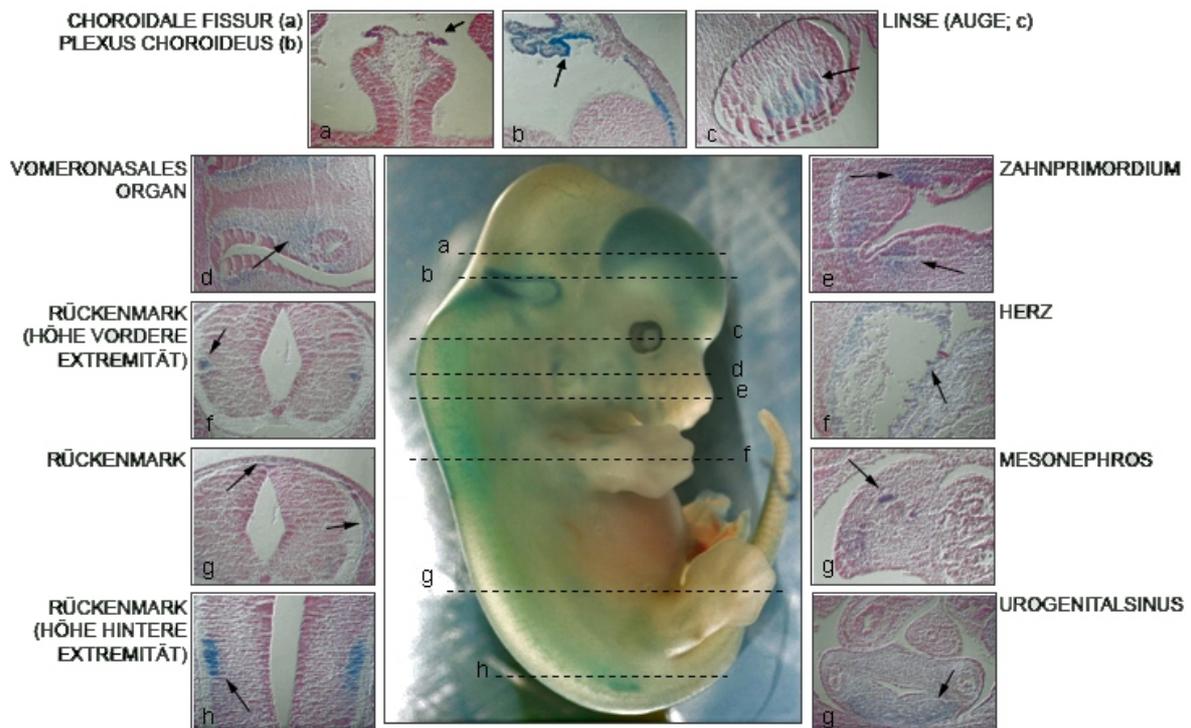


Abbildung 26: Die Expression des LacZ-Reporters an E12.5. Histologische Schnitte mit Kernechtrot- und LacZ-Färbung. Die Buchstaben markieren die Schnittebenen im Embryo.

3.2.5 Die adulte Expression des LacZ-Reporters

Die Expression des LacZ-Reporters unter Kontrolle des *mDia3*-Promotors im adulten Tier umfasst hauptsächlich zwei Organsysteme (Abbildung 27).

Zum einen ist die Expression im Herz-Kreislauf-System sehr hoch. Im Myokard des Herzens findet sich eine starke LacZ-Expression, während beispielsweise die Expression in der Aortenwand zwar vorhanden, jedoch nur sehr schwach ausgeprägt ist. Auch in Gefäßen der Lunge ist eine schwache Expression zu beobachten.

Das zweite Organsystem mit hoher LacZ-Expression ist das Urogenitalsystem. Im Bereich des Nierenbeckens ist die LacZ-Expression sehr hoch, während sie in der Wand der Harnblase eher schwach ist. Auch das Ovar und der Uterus sowie bestimmte Bereiche des Testis zeigen eine hohe LacZ-Expression. Bei den Expressionsdomänen im Testis handelt es sich um die Regionen, an denen die Keimzellen zu finden sind. Möglicherweise handelt es sich also bei den LacZ-positiven Zellen um die männlichen Keimzellen.

Die Expression im ZNS wurde in den adulten *mDia3*-GT Mäusen nicht untersucht. Aufgrund des Expressionsmusters im Embryo ist jedoch anzunehmen, dass der LacZ-Reporter auch im adulten ZNS exprimiert wird.

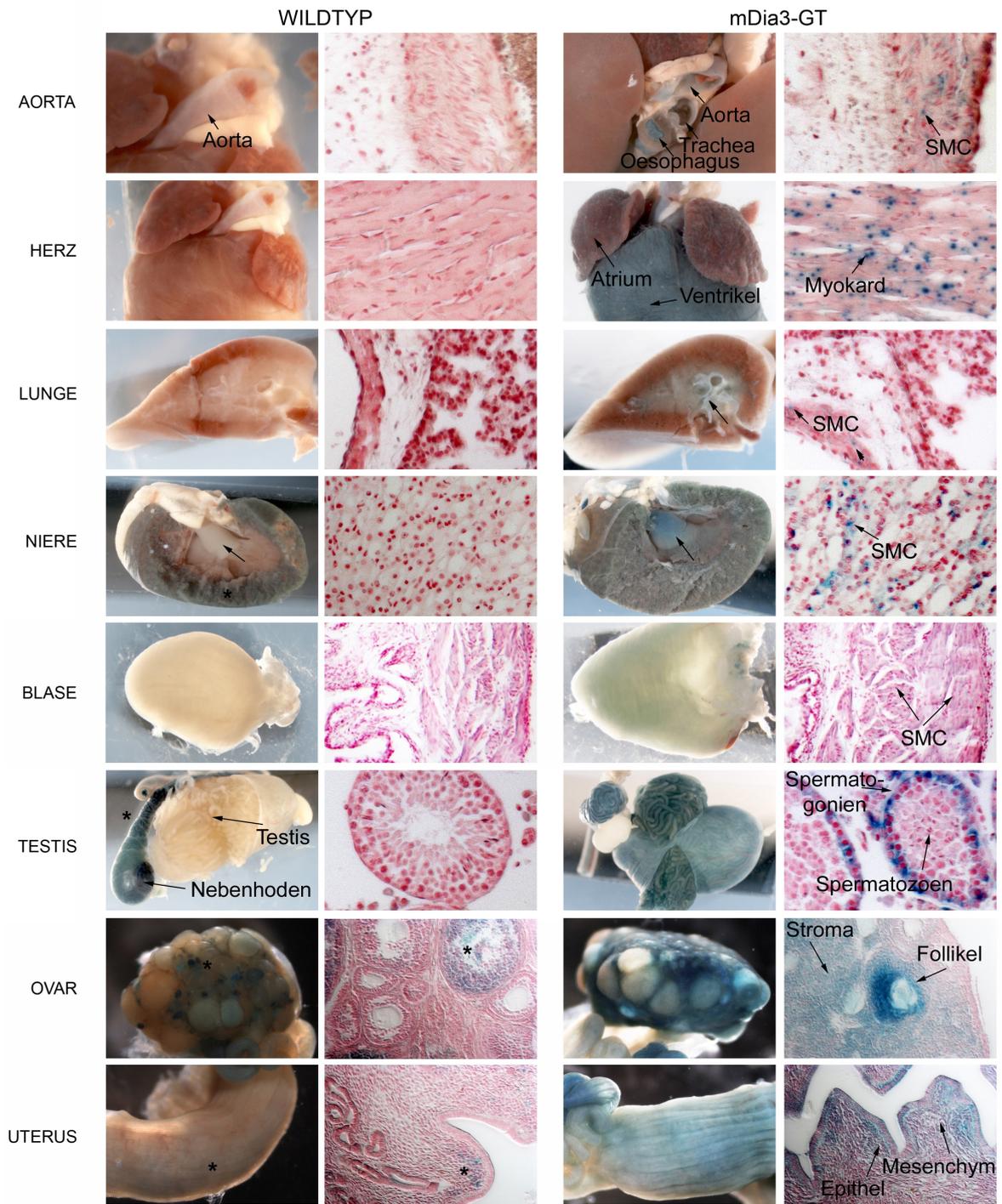


Abbildung 27: Die Expression des LacZ-Reporters in der adulten Maus. Links sind jeweils ganze Organe von Wildtyp- bzw. mDia3-GT Mäusen mit LacZ-Färbung abgebildet. Rechts sind die entsprechenden histologischen Schnitte mit Kernechtrot- und LacZ-Färbung. Sternchen markieren endogene LacZ-Expression im Nierenkortex, den Nebenhoden, im Ovar und im Uterus. SMC – glatte Muskelzellen.

3.2.6 Die Expression von *mDia3* in Wildtyp-Embryonen stimmt mit dem LacZ-Muster weitgehend überein

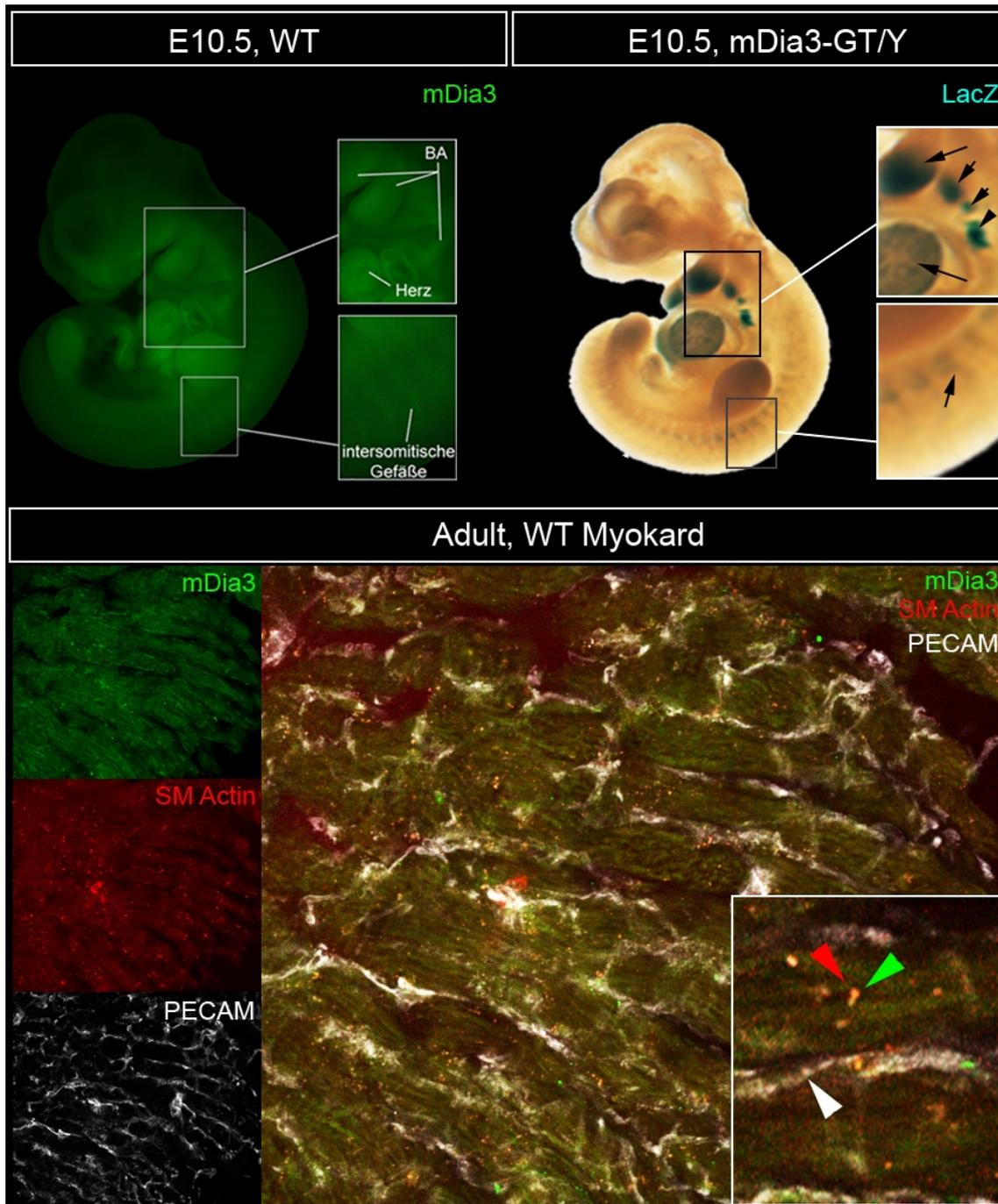


Abbildung 28: Die endogene Expression von *mDia3*. Oben: E10.5 WT-Embryo mit Immunfärbung gegen *mDia3* im Vergleich zur LacZ-Färbung des *mDia3*-GT Embryos. Pfeile kennzeichnen Expressionsdomänen. Unten: Histologische Schnitte von adulten WT-Herzen. Kofärbung von *mDia3*, SM Aktin (glatte Muskelzellen-Marker) und PECAM (Endothel-Marker). Pfeilköpfe kennzeichnen die jeweilige Expression.

Um zu überprüfen, ob die Expression des LacZ-Reporters in *mDia3*-GT Embryonen mit der endogenen Expression von *mDia3* übereinstimmt, wurden ganze Embryonen für eine

Immunfluoreszenz-Färbung mit einem *mDia3*-Antikörper eingesetzt. Abbildung 28 (oben) zeigt deutlich, dass an E10.5 die Expressionsdomänen von *mDia3* mit der LacZ-Färbung übereinstimmen. Die Färbung ist stark im Herzen sowie in Gefäßen, vor allem den intersomitischen Gefäßen, und den Branchialbögen zu erkennen. Histologische Schnitte zeigen zudem eine hohe *mDia3*-Expression im Herzen (Abbildung 28, unten). Da für die anderen *mDia*-Isoformen *mDia1* und *mDia2* eine Funktion in der glatten Muskulatur bekannt ist, wurde zudem untersucht, ob *mDia3* ebenfalls von glatten Muskelzellen exprimiert wird. Dazu wurden Kofärbungen mit dem glatten Muskelzellmarker *SM Aktin* und zur Kontrolle dem Endothelmarker *PECAM* angefertigt. Auf den histologischen Schnitten von Myokardzellen zeigt sich, dass *PECAM* und *mDia3* nicht in den gleichen Zellen exprimiert werden. Dafür ist eine deutliche Koexpression von *mDia3* und *SM Aktin* detektierbar. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch *mDia3* in der glatten Muskulatur eine Funktion besitzt.

3.2.7 *mDia3*-GT Embryonen zeigen Defekte in der Entwicklung des Herzens, des Gehirns und der Schwanzregion

Die morphologisch sichtbare Ausbildung eines mutanten Phänotyps in *mDia3*-GT Embryonen nach Aggregation der ES-Zellen mit tetraploiden Wildtyp-Embryonen beginnt an E10.5 (Abbildung 29). Betroffen sind vor allem das zentrale Nervensystem, das Herz und die Schwanzregion.

Zunächst ist deutlich sichtbar, dass es im Vergleich zum Wildtyp-Embryo zu einer abnormalen Ausbildung der Hirnregion kommt (Abbildung 29, Pfeile oben). Bei vielen Embryonen erfolgt die Schließung des Neuralrohrs nicht komplett. Auch die Embryonen, bei denen die Fusion vollständig ist, bilden die Hirnregion nicht normal aus. An E10.5 scheint das Neuralrohr im Vergleich zum Wildtypen dünnwandig und es sind Defekte in der Musterbildung sichtbar. An E12.5 weisen viele Embryonen nach wie vor einen Exenzephalus auf, worunter man eine ungeschlossene Schädeldecke versteht. Diese Öffnung zieht sich bis in die Gesichtsregion fort und bildet eine Kiefer-Gaumen-Spalte (Abbildung 29, Pfeil unten).

Ebenfalls offensichtlich ist die Mißbildung des Herzens (Abbildung 29, Pfeilspitzen). An E10.5 weisen viele Embryonen ein stark vergrößertes Perikardium auf. An E12.5 sind die Vorhöfe stark vergrößert und die Ventrikel weisen Unebenheiten und Einblutungen auf. Der Ausflußtrakt des Herzens verläuft oftmals gerade nach kranial, anstatt in Richtung Mitte und scheint nur aus einem Gefäß zu besitzen, anstatt sich in Aorta und Pulmonalarterie aufzutrennen. Diesen Phänotyp bezeichnet man als persistierenden Truncus Arteriosus (PTA) und ist ein kongenitaler Herzfehler, den man auch häufig beim Menschen beobachten kann.

Als letzter morphologisch deutlich sichtbare Phänotyp ist die Abnormalität der Schwanzspitze zu nennen (Abbildung 29, Sternchen). Während es an E10.5 zu einer blasenförmigen Erweiterung der Schwanzspitze kommt, sind an E12.5 entweder eine Duplikation oder

andersartige Auswüchse der Schwanzspitze sichtbar. Ebenfalls nicht selten ist die Formierung einer Struktur auf der Mittellinie in Höhe der hinteren Extremitäten, die einer kleinen dritten Hinterextremitätenknospe gleicht (Abbildung 29, Ausschnitt unten).

Eine genauere Untersuchung erfolgte nur für den Phänotypen des kardiovaskulären Systems. Dieser wird ab dem nächsten Kapitel detailliert beschrieben.

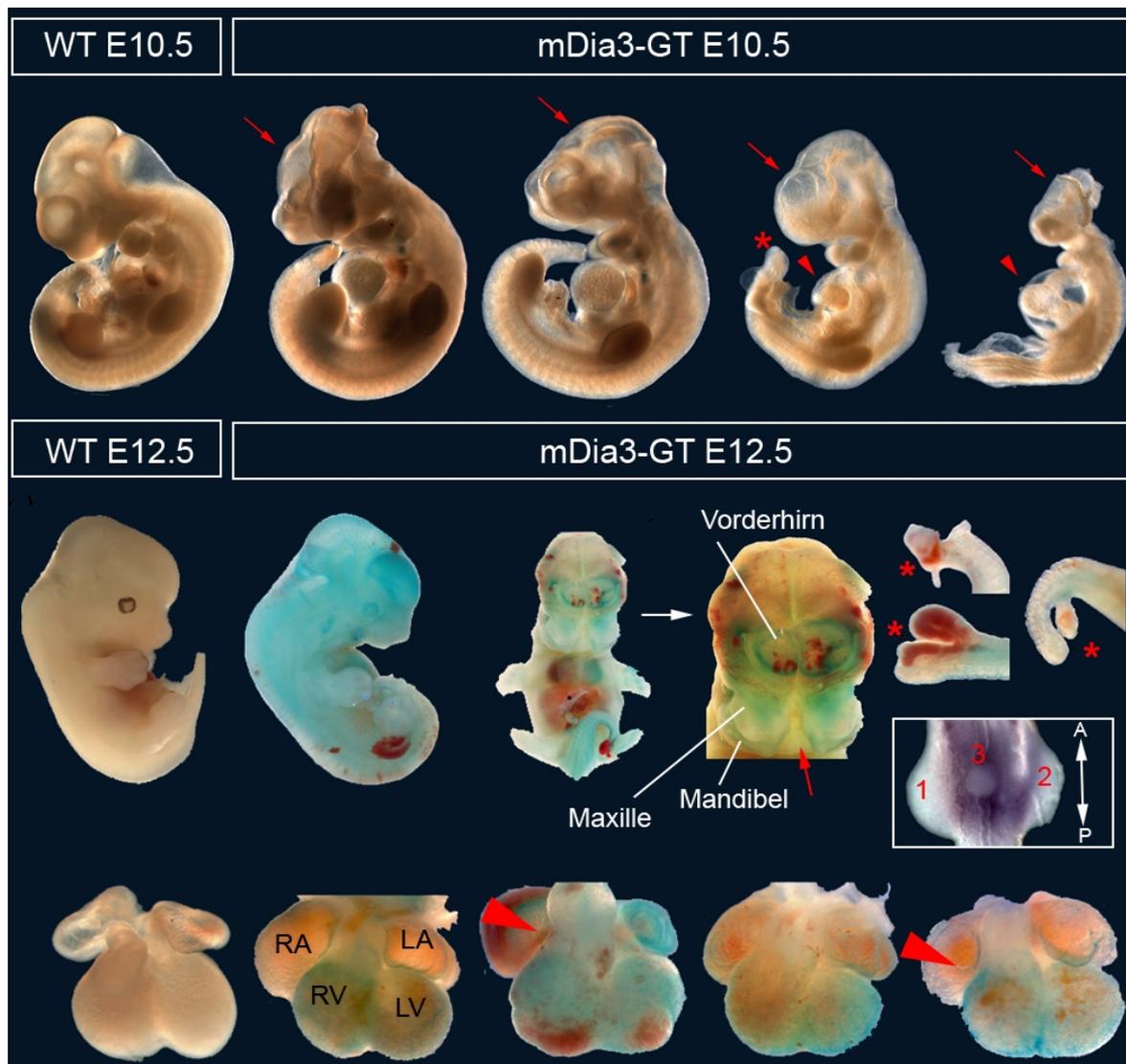


Abbildung 29: Phänotyp von *mDia3-GT* Embryonen an E10.5 und E12.5. WT- und *mDia3-GT* Embryonen mit LacZ-Färbung. Oben: Embryonen an E10.5 mit lateraler Ansicht. Pfeile zeigen den Kopfphänotyp, Pfeilspitzen zeigen Herzdefekte, Sternchen markieren Schwanzdefekte. Unten: Die Vergrößerung des Kopfes von vorne zeigt die Kiefer-Gaumen-Spalte (Pfeil). Die Vergrößerung der Schwanzregionen zeigt die Duplikationen und Auswüchse der Schwanzspitzen (Sternchen). Isolierte Herzen von vorne mit Ausflußtrakt-Defekten (Pfeilspitzen). Der Ausschnitt zeigt den Bereich der Hinterextremitäten-Knospen 1-3 mit in situ-Hybridisierung gegen *Pitx2*. RA – rechtes Atrium, LA – linkes Atrium, RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel.

3.2.8 Während der Herzentwicklung zeigen sich Links-Rechts-Defekte

Die genauere Analyse der *mDia3*-GT Embryonen aus den Aggregationsexperimenten zeigte zunächst morphologische Defekte in der Herzbildung. Bereits an E9.5 kommt es zu einer Verkürzung des Ausflußtraktes (Abbildung 30A oben, roter Pfeil), die in einer abnormen Herzdrehung resultiert und später zu einem PTA führt (Abbildung 29). Dieser Phänotyp wurde oftmals als Ursache eines Links-Rechts-Defektes beschrieben und nimmt seinen Ursprung bereits während der Gastrulation, wenn die Links-Rechts-Achse initial festgelegt wird (Hamada et al., 2002; Wright et al., 2002). Dazu wird im Primitivknoten durch Zilienrotation der sogenannte „Nodal Flow“ erzeugt, der zur unilateralen Aktivierung des Nodal/Tgfb β -Signalweges führt (Hirokawa et al., 2006). Es kommt zur Aktivierung von *Nodal* (Lohr et al., 1997) sowie *Nodal*-Antagonisten, wie z.B. *Lefty1* und *Lefty2* (Hamada et al., 2002) und *Pitx2c* (Kitamura et al., 1999; Liu et al., 2001; Liu et al., 2002; Kioussi et al., 2002). Bei *Pitx2c* handelt es sich um einen Homeobox-Transkriptionsfaktor, dessen Fehlen in 70% der Embryonen ebenfalls einen PTA verursacht (Kioussi et al., 2002).

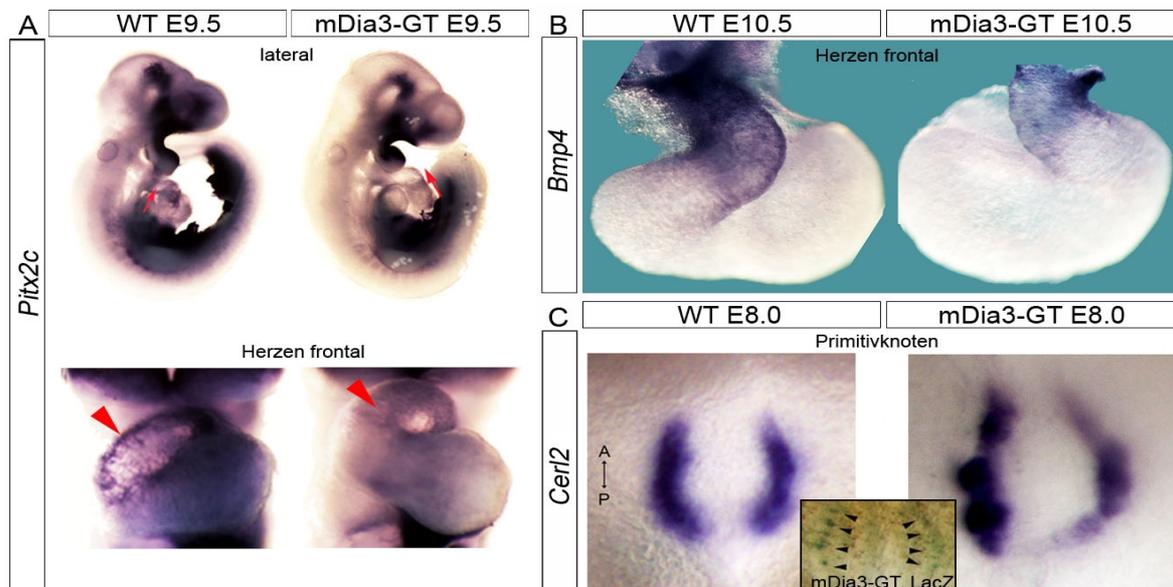


Abbildung 30: Links-Rechts-Defekte in *mDia3*-GT Embryonen. A) *In situ*-Hybridisierung gegen den Links-Rechts-Marker *Pitx2c*. Oben: Ganze Embryonen von lateral. Pfeile markieren den Ausflußtrakt. Unten: Herzen von frontal. Pfeilspitzen zeigen die Expressionsdomäne von *Pitx2c*. B) *In situ*-Hybridisierung auf Herzen von frontal gegen den Ausflußtrakt-Marker *Bmp4*. C) *In situ*-Hybridisierung gegen den frühen Links-Rechts-Marker *Cerl2*. Der Ausschnitt zeigt die LacZ-Färbung im Primitivknoten eines *mDia3*-GT Embryos. Pfeilköpfe markieren die LacZ-Expression.

Trotz des Links-Rechts-Defektes zeigen *Pitx2*^{-/-}-Embryonen eine korrekte rechtsseitige Herzdrehung, was auch in den *mDia3*-GT Embryonen der Fall ist. Eine Ausnahme bildet ein einzelner *mDia3*-GT Embryo, der eine komplette Inversion der Herzdrehung aufweist (Abbildung 30B) und somit einen Hinweis auf einen Links-Rechts-Defekt gibt. Um dies noch weiter zu verdeutlichen, wurden verschiedene Markeranalysen mittels *in situ*-Hybridisierung

durchgeführt. An E9.5 zeigen die bereits morphologisch nicht korrekt gedrehten *mDia3*-GT Herzen eine deutliche Runterregulierung von *Pitx2* im Vergleich zu den Wildtyp-Herzen (Abbildung 30A, unten). Dies könnte erklären, warum es in den *mDia3*-GT Embryonen zu einem ähnlichen Herzphänotypen kommt wie in *Pitx2*^{-/-}-Embryonen. Das invertierte *mDia3*-GT Herz wurde mit Hilfe des Ausflußtraktmarkers *Bmp4* untersucht (Abbildung 30B). Auch hier zeigt sich, dass der Ausflußtrakt deutlich verkürzt ist.

Zwar zeigen *mDia3*-GT Embryonen an E8.0 keinen morphologisch sichtbaren Phänotyp, die Expression des LacZ-Reporters in bestimmten Zellen des Primitivknotens deutet jedoch auf eine spezifische Funktion von *mDia3* in der Ausbildung der Links-Rechts-Achse hin (Abbildung 30C, Ausschnitt). Um dies zu untersuchen wurde die Expression des Links-Rechts-Markers *Cerberus-like 2* (*Cerl2*) untersucht. *Cerl2* wird auf beiden Seiten des Primitivknotens exprimiert, da es jedoch als *Nodal*-Antagonist wirkt und dessen Expression auf die linke Seite beschränkt, wird es rechts stärker exprimiert (Marques et al., 2004). Dieses Ungleichgewicht ist zwar in *mDia3*-GT Embryonen sichtbar, jedoch zeigt sich nicht die glatte sichelförmige Struktur wie in den Wildtyp-Embryonen (Abbildung 30C). Vielmehr kommt es zur Ausbildung einer ungleichmäßigen Struktur, die auf Defekte in der Musterbildung hindeutet.

Diese Ergebnisse sind erste Hinweise dafür, dass die *mDia3*-GT Embryonen unter einem Links-Rechts-Defekt leiden. Dieser nimmt seinen Ursprung bereits während der Gastrulation und führt in den meisten Fällen zur Ausbildung eines PTAs und verursacht in einzelnen Fällen sogar eine Herzinversion.

3.2.9 *mDia3*-GT ist spezifisch in kardialen Neuralleistenzellen exprimiert

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Links-Rechts-Defekte gehören im Menschen zu den kongenitalen Herzdefekten, die nach der Geburt operabel behoben werden können und somit nicht zwingendermaßen zur embryonalen Letalität führen. Da jedoch bis auf wenige Ausnahmen alle *mDia3*-GT Embryonen spätestens am Tag E14.5 versterben, muss es noch einen anderen Grund für die embryonale Letalität geben. Häufig wurde das Fehlen der kardialen Neuralleistenzellen (NC-Zellen) mit den bereits beschriebenen Herzdefekten assoziiert (Überblick in Hutson und Kirby, 2007). Beispielsweise führt die Deletion des Bmp-Rezeptors *Alk2* in NC-Zellen zu Defekten in den Branchialbogenarterien und PTA (Kaartinen et al., 2004). Die kardialen NC-Zellen entstehen im Neuralrohr auf Höhe der otischen Plakode bis zum 3. Somitenpaar (Abbildung 33, Höhe BA2-4; Kirby et al., 1985). Sie wandern zunächst in die Branchialbögen, wo sie bei der Remodellierung der Branchialbogenarterien III, IV und VI beteiligt sind (Kuratani und Kirby, 1991). Dazu umschließen sie die bereits aus endothelialen Zellen bestehenden Arterien und bilden die glatte Muskelzellschicht (Kuratani und Kirby, 1992). Ein Teil der NC-Zellen wandert weiter in den Ausflußtrakt und bildet dort das Septum, das den Ausflußtrakt in Aorta und Pulmonalarterie teilt (Phillips et al., 1987). Da die

Expression des LacZ-Reporters in *mDia3*-GT Embryonen nur für ein kurzes Zeitfenster spezifisch in den Branchialbögen detektiert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die *mDia3*-GT Embryonen neben dem Links-Rechts-Defekt noch an einem NC-Defekt leiden.

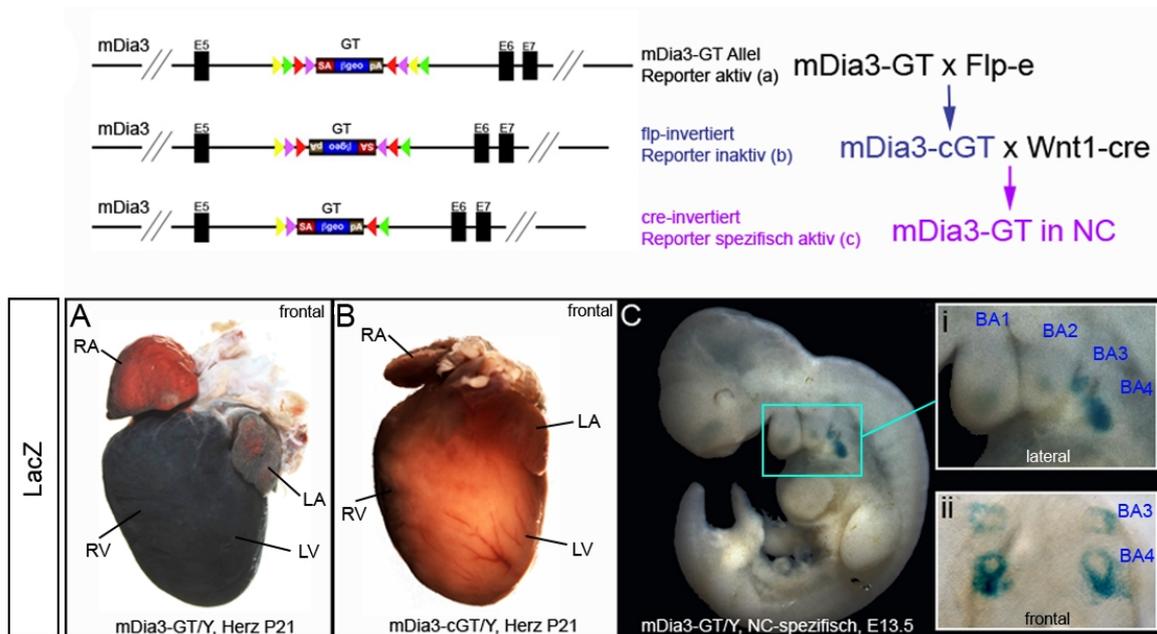


Abbildung 31: Analyse des NC-spezifischen *mDia3*-GT Expressionsmusters. Schema zur Herstellung des NC-spezifischen *mDia3*-GT Mausmodells. A) LacZ-gefärbtes, adultes Herz eines *mDia3*-GT Männchens. B) LacZ-gefärbtes, adultes Herz eines konditionellen *mDia3*-cGT Männchens. C) NC-spezifische LacZ-Färbung in *mDia3*-GT Embryo. Ausschnitt i: Vergrößerung der Expression in den Branchialbögen. Ausschnitt ii: mit BABB behandelter Embryo. Ansicht der LacZ-Expression von frontal. NC – Neuralleiste, RA – rechtes Atrium, LA – linkes Atrium, RV - rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, BA – Branchialbogen.

Um dies zu untersuchen, wurde eine NC-spezifisches *mDia3*-GT Mausmodell hergestellt (Abbildung 31, Schema). Dazu wurde eine *mDia3*-GT Maus mit einer Flp-e Maus verpaart. Diese exprimiert ubiquitär die Flp-Rekombinase, die die Inversion der GT-Kassette und somit die Stilllegung der *mDia3*-GT Mutation verursacht. Die resultierende Mauslinie wurde *mDia3*-cGT (conditional Gene Trap) genannt. Während die Expression des LacZ-Reporters im adulten Herzen der ursprünglichen *mDia3*-GT Mäuse sehr stark ist (Abbildung 31A), kann in den konditionellen *mDia3*-cGT Mäusen keine LacZ-Expression mehr detektiert werden (Abbildung 31B). Die GT-Mutation ist in diesen Mäusen also tatsächlich stillgelegt. Im nächsten Schritt wurden die *mDia3*-cGT Mäuse mit *Wnt1*-cre-Mäusen verpaart. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Wnt1*-Promotors in frühen migrierenden NC-Zellen (Brault et al., 2001). Diese Verkreuzung führt dazu, dass die *mDia3*-GT Mutation durch erneute Inversion der GT-Kassette in den frühen NC-Zellen der *mDia3*-cGT Mäuse reaktiviert wird. Da dieser Vorgang irreversibel ist, besitzen auch alle Tochterzellen der NC-Zellen das mutante *mDia3*-GT Allel. Die Analyse eines NC-spezifischen *mDia3*-GT Embryos zeigte, dass der LacZ-Reporter tatsächlich in NC-Zellen aktiv ist und es somit die NC-Zellen

sind, die *mDia3* exprimieren (Abbildung 31Ci). Vor allem in den Branchialbögen III und IV ist deutlich zu sehen, wie die LacZ-exprimierenden NC-Zellen die Branchialbogenarterien umhüllen (Abbildung 31Cii). Der NC-spezifische *mDia3*-GT Embryo war zum Zeitpunkt der Isolation bereits tot und zeigte die üblichen Zeichen des *mDia3*-GT Phänotyps. Dies deutet darauf hin, dass die embryonale Letalität der *mDia3*-GT Embryonen durch Defekte in NC-Zellen verursacht wird.

3.2.10 Die Mutation von *mDia3* führt zur abnormen Remodellierung der Branchialbogenarterien

Das System aus Branchialbogenarterien ist zunächst ein symmetrisches System aus jeweils sechs Branchialbogenarterien auf der rechten und linken Körperseite, die jeweils mit der rechten bzw. linken Aorta dorsalis verbunden sind (Abbildung 32). Im Laufe der Embryonalentwicklung kommt es unter dem Einfluß der NC-Zellen zur Remodellierung dieser Arterien. Aus den Branchialbogenarterien III bilden sich beidseitig die Arteriae carotis internae, aus den Branchialbogenarterien IV bilden sich links die Aorta und rechts der Truncus brachiocephalicus, während sich aus den Branchialbogenarterien VI links der Truncus pulmonalis und der Ductus arteriosus sowie rechts die Arteria pulmonalis bilden. Die restlichen Branchialbogenarterien werden zurückgebildet.

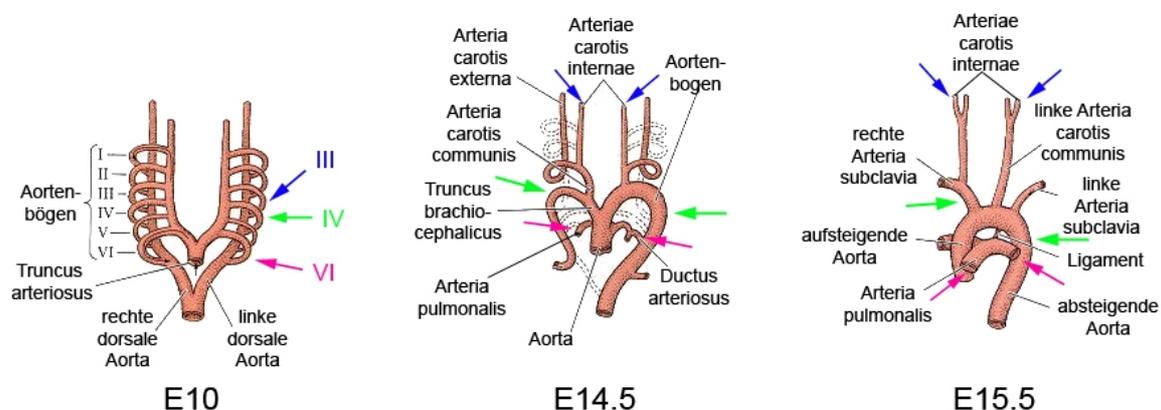


Abbildung 32: Remodellierung der Branchialbogenarterien. Die Branchialbogenarterien III (blau), IV (grün) und VI (rot) werden remodelliert, während die restlichen Branchialbogenarterien zurückgebildet werden. Modifiziert nach Langman, J. „Medical Embryology“, 1981.

Um zu untersuchen, ob die Mutation von *mDia3* in den NC-Zellen der Branchialbogenarterien einen Effekt auf deren Remodellierung hat, wurden an E10.5 die Blutgefäße von *mDia3*-GT und WT-Embryonen sichtbar gemacht. Dazu wurde zunächst in das schlagende Herz Tinte injiziert und anschließend eine LacZ-Färbung durchgeführt (Abbildung 33). Während im Wildtyp-Embryo eine klare Verbindung zwischen der dorsalen Aorta und den Branchialbogenarterien III, IV und VI besteht, ist bei den *mDia3*-GT Embryos die Verbindung

der Branchialbogenarterie VI und teilweise auch der Branchialbogenarterie IV zur dorsalen Aorta gestört.

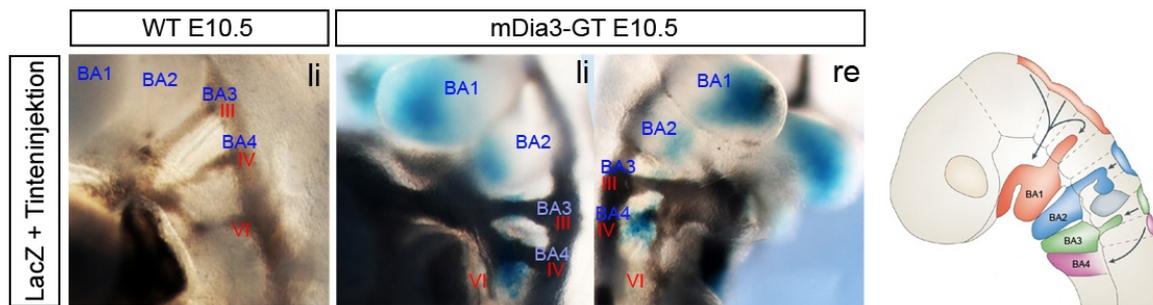


Abbildung 33: Die Remodelierung der Branchialbogenarterien in *mDia3-GT* Embryonen. Die Blutgefäße sind mit schwarzer Tinte angefärbt. Die Branchialbögen sind blau gekennzeichnet, die zugehörigen Arterien sind rot beschriftet. li – Blick auf linke Seite, re – Blick auf rechte Seite. Zeichnung modifiziert nach Guthrie, 2007.

Vor allem auf der linken Seite des *mDia3-GT* Embryos ist gut sichtbar, dass die Branchialbogenarterie IV in der *mDia3-GT* Expressionsdomäne versiegt. Obwohl sich aus dieser Arterie eigentlich der Truncus brachiocephalicus bilden sollte, wird sie zurückgebildet. Daraus folgt, dass die Expression von *mDia3* in NC-Zellen wichtig für die Remodellierung von Branchialbogenarterien ist und dass NC-Zellen mit der *mDia3-GT* Mutation ihre Funktion in der Remodellierung nicht mehr korrekt ausführen können.

3.2.11 *mDia3-GT* Neuralleistenzellen migrieren nicht in den Ausflußtrakt

Wie bereits beschrieben, wandern die kardialen NC-Zellen zunächst in die Branchialbögen, um bei der Remodellierung der dortigen Arterien mitzuwirken. Ein Teil dieser NC-Zellen wandert jedoch nach einer kurzen Pause weiter in den Ausflußtrakt, um diesen zu septieren. Um zu überprüfen, ob diese Funktion der NC-Zellen in *mDia3-GT* Embryonen normal ausgeführt wird, wurde die Migration der NC-Zellen mittels *in situ*-Hybridisierung betrachtet. Als Marker dafür eignet sich der Transkriptionsfaktor *Sox10*, da er in allen migrierenden NC-Zellen exprimiert ist (Bondurand et al., 1998; Herbarth et al., 1998). Während sowohl die NC-Zellen der WT- als auch der *mDia3-GT* Embryonen in die Branchialbögen einwandern (Abbildung 34), scheint die Migration der NC-Zellen von den Branchialbögen in den Ausflußtrakt gestört zu sein. Im Wildtyp ist deutlich eine Population zu erkennen, die in den Ausflußtrakt wandert (Abbildung 34, rote Pfeile). Diese Population ist in den *mDia3-GT* Embryonen nicht detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Migration der *mDia3-GT* NC-Zellen in den Ausflußtrakt gestört ist und dieser Defekt vermutlich zur Ausbildung des PTA führt.

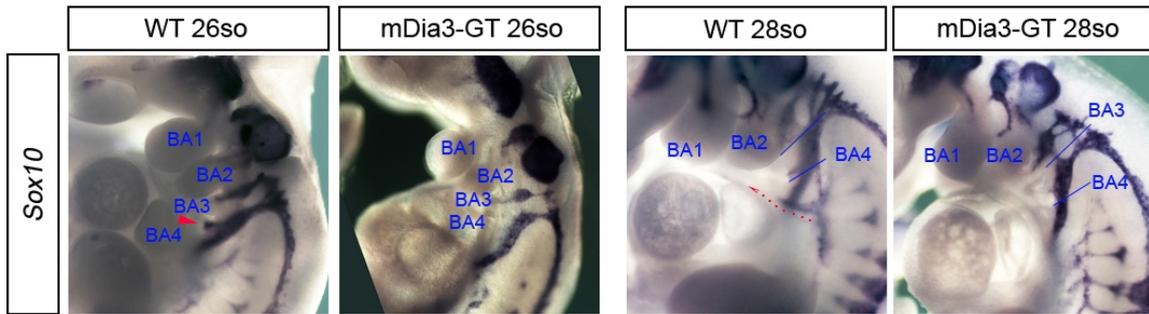


Abbildung 34: Migration von Neuralleistenzellen. In situ-Hybridisierung auf den NC-Marker Sox10. Die roten Pfeile markieren die NC-Population, die in den Ausflußtrakt auswandert.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse, dass *mDia3* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems spielt und vor allem großen Einfluß auf die Funktion und Migration der kardialen NC-Zellen hat.

4 Diskussion

4.1 Der Phänotypen-basierte Screen bietet auf schnellem Weg eine verlässliche Basis für weitere Analysen

Die Nutzung von Genfallen (GT)-ES-Klonen in Kombination mit der ES-Zell-Embryonen-Aggregation ermöglicht die phänotypische Analyse von Mäuseembryonen ohne ein Mausmodell mit Keimbahntransmission herstellen zu müssen. Auf diese schnelle und kostengünstige Weise wurden phänotypische Analysen für 17 X-chromosomale Gene durchgeführt. Insgesamt liefern die Screendaten aus München und Toronto Informationen für 10% der syntenischen Gene des XC.

Die Daten des Phänotypen-basierten Screens zeigen eine hohe Verlässlichkeit, da für mehrere Gene gezeigt wurde, dass unterschiedliche GT-ES-Klone mit Insertion im gleichen Gen in den Aggregationsexperimenten zu denselben Phänotypen führen. Zudem erbringt die Rettung des *Nono*-GT Phänotyps durch Inversion der GT-Kassette den Beweis, dass die Ausbildung des mutanten Phänotyps tatsächlich durch die GT-Insertion und nicht durch Probleme der Aggregationstechnik oder zusätzliche Mutationen im ES-Zell-Genom verursacht wird.

Bisher wurden unter den nach Mendel vererbten Erkrankungen häufiger Assoziationen zu dem XC als zu Autosomen detektiert. Aufgrund der Hemizygotie X-chromosomaler Gene von Männern und der damit verbundenen einfachen Detektion damit assoziierter Krankheiten wurde jedoch angenommen, dass es sich dabei um eine Verzerrung der Statistik handelt. Im Phänotypen-basierten Screen in München und Toronto wurden insgesamt 58 Gene untersucht. Davon zeigten 32% (19/58) einen Phänotyp während der frühen Embryonalentwicklung, was in etwa dem Prozentsatz früherer GT-basierter Phänotypenanalysen von Autosomen entspricht (Friedrich et al., 1991; Mitchell et al., 2001). Daraus kann man schließen, dass autosomale und X-chromosomale letale Phänotypen in gleichen Anteilen vorkommen. Folglich trägt der Phänotypen-basierte Screen neben der Analyse X-chromosomaler Phänotypen auch zur Aufklärung statistischer bzw. prinzipieller genetischer Fragestellungen bei und hilft somit, die Erkenntnisse über das XC im Allgemeinen zu erweitern.

4.1.1 GT-Klone können als Mausmodell für X-chromosomale Krankheiten dienen

Die Auswahl einiger Gene, die bereits mit einem humanen Krankheitsbild assoziiert sind, und deren Mutation im Phänotypen-basierten Screen zur Ausbildung eines Phänotyps führt sollte

zeigen, dass das Prinzip des Phänotypen-basierten Screens funktioniert.

Ein Beispiel ist das Gen *BcoR*. Mutationen von *BcoR* sind mit dem Okulofaziocardiodentalem Syndrom assoziiert (Ng et al., 2004). Bei männlichen Betroffenen konnte eine hypomorphe Mutation von *BcoR* festgestellt werden, bei der noch ein funktioneller Teil des Proteins hergestellt wird. Wamstad et al. stellten eine Mausmutante mit *BcoR*-Funktionsverlust her und konnten postnatal keine lebenden Männchen erhalten. Auch im Phänotypen-basierten Screen führt die Mutation von *BcoR* zur embryonalen Letalität. Dabei wurden insgesamt drei Klone mit zwei unterschiedlichen Insertionsstellen untersucht. Zwei GT-Klone mit Insertionen in Intron 5 zeigen einen frühen Phänotyp während der Gastrulationsstadien. Bei diesen Klonen handelt es sich vermutlich um Klone mit vollem *BcoR*-Funktionsverlust, da durch die Insertion der GT-Kassette alle Isoformen betroffen sind und somit kein wildtypisches *BcoR*-Transkript mehr hergestellt werden kann. Der andere GT-Klone zeigt einen späteren Phänotyp während der Neurulation und hat die GT-Insertion in Intron 1. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein hypomorphes *BcoR*-Allel. Wamstad et al. beschreiben drei unterschiedliche Promotoren im Bereich von Exon 1 sowie alternative Spleißmöglichkeiten für *BcoR* (Wamstad et al., 2007). Vermutlich liegt die GT-Insertion in Intron 1 zwischen den Promotoren, so dass die Promotoren, die stromabwärts der Insertion liegen noch funktionieren und die Transkription von wildtypischem *BcoR* initiieren können. Es ist wahrscheinlich, dass durch die unterschiedlichen Insertionsstellen verschiedene Isoformen betroffen sind und sich deshalb die Phänotypen der Klone derart stark unterscheiden. Dies zeigt, dass durch die gezielte Vorauswahl von GT-Klonen mit bereits vorher bekannter Insertionsstelle der GT-Kassette nicht nur eine Gen-spezifische Mutationsanalyse ermöglicht wird, sondern auch die Analyse verschiedener Isoformen. Dafür bildet die Analyse von Uez et al. in der drei verschiedene *Sall4*-GT Klone mit unterschiedlichen Insertionsstellen untersucht wurden ein gutes Beispiel. Einer der drei *Sall4*-GT Klone besitzt durch die Integration der GT-Kassette ein hypomorphes *Sall4*-Allel mit Funktionsverlust im extraembryonalen Gewebe. Bei den anderen beiden *Sall4*-GT Klonen handelt es sich um Klone mit vollem Funktionsverlust. Die Analyse der drei *Sall4*-GT Klone ergab neue Einblicke in die Regulierung der Körperachsenbildung. Dabei konnte anhand des hypomorphen *Sall4*-GT Klons speziell die Funktion von *Sall4* im extraembryonalen Gewebe während der Ausbildung der proximodistalen Körperachse untersucht werden (Uez et al., 2008). Dies zeigt, dass die gezielte Selektion verschiedener Klone eines Gens sogar dazu beitragen kann, die bestimmten Funktionen einzelner Isoformen *in vivo* zu entschlüsseln, was eine sehr detaillierte Genanalyse ermöglicht.

Ein weiteres Beispiel für die Vorauswahl eines Gens mit bekannter Assoziation ist *Atrx*. Die Mutation von humanem *ATR*X führt zur Ausbildung des schwerwiegenden ATRX-Syndroms, welches sich vor allem durch psychomotorische und mentale Retardierung bemerkbar macht (Gibbons et al., 1995). In weiblichen, nicht erkrankten Trägern der *ATR*X-Mutation ist das betroffene XC zu einem abnorm hohen Anteil inaktiviert (Plenge et al., 2002). Um die Funktion

von *Atrx in vivo* zu untersuchen wurden verschiedene Mausmodelle hergestellt. Die Überexpression von *Atrx* verursacht Wachstumsretardierung, Neuralrohrdefekten und embryonale Letalität, während die konditionelle Inaktivierung aller *Atrx*-Isoformen im Vorderhirn zu dessen Reduktion führt (Berube et al., 2002). Berube et al. vermuten, dass *Atrx* für das Überleben der Neurone erforderlich ist (Berube et al., 2005). Ähnliches beschreiben auch Medina et al., die die Funktion von *Atrx* in der Retina untersuchten und zu dem Schluß kamen, dass *Atrx* für das Überleben und die Differenzierung von Interneuronen essentiell ist (Medina et al., 2009). Die GT-Insertion des in diesem Screen untersuchten *Atrx*-GT Klons betrifft alle *Atrx*-Isoformen, es handelt sich bei diesem Klon also sehr wahrscheinlich um einen Klon mit vollem Funktionsverlust. Die spezifische LacZ-Expressionsdomäne in den Mittelhirnen der *Atrx*-GT Embryonen sowie die unvollständige Schließung deren Neuralrohre zeigt, dass das Fehlen von *Atrx* in den GT-Embryonen ähnlich fatale Folgen wie dessen Überexpression hat. Folglich scheint bei der Ausbildung eines *Atrx*-abhängigen Phänotyps die Dosierung eine wichtige Rolle zu spielen, was jedoch in weiteren Analysen bestätigt werden müsste. Insgesamt könnten die *Atrx*-GT ES-Zellen zur Herstellung eines weiteren *Atrx*-Mausmodells dienen, anhand dessen die Funktion von *Atrx* erforscht werden kann. Vor allem bei solchen komplexen neuronalen Phänotypen eignet sich die Insertion des LacZ-Reporters sehr gut, um den betroffenen Zelltyp zu identifizieren.

Bei den Analysen von *Atrx* und *BcoR* mittels der Genfalle handelt es sich um zwei Gene, bei denen eine Assoziation zu humanen Krankheiten bekannt ist. Diese beiden Beispiele zeigen, dass sich mittels der Genfalle mutierte ES-Klone zur Generierung von Modellsystemen für humane Krankheiten eignen und somit eine detaillierte Analyse des Krankheitsbildes und seiner Entstehung ermöglichen.

4.1.2 Die Identifizierung neuer X-chromosomaler Krankheitsgene

Der Phänotypen-basierte Screen wurde nicht nur entworfen, um Modellsysteme für bekannte humane Krankheiten zu generieren, sondern vor allem um neue für die Embryonalentwicklung wichtige Gene bzw. potentielle Krankheitsgene auf dem XC zu identifizieren.

So zeigte sich z.B. dass die bisher noch relativ unbekannt Glykosyltransferase *Alg13* eine scheinbar essentielle Rolle während der Fusion des primitiven Herzrohres spielt. Die Folge der Mutation von *Alg13* durch die GT-Insertion ist die Ausbildung einer Herzduplikation, der sogenannten Cardia Bifida. Dieser Phänotyp ist extrem selten und konnte bisher nur im *HIF1 α* ^{-/-} Mausmodell beobachtet werden (Compernelle et al., 2003). Auch die Expression des LacZ-Reporters in *Alg13*-GT Embryonen zeigt ein sehr spezifisches Muster. Die Daten des Phänotypen-basierten Screens liefern erste Hinweise auf die Funktion von *Alg13 in vivo*, so dass eine detailliertere Analyse der Funktion von *Alg13* sicherlich interessante Ergebnisse liefern würde.

Ebenfalls interessante Neuigkeiten ergaben die Aggregationen der *mDia3*-GT ES-Klone. Ausschlaggebend für eine intensive Analyse war hier gar nicht unbedingt der Phänotyp, der erst an E10.5 deutlich zu erkennen ist. Vielmehr zeigte die Expression des LacZ-Reporters ab E10.0 ein sehr spezifisches Muster in den Branchialbögen und im Herzen, das auf eine interessante Funktion der bisher relativ unbekanntenen mDia-Isoform *mDia3* hindeutete. Bisher wurden in der Literatur hauptsächlich *mDia1* und *mDia2* behandelt. Diese beeinflussen durch ihre Funktion als Aktin-Nukleatoren die Remodellierung des Zytoskeletts und regulieren vor allem die Expression von glatten Muskelzellmarkern über den MRTF-SRF-Signalweg. Im Menschen wurden Mutationen in *mDia1* mit Taubheit in Verbindung gebracht, Mutationen in *mDia2* wurden bisher nicht mit humanen Krankheiten assoziiert. Die Untersuchungen im Phänotypen-basierte Screen ergaben, dass sich *mDia3* in der frühen Embryonalentwicklung funktionell deutlich von den beiden anderen eher als funktionell redundant beschriebenen mDia-Isoformen abhebt. Die spezifische Expression des LacZ-Reporters in den Branchialbögen und dem Herzen sowie der letale Phänotyp der *mDia3*-GT Embryonen zeigt dies ganz deutlich. Erst ab der späten Embryonalentwicklung sowie in den adulten Tieren konnte eine spezifische LacZ-Reporterexpression in der glatten Muskulatur detektiert werden, die darauf hindeutet, dass zwischen *mDia3* ab diesem Zeitpunkt eine funktionelle Redundanz mit *mDia1* und *mDia2* besteht. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die Genfalle nicht nur durch ihre Mutagenität, sondern auch durch ihre Reporteraktivität wichtige Informationen über das betroffene Gen liefert.

Insgesamt hat sich bestätigt, dass der Phänotypen-basierte Screen ein guter experimenteller Ansatz ist, um bisher unbekannte X-chromosomale Krankheitsgene zu identifizieren. Im Vergleich zu anderen Phänotypen-basierten Screening-Methoden, wie z.B. dem ENU-Screen (N-ethyl-N-nitrosourea; Überblick in Kile und Hilton, 2005), bei dem eine chemisch bedingte, randomisierte Mutation des Genoms erfolgt, die zunächst identifiziert werden muss, erlaubt der Phänotypen-basierte Screen mit Hilfe der Genfalle die Präselektion der mutierten Gene. Dadurch können gezielt interessant erscheinende Gene gewählt werden, zudem ergibt sich eine große Zeit- und Kostenersparnis. Die im Screen erhaltene Daten geben interessante Anhaltspunkte über die untersuchten Gene. Diese dienen als Basis für weitere, detaillierte Analysen, die letztendlich die Rolle von X-chromosomalen Genen während der Embryonalentwicklung und bei der Entstehung von Krankheiten aufklären sollen.

4.2 Der kardiovaskuläre *mDia3*-GT Phänotyp wird durch die Interaktion verschiedener Entwicklungsprozesse verursacht

Die Analyse des *mDia3*-GT Klons E093H03 im Rahmen des Phänotypen-basierte Screens ergab, dass die nach den Aggregationsexperimenten resultierenden Embryonen aufgrund eines Herzdefektes versterben. Zudem zeigte sich ab E9.5 eine sehr spezifische LacZ-

Reporteraktivität in den Branchialbögen sowie dem Herzen. Um die Rolle von *mDia3* während der Herzentwicklung zu entschlüsseln wurde der kardiovaskuläre Phänotyp in weiteren Experimenten detailliert analysiert.

Die Entwicklung des Herzens ist ein komplexer Vorgang an dem verschiedene Prozesse beteiligt sind. Beispielsweise bildet sich bereits kurz nach der Gastrulation die für die Herzdrehung wichtige Links-Rechts-Achse aus. Später kommt es zur Formierung, Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen sowie deren Interaktion mit Zellen des zweiten Herzfeldes. Kommt es zur Mißbildung des Herzens ist die Klärung der Ursache oft sehr schwierig, da meistens nicht nur ein Entwicklungsprozess gestört ist, sondern auch die Interaktionen verschiedener Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beeinträchtigt sind und diese Abnormalitäten in ihrer Gesamtheit zur Ausbildung eines Phänotyps führen.

Auch die Aufklärung des kardiovaskulären *mDia3*-GT Phänotyps kann nicht anhand einer mechanistischen Störung erklärt werden. Die Ausbildung des in den *mDia3*-GT Embryonen beobachteten persistierenden Truncus Arteriosus (PTA), bei dem anstatt der Pulmonalarterie und der Aorta nur ein Ausflußtrakt bestehen bleibt, und den Defekten in der Remodellierung der Branchialbogenarterien wurde schon mehrfach in Mausmodellen beobachtet und hat seinen Ursprung in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen (Überblick in Hutson und Kirby, 2007).

4.2.1 Die Entstehung kardiovaskulärer Phänotypen aufgrund von NC-Defekten

Die Funktion kardialer NC-Zellen wurde intensiv im Hühnerembryo untersucht (Hutson und Kirby, 2003). Dazu wurden die prä migratorischen Neuralleistenzellen entfernt und die kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Phänotypen untersucht (Nishibatake et al, 1987). Bei den kardiovaskulären Phänotypen können drei Komponenten beobachtet werden, zu denen Remodellierungsdefekte der Branchialbogenarterien, Ausflußtraktdefekte und die abnormale Myokardfunktion gehören (Überblick in Hutson und Kirby, 2007). Die ersten beiden Komponenten können auch in *mDia3*-GT Embryonen festgestellt werden.

4.2.1.1 Die abnorme Remodellierung der Branchialbogenarterien

Die am häufigsten beobachteten Abnormalitäten bei der Remodellierung der Branchialbogenarterien sind die Verengung bzw. die Zurückbildung der Arterien, die in den Branchialbögen III, IV und VI entstehen (Bockman et al, 1985; Bockman et al., 1987). Während die NC-Zellen bei der initialen Formation der endothelialen Kanäle nicht beteiligt sind, spielen sie bei der Ausbildung der finalen Gefäße eine wichtige Rolle. Von der Neuralleiste wandern sie ab E9.0 in die Pharynxregion ein und pausieren kurz. Anschließend migrieren sie in die Branchialbögen weiter, umgeben dort die endothelialen Vorläufer und

differenzieren in glatte Muskulatur (Kuratani und Kirby, 1992). Ihre Abwesenheit führt zum unvorhersehbaren Fortbestehen oder zur Regression der Gefäße (Waldo et al., 1996).

Dies ist auch in den *mDia3*-GT Mäusen zu beobachten. Zum einen zeigen die NC-spezifischen *mDia3*-GT Embryonen eindeutig die Expression des LacZ-Reporters in den Neuralleistenzellen. Zum anderen verdeutlicht die Tinteninjektion in Kombination mit der LacZ-Färbung, dass *mDia3*-positive Zellen die Blutgefäße umgeben und zu deren Remodellierung beitragen. Wichtige Gefäße, die eigentlich fortbestehen sollten, verenden in Regionen mit hoher LacZ-Expression. Da die Expression des LacZ-Reporters nicht in der Neuralleiste selbst, sondern erst in den Branchialbögen hochreguliert wird, kann man davon ausgehen, dass *mDia3* keine Funktion in den frühen migratorischen NC-Zellen besitzt. Vielmehr scheint es sich hier um eine sehr spezifische Funktion bei der Remodellierung und der Bildung von glatter Muskulatur zu handeln.

4.2.1.2 Defekte in der Entwicklung des Ausflußtraktes

Von den NC-Zellen, die in die Branchialbögen eingewandert sind, wandert eine Subpopulation weiter in den Ausflußtrakt und zwar speziell in mesenchymale Bereiche, die die Grundlage der späteren Septen bilden (Phillips et al., 1987; Miyagawa-Tomita et al., 1991). Unter Einfluß der NC-Zellen wachsen diese Vorläufer spiralförmig zusammen und trennen derart den Ausflußtrakt in Pulmonalarterie und Aorta (Waldo et al., 1998). Wandern keine NC-Zellen in den Ausflußtrakt kommt es zur Ausbildung verschiedener Defekte. Dazu zählen entweder die fehlende Septierung, auch PTA genannt, oder die Bildung einer reitenden Aorta, bei der der Ursprung der Aorta anstatt vom linken Ventrikel mittig verschoben ist, so dass sie Blut aus beiden Ventrikeln erhält (Nishibatake et al, 1987).

Die Analyse der *mDia3*-GT Embryonen mit dem NC-Marker *Sox10* zeigt, dass die NC-Zellen zwar in die Branchialbögen einwandern, jedoch die Subpopulation der NC-Zellen, die in den Ausflußtrakt wandern, fehlt. Dies führt zur Bildung eines Ausflußtraktdefekts, der morphologisch einem PTA gleicht. Während also die Mutation von *mDia3* keinen Einfluß auf die initiale NC-Migration in die Branchialbögen nimmt, hat sie Einfluß auf die Migration der NC-Subpopulation von den Branchialbögen in den Ausflußtrakt.

Zwar sind NC-Zellen dazu bestimmt sich in Zelltypen unterschiedlichster Art zu differenzieren, dennoch gibt es auch unter ihnen verschiedene Stammzellpopulationen, die teilweise noch im adulten Organismus nachweisbar sind (Wong et al., 2006). Eine Stammzellpopulation bilden die frühen, migrierenden NC-Zellen (eNCSC, early neural crest stem cell). Ein Teil dieser Stammzellen bleibt erhalten und bildet die späteren NC-Stammzellen (NCSC), die im Gegensatz zu den frühen eNCSCs auf den mitogenen Faktor EGF reagieren. Fuchs et al. analysierten die Rolle des Rho-GTPase/EGF Signalwegs in NC-Zellen durch das konditionelle Ausschalten der kleinen Rho-GTPasen Rac1 bzw. Cdc42 mit Hilfe der NC-spezifischen Wnt1-

cre Mauslinie (Fuchs et al., 2009). In den frühen eNCSCs konnten keinerlei Defekte festgestellt werden, diese Zellen können normal migrieren, proliferieren und differenzieren. Erst nachdem die eNCSCs ihr initiales Ziel erreicht haben bilden sie die späten NCSCs und entwickeln eine Abhängigkeit vom Rho-GTPase/EGF Signalweg. Das Fehlen von Rac1 bzw. Cdc42 führt dazu, dass die NCSCs eine reduzierte mitotische Aktivität aufweisen und vermehrt aus dem Zellzyklus austreten. Für das Mausmodell bedeutet dies, dass die Embryonen erst nach E10.5 einen mutanten Phänotyp entwickeln, der mit einem PTA und einer Kiefer-Gaumen-Spalte einhergeht (Fuchs et al., 2009).

Dies erinnert stark an den *mDia3*-GT Phänotyp. Die initiale Migration der NC-Zellen in den Pharynx und die Branchialbögen ist nicht gestört. Dort beginnt die Expression des LacZ-Reporters und die *mDia3*-GT-Mutation kommt zum tragen. Dies zeigt sich durch die Ausbildung von Defekten in der Remodellierung der Branchialbögen, der Septierung des Ausflußtraktes und teilweise auch in der Ausbildung einer Gaumen-Kiefer-Spalte. Ob diese Probleme ebenfalls durch das Herabsetzen der Proliferationsfähigkeit der NCSCs verursacht werden, lässt sich anhand der Versuchsergebnisse nicht beurteilen. Ebenfalls unklar ist, ob die NC-Zellen in den Branchialbögen die uneingeschränkte Fähigkeit besitzen in SM-Zellen zu differenzieren.

Es ist bekannt, dass *mDia3* als Effektor kleiner Rho-GTPase wirkt. Besonders die Interaktion mit Cdc42 wurde bereits gezeigt (Watanabe et al., 1997; Yasuda et al., 2004). Deshalb lassen die hier gezeigten Ergebnisse die Vermutung zu, dass es sich bei dem beobachteten *mDia3*-GT Phänotyp um die Folge eines gestörten Rho-GTPase/EGF-Signalweges handelt. Dies müsste jedoch in weiteren Versuchen detailliert untersucht werden.

4.2.2 Die Rolle des sekundären Herzfeldes bei der Entstehung von kardiovaskulären Phänotypen

Bei dem sekundären Herzfeld handelt es sich um eine Zellpopulation, die an der Bildung des Ausflußtrakts mit anschließenden Branchialbogenarterien beteiligt ist und ebenfalls zum rechten Ventrikel sowie den Vorhöfen beiträgt (Kelly et al., 2001; Zaffran et al., 2004). Während der Herzentwicklung erfolgt eine Verlängerung des zukünftigen Ausflußtrakts durch die Einwanderung von Zellen des sekundären Herzfeldes aus dem Pharynx. Diese bilden dort zunächst Myokardzellen und später glatte Muskulatur (Waldo et al., 2005a). Fehlen die kardialen NC-Zellen, kommt es nicht zur Einwanderung von Myokardzellen, die glatte Muskulatur wird jedoch normal gebildet. Insgesamt kommt es zur Bildung eines verkürzten und deformierten Ausflußtrakts. Anstatt in den Ausflußtrakt zu wandern und dort in Myokardzellen zu differenzieren, proliferieren die Zellen des zweiten Herzfeldes übermäßig. Die Folge ist unter anderem ein gehemmter Blutfluß, der zu einem Remodellierungsdefekt in den Branchialbogenarterien beitragen kann, da dieser Prozess auch durch die Hämodynamik

beeinflusst wird. Die Bildung des normalen Ausflußtraktes ist also von einer Interaktion zwischen Zellen des zweiten Herzfeldes im Pharynx und den NC-Zellen abhängig. Die Vermittlung dieser beiden Zelltypen erfolgt unter anderem über den Fgf-Signalweg (Farrel et al., 2001). Deshalb ist auch oftmals bereits vor dem Beginn der NC-Migration in den Ausflußtrakt ein mutanter Phänotyp im Ausflußtrakt sichtbar (Waldo et al., 2005b).

An E9.5 zeigt sich in den *mDia3*-GT Embryonen ein für Defekte im zweiten Herzfeld typischer verkürzter Ausflußtrakt, ohne dass LacZ-Expression im zweiten Herzfeld nachweisbar ist. Dieser Phänotyp entsteht zeitgleich mit dem Beginn der LacZ-Expression in den Branchialbögen und resultiert vermutlich aus einer gestörten Kommunikation zwischen den defekten NC-Zellen und den Zellen des zweiten Herzfeldes im Pharynx. Es handelt sich also wahrscheinlich um einen durch Defekte in NC-Zellen verursachten sekundären Effekt.

4.2.3 Pitx2 als Überträger der Links-Rechts-Achse auf asymmetrische Organe

Der Transkriptionsfaktors *Pitx2* spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Links-Rechts-Phänotypen. Die Festlegung der Links-Rechts-Achse im Primitivknoten führt zur linksseitigen Aktivierung des Tgf β -Mitglieds *Nodal* im lateralen Plattenmesoderm (Collignon et al., 1996). Ein direktes Zielgen von *Nodal* ist wiederum *Pitx2*. Während die Expression von *Nodal* transient ist, wirkt *Pitx2* als molekularer Überträger der Links-Rechts-Asymmetrie während der Morphogenese asymmetrischer Organe, so auch in den Myokardzellen des zweiten Herzfeldes im Ausflußtrakt (Campioni et al., 1999). Bajolle et al. konnten zeigen, dass der Ausflußtrakt nach der Elongation gegen den Uhrzeigersinn rotiert. Ohne *Pitx2* rotiert der Ausflußtrakt unvollständig und es kommt zur Ausbildung eines PTA (Bajolle et al., 2006). Dies zeigt, dass bereits vor Beginn der Herzbildung wichtige Entwicklungsprozesse ablaufen, deren Störung zur Ausbildung eines sehr viel später auftretenden Phänotyps beitragen kann.

Die *mDia3*-GT Embryonen zeigen eine sehr spezifische LacZ-Expression im Primitivknoten. Die Analyse des Links-Rechts-Markers *Cer12* zeigt, dass die Etablierung der Links-Rechts-Achse zwar stattfindet, jedoch Defekte in der Musterbildung beobachtet werden können. An E9.5 zeigt sich ein deutlich verkürzter Ausflußtrakt mit herabgesetzter *Pitx2*-Expression. Infolgedessen kommt es wahrscheinlich auch zu einem Defekt in der Rotation, der zusammen mit den Defekten in den NC-Zellen zur Ausbildung des PTA führt.

4.2.4 Die Interaktion zwischen Links-Rechts-Markern, dem zweiten Herzfeld und NC-Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben wie viele Faktoren bei der Ausbildung des kardiovaskulären Phänotyps, den die *mDia3*-GT Embryonen zeigen, beteiligt sind und wie wichtig das komplexe Zusammenspiel verschiedenster Entwicklungsabläufe für die korrekte Herzbildung ist. Abbildung 35A zeigt noch einmal die Interaktion von NC-Zellen, dem zweiten Herzfeld und Links-Rechts-Markern während der Herzentwicklung.

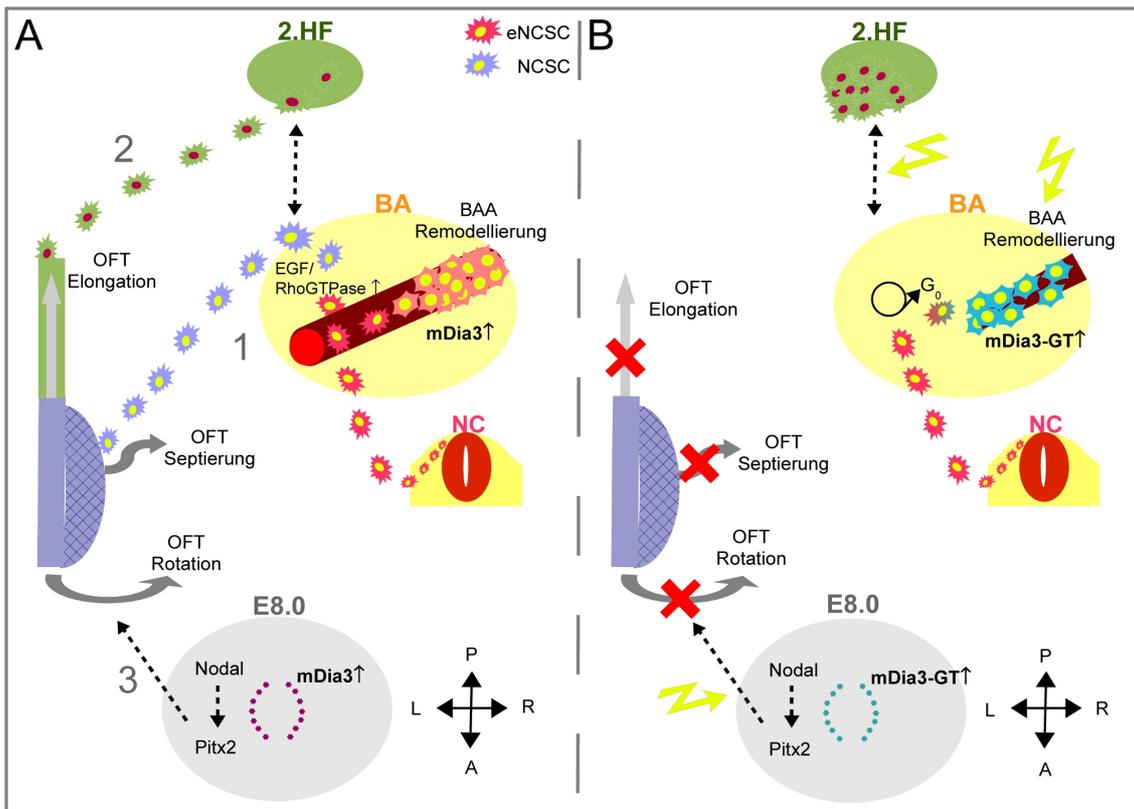


Abbildung 35: Modell zur Entstehung des *mDia3*-GT Phänotyps. A) Die korrekte Bildung des OFT wird durch drei Prozesse bestimmt. 1. Migration der frühen NC-Zellen (eNCSCs) in die BA. *mDia3*-positive Subpopulation der NC-Zellen (NCSCs) wandert abhängig von EGF-RhoGTPase in OFT und führt dort zur Septierung. 2. Kommunikation zwischen Zellen des 2.HF mit NC-Zellen. Unter diesem Einfluß Migration in OFT, dort Elongation des OFT. 3. „Nodal Flow“ im Primitivknoten führt zur Bildung der Links-Rechts-Achse. Spezifische *mDia3*-Expression im Primitivknoten. Spezifische linksseitige Nodal-Expression induziert die Expression von Pitx2. Pitx2 überträgt Links-Rechts-Achse auf asymmetrische Organe und verursacht OFT Rotation. B) Die Mutation von *mDia3*-GT hat keinen Einfluss auf Migration der eNCSCs in die BAs. Dort führt die Expression von *mDia3*-GT zu Remodellierungsdefekten der BAAs, keine Migration der NCSCs in OFT. Wahrscheinlich verlassen die NCSCs Zellzyklus und gehen in die G₀-Phase. Keine OFT Septierung. Keine Migration von 2.HF-Zellen in OFT, Elongation bleibt aus. Niedrige Pitx2-Expression führt zum Ausbleiben der OFT Rotation. Das Zusammenspiel der beschriebenen drei Defekte führt zur Ausbildung des PTA. OFT – Ausflußtrakt, BA – Branchialbogen, BAA – Branchialbogenarterie, 2.HF – 2. Herzfeld, eNCSC – frühe Neuralleistenzellen, NCSC – späte Neuralleistenzellen.

Die korrekte Bildung des Ausflußtraktes wird durch drei Prozesse bestimmt:

1. Ausflußtrakt-Septierung: Zunächst migrieren frühe NC-Zellen (eNCSCs) in die Branchialbögen und bilden dort die glatte Muskulatur der Gefäße und remodellieren diese. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die *mDia3*-Expression in den Branchialbögen. Eine Subpopulation der NC-Zellen (NCSCs) wandert in Abhängigkeit vom EGF-RhoGTPase Signalweg weiter in den Ausflußtrakt und führt dort zu dessen Septierung.

2. Ausflußtrakt-Elongation: Mesodermale Zellen des 2. Herzfeldes kommunizieren mit den NC-Zellen in den Branchialbögen. Die Interaktion wird wahrscheinlich über den Fgf-Signalweg übertragen. Unter diesem Einfluss migrieren Zellen des 2. Herzfeldes in den distalen Teil des Ausflußtraktes und verlängern diesen.

3. Ausflußtrakt-Rotation: Bereits kurz nach der Gastrulation wird durch die Ausbildung des „Nodal Flow“ im Primitivknoten die Links-Rechts-Achse festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt wird *mDia3* spezifisch im Primitivknoten exprimiert. Durch die spezifische Nodal-Expression im linken Seitenplattenmesoderm wird auch die Expression des Transkriptionsfaktors *Pitx2* induziert. Dieser überträgt die Links-Rechts-Achse auf asymmetrische Organe und verursacht die Rotation des Ausflußtraktes gegen den Uhrzeigersinn.

In Abbildung 35B ist hypothetisch dargestellt, wie die *mDia3*-GT Mutation in die verschiedenen Prozesse eingreift und so zur Ausbildung des kardiovaskulären Phänotyps führen könnte:

1. Ausflußtrakt-Septierung: Die *mDia3*-Mutation hat keinen Einfluss auf die Migration der eNCSCs in die Branchialbögen. Dort führt die Expression von *mDia3*-GT zu Remodellierungsdefekten der Arterien und die Migration der NCSCs in den Ausflußtrakt bleibt aus. Ähnlich dem EGF-RhoGTPase-defizienten Phänotyp verlassen die NCSCs wahrscheinlich den Zellzyklus und gehen in die G₀-Phase über. Ohne die NC-Zellen im Ausflußtrakt kommt es nicht zu dessen Septierung. Zudem ist wahrscheinlich die Differenzierung der NCSCs in glatte Muskelzellen gestört, da die LacZ-Reporteraktivität auf eine Rolle von *mDia3* in der glatten Muskulatur hindeutet.

2. Ausflußtrakt-Elongation: Auch die Kommunikation der NC-Zellen mit dem zweiten Herzfeld wird durch die *mDia3*-GT Mutation gestört. Anstatt in den Ausflußtrakt einzuwandern, kommt es zur vermehrten Proliferation der Myokardzellen im Pharynx. Die Folge ist die Bildung eines verkürzten, deformierten Ausflußtrakts.

3. Ausflußtrakt-Rotation: Die Mutation von *mDia3* führt zu Defekten in der Links-Rechts-Achse, die sich unter anderem in einer niedrigen *Pitx2*-Expression widerspiegeln. Dies führt zum

Ausbleiben der Rotation des Ausflußtraktes.

Dieses komplexe Zusammenspiel führt zu den Remodellierungsdefekten in den Branchialbogenarterien und zur Ausbildung des PTA. Insgesamt eignet sich der *mDia3*-GT Klon gut zur Erforschung der Interaktion und Kommunikation verschiedener Zell- und Gewebetypen während der Herzentwicklung. Die *mDia3*-GT Mauslinie mit hoher männlicher Letalität ermöglicht die Untersuchung kongenitaler Herzdefekte, wie man sie auch im Menschen finden kann.

4.3 Die Redundanz zwischen den mDia-Isoformen

Nachdem mDia3 seine spezifische Funktion in der Herzentwicklung ausgeführt hat, ist es hauptsächlich in der glatten Muskulatur exprimiert. Für die anderen mDia-Isoformen (mDia1 und mDia2) wurde mehrfach eine regulatorische Funktion der für glatte Muskelzellen spezifischen Transkriptionsfaktoren MRTFI und MRTFII beschrieben, die zur Aktivierung SM-spezifischer Genexpression führt. Aufgrund der demonstrierten LacZ-Reporteraktivität in der glatten Muskulatur der *mDia3*-GT Mäuse ist es wahrscheinlich, dass mDia3 in der glatten Muskulatur eine ähnliche Funktion wie mDia1 und mDia2 übernimmt und somit in diesem Gewebe eine hohe Redundanz zwischen den mDia-Isoformen herrscht.

Dennoch deutet die LacZ-Expression in den *mDia3*-GT Embryonen zusätzlich auf eine sehr spezifische Funktion im Primitivknoten, den Branchialbögen und während der Herzentwicklung hin. Die Ausbildung eines heterogenen Phänotyps von der embryonalen Letalität ab E10.5 über die perinatale Letalität bis hin zur Überlebensfähigkeit gibt jedoch auch in diesen Bereichen erste Hinweise auf eine funktionelle Redundanz mit den anderen mDia-Isoformen. Möglicherweise können mDia1 oder mDia2 die Funktionen von mDia3 zumindest teilweise übernehmen, so dass es zur Ausbildung eines weniger starken oder sogar wildtypischen Phänotypen kommt.

Eine funktionelle Redundanz wurde bereits für andere Genfamilien beschrieben, z.B. für die Dishevelled-Genfamilie. Das Ausschalten von *Dvl3* führt zur perinatalen Letalität aufgrund von Herz- und Neuralrohr-Defekten. Das gleichzeitige Ausschalten von *Dvl1* und *Dvl3* führt jedoch zu einer sehr viel früheren Letalität. Dieser Phänotyp ist sehr viel schwerer als der Phänotyp der Einzelknockouts und deutet auf eine funktionelle Redundanz zwischen den Familienmitgliedern hin (Etheridge et al., 2008). Ähnlich könnte es sich auch in der mDia-Familie verhalten. Dies müsste jedoch in weiteren funktionellen Studien bestätigt werden.

4.4 Die Lokalisation und Funktion von mDia3 auf zellulärer Ebene

4.4.1 Die Kolokalisation von mDia3 und kleinen GTPasen

Um die Funktion von mDia3 auf zellulärer Ebene zu klären, wurde die Lokalisation von endogenem, nicht mutiertem mDia3 untersucht. mDia3 gehört zu den Diaphanous-related Formins (DRFs) und ist in die Remodellierung des Zytoskeletts involviert. Durch die Bindung an kleine GTPase wie z.B. RhoA wirkt es als deren Effektor und führt zur Herstellung von F-Aktin. Die Bindung von endogenem mDia3 in Wildtyp-Mausfibroblasten an RhoA wurde auch in dieser Arbeit gezeigt und bestätigt dieses Ergebnis.

Um die Lokalisation von mDia3 in den Zellkompartimenten aufzuklären wurde die Kolokalisation von mDia3 mit verschiedenen kleinen GTPasen untersucht. Diese gelten als Marker für die Transportvesikel der verschiedenen Zellorganellen. In WT-ES-Zellen und Mausfibroblasten konnte mDia3 in Rab6-positiven Vesikeln detektiert werden. Dies sind Vesikel, die ihren Inhalt vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum oder in die Peripherie transportieren. Interessanterweise kann keine Lokalisation der *mDia3*-GT Fusion in diesen Vesikeln detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Lokalisationssequenz von mDia3 stromabwärts der GT-Insertion liegt und mDia3 scheinbar nicht mehr zu seinem Bestimmungsort transportiert werden kann.

Allerdings zeigte eine weitere Analyse, dass die *mDia3*-GT Fusion in Rab11A-positiven, wiederverwertbaren Endosomen detektiert werden kann. Ob es sich dabei um ein Artefakt durch die GT-Mutation handelt, oder ob auch endogenes mDia3 in diesen Vesikeln lokalisiert ist und vielleicht durch eine andere Lokalisationssequenz kontrolliert wird, muss weiter untersucht werden.

Insgesamt geben diese Studien zwar erste Hinweise auf die Lokalisation von mDia3, allerdings müssen weitere Analysen diese Hinweise bestätigen und weiter ausbauen.

4.4.2 Die Funktion von mDia3 in der Ziliogenese

Die Festlegung der Links-Rechts-Achse des Embryos erfolgt durch die gerichtete Zilienbewegung, dem sogenannten Nodal Flow, der monozyliären „Pit“-Zellen im Primitivknoten des gastrulierenden Embryos. Deshalb kommt es bei einem Ziliendefekt unter Umständen zu Störungen während der Bildung der Links-Rechts-Achse, die zu einem Situs Inversus oder verschiedenen Herzdefekten führen können (Übersicht in Sutherland und Ware, 2009). Beispielsweise bilden die „Pit“-Zellen von Embryonen mit einer Mutation des Gens Pitchfork mehrere Zilien bzw. Zilien mit abnormaler Morphologie aus. Der „Nodal Flow“ und die als Folge entstehende linksseitige Aktivierung des Nodal-Signalwegs in den „Crown“-Zellen sind dadurch stark beeinträchtigt, es kommt zur Ausbildung von Links-Rechts-Defekten mit

embryonaler Letalität aufgrund eines Herzdefektes (Kinzel et al., in Revision). Die LacZ-Expression im Primitivknoten der *mDia3*-GT Embryonen sowie die Ausbildung von Links-Rechts- bzw. Herzdefekten deutete auf eine mögliche Rolle von *mDia3* in der Ziliogenese hin. Die Analysen mit dem Zilienmarker Arl13 und dem Zentrosomenmarker γ -Tubulin ergaben jedoch, dass *mDia3* weder am Zentrosom, an dem das Zilium verankert ist, noch am Zilium selbst lokalisiert ist. Dies heisst jedoch nicht, dass sich die Mutation von *mDia3* nicht auf die Ziliogenese auswirkt. Da *mDia3* bei der Remodellierung des Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt, könnten möglicherweise Defekte im Zytoskelett indirekt die Ziliogenese stören. Dies müsste jedoch in weiteren Analysen untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Ausstattung

| | |
|--------------------------------|---|
| Zentrifugen | 5417 C (Eppendorf AG, Hamburg) |
| | 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg) |
| | Heraeus Rotanta 460 R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) |
| | Hettlich Universal 30F (Andreas Hettlich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) |
| | 1-14 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) |
| | Galaxy Mini (VWR International GmbH, Darmstadt) |
| Inkubatoren | 37°C Labotec Inkubator C200 (Labotec, Dillenburg) |
| | 37°C Bakterien Schüttler (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Cornelius) |
| | 65°C Ofen |
| | Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg) |
| | Shake `n/ Stack (ThermoHybaid), Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) |
| Elektroporationssysteme | BioRad Gene Pulser Xcell (BioRad Laboratories, München) |
| Stromversorgung | Power Pack Basic (BioRad Laboratories, München) |
| | Agarose Gel Kammern Midi 450 (Hamischmacher, Kassel) |
| Geldokumentationssystem | UV- Transilluminator (Biorad, München) |
| | Gene Flash (Syngene Bio Imaging, Synoptics Ltd, Cambridge) |
| Pinzetten | (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) |
| Pipetten | 1000µl/200µl/20µl/10µl Eppendorf Research (Eppendorf AG, Hamburg) |
| | Pipetboy accu-jet and accu-jet R Pro (Brand GmbH & Co, KG, Wertheim) |

| | |
|--------------------------------|--|
| Photometer | BioPhotometer (Eppendorf) ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) |
| Polyacrylamid-Gelkammer | Mini Trans-Blot R Cell (BioRad GmbH, Heidelberg) |
| PCR Maschinen | Px2 Thermo Hybaid (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) PXE0.2 Thermo Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) |
| Vortexer | Vortexer (VWR international GmbH, Darmstadt) |
| Taumler | VSR 23 (Grant BOEKEL, VWR international GmbH, Darmstadt) |
| Roller | Mixer SRT1 (Bibby Scientific (Stuart), Staffordshire, GB) |
| Wasserbad | VWR |
| pH-Meter | pH211 Microprocessor pH-Meter (HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein) |
| Pumpen | LABOPORT R (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) |
| Filmkassetten | Hypercassette (Amersham, GE Healthcare GmbH, München) |
| Entwicklermaschine | AGFA Curix 60 developing machine (AGFA Health Care GmbH, Bonn) |
| Mikroskope | Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Göttingen) Lumar.V12 (Carl Zeiss AG, Göttingen) MS5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) |
| Kameras | AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG, Göttingen) AxioCam HRm (Carl Zeiss AG, Göttingen) |
| Mikrowelle | 700W (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern) |
| Rührer | STIR (VWR international GmbH, Darmstadt) |
| Mikrotom | Microm HM 355S rotation microtome (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) |
| Glaswaren | Schott-Duran (Schott Mainz) |
| Plastikwaren | (VITLAB GmbH, Großostheim) |
| Zählkammer für Zellen | Neubauer (LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) |

| | |
|-----------------------|---|
| Gefrierschrank | -20°C (Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen) -80°C (Sanyo, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf) |
| Kühlschrank | 4°C (Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen) |

5.1.2 Verbrauchsmaterial

| | |
|-----------------------------------|--|
| 50ml/15ml Gefäße | (Becton and Dickinson and Company, Franklin Lakes; Sarstedt, Nümbrecht) |
| 2ml/1,5ml Reaktionsgefäße | (Eppendorf AG, Hamburg) |
| 0,2ml Reaktionsgefäße | (Eppendorf AG, Hamburg) |
| 5/10/25ml Plastikpipetten | BD Labware (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) |
| 6/15/10cm Petrischalen | nunc (ThermoScientific Fisher, Wiesbaden) |
| 6/12/24/48/96-Loch-Platten | nunc (Thermo scientific Fisher, Wiesbaden) |
| 10cm Bakterienplatten | BD Falcon™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) |
| Einbettkassetten | Peel-A-Way Embedding Molds (Peela-A-Way, Warrington, USA) Einbettkassetten (Roth) |
| Einfrierröhrchen | (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Hybridisierungsröhrchen | (Hartenstein, Würzburg) |
| Plastik Pasteurpipetten | Transferpipetten (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) |
| Parafilm | Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha) |
| PVDF-Membran | (BIORAD Laboratories, Hercules) |
| Blot Papier | Whatman Papier (GE Healthcare Buchler GmbH & Co, München) |
| Filme | Kodak BioMax MS (Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg) |

5.1.3 Reaktionssysteme (Kits)

| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| QIAquick PCR Purific. Kit | (Qiagen Holding, Hilden) |
| QIAquick Gel Extraktion Kit | (Qiagen Holding, Hilden) |
| QIAgen Maxi Kit | (Qiagen Holding, Hilden) |
| QIAgen Mini Kit | (Qiagen Holding, Hilden) |

| | |
|------------------------------|---|
| DIG-RNA-Labeling Kit | (Roche Holding GmbH, Applied Science, Mannheim) |
| ECL Detection Kit | (Millipore Cooperation, Billerica, MA) |
| PCR 5 PRIME Mastermix | (5 PRIME, Hamburg) |

5.1.4 Chemikalien

(Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg; Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe)

| | |
|----------|---|
| A | Acrylamid/Bisacrylamid |
| | Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) |
| | Aluminiumsulfat |
| | Ampicillin |
| | APS (Ammoniumpersulfat) |
| B | BSA (bovines Serumalbumin) |
| | Benzylalkohol |
| | Benzylbenzoat |
| | Bradford Reagenz |
| | BM Purple AP Substrat (Boehringer Mannheim) |
| C | Chloroform, 99% |
| | Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) |
| D | Diethylpyrocarbonat (DEPC), ca. 97% |
| | Dimethylsulfoxid (DMSO), >99,9% |
| | Dithioereitol (DTT) |
| E | EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) |
| | Ethanol, 96% |
| | Ethidiumbromid |
| F | Formaldehyd |
| | Formamid |
| G | Gelatine |
| | Glutaraldehyd |
| | Glycerol |
| | G418 (Geneticin, 50mg/ml, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA) |
| H | Heparin |
| | HEPES (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA) |
| | hCG (humanes Choriongonadotropin) |
| I | Isopropanol |

| | |
|----------|--|
| K | Kernechtrot-Pulver KSOM (Millipore) |
| L | Levamisol Lithiumchlorid |
| M | Magnesiumchlorid MEMs non essential amino acids (100x, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA) Methanol, 100% Milchpulver (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) Mineralöl Mitomycin C β-Mercaptoethanol (50mM) |
| N | Natriumacetat Natriumchlorid Nonidet P-40 (NP-40) |
| O | Oligo-dT-Primer (Promega GmbH, Mannheim) |
| P | Paraffin Paraformaldehyd PBS (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA) PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) Polyacrylamid |
| R | Rotihistol |
| S | Saccharose Salzsäure Schafserum SDS (Natriumdodecylsulfat) Stickstoff, flüssig (Linde AG, München) |
| T | TEMED (Tetramethylethyldiamin) Tween20 Tinte, wasserunlöslich Tris Triton X-100 Trizol (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Karlsruhe) |
| W | Wasserstoffperoxid |

| | |
|----------|----------------|
| X | X-Gal Xylol |
| Y | Yeast tRNA |

5.1.5 Puffer und Lösungen

5.1.5.1 Isolierung genomischer DNA

Proteinase-K-Lysis-Puffer 100mM Tris, pH8,0-8,5, 5mM EDTA, pH8,0, 2% SDS, 200mM Natriumchlorid

TE Puffer 10mM TrisHCl, pH8,0, 0,1mM EDTA

5.1.5.2 DNA/RNA-Agarosegele

TAE-Puffer (50x) 2M Tris, 50mM Essigsäure, 50mM EDTA

Ladepuffer DNA 100mM EDTA, 2% SDS, 60% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau

Ladepuffer RNA (2x) 95% Formamid, 0,025% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol FF, 0,025% Xylencyanol FF, 0,025% Ethidiumbromid, 0,5mM EDTA

5.1.5.3 Western Blot

Lysispuffer 50mM Tris/HCl, pH7,4; 150mM NaCl; 2mM EDTA, pH 8,0; 1% Nonidet P-40
(frisch zugeben: Proteinase Inhibitorcocktail 1:200)

APS 10% APS (in Aqua dest.)

4x Tris/SDS pH8,8 1,5M Tris (pH 8,8); 0,4% SDS (für Trenngel)

4x Tris/SDS pH6,8 0,5M Tris (pH 6,8); 0,4% SDS (für Sammelgel)

Laufpuffer 10x Tris-Glycin: 1,0% SDS; 0,25M Tris; 1,92M Glycin

4x SDS-Ladepuffer 200mM Tris/HCl, pH 6,8; 8% SDS; 40% Glycerol; 0,4% Bromphenolblau
(frisch zugeben: 40µl 2M DTT auf 160 µl Puffer)

| | |
|------------------------|--|
| Anodenpuffer I | 0,3M Tris pH10,4; 10% Methanol |
| Anodenpuffer II | 25mM Tris pH 10,4; 10% Methanol |
| Kathodenpuffer | 25mM Tris pH 9,4; 40mM Glycin; 10% Methanol |
| 10xTBS | 100mM Tris-HCl, pH7,4; 1,5M NaCl; 1,0% Tween20 |
| TBST | 1xTBS; 0,1% Tween-20 |
| ECL-Lösung | Jeweils 1 Aliquot von Lösung A und B mischen. |

5.1.5.4 LacZ-Färbung

| | |
|---------------------|---|
| Fixierlösung | PBS; 0,02% NP-40; 5 mM EGTA pH 8,0; 2 mM MgCl ₂ ; 1% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd |
| Färbelösung | PBS; 0,02% NP-40; 2 mM MgCl ₂ ; 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]; 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] x 6H ₂ O; 0,01% Natriumdeoxycholat; 1 mg/ml X-Gal in PBS |

5.1.5.5 Immunhistochemische Färbung

| | |
|---------------------------------|--|
| Permeabilisierungslösung | 0,1% Triton X-100; 100M Glycin in PBS |
| Blockinglösung | 10% Kälberserum (FCS); 0,1% BSA, 3% Schafserum in TBST |

5.1.6 Enzyme und Reaktionssysteme

| | |
|-----------------------------|--|
| Proteinase-Inhibitor | (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) |
| Superscript II | (Fermentas GmbH, St-Leon-Rot) |
| RNase-Inhibitor | (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot) |
| Restriktionsenzyme | (NEB GmbH, Frankfurt a.M.; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) |
| RNase | (Promega GmbH, Mannheim) |
| RNase-freie Dnase I | (Promega GmbH, Mannheim) |

5.1.7 Antikörper und Seren

5.1.7.1 Primäre Antikörper

| | | |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------|
| anti-Aktin | mouse, 1:5000 (WB) | (BD) |
| anti-Arl13 | rat, 1:1000 (IHC) | |
| anti-Dia2 (=anti-mDia3) | goat, 1:100 (IHC), 1:500 (WB) | (BD) |
| anti-DIG-AP Fab fragments | (ISH) | (Roche) |
| anti-LacZ | chicken, 1:250 (IHC) | (ProSci) |
| anti-p54nrb | mouse, 1:2500 (WB) | (BD) |
| anti-Rab6 | rabbit, 1:250 (IHC) | (Santa Cruz) |
| anti-Rab11A | goat, 1:250 (IHC) | (Santa Cruz) |
| anti-RhoA | rabbit, 1:250 (IHC) | (Santa Cruz) |

5.1.7.2 Sekundäre Antikörper

| | | |
|-----------------------------------|---------|--------------|
| anti-chicken Cy3 | 1:800 | (Dianova) |
| anti-goat 488 | 1:800 | (Invitrogen) |
| anti-goat 555 | 1:800 | (Invitrogen) |
| anti-goat IgG (HRP-gekop.) | 1:10000 | (Millipore) |
| anti-mouse 555 | 1:800 | (Invitrogen) |
| anti-mouse (HRP-gekop.) | 1:1000 | (Millipore) |
| anti-rabbit 555 | 1:800 | (Invitrogen) |
| anti-rat 555 | 1:800 | (Invitrogen) |

5.1.7.3 Seren

| | |
|--------------------|---------|
| Schafserum | (Sigma) |
| Kälberserum | (PAA) |

5.1.8 Plasmide

| | |
|---------------|--|
| PPGKFLPobpA | Flip-Rekombinase Expressionsplasmid (P- Soriano) |
| IRAMp995P089Q | Full length cDNA-Klon von mDia3 |

5.1.9 Oligonukleotide

| Name | Sequenz | Funktion | T _A |
|-----------------------|----------------------------|--|----------------|
| BcoR Ex5 fw | tgatgcgcttctcagagtgg | Vorwärts-Primer zur Bestätigung der GT-Integrationsstelle (RT-PCR) | 56°C |
| Crsp2fw | cgggcctactcggagcttat | | |
| Cul4bEx2/s | ggatgtcacgttcaactaggt | | |
| Diap2 Ex5 fw | gcctgaaaaacagcaaacat | | |
| Diap2fw | tgggggagttttcctctcc | | |
| DXImx46efw | ccagtcggaacgtgaagag | | |
| Flnafw | tcccacgagagaatggcatc | | |
| Glt28d1fw | gcaggtgcaggaagctgtt | | |
| Glt28d1fw | gcaggtgcaggaagctgtt | | |
| Jarid1CEX1/s | agggcctagactccgagaag | | |
| NonoEx2/s | gtcgaggttagtgaggactgc | | |
| P078_0408_fw | tctggtgacgacttctctga | | |
| Rab9fw | ccggagtctctggccttctt | | |
| Rbm10 fw | tagaggtggtcgtggtgaca | | |
| Rbm3Ex2/s | tctctgtaggagggtcaac | | |
| Rbm41fw | gccagcgcacctttacct | | |
| Ureb1Ex1/s | tagtgctccgtgaggtgtg | | |
| Usp9xfw | caaatgggtcattcctgcact | | |
| W069B04 fw | tttggtgctattggcaaac | | |
| EP274 | atatcctgatctccagataactgccg | Rückwärts-Primer zu o.g. Primern (außer Rbm3Ex2/s) | 56°C |
| NeolN10 | caggtcggcttgacaaaagaac | Rückwärts-Primer zu Rbm3Ex2/s | |
| NonoEx4/as | cctggttctctaaaattctca | Rückwärts-Primer für Wildtyp-Nono Fragment (RT-PCR) | 56°C |
| NonoEx11/s | aggacctgccactatgatgc | Primer für Wildtyp-Nono Fragment (RT-PCR) | 56°C |
| NonoEx12/as | gcaggaaggcctatctattg | | |
| Diap1 RT fw | ggcctaaatggtaaggagat | Spezifische Detektion von mDia1 (RT-PCR) | 56°C |
| Diap1 RT rev | aaacacggaccctgctttg | | |
| Diap3 RT fw | aagggtcacgtccacacca | Spezifische Detektion von mDia2 (RT-PCR) | 56°C |
| Diap3 RT rev | gccagcagggttcaactt | | |
| Diap2 RT fw | gagcatggggcttagttaga | Spezifische Detektion von mDia3 (RT-PCR) | 56°C |
| Diap2 RT rev | ccagcttccacaccataacctg | | |
| Diap2_Ex25 fwd | agcaaagctgcaaaagaga | Primer für Wildtyp-mDia3 Fragment (RT-PCR) | 56°C |
| Diap2_Ex27 rev | gagagcgagatctttccaga | | |
| B045 | ctccgcctcctcttcccatc | Detektion des invertierbaren GT-Allels | 59°C |
| B048 | cctccccgtgccttcttgac | | |
| B050 | tttgaggggacgacgacagtat | | |
| Sry fw | tgactgggatgcagtagttc | Detektion des Y-Chromosoms | 54°C |
| Sry rev | tgtagtagagagaaccctg | | |
| Diap2GT_In5_614bp fw | atgtggaacagctctcaacc | Genotypisierung mDia3 Wildtyp-Allel | 54°C |
| Diap2GT_In5_331bp rev | ggatactgcagaatgctggt | | |
| Diap2GT_In5_614bp fw | atgtggaacagctctcaacc | Genotypisierung mDia3 GT-Allel | 54°C |
| GT_frt_rev | aacttcggaataggaactctg | | |

5.1.10 Molekulargewicht-Marker

DNA-Leiter 100bp Leiter (NEB GmbH, Frankfurt a.M.)

Protein-Leiter SeeBlueR Plus2 Pre-Stained standard (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

5.1.11 Bakterien und Kulturmedien

5.1.11.1 Bakterien

***E.coli* K12 DH5α** F-*lacI*-*recA1*, *endA1*, D(*lacZY A-argF*), U169, F80d*lacZDM15*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* (Hanahan et al., 1985)

5.1.11.2 Kulturmedien

LB Medium (Lysogeny broth; Bertani, 1951)

LB Agar (Lysogeny broth; Bertani 1951)

versehen mit 100µg/ml Ampicillin

5.1.12 Zelllinien, Kulturmedien und Zellkulturlösungen

5.1.12.1 Zelllinien

MEF Primäre murine embryonale Fibroblasten

IDG3.2 Murine ES-Zelllinie (F1);
genetischer Hintergrund: 129SV/C57Bl/6

E14 Murine ES-Zelllinie; genetischer Hintergrund: 129P2/OlaHsd

5.1.12.2 Kulturmedien

MEF DMEM (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA),
versehen mit 2mM L-Glutamin (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA); 15% FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach); 0,1mM β-Mercaptoethanol (50mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA);

1xMEM (non-essentiell amino acids, 100x; Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

IDG3.2 DMEM (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA), versehen mit 2mM L-Glutamin (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA), 15% FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach); 0,1mM β-Mercaptoethanol (50mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA); 1xMEM (non-essentiell amino acids, 100x; Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA), ESGRO R (LIF) (107 U/ml, Chemicon, Millipore, Schwalbach), 2mM HEPES (200mM, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

E14 Stempan E14 (PAN), versehen mit LIF

5.1.12.3 Zellkulturlösungen

1x PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ (Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

1x Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA.4NA, Gibco, Invitrogen™ Cooperation, Carlsbad, CA)

5.1.13 Mauslinien

C57Bl/6N inbred strain (Inzuchtstamm)

CD1 outbred strain
(Stamm mit gemischtem genetischen Hintergrund)

dsRed Mauslinie, die ubiquitär ein rotes Fluoreszenzprotein exprimiert
(Vintersten et al., 2004)

Flp-e Mauslinie, die ubiquitär Flp-Rekombinase exprimiert
(Dymecki, 1996)

Rosa-cre Mauslinie, die ubiquitär Cre-Rekombinase exprimiert
(Soriano, 1999)

Wnt1-cre Mauslinie, die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des

Wnt1-Promotors exprimiert (Brault et al., 2001)

YFP

Mauslinie, die ubiquitär ein gelbes Fluoreszenzprotein
exprimiert (Hadjantonakis et al., 2002)

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Auftauen von ES-Zellen

Eingefrorene ES-Zellen werden möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in ein 10ml Falcon mit ES-Medium überführt. Die Zellen werden bei 1200rpm für 4min abzentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in benötigter Verdünnung ausplattiert. E14 Zellen werden auf Gelatine-beschichteten Platten ausgesät. Dazu wird 0,1% Gelatine auf die Platte gegeben und wieder abgesaugt. Die Zellen können dann sofort auf der Platte ausgesät werden. Andere ES-Zellen benötigen Feeder-beschichtete Platten.

5.2.1.2 Passagieren von ES-Zellen

ES-Zellen werden kurz mit PBS gewaschen und für 3 (E14) bzw. 4 (andere ES-Zellen) min bei 37°C im Inkubator mit 0,05% Trypsin von der Platte gelöst. Die abtrypsinierten Zellen werden in 10ml frisches ES-Medium überführt und resuspendiert, abzentrifugiert und mindestens im Verhältnis 1:4 ausplattiert. Die ES-Zellen für die tetraploide Aggregation werden am Abend vor der Benutzung dünn in drei verschiedenen Konzentrationen ausgesät.

5.2.1.3 Einfrieren von ES-Zellen

ES-Zellen werden wie oben beschrieben abtrypsiniert. Das Zellpellet wird entweder in 1ml ES-Medium + 100µl DMSO (E14) oder in 1ml Einfriermedium (andere ES-Zelllinie) resuspendiert und so schnell wie möglich in Einfriereröhrchen bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung werden die Röhrchen nach 24h in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2.1.4 Transfektion von ES-Zellen

Für die Inversion der GT-Kassette müssen ES-Zellen mit einem Flip-Plasmid (PPGKFLPobpA) transfiziert werden. Dazu wird eine 10cm Platte mit ca. 80% konfluenten ES-Zellen abtrypsiniert und abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wird das Pellet in 1,6ml eiskaltem PBS resuspendiert. Davon werden 0,8ml in eine vorgekühlte Küvette überführt und mit 100µl gelöstem Plasmid (15-30µg DNA) gemischt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wird elektroporiert ($U = 220V$, $C = 500\mu F$, $R = \infty \Omega$) und nochmals für 5min inkubiert. Im Anschluß wird der Inhalt der Küvette auf zwei 10cm Platten mit vorgewärmtem Medium ausplattiert. Am folgenden Tag werden die Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert und resuspendiert. 20µl der Zellsuspension werden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und

alle vier Quadranten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl n/ml erfolgt nach der Formel $n/ml = n/4 \times 10^4$. Auf fünf 10cm Platten werden jeweils 1000-2000 Zellen ausgesät um Einzelklone zu erhalten.

5.2.1.5 Picken von Einzelklonen

Ca. 7 Tage nach dem Aussäen der Zellen können Einzelklone gepickt werden. Dazu wird von den 10cm Platten das Medium abgesaugt und stattdessen 10ml PBS auf die Zellen gegeben. Anschließend werden mit einer 100µl Pipette Klone gepickt, indem der Klon durch leichte Berührung mit der Pipettenspitze von der Platte gelöst und anschließend mit einem Volumen von 30µl eingesaugt wird. Die Einzelklone werden in eine konische 96-Loch-Platte gegeben. Ist diese mit Klonen gefüllt, werden mit einer Multichannelpipette jeweils 30µl Trypsin in jedes Loch gegeben und für 15min im Inkubator inkubiert. Währenddessen werden pro 96-Loch-Platte zwei 96-Loch-Platten mit flachem Boden mit Gelatine beschichtet und anschließend mit je 100µl Medium gefüllt. Zu den abtrypsinieren Zellen werden 60µl Medium gegeben und gut resuspendiert. Jeweils 60µl dieser Suspension werden dann in die vorbereiteten 96-Loch-Platten überführt. Das Medium der einen Platte wird am folgenden Tag durch Selektionsmedium mit 300µg/ml Neomycin (G418) ersetzt. Die folgenden Tage wird das Medium gewechselt und dokumentiert, welche Klone gestorben sind. Wenn die Klone der anderen Platte nach 2-3 Tagen eine dicht gewachsen sind, werden sie weggefroren. Dazu wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann werden die Zellen mit 30µl abtrypsinieren und in 120µl ES-Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Anschließend wird die Platte bei -80°C weggefroren. Die Klone, die bei der Selektion gestorben sind, werden später von der eingefrorenen Platte expandiert. Dazu wird zunächst die gesamte 96-Loch-Platte aufgetaut, um dann die einzelnen Klone auf eine mit Gelatine beschichtete und Medium gefüllte 48-Loch-Platte zu überführen. Die Klone werden die nachfolgenden Tagen jeweils auf größeren Platten expandiert.

5.2.1.6 Herstellung von Mausfibroblasten

Primäre embryonale Mausfibroblasten (Mouse Embryonic Fibroblasts – MEFs) können an den Tagen E11.5-E14.5 aus Embryonen gewonnen werden. Dazu werden die Embryonen in PBS isoliert, Kopf und innere Organe werden entfernt. Der Rest des Embryos wird mit dem Stempel einer 6ml Spritze durch ein Zellsieb gedrückt und mit 3ml PBS in eine 6-Loch-Platte gespült, so dass eine Einzelzellsuspension entsteht. Diese wird mit 3ml Trypsin versetzt und für 15min im Inkubator inkubiert. Anschließend wird mit 10ml Medium resuspendiert und für 5min bei 1200rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird dann abgenommen und das Pellet in 4ml resuspendiert. Die Suspension wird auf eine 6-Loch-Platte ausgesät.

5.2.1.7 Herstellung von Feederzellen und Behandlung mit Mitomycin

Mausfibroblasten, die als Feederzellen verwendet werden, werden an E14.5 aus CD1 Embryonen isoliert. Die Zellen werden normal passagiert und Aliquots eingefroren. Passage 3 (P3) Feeder werden auf 5x15cm Platten aufgetaut und weiter auf 25x15ml Platten expandiert (P4). Dichte P4 Feeder werden abtrypsiniert und die Zellen von je 5x15cm werden in ein 50ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation wird das Pellet in 20ml Feedermedium mit 10µg/ml Mitomycin C (MMC) resuspendiert und im Brutschrank mit losem Deckel für 1h inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und entweder direkt ausplattiert oder in Aliquots bei -80°C eingefroren. Ausplattierte Feederzellen können bis zu 5 Tagen nach dem Ausplattieren genutzt werden.

5.2.1.8 Immundetektion auf Zellen

Um ein Protein in ES-Zellen oder MEFs anzufärben wurden 1×10^3 Zellen in einer mit Deckgläschen gefüllte 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese Zellen für 5min mit 4% PFA fixiert und dann entweder in PBS bei 4°C gelagert oder mit 100% eiskaltem Methanol auf Eis für 5min permeabilisiert. Anschließend wurde für 2h bei Raumtemperatur mit Blocking-Lösung geblockt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 1h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach Entfernen des Zweitantikörpers mit PBS wurden die Deckgläschen mit Hilfe des DAPI VectaMount Mediums eingedeckelt und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert.

5.2.2 Molekularbiologie

5.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wird mit einem Photometer (Nanodrop) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt. Der Quotient OD260/OD280 gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Werte zwischen 1,8 und 2,0 bedeuten eine hohe Reinheit der gelösten RNA oder DNA.

5.2.2.2 Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Eigenschaft von DNA- oder RNA- Fragmente innerhalb eines Agarosegels in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell zu wandern macht man sich bei der Auftrennung von DNA/RNA-Fragmenten zu Nutze. Ein 1% Agarose/TAE-Gemisch wird zunächst aufgekocht, kurz unter kaltem Wasser gekühlt und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von

0,005% versetzt. Dieses heiße Gemisch wird in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach Erhärten des Geles wird der Kamm gezogen und der Schlitten in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Der optimale Auftrennungsbereich 1% Gele liegt bei 500bp und 7kb. Um größere Fragmente aufzutrennen, muss ein niedrigprozentiges Gel gegossen werden, um kleinere Fragmente aufzutrennen, höherprozentige Gele. Das Gel wird nun beladen und ein elektrisches Feld angelegt, wobei sich am Ende der geladenen Proben die Kathode und am anderen Ende die Anode befindet. Die DNA/RNA wandert innerhalb des Gels Richtung der positiv geladenen Anode. Kleinere Fragmente mit geringerem Molekulargewicht wandern innerhalb des Gels schneller als große Fragmente. Als Marker werden 10µl eines 1kb-Größenstandards (80 µg/µl) verwendet.

5.2.2.3 DNA-Präparation aus Mausschwänzen und ES-Zellen

Auf die ES-Zellen werden 500µl Lysispuffer gegeben, mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mausschwänzen werden ebenfalls 500µl Lysispuffer zugegeben. Nach der Lyse über Nacht bei 55°C wird für 20min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi mit 500µl Isopropanol überführt. Nach mehrmaligem Invertieren wird nochmals für 5min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wird das Ethanol abgenommen und das Pellet 15min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird es in 300µl Wasser resuspendiert.

5.2.2.4 Plasmidpräparation mit dem Qiagen-Kit

Kleine Mengen an Plasmid-DNA werden mit Hilfe des Mini-Kits von QIAGEN präpariert. Das entstehende DNA-Pellet wird in 50µl TE-Puffer resuspendiert. Für größere Mengen an DNA wird das QIAGEN Maxi-Kit verwendet und die DNA in 300µl TE-Puffer eluiert.

5.2.2.5 RNA-Präparation aus ES-Zellen

Auf eine 6cm Platte mit konfluenten ES-Zellen werden 800µl Trizol Reagenz gegeben. Mit einem Zellschaber werden die Zellen abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mit einer Spritze wird die Suspension homogenisiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 160µl Chloroform zugegeben, mehrfach invertiert und bei 4°C für 30min bei 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt und mit 400µl Isopropanol gefällt. Anschließend wird wie bei der DNA Extraktion mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet maximal 5min unter dem Abzug auf Eis getrocknet und in 30µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

5.2.2.6 Herstellung von cDNA mittel reverser Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA in copyDNA (cDNA) übersetzt. Im Anschluß kann eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt werden um Bereiche eines bestimmten Transkripts zu detektieren. Diese PCR wird dann RT-PCR (Reverse Transkription-PCR) genannt. Für die reverse Transkription werden 2µg RNA mit 1µl Oligo-dT-Primer (500ng/µl) versetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 11µl gebracht. Die Lösung wird für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, wo folgende Komponenten hinzugefügt werden:

4,0µl 5x Transkriptasepuffer, 2,0µl DTT (0,1M > 10mM), 1,0µl dNTPs (je 10mM > 0,8mM), 1,0µl RNA Inhibitor (40U/µl > 40U)

Das Gemisch wird nun für 2min bei 42°C inkubiert und anschließend 1µl SuperScript II Reverse Transkriptase (200U/µl) zugegeben. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 42°C für 50min, bevor die Reaktion durch Denaturierung des Enzymes bei 70°C über 15min abgestoppt wird. Die cDNA kann nun bei -20°C gelagert werden.

5.2.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation spezifischer Genregionen mit Hilfe von spezifischen Primern. Sie wird mit dem 5 Prime Master Mix (5 Prime) durchgeführt.

PCR Mix: 8µl 5 PRIME Reaktionsgemisch, 7.5µl H₂O, 1µl Vorwärts-Primer, 1µl Rückwärts-Primer, 1.5µl MgCl₂ (im 5 PRIME-Kit enthalten), 1µl cDNA

PCR Konditionen: 4' - 94°C; 34 Zyklen: 1' - 94°C, 1' - 54-59°C, 1' - 72°C; 7' - 72°C, ∞ - 4°C

5.2.2.8 Chemische Transformation von Bakterien

Nach Auftauen eines 100µl Aliquots Dh5a-Bakterien auf Eis werden 4µl des zu transformierenden Vektors zugegeben und das Gemisch für 30min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock werden die Bakterien für 90sec bei 42°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt. Die Bakterien werden dann mit LB Medium verdünnt und für 60min bei 37°C geschüttelt. Abschließend wird diese Kultur auf einer LB-Agar-Platte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können für die Mini- oder Maxipräparation Klone gepickt werden.

5.2.2.9 Sequenzierreaktion

Das zu sequenzierende PCR Produkt wird mit Hilfe des Gelextraktionskits (Qiagen) aus dem Agarosegel isoliert und für die folgende Sequenzierreaktion eingesetzt. Diese wird mit dem Big Dye Terminator v3.1 Sequenzierkit (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion werden Didesoxy-Nukleotide verwendet, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen für jede Base vorhanden sind. Dafür wird eine PCR mit einem Primer durchgeführt, deren Amplifikation abbricht, sobald ein Didesoxy-Nukleotid mit spezifischer Fluoreszenzmarkierung eingebaut wird. Dadurch entstehen statistisch verteilte Fragmente jeder Länge, wobei sich am Ende jedes Fragments ein Didesoxy-Nukleotid mit der jeweiligen spezifischen Fluoreszenzmarkierung befindet.

PCR-Ansatz: 0,5µl BigDye, 2,0µl BigDye-Puffer, 10pM Primer (sense/antisense)
(n) bp/100 = x ng. Der Ansatz wird mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5µl gebracht.

PCR-Konditionen: 1' - 96°C; 35 Zyklen: 10" - 96°C, 5" - 50°C, 4' - 60°C; 8 – 4°C

Um die DNA zu präzipitieren werden der PCR-Reaktion 0,5µl 125mM EDTA, 2,0µl 3M Natriumacetat und 50µl reines Ethanol zugegeben und bei Raumtemperatur für 15min inkubiert. Die DNA wird für 30min bei 11000rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird es in 25µl HPLC-Wasser gelöst und in eine spezielle 96-Loch-Platte überführt. Die Sequenziermaschine trennt die PCR-Fragmente chromatisch auf und liest mit Hilfe der mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Fragmente die Basen-Abfolge ab.

5.2.2.10 Herstellung von Sonden für die *In Situ*-Hybridisierung

Sonden für die Detektion einer spezifischen Genexpression bestehen aus DIG-gelabelten RNA-Fragmenten des Gegenstrangs (=Antisense). Als Vorlage dafür kann entweder ein PCR-Fragment oder ein Plasmid dienen. Da die *in vitro*-Transkription mit Hilfe der RNA-Polymerasen Sp6, T3 und T7 erfolgt, müssen dem gewünschten Fragment jeweils ein Sp6-, T3- oder T7-Promotor vorangehen. Bei der Generierung einer Sonde mit Hilfe eines Plasmids, muss dieses zunächst mit einem Restriktionsenzym nach Angabe des Herstellers linearisiert werden. Liegt von dem betreffenden Gen ein cDNA-Klon vor (z.B. von RZPD, heute Imagenes), kann diese cDNA zunächst mittels PCR amplifiziert werden. Je nach Vektor und Promoter werden folgende Primer und Bedingungen gewählt:

| Vektor (Polymerase) | Primer Name | Primer Sequenz | PCR Programm |
|---|----------------------------------|--|---|
| PBlueskript-Lion (Sp6) | Lion-5-Sp6 | AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT | 94°C 3'15 95°C 45'' |
| | Lion-3-Sp6 | ATTTAGGTGAACACTATAGAATCGAA GC GGCCGCCCGGGCAGGT | 56°C 45'' 72°C 1' 30 Zyklen 72°C 4' |
| PSport1 (Sp6) pCMV-Sport6 (T7) pCMV-Sport2 (T7) pT7T3D-Pac1 (T3) | TM-M13 fwd TM-M13 rev | GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG G CAGGAAACAGCTATGAC | 96°C 2' 96°C 10'' 52°C 5'' 72°C 4' 30 Zyklen 72°C 4' |

Da die Sonde für mDia3 nicht die gesamte cDNA im RZPD-Klon umfasst, wurde davon nur ein kurzes, für mDia3 hochspezifisches Fragment amplifiziert. Dazu wurden spezifische mDia3-Primer mit T7- bzw. Sp6-Linker verwendet. Von dem erhaltenen Fragment wurde dann durch *in vitro*-Transkription die Sonde hergestellt. Diese wird folgendermaßen durchgeführt:

- 1µl Transkriptionspuffer (Roche)
- 1µl 10xDIG RNA-Reaktionsmix (Roche)
- 0,5µl RNase-Inhibitor (Roche)
- 0,5µl RNA-Polymerase (Roche)

Diesem Ansatz werden 1µl linearisierte Plasmid-DNA oder 4µl von oben genannter PCR zugegeben. Mit DEPC-Wasser wird der Ansatz auf 11µl aufgefüllt und für 2h bei 37°C

inkubiert. Um die RNA zu fällen wird das Volumen anschließend mit DEPC-Wasser auf 100µl aufgefüllt, 10µl 4M LiCl und 300µl 100% Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die RNA wird dann mit 14000rpm bei 4°C für 30min zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Schließlich wird die RNA in 55µl DEPC-Wasser aufgenommen, die Qualität der RNA mittels Gelelektrophorese kontrolliert und die Menge an RNA mittels Nanodrop ermittelt. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C.

5.2.3 Biochemie

5.2.3.1 Western Blot

ES-Zellen werden in Lysepuffer lysiert, abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 10min auf Eis wird das Lysat abzentrifugiert und der Überstand (=Gesamtzellextrakt) in Aliquots bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt (Bradford Reagent, Sigma Aldrich). Dazu wird das Bradford-Reagenz 1:4 (Bradford:Wasser) mit Wasser verdünnt und jeweils 5µl Proteinextrakt zu 500µl des Bradford-Wasser-Gemischs gegeben. Nach 5min wird mit einem Photometer die Absorption bei 595nm gemessen und die Konzentration anhand einer BSA-Standardkurve berechnet. Jeweils gleiche Proteinkonzentrationen (20µg) werden für den Western Blot eingesetzt. Dazu werden die Proben auf einem 10%igen SDS Gel bei 80V aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet (Bio-Rad). Vor dem Blotten wird das SDS Gel für 10min in Kathodenpuffer und die PVDF Membran 15s in Methanol, 2min in Wasser und 5min in Anodenpuffer II geschwenkt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur erfolgt wie unten beschrieben. Nach dem Blotten für x min bei xA wird die PVDF Membran zunächst für 2h in 5% Milchpulver/TBST und anschließend über Nacht bei 4°C in Primärantikörperlösung mit 1% Milchpulver/TBST (1:500) überführt. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST wird die Membran für 1h bei Raumtemperatur in Sekundärantikörperlösung in 1% Milchpulver/TBST (1:5000) inkubiert. Die Proteinbanden werden mit Hilfe von ECL Lösung (ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) und dem Biomax MS Film (Kodak) visualisiert. Als Ladekontrolle wird anschließend beta-Actin mit Hilfe des α -Actin Antikörpers (1:5000) und des α -mouse Antikörpers (1:10000) nachgewiesen.

Blot Aufbau: Anode (+), 2x Whatman Papier in Anodenpuffer I,
 1x Whatman Papier in Anodenpuffer II, PVDF Membran, SDS Gel,
 3x Whatman Papier in Kathodenpuffer, Kathode (-)

| <u>10% SDS Trenngel (2 Gele)</u> | | <u>5% SDS Sammelgel (2 Gele)</u> | |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| 5ml | Acrylamid | 0.65 ml | Acrylamid |
| 3.75ml | 4xTris/SDS pH 8.8 | 1.25ml | 4xTris/SDS pH 6.8 |
| 6.25ml | H ₂ O | 3.10ml | H ₂ O |
| 20µl | TEMED | 10µl | TEMED |
| 150µl | 10% APS | 50µl | 10% APS |

5.2.4 Embryologie

5.2.4.1 Herstellung tetraploider Embryonen

CD1 und BDF-1 Weibchen werden superovuliert indem ihnen 100µl PMSG und 46h später 100µl humanes choriones Gonadotropin (hCG) intraperitoneal injiziert werden. Um Embryonen im 2-Zell-Stadium zu erhalten werden weitere 48h später die Eileiter der superovulierten Weibchen entnommen und gespült.

Die Embryonen werden in Mannitol überführt und zwischen zwei Platinelektroden platziert. Durch Anlegen eines Stromes von 0.5-1V wird die Grenzachse der Blastomere senkrecht zur Elektrode orientiert und die Blastomere mit Hilfe eines kurzen elektrischen Impulses (35V für 35µsec) fusioniert. Anschließend werden die Embryonen in M2 Medium gewaschen und in KSOM (Millipore) transferiert. Dieses Protokoll wurde von Nagy et al. übernommen (detailliertes Protokoll in dem Buch „Manipulating the Mouse Embryo“).

5.2.4.2 Herstellung von Chimären aus ES-Zell/tetraploiden Embryo-Aggregaten

Die fusionierten tetraploiden Embryonen werden in KSOM Tropfen unter Mineralöl bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Für die Aggregation werden diejenigen Embryonen eingesetzt, die sich 24h nach der Fusion bis zum 4-Zell-Stadium weiterentwickelt haben. Zunächst werden diese tetraploiden Embryonen mit Tyrode's Lösung behandelt, um die Zonae pellucidae zu entfernen. Anschließend werden die ES-Zellen kurz abtrypsiniert und jeweils ein Zellklumpen von 8-15 Zellen in eine Vertiefung der Aggregationsplatte zwischen je zwei tetraploiden Embryonen platziert. Diese Aggregate wurden über Nacht in KSOM gelagert und am darauffolgenden Tag in die Uteri von E2.5 pseudoschwangeren Mäusen transferiert.

5.2.4.3 Isolierung von Mäuseembryonen

Zur Isolierung der Embryonen an E6.5-E17.5 wird die schwangere Maus durch Genickbruch getötet. Anschließend werden die Embryonen mit dem Uterus aus dem Bauchraum entfernt und in PBS überführt. Unter einem Binokular werden dann die Embryonen einzeln isoliert. Eine detaillierte Anleitung ist im Buch „Manipulating the Mouse Embryo“ zu finden. Die Klassifizierung der Entwicklungsstadien während der Gastrulation erfolgt nach Downs und Davis (Downs und Davis, 1993).

5.2.4.4 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside) Färbung

Frisch präparierte Embryonen (E6.5-11.5) werden für 30 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung fixiert, kurz mit PBS gewaschen und dann über Nacht bei Raumtemperatur in Färbelösung gefärbt. Danach werden die Embryonen nochmals kurz in PBS gewaschen, in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und mit einem Zeiss Lumar. V12 SteREO Mikroskop mit AxioCam MRc5 Kamera fotografiert.

5.2.4.5 *In Situ*-Hybridisierung mit ganzen Embryonen

5.2.4.5.1 Tag 1

Embryonen werden in einem Methanol/PBT Gradienten (75%, 50%, 25%) für je 5min rehydriert und anschließend zweimal für 10min in PBT gewaschen. Dann werden die Embryonen in 3% H₂O₂/PBT für 20min bei Raumtemperatur gebleicht und nochmals dreimal mit PBT für 5min gewaschen. Es folgt ein Postfixierungsschritt mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd für 20min bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit PBT werden die Embryonen für 1-2h bei 70°C in Prehyb-Lösung und letztendlich in Hyb-Lösung über Nacht inkubiert.

| | |
|----------------|--|
| PBT: | 1xPBS, 0.1% Tween-20 |
| Prehyb-Lösung: | 50% Formamid, 5xSSC pH 4.5, 1% SDS, 50µg/ml yeast tRNA, 50µg/ml Heparin |
| Hyb-Lösung: | Prehyb-Lösung, 1µg/ml Sonde |

5.2.4.5.2 Tag 2

Die Embryonen werden dreimal mit vorgewärmter Lösung I für je 30min bei 70°C gewaschen. Lösung I wird dann durch TNT ersetzt und weitere dreimal mit TNT für 5min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wird 1h bei 37°C mit 0,1mg/mg RNase/TNT verdaut und zunächst dreimal für je 30min bei 65°C mit Lösung II und dann dreimal für 5min

bei Raumtemperatur mit MAB gewaschen. Die Embryonen werden dann für 2-3h bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung und anschließend über Nacht bei 4°C in Antikörper-Lösung inkubiert.

Lösung I: 50% Formamid, 5xSSC pH 4.5, 1% SDS
Lösung II: 50% Formamid, 5xSSC pH 4.5, 0.2% SDS
TNT: 10mM Tris HCl pH7.5, 0.5M NaCl, 0.1% Tween-20
MAB: 100mM Maleic Acid, 150mM NaCl, 2mM Levamisole, 0.1% Tween-20, auf pH7.5 mit NaOH
Blocking-Lösung: MAB, 2% BM Blocking Reagent

Antikörper-Lösung: Eine Spatelspitze Embryonenpulver wird für 30min bei 70°C in 5ml Blocking-Lösung gelöst. Dann werden 50µl Schafserum und 0,4µl Anti-Dig Alkaline Phosphatase Antikörper (1:5000) zur gekühlten Lösung zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wird für 10min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Falcon überführt und dieser dann mit Blocking-Lösung/1% Schafserum auf 20ml verdünnt.

5.2.4.5.3 Tag 3

Die Embryonen werden zunächst dreimal kurz und dann über den Tag verteilt stündlich bei Raumtemperatur mit MAB gewaschen. Über Nacht werden die Embryonen ebenfalls in MAB bei 4°C gelagert.

5.2.4.5.4 Tag 4

Die Embryonen werden dreimal für 5min bei Raumtemperatur in NTMT gewaschen und anschließend mit BM Purple im Dunkeln zunächst bei Raumtemperatur und gegebenenfalls über Nacht bei 4°C gefärbt. Nach dem Erreichen des gewünschten Färbegrads werden die Embryonen kurz in PBT gewaschen und anschließend in 4% Paraformaldehyd bei 4°C gelagert bzw. in PBS fotografiert.

NTMT: 100mM Tris HCl pH9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20, 2mM Levamisol

5.2.4.6 Injektion von Tinte in das Gefäßsystem

Um das Gefäßsystem eines Embryos sichtbar zu machen, wird schwarze Tinte in das

schlagende Herz eines Embryos injiziert. Dazu wird der Embryo im Stadium E10.5-E12.5 in PBS isoliert, jedoch nicht die Verbindung zum extraembryonalen Gewebe getrennt. Das Tinten-Wasser-Gemisch (1:1) wird mit Hilfe einer spitzen Injektionskapillare und einer Mundpipette in das noch schlagende Herz injiziert. Sobald sich die Tinte im gesamten Gefäßsystem verteilt hat, wird der Embryo in 4% PFA fixiert.

5.2.4.7 Klären von Embryonen

Zur besseren Visualisierung innerer angefärbter Strukturen wird der Embryo durch einen Methanol-Gradienten in 100% Methanol überführt und dann in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (BABB, 2:19) gegeben. Dies führt dazu, dass der Embryo durchsichtig wird und innere Strukturen gut sichtbar sind.

5.2.4.8 Immundetektion auf ganzen Embryonen

Frisch präparierte Embryonen werden für 20min in 2% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Permeabilisierungslösung für 10min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es folgen eine 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blockinglösung sowie die Immundetektion über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blockinglösung. Am nächsten Tag wird dreimal 10min mit PBT gewaschen und anschließend für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in Blockinglösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Embryonen zwischen Spacern auf Objektträgern in VectaMount eingebettet und an dem konfokalen Mikroskop analysiert.

PBT: 0,1% Tween-20, PBS
Permeab.-Lösung: 100mM Glyzin in PBS
Blocking-Lösung: 10% FCS, 3% Schafserum, 1% BSA, PBT

5.2.5 Histologie

5.2.5.1 Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten

Die Embryonen werden zunächst über Nacht bei 4°C mit 4% PFA fixiert. Dann werden sie in einem Ethanolgradienten dehydriert und für 1h in Xylol inkubiert. Anschließend werden sie für 72h in flüssigem Paraffin bei 65°C gelagert und dann in einen Paraffinblock gegossen, der bei Raumtemperatur erhärtet. Der in Paraffin eingebettete Embryo wird mit einem Rotationsmikrotom in 8-20µm dicke Schnitte geschnitten. Diese Schnitte werden nach Trocknung bei 37°C in Xylol entwacht, in einem Ethanolgradienten hydriert und mit Kernechtrotlösung für 45s gefärbt. Die Schnitte werden anschließend wieder dehydriert und

mit Rotihistol eingedeckelt.

Kernechtrotlösung: 75mM $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ in H_2O aufkochen, dann 1g Kernechtrotpulver zugeben, abkühlen lassen und filtrieren

5.2.5.2 Herstellung von Cryoschnitten

Frisch präparierte Embryonen bzw. Organe werden für 30-60min in Fixier-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden sie kurz mit PBS gewaschen und in 30% Saccharose/PBS überführt. Nach vollständiger Penetration dieser Lösung wurden die Embryonen in 50% OCT/ 15% Saccharose/PBS überführt und wieder bis zur vollständigen Penetration geschwenkt. Nach einem kurzen Waschschrift mit 100% OCT werden die Embryonen mit OCT in Blöcke gefüllt, die dann in Trockeneis/Ethanol erhärtet werden. Die Blöcke werden bei -20°C gelagert und mit einem Cryostat in 6-20 μm dicke Schnitte geschnitten.

Fixier-Lösung: PBS, 0.02% NP-40, 5 mM EGTA pH 8.0, 2 mM MgCl_2 , 1% Formaldehyd, 0.2% Glutaraldehyd

5.2.5.3 Immundetektion auf Cryoschnitten

Die zu färbenden Cryoschnitte werden bei Raumtemperatur aufgetaut und trocknen gelassen. Es folgt ein kurzer Waschschrift in 0,1% Triton X-100/PBS zur Entfernung des OCT. Anschließend wird für 1-2h bei Raumtemperatur in Blockinglösung geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blocking-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag folgen drei Waschschriffe in 0,1% Triton X-100/PBS und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Blockinglösung bei Raumtemperatur. Nach erneutem mehrmaligen Waschen werden die Schnitte in VectaMount mit DAPI eingedeckelt und unter dem konfokalen Mikroskop analysiert.

Blocking-Lösung: 10% FCS, 3% Schafserum, 1% BSA in 0,1% Triton X-100/PBS

5.2.6 Der hemizygote, phänotypen-basierte Screen

5.2.6.1 Durchführung des Screens

In einem primären Screen wurden die GT-ES-Klone mit tetraploiden Embryonen der BDF-1 Linie aggregiert. Mutante Phänotypen wurden in einem sekundären Screen validiert. Die Aggregation einiger ES-Klone führte zur Bildung von möglicherweise chimären Embryonen,

was anhand des X-gal Expressionsmuster beurteilt wurde. Diese Klone wurden mit tetraploiden CD1 Embryonen aggregiert, die ubiquitär ein Fluoreszenzprotein exprimieren, um den Beitrag tetraploider Zellen zum embryonalen Gewebe auszuschließen.

5.2.6.2 Bestätigung der GT-Integrationsstelle

Die vom GGTC ursprünglich ermittelten GT-Integrationsstellen wurden zu einem großen Teil vom GGTC selbst mit Hilfe von Splinkerette PCR verifiziert. Für die restlichen Klone wurden Primer gewählt, die zum einen das Exon aufwärts der Integrationsstelle bzw. die β -Geo-Kassette erkennen. Mit Hilfe einer RT-PCR konnte so das Fusionstranskript nachgewiesen werden. Für einige Klone konnte die genaue Größe des PCR Fragments nicht berechnet werden bzw. stimmte nicht mit der berechneten Größe überein. In diesen Fällen wurden die Produkte der RT-PCR sequenziert.

6 Ergänzende Abbildungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gen- bzw. Proteinstrukturen der im Phänotypenbasierten Screen analysierten Gene. Oben sind jeweils die verschiedenen Isoformen mit Exon/Intron-Strukturen angegeben. Direkt darunter sind die dazugehörigen regulatorischen Bereiche markiert. Im unteren Bereich der Abbildungen ist das Protein mit den jeweiligen Exons und entsprechenden Proteindomänen dargestellt. Die Quelle der Abbildungen ist der Ensembl Genome Browser (ensembl.org).



Abbildung 36: BcoR. 15 Exons, 6442bp. Integrationen: A20062, W096D07: Intron 1; P101H07: Intron 5. Proteindomänen: ANK: Ankyrin-Repeats (Proteininteraktion).

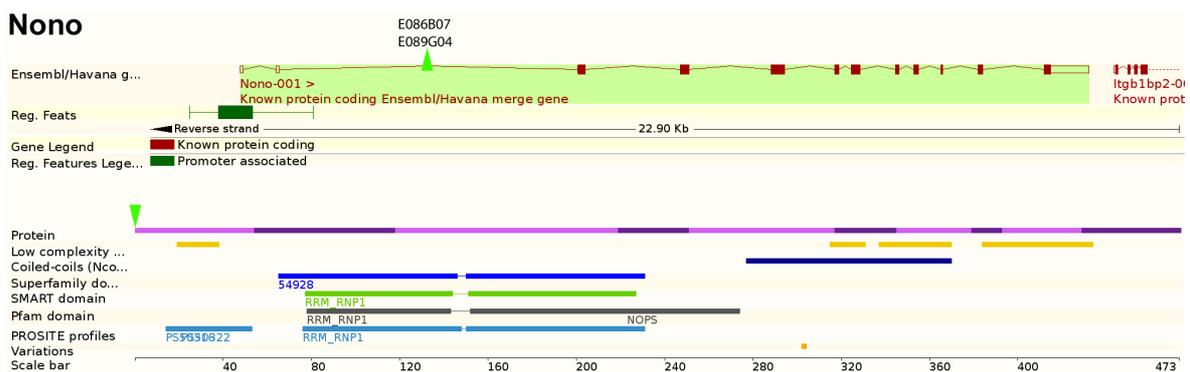


Abbildung 37: Nono. 12 Exons, 2427bp. Integrationen: E086B07, E089G04: Intron2. Proteindomäne: RRM-RNP1: RNA-Bindedomäne.

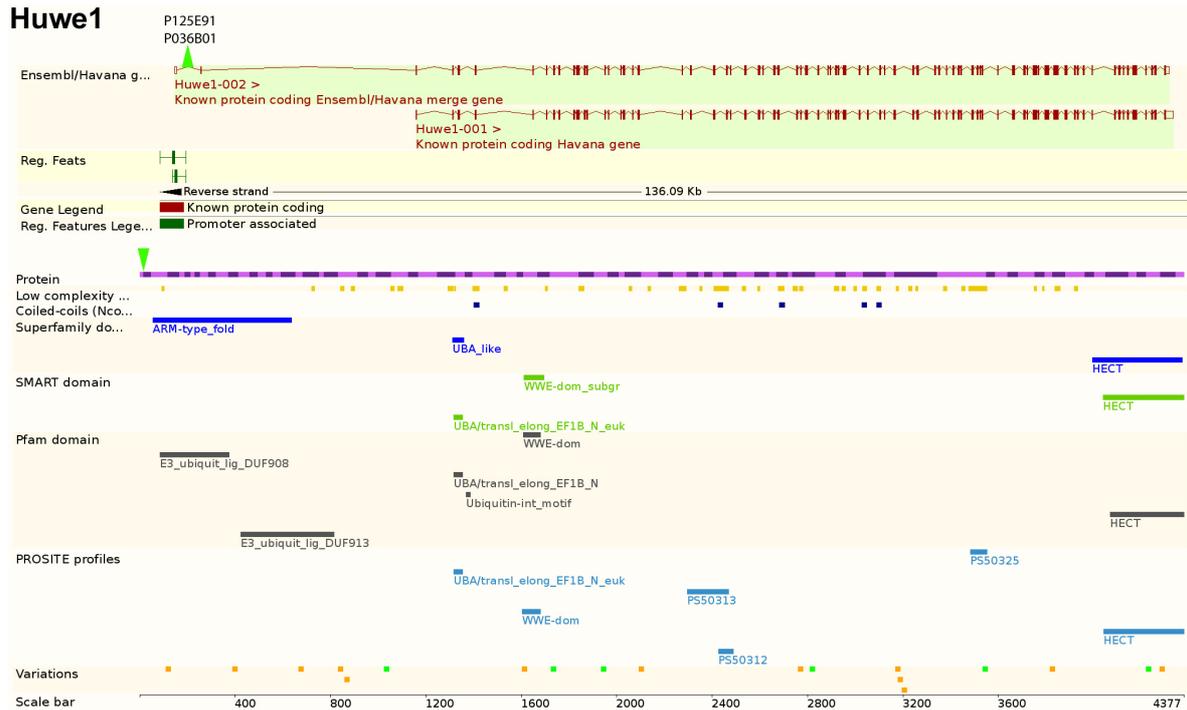


Abbildung 38: Huwe1. 81 Exons, 14168bp. Integrationen: P125E01, P036B01: Intron 1. Proteindomänen: E3: E3 Ubiquitin-Ligase; UBA: Ubiquitin-assoziierte Domäne (Ubiquitin-Bindung).; HECT: Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus (Bindung an E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym).

ATRX



Abbildung 39: Atrx. 35 Exons, 10269bp. Integration: P034D09: Intron 1. Proteindomänen: Znf: Zinkfinger (Bindung des Zielmoleküls); DEAD,SNF2, DNA/RNA-Helicase: Helikase-Aktivität (Entwindung von Nukleinsäuren).

Alg13

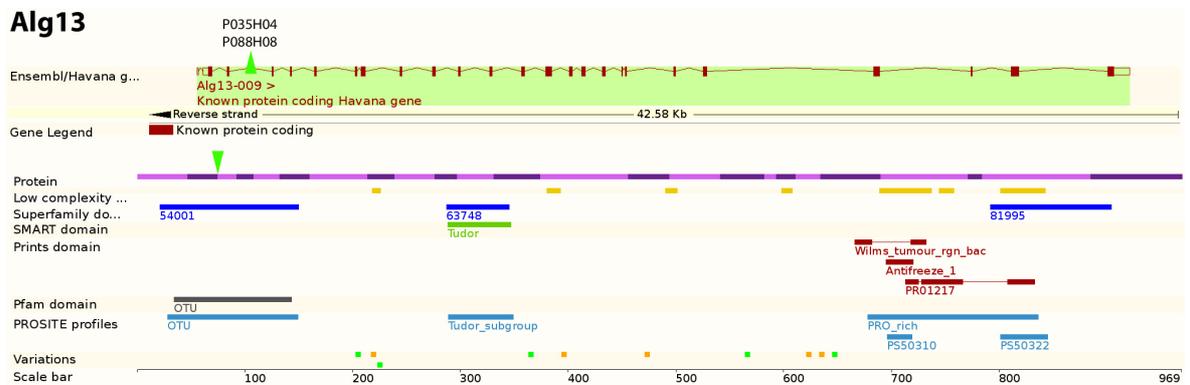


Abbildung 40: Alg13. 25 Exons, 3801bp. Integrationen: P035H04, P088H08: Intron 3. Proteindomänen: OTU: Cystein-Protease (predicted); Tudor: unbekannte Funktion; Wilms-Tumor Protein Region: unbekannte Funktion.

Cul4b

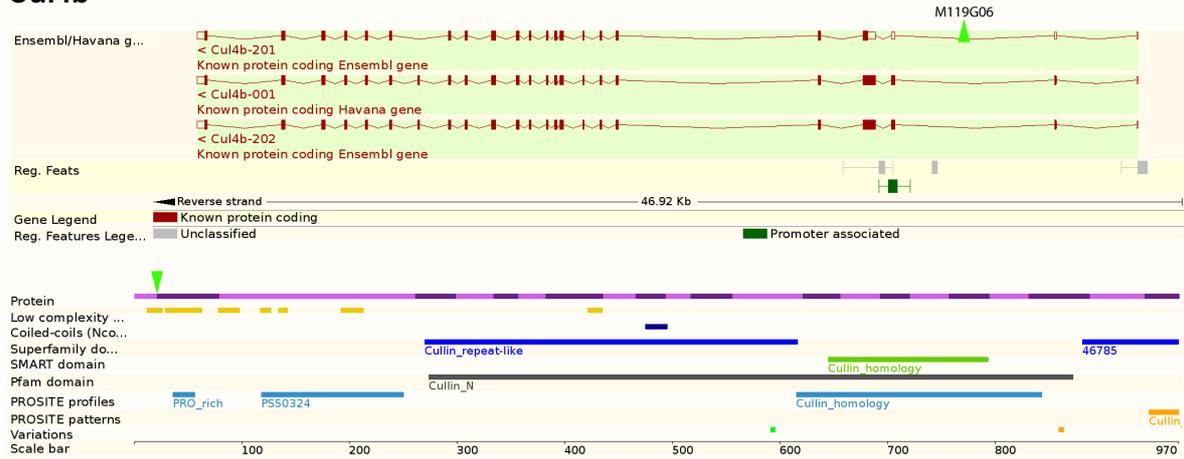


Abbildung 41: Cul4b. 23 Exons, 3344bp. Integration: M119G06: Intron2. Proteindomänen: Cullin-Domänen: Bindung der Ubiquitin-Ligase.

Otud5

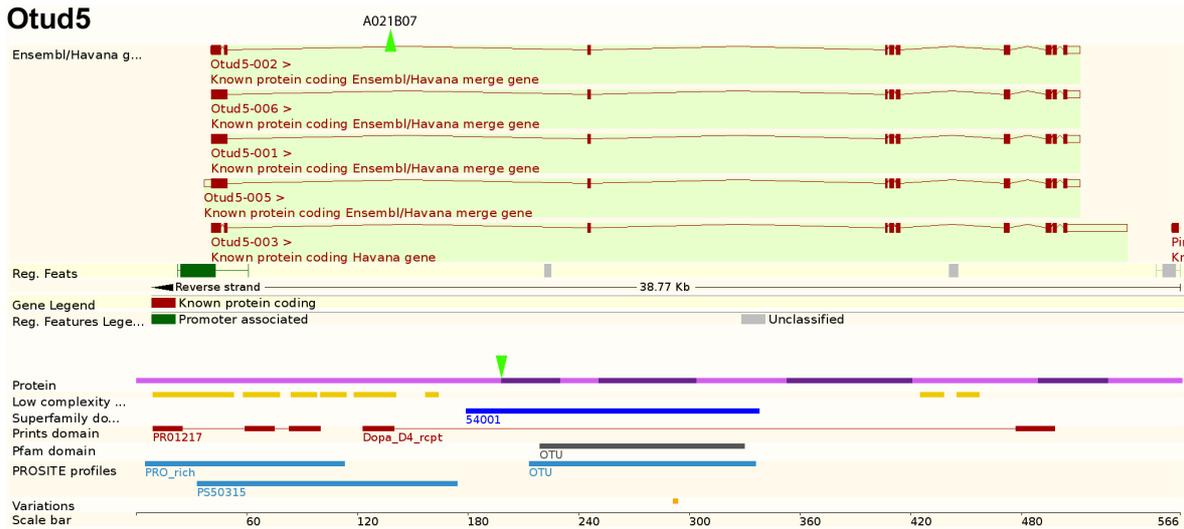


Abbildung 42: Otud5. 9 Exons, 2201bp. Integration: A021B07: Intron 1. Proteindomänen: Dopa D4: Dopamin-Rezeptor; OTU: verwandt mit Ovarian Tumour Gen von Dros. m., unbekannte Funktion.

Jarid1c

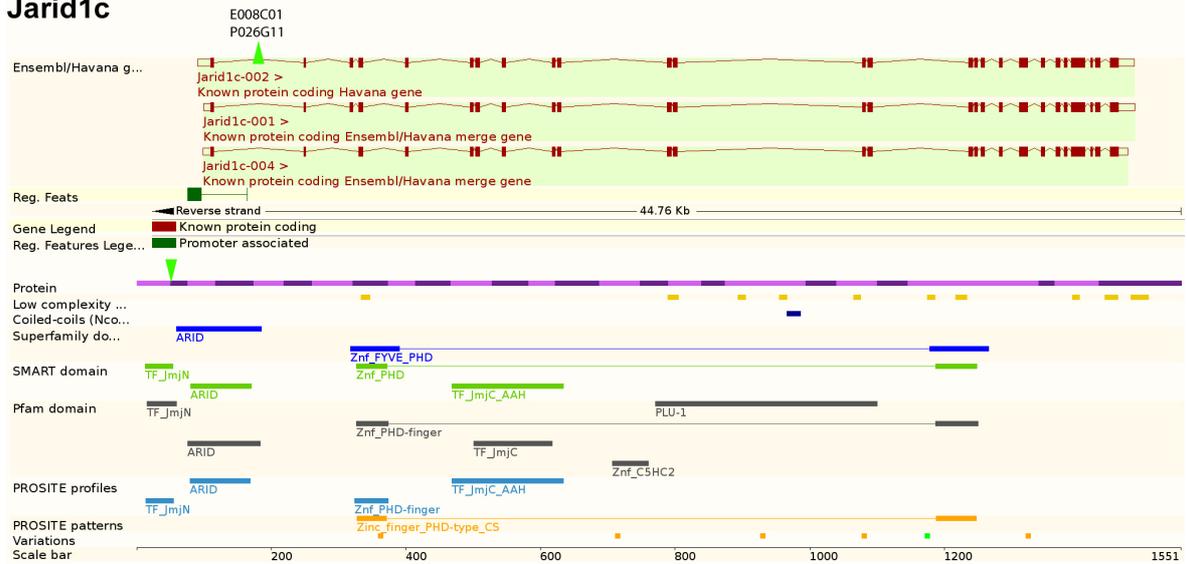


Abbildung 43: Jarid1c. 26 Exons, 5645bp. Integrationen: E008C01, P026G11: Intron 1. Proteindomänen: ARID: Chromatin-Remodellierung; Znf: Zinkfinger (Interaktion mit Zielmolekül).

Rbm41

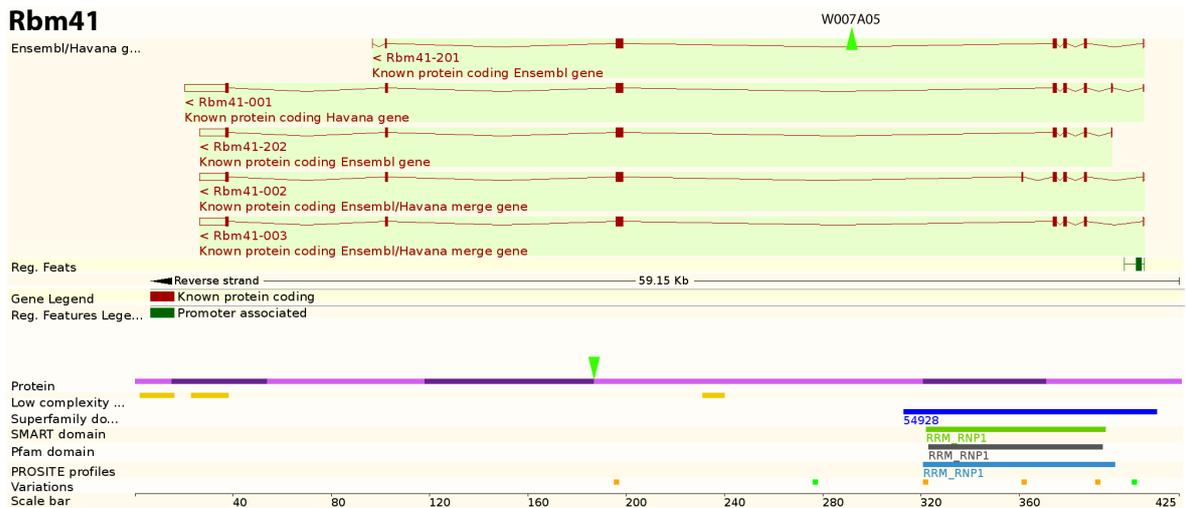


Abbildung 44: Rbm41. 8 Exons, 3691bp. Integration: W007A05: Intron4. Proteindomäne: RRM-RNP: RNA-Bindung.

Rbbp7

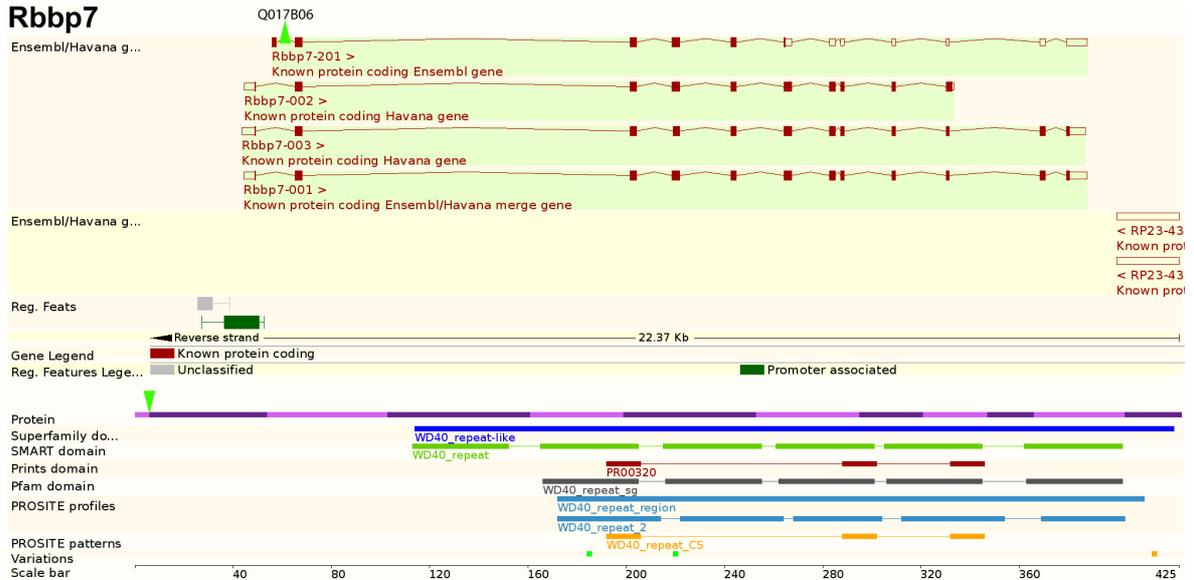


Abbildung 45: Rbbp7. 12 Exons, 1888bp. **Integration:** Q017B06: Intron 1. **Proteindomäne:** WD40: verschiedene Funktionen (Signaltransduktion, Transkriptionskontrolle).

mDia3

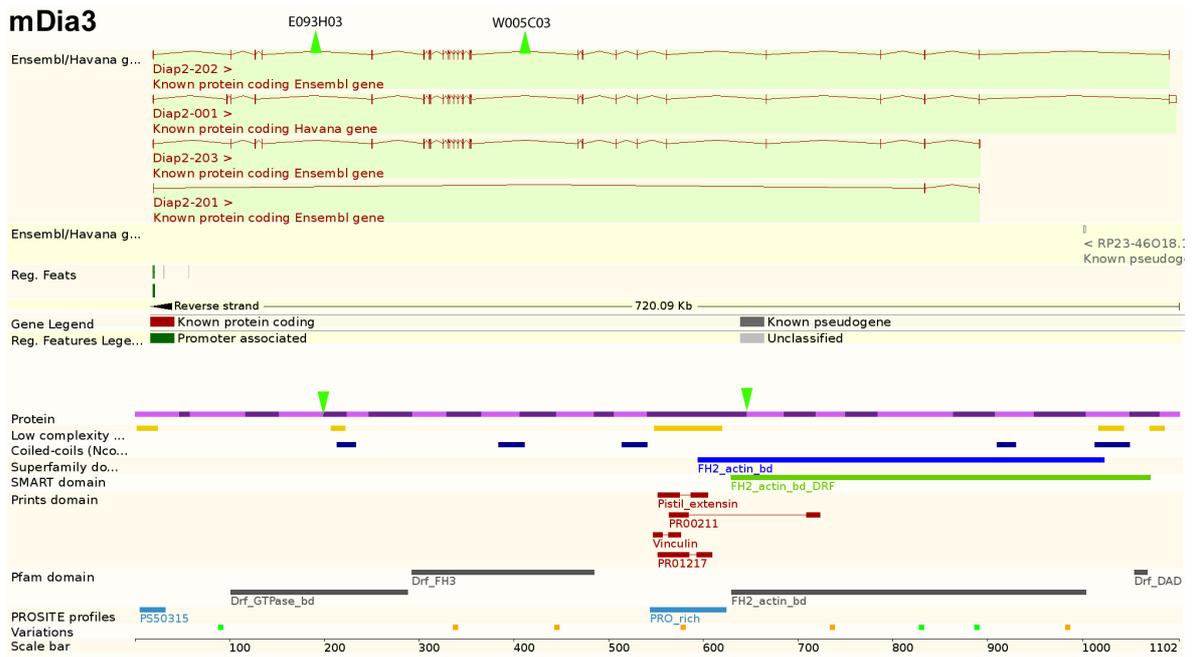


Abbildung 46: mDia3. 27 Exons, 8438bp. **Integrationen:** E093H03: Intron 5; W005C03: Intron 16. **Proteindomänen:** Drf: Rho-Bindung; FH: Formin-Homologie (Zytoskelett-Reorganisation); DAD: Diaphanous Autoregulatorische Domäne.

A830080D01Rik

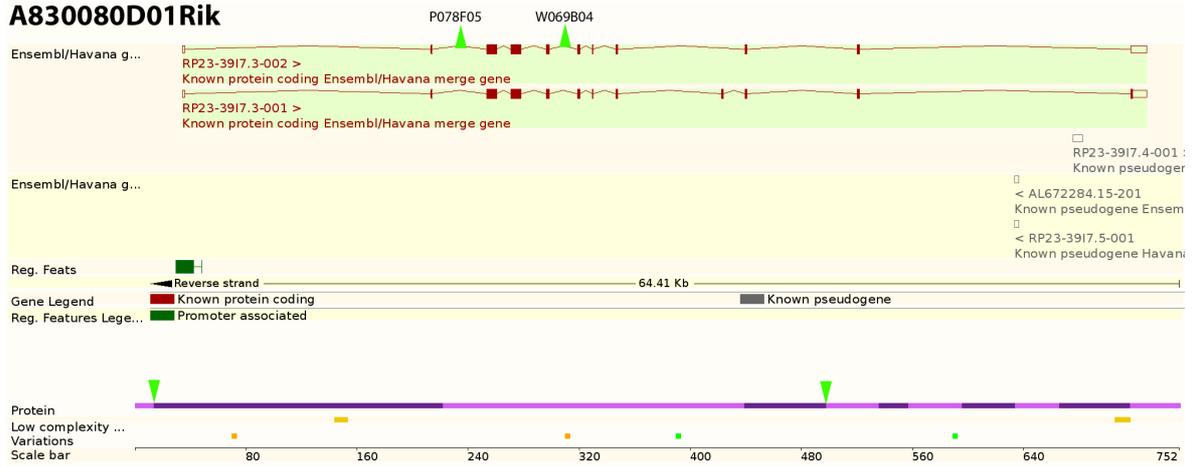


Abbildung 47: A830080D01Rik. 12 Exons, 3366bp. Integrationen: P078F05: Intron 2; W069B04: Intron5. Proteindomänen: unbekannt.

Usp9x

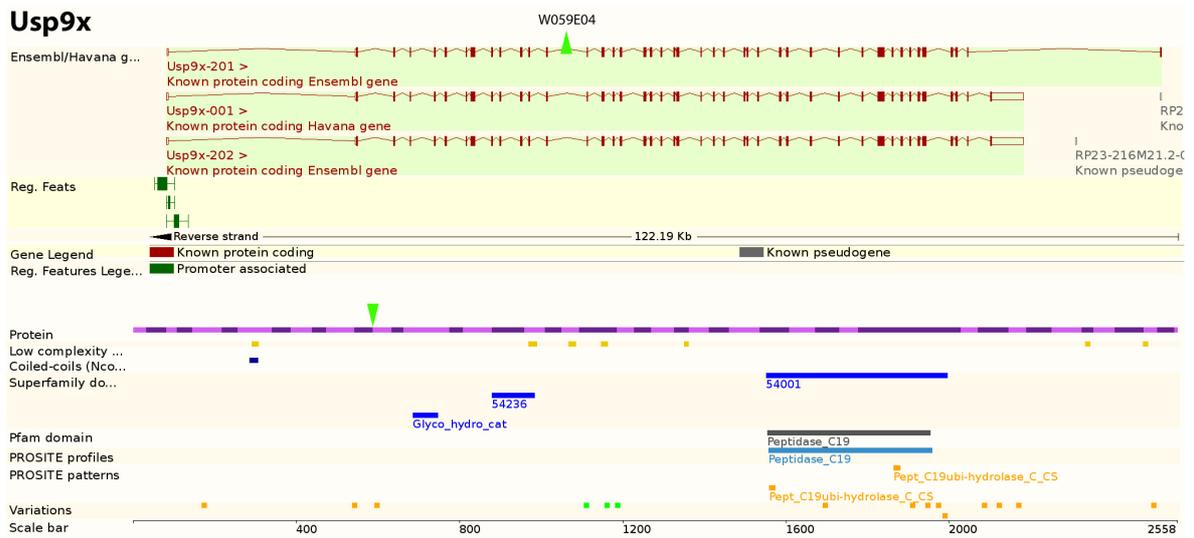


Abbildung 48: Usp9x. 46 Exons, 11885bp. Integration: W059E04. Proteindomänen: Glycohydro: Spaltung glykosidischer Bindungen; Peptidase C19: Ubiquitin-spezifische Peptidase.

Filamin A

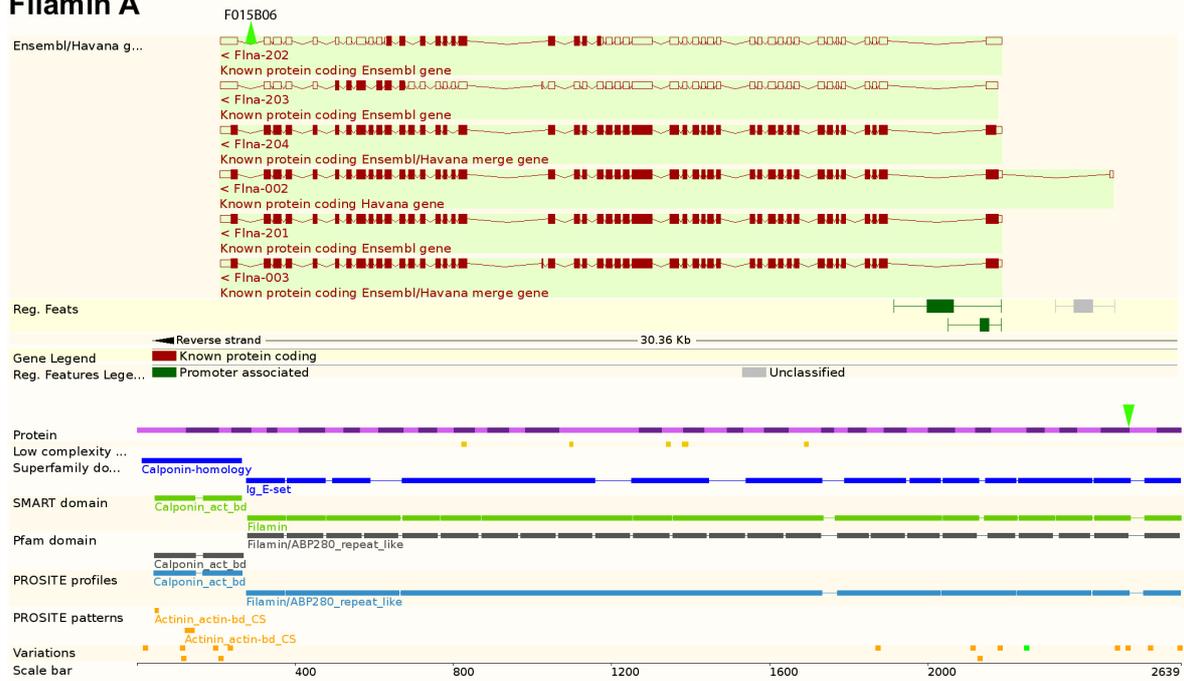


Abbildung 49: Filamin A. 47 Exons, 8456bp. **Integration:** Intron 44. **Proteindomänen:** Calponin-Homologie: Aktin-Bindung; Filamin: bildet spezifische stabförmige Struktur („rod“).

Rbm10



Abbildung 50: Rbm10. 24 Exons, 3564bp. **Integration:** W081D04. **Proteindomänen:** RRM-RNP: RNA-Bindung; Znf: Zinkfinger (Interaktion mit Zielmolekül).

Rab9

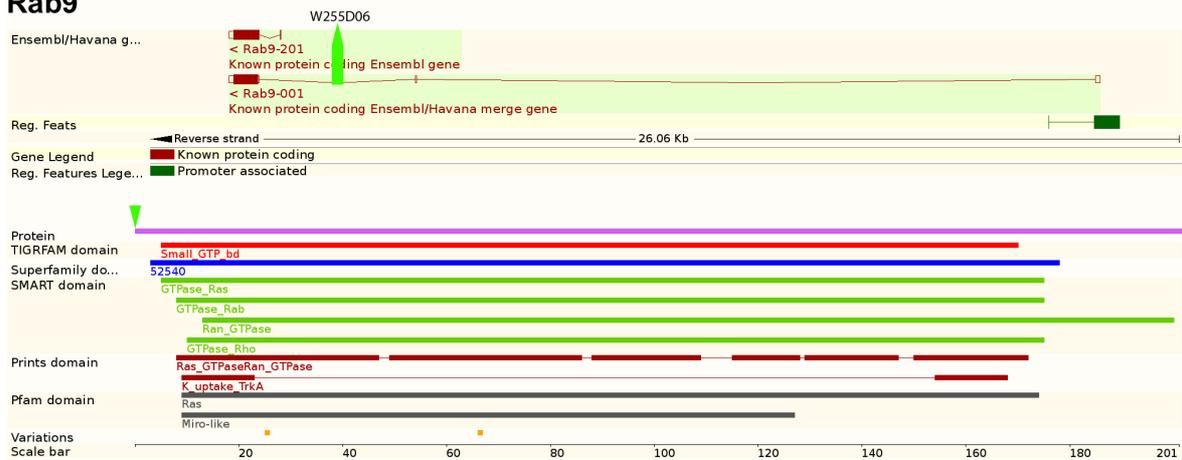


Abbildung 51: Rab9. 3 Exons, 889bp. Integration: Intron 2. Proteindomäne: GTPase: Spaltung von GTP, Regulierung verschiedener Vorgänge.

Med14

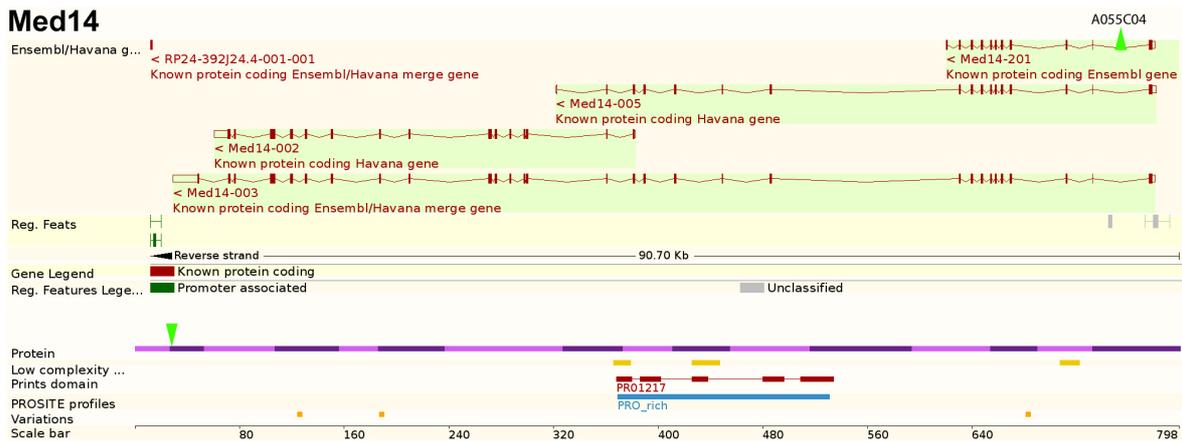


Abbildung 52: Med14. 31 Exons, 6861bp. Integration: A055C04. Proteindomäne: PRO: unbekannt Funktion.

7 Literaturverzeichnis

- Abidi, F. E., L. Holloway, et al. (2008). "Mutations in JARID1C are associated with X-linked mental retardation, short stature and hyperreflexia." J Med Genet **45**(12): 787-793.
- Agulnik, A. I., M. J. Mitchell, et al. (1994). "A mouse Y chromosome gene encoded by a region essential for spermatogenesis and expression of male-specific minor histocompatibility antigens." Hum Mol Genet **3**(6): 873-878.
- Arnold, S. J. and E. J. Robertson (2009). "Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 91-103.
- Averbeck, N., S. Keppler-Ross, et al. (2007). "Membrane topology of the Alg14 endoplasmic reticulum UDP-GlcNAc transferase subunit." J Biol Chem **282**(40): 29081-29088.
- Badri, K. R., Y. Zhou, et al. (2008). "Embryological origin of airway smooth muscle." Proc Am Thorac Soc **5**(1): 4-10.
- Bajolle, F., S. Zaffran, et al. (2006). "Rotation of the myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries." Circ Res **98**(3): 421-428.
- Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1998). "Anterior patterning in mouse." Trends Genet **14**(7): 277-284.
- Berube, N. G., M. Jagla, et al. (2002). "Neurodevelopmental defects resulting from ATRX overexpression in transgenic mice." Hum Mol Genet **11**(3): 253-261.
- Berube, N. G., M. Mangelsdorf, et al. (2005). "The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis." J Clin Invest **115**(2): 258-267.
- Bione, S., C. Sala, et al. (1998). "A human homologue of the Drosophila melanogaster diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility." Am J Hum Genet **62**(3): 533-541.
- Bladen, C. L., D. Udayakumar, et al. (2005). "Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor." J Biol Chem **280**(7): 5205-5210.

- Bockman, D. E. and M. L. Kirby (1985). "Neural crest interactions in the development of the immune system." J Immunol **135**(2 Suppl): 766s-768s.
- Bockman, D. E., M. E. Redmond, et al. (1987). "Effect of neural crest ablation on development of the heart and arch arteries in the chick." Am J Anat **180**(4): 332-341.
- Bondurand, N., A. Kobetz, et al. (1998). "Expression of the SOX10 gene during human development." FEBS Lett **432**(3): 168-172.
- Bowen, N. J., N. Fujita, et al. (2004). "Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes." Biochim Biophys Acta **1677**(1-3): 52-57.
- Brault, V., R. Moore, et al. (2001). "Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development." Development **128**(8): 1253-1264.
- Brennan, J., C. C. Lu, et al. (2001). "Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo." Nature **411**(6840): 965-969.
- Brown, S. A., J. Ripperger, et al. (2005). "PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator." Science **308**(5722): 693-696.
- Buckingham, M., S. Meilhac, et al. (2005). "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells." Nat Rev Genet **6**(11): 826-835.
- Burtscher, I. and H. Lickert (2009). "Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo." Development **136**(6): 1029-1038.
- Cabezas, D. A., R. Slauch, et al. (2000). "A new X linked mental retardation (XLMR) syndrome with short stature, small testes, muscle wasting, and tremor localises to Xq24-q25." J Med Genet **37**(9): 663-668.
- Cambray, N. and V. Wilson (2002). "Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge." Development **129**(20): 4855-4866.
- Cambray, N. and V. Wilson (2007). "Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors." Development **134**(15): 2829-2840.
- Campione, M., H. Steinbeisser, et al. (1999). "The homeobox gene Pitx2: mediator of

- asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping." Development **126**(6): 1225-1234.
- Caspary, T., C. E. Larkins, et al. (2007). "The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture." Dev Cell **12**(5): 767-778.
- Clerc, P. and P. Avner (2006). "Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men." Curr Opin Genet Dev **16**(3): 246-253.
- Collignon, J., I. Varlet, et al. (1996). "Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning." Nature **381**(6578): 155-158.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, et al. (2003). "Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha." Cardiovasc Res **60**(3): 569-579.
- Copeland, S. J., B. J. Green, et al. (2007). "The diaphanous inhibitory domain/diaphanous autoregulatory domain interaction is able to mediate heterodimerization between mDia1 and mDia2." J Biol Chem **282**(41): 30120-30130.
- Copp, A. J., N. D. Greene, et al. (2003). "The genetic basis of mammalian neurulation." Nat Rev Genet **4**(10): 784-793.
- Cox, B. J., Vollmer, M., Tamplin, O., et al. „Phenotypic annotation of the mouse X chromosome." Genome Research (in Revision).
- Dequeant, M. L. and O. Pourquie (2008). "Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis." Nat Rev Genet **9**(5): 370-382.
- DeWard, A. D. and A. S. Alberts (2008). "Microtubule stabilization: formins assert their independence." Curr Biol **18**(14): R605-608.
- Downs, K. M. and T. Davies (1993). "Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope." Development **118**(4): 1255-1266.
- Dymecki, S. M. (1996). "Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6191-6196.

- Eisenmann, K. M., R. A. West, et al. (2007). "T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice." J Biol Chem **282**(34): 25152-25158.
- Etheridge, S. L., S. Ray, et al. (2008). "Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development." PLoS Genet **4**(11): e1000259.
- Faix, J. and R. Grosse (2006). "Staying in shape with formins." Dev Cell **10**(6): 693-706.
- Farrell, M. J., J. L. Burch, et al. (2001). "FGF-8 in the ventral pharynx alters development of myocardial calcium transients after neural crest ablation." J Clin Invest **107**(12): 1509-1517.
- Fox, J. W., E. D. Lamperti, et al. (1998). "Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia." Neuron **21**(6): 1315-1325.
- Friedrich, G. and P. Soriano (1991). "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." Genes Dev **5**(9): 1513-1523.
- Froyen, G., M. Corbett, et al. (2008). "Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation." Am J Hum Genet **82**(2): 432-443.
- Fuchs, S., D. Herzog, et al. (2009). "Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1." Cell Stem Cell **4**(3): 236-247.
- Gasman, S., Y. Kalaidzidis, et al. (2003). "RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase." Nat Cell Biol **5**(3): 195-204.
- Gibbons, R. J., D. J. Picketts, et al. (1995). "Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome)." Cell **80**(6): 837-845.
- Gupton, S. L., K. Eisenmann, et al. (2007). "mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration." J Cell Sci **120**(Pt 19): 3475-3487.
- Guthrie, S. (2007). "Patterning and axon guidance of cranial motor neurons." Nat Rev

Neurosci **8**(11): 859-871.

Hadjantonakis, A. K., S. Macmaster, et al. (2002). "Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal." BMC Biotechnol **2**: 11.

Hamada, H., C. Meno, et al. (2002). "Establishment of vertebrate left-right asymmetry." Nat Rev Genet **3**(2): 103-113.

Hansen, J., T. Floss, et al. (2003). "A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9918-9922.

Heard, E. and C. M. Disteché (2006). "Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome." Genes Dev **20**(14): 1848-1867.

Heasman, S. J. and A. J. Ridley (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 690-701.

Herbarth, B., V. Pingault, et al. (1998). "Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5161-5165.

Hirokawa, N., Y. Tanaka, et al. (2006). "Nodal flow and the generation of left-right asymmetry." Cell **125**(1): 33-45.

Hittelman, A. B., D. Burakov, et al. (1999). "Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins." EMBO J **18**(19): 5380-5388.

Horn, C., J. Hansen, et al. (2007). "Splinkerette PCR for more efficient characterization of gene trap events." Nat Genet **39**(8): 933-934.

Horn, D., M. Chyrek, et al. (2005). "Novel mutations in BCOR in three patients with oculo-facio-cardio-dental syndrome, but none in Lenz microphthalmia syndrome." Eur J Hum Genet **13**(5): 563-569.

Hutson, M. R. and M. L. Kirby (2003). "Neural crest and cardiovascular development: a 20-year perspective." Birth Defects Res C Embryo Today **69**(1): 2-13.

- Hutson, M. R. and M. L. Kirby (2007). "Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations." Semin Cell Dev Biol **18**(1): 101-110.
- Huynh, K. D., W. Fischle, et al. (2000). "BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression." Genes Dev **14**(14): 1810-1823.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, et al. (2001). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1." Nat Cell Biol **3**(1): 8-14.
- Jensen, L. R., M. Amende, et al. (2005). "Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation." Am J Hum Genet **76**(2): 227-236.
- Kaartinen, V., M. Dudas, et al. (2004). "Cardiac outflow tract defects in mice lacking ALK2 in neural crest cells." Development **131**(14): 3481-3490.
- Kalantry, S., S. Purushothaman, et al. (2009). "Evidence of Xist RNA-independent initiation of mouse imprinted X-chromosome inactivation." Nature **460**(7255): 647-651.
- Kameoka, S., P. Duque, et al. (2004). "p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes." EMBO J **23**(8): 1782-1791.
- Kayagaki, N., Q. Phung, et al. (2007). "DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production." Science **318**(5856): 1628-1632.
- Kelly, R. G., N. A. Brown, et al. (2001). "The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm." Dev Cell **1**(3): 435-440.
- Kile, B. T. and D. J. Hilton (2005). "The art and design of genetic screens: mouse." Nat Rev Genet **6**(7): 557-567.
- Kinder, S. J., T. E. Tsang, et al. (2001). "The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm." Development **128**(18): 3623-3634.
- Kinzel, D., K. Boldt, et al. „Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry.“ Dev Cell (in Revision).

- Kioussi, C., P. Briata, et al. (2002). "Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development." Cell **111**(5): 673-685.
- Kioussi, C., P. Briata, et al. (2002). "Pitx genes during cardiovascular development." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **67**: 81-87.
- Kirby, M. L., K. L. Turnage, 3rd, et al. (1985). "Characterization of conotruncal malformations following ablation of "cardiac" neural crest." Anat Rec **213**(1): 87-93.
- Kitamura, K., H. Miura, et al. (1999). "Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism." Development **126**(24): 5749-5758.
- Kuratani, S. C. and M. L. Kirby (1991). "Initial migration and distribution of the cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest." Am J Anat **191**(3): 215-227.
- Kuratani, S. C. and M. L. Kirby (1992). "Migration and distribution of circumpharyngeal crest cells in the chick embryo. Formation of the circumpharyngeal ridge and E/C8+ crest cells in the vertebrate head region." Anat Rec **234**(2): 263-280.
- Lai, S. L., T. H. Chan, et al. (2008). "Diaphanous-related formin 2 and profilin I are required for gastrulation cell movements." PLoS One **3**(10): e3439.
- Lammers, M., S. Meyer, et al. (2008). "Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins." J Biol Chem **283**(50): 35236-35246.
- Larsson, E., X. Zhou, et al. (2007). "RhoA-dependent vascular smooth muscle cell-specific transcription: adding diaphanous formins to the puzzle." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(3): 448-449.
- Lee, J. D. and K. V. Anderson (2008). "Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse." Dev Dyn **237**(12): 3464-3476.
- Lewis, S. L. and P. P. Tam (2006). "Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function." Dev Dyn **235**(9): 2315-2329.
- Liu, C., W. Liu, et al. (2001). "Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c

- activity." Development **128**(11): 2039-2048.
- Liu, Z., D. Miao, et al. (2007). "Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis." Dev Dyn **236**(10): 2889-2898.
- Lohr, J. L., M. C. Danos, et al. (1997). "Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development." Development **124**(8): 1465-1472.
- Lu, C. C., J. Brennan, et al. (2001). "From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 384-392.
- Majesky, M. W. (2007). "Developmental basis of vascular smooth muscle diversity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1248-1258.
- Mak, W., T. B. Nesterova, et al. (2004). "Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos." Science **303**(5658): 666-669.
- Manner, J. (2009). "The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations." Clin Anat **22**(1): 21-35.
- Marques, S., A. C. Borges, et al. (2004). "The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis." Genes Dev **18**(19): 2342-2347.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.
- Medina, C. F., C. Mazerolle, et al. (2009). "Altered visual function and interneuron survival in *Atrx* knockout mice: inference for the human syndrome." Hum Mol Genet **18**(5): 966-977.
- Mitchell, K. J., K. I. Pinson, et al. (2001). "Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development." Nat Genet **28**(3): 241-249.
- Miyagawa-Tomita, S., K. Waldo, et al. (1991). "Temporospatial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimeras." Am J Anat **192**(1): 79-88.

- Nagy, A., E. Gocza, et al. (1990). "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." Development **110**(3): 815-821.
- Nagy, A., J. Rossant, et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8424-8428.
- Ng, D., N. Thakker, et al. (2004). "Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR." Nat Genet **36**(4): 411-416.
- Nishibatake, M., M. L. Kirby, et al. (1987). "Pathogenesis of persistent truncus arteriosus and dextroposed aorta in the chick embryo after neural crest ablation." Circulation **75**(1): 255-264.
- Oberoi, S., A. E. Winder, et al. (2005). "Case reports of oculofaciocardiodental syndrome with unusual dental findings." Am J Med Genet A **136**(3): 275-277.
- Ohtake, F., A. Baba, et al. (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." Nature **446**(7135): 562-566.
- Okamoto, I., A. P. Otte, et al. (2004). "Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development." Science **303**(5658): 644-649.
- Owens, G. K., M. S. Kumar, et al. (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Palazzo, A. F., T. A. Cook, et al. (2001). "mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules." Nat Cell Biol **3**(8): 723-729.
- Papaiannou, V. B., RR. (2005). Mouse Phenotypes, A Handbook of Mutation Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Peng, J., B. J. Wallar, et al. (2003). "Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42." Curr Biol **13**(7): 534-545.
- Pfister, S., K. A. Steiner, et al. (2007). "Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development." Gene Expr Patterns **7**(5): 558-573.

- Phillips, M. T., M. L. Kirby, et al. (1987). "Analysis of cranial neural crest distribution in the developing heart using quail-chick chimeras." Circ Res **60**(1): 27-30.
- Picketts, D. J., D. R. Higgs, et al. (1996). "ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome." Hum Mol Genet **5**(12): 1899-1907.
- Plenge, R. M., R. A. Stevenson, et al. (2002). "Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders." Am J Hum Genet **71**(1): 168-173.
- Qian, Y. W. and E. Y. Lee (1995). "Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast." J Biol Chem **270**(43): 25507-25513.
- Qian, Y. W., Y. C. Wang, et al. (1993). "A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast." Nature **364**(6438): 648-652.
- Rosner, M. H., M. A. Vigano, et al. (1990). "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo." Nature **345**(6277): 686-692.
- Rossant, J. and P. P. Tam (2009). "Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse." Development **136**(5): 701-713.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-5170.
- Schnutgen, F., S. De-Zolt, et al. (2005). "Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7221-7226.
- Shav-Tal, Y. and D. Zipori (2002). "PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins." FEBS Lett **531**(2): 109-114.
- Sheardown, S., D. Norris, et al. (1996). "The mouse Smcx gene exhibits developmental and tissue specific variation in degree of escape from X inactivation." Hum Mol Genet **5**(9): 1355-1360.
- Shmueli, A. and M. Oren (2005). "Life, death, and ubiquitin: taming the mule." Cell **121**(7):

963-965.

- Snarr, B. S., C. B. Kern, et al. (2008). "Origin and fate of cardiac mesenchyme." Dev Dyn **237**(10): 2804-2819.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nat Genet **21**(1): 70-71.
- Srinivas, S. (2006). "The anterior visceral endoderm-turning heads." Genesis **44**(11): 565-572.
- Srivastava, D. (2006). "Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis." Cell **126**(6): 1037-1048.
- Staus, D. P., A. L. Blaker, et al. (2007). "Diaphanous 1 and 2 regulate smooth muscle cell differentiation by activating the myocardin-related transcription factors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(3): 478-486.
- Stayton, C. L., B. Dabovic, et al. (1994). "Cloning and characterization of a new human Xq13 gene, encoding a putative helicase." Hum Mol Genet **3**(11): 1957-1964.
- Stennard, F. A. and R. P. Harvey (2005). "T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart." Development **132**(22): 4897-4910.
- Sutherland, M. J. and S. M. Ware (2009). "Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus." Am J Med Genet C Semin Med Genet **151C**(4): 307-317.
- Tabata, T. (2001). "Genetics of morphogen gradients." Nat Rev Genet **2**(8): 620-630.
- Tahiliani, M., P. Mei, et al. (2007). "The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation." Nature **447**(7144): 601-605.
- Tarpey, P. S., F. L. Raymond, et al. (2007). "Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor." Am J Hum Genet **80**(2): 345-352.
- Uez, N., H. Lickert, et al. (2008). "Sall4 isoforms act during proximal-distal and anterior-posterior axis formation in the mouse embryo." Genesis **46**(9): 463-477.

- van Ijzendoorn, S. C. (2006). "Recycling endosomes." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1679-1681.
- Vintersten, K., C. Monetti, et al. (2004). "Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals." Genesis **40**(4): 241-246.
- Vong, Q. P., K. Cao, et al. (2005). "Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin." Science **310**(5753): 1499-1504.
- Waldo, K., S. Miyagawa-Tomita, et al. (1998). "Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure." Dev Biol **196**(2): 129-144.
- Waldo, K. L., M. R. Hutson, et al. (2005). "Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field." Dev Biol **281**(1): 66-77.
- Waldo, K. L., M. R. Hutson, et al. (2005). "Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart." Dev Biol **281**(1): 78-90.
- Waldo, K. L., D. Kumiski, et al. (1996). "Cardiac neural crest is essential for the persistence rather than the formation of an arch artery." Dev Dyn **205**(3): 281-292.
- Wamstad, J. A. and V. J. Bardwell (2007). "Characterization of Bcor expression in mouse development." Gene Expr Patterns **7**(5): 550-557.
- Wang, D. Z. and E. N. Olson (2004). "Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators." Curr Opin Genet Dev **14**(5): 558-566.
- Watanabe, N., P. Madaule, et al. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." EMBO J **16**(11): 3044-3056.
- Wei, J., B. Chen, et al. (1993). "Smith-Fineman-Myers syndrome: report on a large family." Am J Med Genet **47**(3): 307-311.
- Wen, Y., C. H. Eng, et al. (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." Nat Cell Biol **6**(9): 820-830.
- White, J., L. Johannes, et al. (1999). "Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde

- transport pathway in live cells." J Cell Biol **147**(4): 743-760.
- Wong, C. E., C. Paratore, et al. (2006). "Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin." J Cell Biol **175**(6): 1005-1015.
- Wright, C. V. and M. E. Halpern (2002). "Specification of left-right asymmetry." Results Probl Cell Differ **40**: 96-116.
- Wurst, W. and L. Bally-Cuif (2001). "Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer." Nat Rev Neurosci **2**(2): 99-108.
- Xu, J., P. S. Burgoyne, et al. (2002). "Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain." Hum Mol Genet **11**(12): 1409-1419.
- Yarden, R. I. and L. C. Brody (1999). "BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4983-4988.
- Yasuda, S., F. Ocegüera-Yanez, et al. (2004). "Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores." Nature **428**(6984): 767-771.
- Zaffran, S., R. G. Kelly, et al. (2004). "Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field." Circ Res **95**(3): 261-268.
- Zhang, Y., H. H. Ng, et al. (1999). "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation." Genes Dev **13**(15): 1924-1935.
- Zhu, X. D. and P. D. Sadowski (1995). "Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid." J Biol Chem **270**(39): 23044-23054.
- Zou, Y., Q. Liu, et al. (2007). "Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation." Am J Hum Genet **80**(3): 561-566.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| ADE | Vorderes definitives Entoderm |
| AP | anterioposterior |
| APS | Vorderer Primitivstreifen |
| ATP, ADP | Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat |
| AV-Kanal | Atrioventrikular-Kanal |
| AVE | Anterior viszerales Entoderm |
| BA | Branchialbogen |
| BP | Basenpaare |
| DAD | Diaphanous-Autoregulationsdomäne |
| DD | Dimerisierungsdomäne |
| DID | Diaphanous-Inhibierungsdomäne |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DRF | Diaphanous-related Formin |
| DV | dorsoventral |
| DVE | Definitives viszerales Entoderm |
| EMT | Epitheliale-Mesenchymale Transition |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ES | Embryonale Stammzellen |
| FH | Formin-Homologie-Domäne |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| GEF | Guanosin-Austausch Faktor |
| GGTC | German Gene Trap Consortium |
| GT | Gene Trap (Genfalle) |
| GTP, GDP | Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat |
| HRP | Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) |
| ICM | Inner Cell Mass (Innere Zellmasse der Blastozyste) |
| KB | Kilobasenpaare |
| LR | Links-Rechts |
| MEF | Mausfibroblasten |
| MT | Mikrotubuli |
| NC | Neural Crest, Neuralleiste |
| NCSC | Neural Crest Stem Cell, early Neural Crest Stem Cell |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |

| | |
|----------------|--|
| PD | proximodistal |
| PE | Primitives Entoderm |
| P _i | Phosphat-Rest |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| PTA | Persistierender Truncus Arteriosus |
| RACE | Rapid Amplification of cDNA-Ends |
| RBD | Rho-Bindedomäne |
| RNA, mRNA | Ribonukleinsäure, Messenger-RNA (Boten-RNA) |
| RPM | Rotations per Minute (Rotationen pro Minute) |
| RT | Reverse Transkription |
| SM | Smooth Muscle, Glatte Muskulatur |
| VE | Viszerales Entoderm |
| WT | Wildtyp |
| XC | X-Chromosom |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: A, B) Die Bildung primärer Gewebetypen. Die Blastozyste an E3.5 besteht aus Trophektoderm und innerer Zellmasse (A). Deren Zellen bilden noch vor der Implantation an E4.5 entweder Nanog-positive Epiblastzellen oder GATA6-positive, primitive Entodermzellen (B). C) Die Ausbildung der proximodistalen Achse. Durch den Aufbau eines Nodal-Signalgradienten entsteht die Festlegung der proximodistalen Achse. Der Gradient wird durch zwei unabhängige Rückkoppelungsschleifen gestärkt: a) Pro-Nodal wird am Übergang von extraembryonalem zu embryonalem Gewebe von Furin oder PACE4 gespalten und aktiviert. Nodal im Epiblasten führt zur Hochregulierung von Bmp4 im extraembryonalen Gewebe, was wiederum die Wnt3- Expression im Epiblasten erhöht. Dieses aktiviert den Nodal-Proximal-Epiblast Enhancer (PEE) und erhöht so nochmals die Nodal-Expression. b) Einige Zellen an der Spitze des Embryos bilden das distale viszerale Entoderm (DVE) und exprimieren die Wnt- und Nodal-Inhibitoren Cerberus-like 1 (Cer1) und Lefty1. Dadurch wird die distale Nodal-Expression inhibiert und der Nodal-Gradient nochmals gestärkt. Modifiziert nach Arnold und Robertson, 2009..... 13

Abbildung 2: A) Die epithelial-mesenchymale Transition am Primitivstreifen. Epiblastzellen nähern sich dem Primitivstreifen, wo sie von den erhöhten Konzentrationen an Wnt3, Fgf8 und Nodal beeinflusst werden. Die Zellen lösen sich von der Basalmembran und verlieren ihre Zellpolarität. Bestehende Zell-Zell-Kontakte werden aufgelöst und die Zelle kann ihre Wanderung entlang des Primitivstreifens beginnen. B) Die Bildung verschiedener Zelltypen während der Gastrulation. Die Bildung des embryonalen Mesoderms während der Gastrulation macht morphologisch die anteroposterior Achse deutlich. Während sich posterior der Primitivstreifen bildet, hat anterior das definitive Entoderm das viszerale Entoderm ersetzt. Die verbliebenen Epiblastzellen bilden das Neuroektoderm. Distal bildet sich ein wichtiger Organisator, der Primitivknoten. Modifiziert nach Arnold und Robertson, 2009..... 16

Abbildung 3: Die Derivate des Mesoderms und Ektoderms. Das axiale Mesoderm differenziert sich in das Notochord, welches die Neurulation induziert. Shh- und Bmp-Gradienten legen die dorsoventrale Achse im Neuralrohr fest. Das paraxiale Mesoderm bildet später die Somiten aus. Intermediäres und Seitenplattenmesoderm bilden Urogenitalsystem bzw. Körperwand und Blutkreislauf. 19

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Herzdrehung. A) Eine ventrale Biegung formt aus dem geraden Herzschauch einen gebogenen Schlauch mit ventraler Krümmung. B) Die Torsion um die kranio-kaudale Achse führt zu einer helikal gewundenen Schleife. C) Der kaudale Shift erfolgt wahrscheinlich aufgrund der Stauchung zwischen kaudalem und kranialem Ende. D)

Charakteristisch für die Entwindung sind 1. der Shift des Ausflußtraktes nach links und ventral, 2. der ventrale Shift des primitiven rechten Ventrikels, 3. der Shift des Atrioventrikularkanals nach rechts. Modifiziert nach Männer, 2009.21

Abbildung 5: Ursprung der Zellpopulationen des Herzens. A) Das primäre Herzfeld ist an E7.75 als halbmondförmige Leiste detektierbar. Dorsal dazu liegen die Zellen des zweiten Herzfeldes. B) An E8.25 bildet das erste Herzfeld den geraden Herzschlauch. Die Zellen des zweiten Herzfeldes bilden die Vorläufer des rechten Ventrikels und des Ausflußtraktes (Conotruncus, CT). C) Die Herzdrehung führt dazu, dass Ein- und Ausflußtrakt an E9.5 nebeneinander liegen. Während der Herzdrehung wandern Neuralleistenzellen in den Ausflußtrakt und bilden dort das Septum. Zudem wandern Neuralleistenzellen in die bilateral symmetrischen Arterien der Branchialbögen. D) An E13.5 sind das Herz sowie die Branchialbogenarterien fertig remodelliert. Das Herz besitzt nun zwei Vorhöfe und zwei Ventrikel, die jeweils durch Septen getrennt sind. V, Ventrikel; A, Atrium, CT, Conus Trunkteriosus; RA, rechtes Atrium; LA, linkes Atrium; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; AS, Aortensack; AVV, Atrioventrikularklappe; Ao, Aorta; PA, Pulmonararterie; DA, Ductus Arteriosus. Modifiziert nach Srivastava, 2006.....22

Abbildung 6: Ursprungsorte der vaskulären glatten Muskulatur. Verschiedene Farben repräsentieren unterschiedliche embryonale Ursprungsorte der glatten Muskelzellen. Modifiziert nach Majesky, 2007.24

Abbildung 7: Die Funktionen von Formins. A) Formins wirken als Aktin Nukleatoren indem sie Aktin-Monomere binden und an das positive Ende von F-Aktin anfügen. B) Die Stabilisierung von Mikrotubuli durch Formins kann potentiell auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen: 1. Durch Anlagerung von Formins an die Seiten von polymerisierten Mikrotubuli. 2. Durch Stabilisierung der Mikrotubuli-Enden mit Hilfe von Tip-Complex-Proteinen, wie z.B. EB1 oder APC. Modifiziert nach De Ward und Alberts, 2008.26

Abbildung 8: Die Regulierung von Rho-GTPasen. Rho-GDP ist inaktiv. Durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) wird GDP gegen GTP ausgetauscht, was Rho in den aktiven Status versetzt. Aktives Rho kann nun mit seinem Effektor interagieren. Der Guanin-Nukleotid Exchange Faktor (GEF) beschleunigt die Spaltung von GTP zu GDP+P, so dass Rho wieder inaktiviert wird.27

Abbildung 9: Die Proteinstruktur der Diaphanous-related Formins (DRFs). DRFs weisen drei Formin-Homologiedomänen (FH) auf. Die Diaphanous-Autoregulationsdomäne (DAD) bringt die FH2-Domäne in die Nähe der Diaphanous-Inhibierungsdomäne (DID). Es kommt zur Faltung des Proteins und somit zur Hemmung seiner Funktion. Durch die Bindung von Rho-

GTP an die Rho-Bindedomäne (RBD) wird die Autoinhibierung aufgehoben und das DRF kann seine Funktion ausüben. CC – Coiled Coil-Domäne.....28

Abbildung 10: Die Aktivierung SMC-spezifischer Gene. Extrazelluläre Einflüsse führen zur Aktivierung von RhoA. Der RhoA Effektor Dia1/2 remodelliert das Zytoskelett und verringert den G-Aktin Pool im Zytoplasma, was zur Freisetzung von MRTF-A/B führt. MRTF-A/B werden mit SRF in den Zellkern transportiert und aktivieren dort die Transkription von Genen, die spezifisch für die glatte Muskulatur (SMC) sind. Modifiziert nach Larsson et al., 2007.29

Abbildung 11: Prinzip der Genfalle. XY-ES-Zellen werden mit einem GT-Vektor transfiziert, welcher zufällig in das Genom integriert. Diese Integrationsstelle wird anschließend identifiziert.....32

Abbildung 12: A) Der phänotypen-basierte, hemizygote Screen. GT-ES-Zellen mit X-chromosomaler (XC) Integration werden mit tetraploiden Embryonen aggregiert. Der entstehende Embryo wird kultiviert und in eine scheinchwangere Maus retransferiert. Phänotyp und LacZ-Expressionsmuster der resultierenden Embryonen werden an E9.5 untersucht. B) Vererbungsschema X-chromosomaler Gene. Segregiert das mutierte XC (XM) einer Mutter an die Tochter ist diese nur bedingt betroffen, da sie aufgrund der X-Inaktivierung ein Mosaik ist. Die Vererbung an einen Sohn kann aufgrund der Hemizygotie zu einem mutanten Phänotyp führen. Kreis: Weibchen, Quadrat: Männchen; hell: wildtypischer Phänotyp; dunkel: mutanter Phänotyp.....36

Abbildung 13: Statistik des Phänotypen-basierten Screens. A) Darstellung des humanen XC mit den humanen Homologen der untersuchten Mausgene. Rechts sind die β -Galaktosidase-Expressionsmuster der Aggregationsexperimente angegeben. B,C) Statistik der Phänotypenverteilung der untersuchten Klone (B) bzw. Gene (C).....37

Abbildung 14: Das Phänotyp/Wildtyp-Verhältnis der untersuchten Gene. Gezeigt sind die Verhältnisse des Münchner sowie des gesamten (München + Toronto) Phänotypen-basierten Screens.....38

Abbildung 15: Embryonen mit Defekten während der Gastrulation. A) Wildtyp-Embryo mit wichtigen embryonalen Strukturen. B-G) GT-Klone drei verschiedener Gene führen zu einem Phänotyp während der Gastrulation. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.....41

Abbildung 16: Embryonen mit Defekten während der Neurulation. A) Wildtyp-Embryonen mit Kennzeichnung embryonaler Strukturen. B-K) GT-Klone acht verschiedener Gene führen zu

einem Phänotyp während der Neurulation. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.....44

Abbildung 17: Die Entstehung einer Cardia Bifida in Alg13-GT Embryonen. A) Die Herzvorläufer-Zellen des ersten Herzfeldes (rot) fusionieren in der Mitte und bilden einen Herzschauch, aus dem sich später das Herz mit vier getrennten Kammern entwickelt. B) Bei Alg13-GT Embryonen kommt es nicht zur Fusion der Herzvorläufer. Deshalb entstehen aus den Herzvorläufern der rechten und linken Körperseite jeweils ein Herzschauch. Histologie: Man sieht im Wildtyp an E9.5 (oben) einen primitiven Ventrikel. Alg13-GT Embryonen weisen an E9.5 zwei primitive Ventrikel nebeneinander auf (unten). Paraffinschnitte, Gegenfärbung mit Kernechtrot.....45

Abbildung 18: Embryonen mit Defekten während der Organogenese. Betroffen ist in diesem Fall nur mDia3. A) Vergrößerter WT-Embryo von lateral. B,C) mDia3-GT Embryonen von lateral. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der mDia3-GT Fusion.....48

Abbildung 19: Embryonen mit Wildtyp-Phänotyp. LacZ-positive Bereiche zeigen die Expression der Fusion aus betroffenem Gen und GT-Kassette.....49

Abbildung 20: Rettung des Nono-Phänotyps durch Inversion der GT-Kassette. A,B) Die Flip-Rekombinase wird durch Elektroporation transient in die Nono-GT ES-Zellen eingebracht und invertiert die GT-Kassette (Kasten). Dies führt dazu, dass die ES-Zellen kein LacZ mehr exprimieren (B) und Neomycin-sensitiv sind. Die positiv invertierten ES-Zellen werden für die tetraploide Aggregation eingesetzt. C) Der Western Blot zeigt, dass ein den C-Terminus von Nono erkennender Antikörper kein Nono-Protein in GT-Zellen detektieren kann. Dieser Effekt ist nach Inversion der GT-Kassette aufgehoben. Als Ladekontrolle dient Aktin. D-G) Nono-GT Embryonen zeigen Defekte in der Gastrulation (D-G). Die Embryonen exprimieren ubiquitär LacZ (D,E), während das extraembryonale Gewebe von den tetraploiden Embryonen abstammt und dsRed exprimiert (F,G). H) Die Embryonen des Nono-GT Klons mit invertierter GT-Kassette zeigen an E8.5 einen Wildtyp-Phänotyp. Die Expression von YFP zeigt, dass nur das extraembryonale Gewebe von tetraploiden Zellen gebildet wurde.....52

Abbildung 21: Statistik der Genotypenverteilung der mDia3-GT Mauslinie. Die Statistik beinhaltet Mäuse der 5. und 6. Rückkreuzungs-Generationen auf den Bl6-Mausstamm. Die Genotypisierung erfolgte drei Wochen nach der Geburt. Signifikanz nach Chi-Quadrat: $p=0,33$54

Abbildung 22: Charakterisierung des mDia3-GT Klones E093H03. A) Die Insertion der GT-Kassette erfolgte in Intron 5 des 27 Exons umfassenden mDia3-Gens. In grün sind die für die

RT-PCR verwendeten Primer dargestellt. B) RT-PCR zum Nachweis verschiedener Wildtyp- mDia3-Transkripte sowie des mDia3-GT-Fusionstranskripts, welches sequenziert und mit der bekannten mDia3-mRNA-Sequenz verglichen wurde (*). C) Die Insertion der GT-Kassette in die Rho-Bindedomäne (RBD) führt zur Deletion der stromabwärtsgelegenen Proteindomänen. D) Western Blot mit Gesamtzellextrakten von WT- bzw. mDia3-GT- Herzen. Der mDia3- Antikörper bindet C-terminal (s. Schema in C). Als Ladekontrolle diente acetyliertes Tubulin. E) Genotypisierungsstrategie für mDia3-GT Embryonen. Nachweis des WT- und mDia3-GT Allels sowie des Y-Chromosoms zur Geschlechtsbestimmung. E = Exon.....56

Abbildung 23: Die Expression des LacZ-Reporters und von endogenem mDia3 in ES-Zellen. A) LacZ-Färbung auf mDia3-GT ES-Zellen. B,D) In mDia3-GT ES-Zellen wurde das LacZ-Fusionsprotein (B) bzw. endogenes mDia3 (D) detektiert. C,E) In WT-ES-Zellen wurde endogenes mDia (C) bzw. das LacZ-Fusionsprotein (E) detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Pfeilköpfe markieren die Lokalisation von mDia3 bzw. LacZ.....57

Abbildung 24: Die Kolokalisation von mDia3 mit verschiedenen subzellulären Markern. mDia3-GT und WT-ES-Zellen (A-E) bzw. WT-MEFs (F-H) wurden mit den jeweiligen Markern gefärbt. G und I zeigen Ausschnitte aus F und H. Pfeilköpfe markieren die Lokalisation.....59

Abbildung 25: Die Expression des LacZ-Reporters in mDia3-GT Embryonen. Für die Stadien E6.5-8.0 ist die Orientierung anterior (A) ↔ posterior (P) angegeben. Die Stadien E8.5-12.5 sind von lateral abgebildet. Die Pfeile deuten auf LacZ-positive Zellen. Gestrichelte Linien deuten den Primitivknoten (oben) bzw. den Verlauf des Hinterdarmes (unten) an. BA – Branchialbögen.....61

Abbildung 26: Die Expression des LacZ-Reporters an E12.5. Histologische Schnitte mit Kernechtrot- und LacZ-Färbung. Die Buchstaben markieren die Schnittebenen im Embryo.. .62

Abbildung 27: Die Expression des LacZ-Reporters in der adulten Maus. Links sind jeweils ganze Organe von Wildtyp- bzw. mDia3-GT Mäusen mit LacZ-Färbung abgebildet. Rechts sind die entsprechenden histologischen Schnitte mit Kernechtrot- und LacZ-Färbung. Sternchen markieren endogene LacZ-Expression im Nierenkortex, den Nebenhoden, im Ovar und im Uterus. SMC – glatte Muskelzellen.....63

Abbildung 28: Die endogene Expression von mDia3. Oben: E10.5 WT-Embryo mit Immunfärbung gegen mDia3 im Vergleich zur LacZ-Färbung des mDia3-GT Embryos. Pfeile kennzeichnen Expressionsdomänen. Unten: Histologische Schnitte von adulten WT- Herzen. Kofärbung von mDia3, SM Aktin (glatte Muskelzellen-Marker) und PECAM (Endothel-Marker). Pfeilköpfe kennzeichnen die jeweilige Expression.....64

Abbildung 29: Phänotyp von mDia3-GT Embryonen an E10.5 und E12.5. WT- und mDia3-GT Embryonen mit LacZ-Färbung. Oben: Embryonen an E10.5 mit lateraler Ansicht. Pfeile zeigen den Kopfphänotyp, Pfeilspitzen zeigen Herzdefekte, Sternchen markieren Schwanzdefekte. Unten: Die Vergrößerung des Kopfes von vorne zeigt die Kiefer-Gaumen-Spalte (Pfeil). Die Vergrößerung der Schwanzregionen zeigt die Duplikationen und Auswüchse der Schwanzspitzen (Sternchen). Isolierte Herzen von vorne mit Ausflußtrakt-Defekten (Pfeilspitzen). Der Ausschnitt zeigt den Bereich der Hinterextremitäten-Knospen 1-3 mit in situ-Hybridisierung gegen Pitx2. RA – rechtes Atrium, LA – linkes Atrium, RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel.66

Abbildung 30: Links-Rechts-Defekte in mDia3-GT Embryonen. A) In situ-Hybridisierung gegen den Links-Rechts-Marker Pitx2c. Oben: Ganze Embryonen von lateral. Pfeile markieren den Ausflußtrakt. Unten: Herzen von frontal. Pfeilspitzen zeigen die Expressionsdomäne von Pitx2c. B) In situ-Hybridisierung auf Herzen von frontal gegen den Ausflußtrakt-Marker Bmp4. C) In situ-Hybridisierung gegen den frühen Links-Rechts-Marker Cer12. Der Ausschnitt zeigt die LacZ-Färbung im Primitivknoten eines mDia3-GT Embryos. Pfeilköpfe markieren die LacZ-Expression.....67

Abbildung 31: Analyse des NC-spezifischen mDia3-GT Expressionsmusters. Schema zur Herstellung des NC-spezifischen mDia3-GT Mausmodells. A) LacZ-gefärbtes, adultes Herz eines mDia3-GT Männchens. B) LacZ-gefärbtes, adultes Herz eines konditionellen mDia3-cGT Männchens. C) NC-spezifische LacZ-Färbung in mDia3-GT Embryo. Ausschnitt i: Vergrößerung der Expression in den Branchialbögen. Ausschnitt ii: mit BABB behandelte Embryo. Ansicht der LacZ-Expression von frontal. NC – Neuralleiste, RA – rechtes Atrium, LA – linkes Atrium, RV - rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, BA – Branchialbogen.69

Abbildung 32: Remodellierung der Branchialbogenarterien. Die Branchialbogenarterien III (blau), IV (grün) und VI (rot) werden remodelliert, während die restlichen Branchialbogenarterien zurückgebildet werden. Modifiziert nach Langman, J. „Medical Embryology“, 1981.....70

Abbildung 33: Die Remodelierung der Branchialbogenarterien in mDia3-GT Embryonen. Die Blutgefäße sind mit schwarzer Tinte angefärbt. Die Branchialbögen sind blau gekennzeichnet, die zugehörigen Arterien sind rot beschriftet. li – Blick auf linke Seite, re – Blick auf rechte Seite. Zeichnung modifiziert nach Guthrie, 2007.....71

Abbildung 34: Migration von Neuralleistenzellen. In situ-Hybridisierung auf den NC-Marker Sox10. Die roten Pfeile markieren die NC-Population, die in den Ausflußtrakt auswandert.....72

Abbildung 35: Modell zur Entstehung des mDia3-GT Phänotyps. A) Die korrekte Bildung des OFT wird durch drei Prozesse bestimmt. 1. Migration der frühen NC-Zellen (eNCSCs) in die BA. mDia3-positive Subpopulation der NC-Zellen (NCSCs) wandert abhängig von EGF-RhoGTPase in OFT und führt dort zur Septierung. 2. Kommunikation zwischen Zellen des 2.HF mit NC-Zellen. Unter diesem Einfluß Migration in OFT, dort Elongation des OFT. 3. „Nodal Flow“ im Primitivknoten führt zur Bildung der Links-Rechts-Achse. Spezifische mDia3-Expression im Primitivknoten. Spezifische linksseitige Nodal-Expression induziert die Expression von Pitx2. Pitx2 überträgt Links-Rechts-Achse auf asymmetrische Organe und verursacht OFT Rotation. B) Die Mutation von mDia3-GT hat keinen Einfluss auf Migration der eNCSCs in die BAs. Dort führt die Expression von mDia3-GT zu Remodellierungsdefekten der BAAs, keine Migration der NCSCs in OFT. Wahrscheinlich verlassen die NCSCs Zellzyklus und gehen in die G0-Phase. Keine OFT Septierung. Keine Migration von 2.HF-Zellen in OFT, Elongation bleibt aus. Niedrige Pitx2-Expression führt zum Ausbleiben der OFT Rotation. Das Zusammenspiel der beschriebenen drei Defekte führt zur Ausbildung des PTA. OFT – Ausflußtrakt, BA – Branchialbogen, BAA – Branchialbogenarterie, 2.HF – 2. Herzfeld, eNCSC – frühe Neuralleistenzellen, NCSC – späte Neuralleistenzellen.....81

Abbildung 36: BcoR. 15 Exons, 6442bp. Integrationen: A20062, W096D07: Intron 1; P101H07: Intron 5. Proteindomänen: ANK: Ankyrin-Repeats (Proteininteraktion).....113

Abbildung 37: Nono. 12 Exons, 2427bp. Integrationen: E086B07, E089G04: Intron2. Proteindomäne: RRM-RNP1: RNA-Bindedomäne.....113

Abbildung 38: Huwe1. 81 Exons, 14168bp. Integrationen: P125E01, P036B01: Intron 1. Proteindomänen: E3: E3 Ubiquitin-Ligase; UBA: Ubiquitin-assoziierte Domäne (Ubiquitin-Bindung).; HECT: Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus (Bindung an E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym).....114

Abbildung 39: Atrx. 35 Exons, 10269bp. Integration: P034D09: Intron 1. Proteindomänen: Znf: Zinkfinger (Bindung des Zielmoleküls); DEAD,SNF2, DNA/RNA-Helicase: Helikase-Aktivität (Entwindung von Nukleinsäuren).....115

Abbildung 40: Alg13. 25 Exons, 3801bp. Integrationen: P035H04, P088H08: Intron 3. Proteindomänen: OTU: Cystein-Protease (predicted); Tudor: unbekannte Funktion; Wilms-Tumor Protein Region: unbekannte Funktion.....115

Abbildung 41: Cul4b. 23 Exons, 3344bp. Integration: M119G06: Intron2. Proteindomänen: Cullin-Domänen: Bindung der Ubiquitin-Ligase.....116

| | |
|--|-----|
| Abbildung 42: Otud5. 9 Exons, 2201bp. Integration: A021B07: Intron 1. Proteindomänen: Dopa D4: Dopamin-Rezeptor; OTU: verwandt mit Ovarian Tumour Gen von Dros. m., unbekannte Funktion..... | 116 |
| Abbildung 43: Jarid1c. 26 Exons, 5645bp. Integrationen: E008C01, P026G11: Intron 1. Proteindomänen: ARID: Chromatin-Remodellierung; Znf: Zinkfinger (Interaktion mit Zielmolekül)..... | 117 |
| Abbildung 44: Rbm41. 8 Exons, 3691bp. Integration: W007A05: Intron4. Proteindomäne: RRM-RNP: RNA-Bindung..... | 117 |
| Abbildung 45: Rbbp7. 12 Exons, 1888bp. Integration: Q017B06: Intron 1. Proteindomäne: WD40: verschiedene Funktionen (Signaltransduktion, Transkriptionskontrolle)..... | 118 |
| Abbildung 46: mDia3. 27 Exons, 8438bp. Integrationen: E093H03: Intron 5; W005C03: Intron 16. Proteindomänen: Drf: Rho-Bindung; FH: Formin-Homologie (Zytoskelett-Reorganisation); DAD: Diaphanous Autoregulatorische Domäne..... | 118 |
| Abbildung 47: A830080D01Rik. 12 Exons, 3366bp. Integrationen: P078F05: Intron 2; W069B04: Intron5. Proteindomänen: unbekannt..... | 119 |
| Abbildung 48: Usp9x. 46 Exons, 11885bp. Integration: W059E04. Proteindomänen: Glycohydro: Spaltung glykosidischer Bindungen; Peptidase C19: Ubiquitin-spezifische Peptidase..... | 119 |
| Abbildung 49: Filamin A. 47 Exons, 8456bp. Integration: Intron 44. Proteindomänen: Calponin-Homologie: Aktin-Bindung; Filamin: bildet spezifische stabförmige Struktur („rod“)..... | 120 |
| Abbildung 50: Rbm10. 24 Exons, 3564bp. Integration: W081D04. Proteindomänen: RRM-RNP: RNA-Bindung; Znf: Zinkfinger (Interaktion mit Zielmolekül)..... | 120 |
| Abbildung 51: Rab9. 3 Exons, 889bp. Integration: Intron 2. Proteindomäne: GTPase: Spaltung von GTP, Regulierung verschiedener Vorgänge..... | 121 |
| Abbildung 52: Med14. 31 Exons, 6861bp. Integration: A055C04. Proteindomäne: PRO: unbekannt Funktion..... | 121 |

9 Publikationen

Cox, B.J.* , Vollmer, M.* , Tamplin, O.* , Lu, M., Biechele, S., Gertsenstein, M., van Campenhout, C., Floss, T., Kühn, R., Wurst, W., Lickert, H., Rossant, J. (2010).

"Phenotypic annotation of the mouse X chromosome."

Genome Research **20(8)**: 1154-1164. *Autoren mit gleichwertigem Beitrag

Baur, F., Nau, K., Sadic, D., Allweiss, L., Elsässer H.P., Gilleman, N., de Wit, T., Krüger, I., Vollmer, M., Philipsen, S., Suske, G. (2010).

"Specificity protein 2 (Sp2) is essential for mouse development and autonomous proliferation of mouse embryonic fibroblasts."

PLoS One **5(3)**: e9587.

David, R., Brenner, C., Stieber, J., Schwarz, F., Brunner, S., Vollmer, M., Mentele, E., Müller-Höcker, J., Kitajima, S., Lickert, H., Rupp, R., Franz, W.M. (2008).

"MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1 mediated blockade of Wnt-signalling."

Nat Cell Biol., **10(3)**: 338-345.

Krüger, I., Vollmer, M., Simmons, D.G., Elsässer, H.P., Philipsen, S., Suske, G. (2007).

"Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects."

Dev Dyn., **236(8)**: 2235-2244.

10 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Dr. Heiko Lickert für die Möglichkeit, dieses für mich sehr interessante Projekt in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Mein weiterer besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Wolfgang Wurst, der freundlicherweise die offizielle Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Thomas Floss bedanken, der bei Fragen bezüglich des Phänotypen-basierten Screens stets ein offenes Ohr für mich hatte und deshalb eine große Hilfe für mich war.

Desweiteren möchte ich Brian Cox, Owen Tamplin und Janet Rossant vom Hospital of Sick Children in Toronto danken, die in ihrem Labor ebenfalls den Phänotypen-basierten Screen bearbeiteten und deswegen maßgeblich an der Publikation dieses Projekts beteiligt waren.

Am Institut für Stammzellforschung möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Lickert bedanken, vor allem jedoch bei meinen Kollegen Doris Bengel, Anne Theis, Moritz Gegg und Patrizia Gaillonardo für die viele Hilfe, wissenschaftliche Interaktion und vor allem die schöne Zeit. Auch den restlichen Mitgliedern des Instituts für Stammzellforschung gilt mein großer Dank für die vielen interessanten Interaktionen und zahlreichen lustigen Begebenheiten.

Am Institut für Entwicklungs-genetik möchte ich Denise Herold und Melanie Hollatz für die Hilfe mit den embryonalen Stammzellen danken sowie Adrienne Tasdemir und Susi Weidemann für die zahlreichen Aggregationsexperimente.

Zu guter Letzt gilt mein großer Dank meinen Eltern und meinem Bruder Simon, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und stets hinter mir standen. Dies gilt auch für meinen Lebensgefährten Elian Kool, der in guten und in schlechten Zeiten für mich da war und mir dadurch die Doktorarbeit so angenehm wie möglich gemacht hat. MERCI VIELMAL!

