

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
und dem Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin

DISSERTATION

Die *cis*-regulatorische Landschaft von *PITX1*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johann Philipp Hüttner
aus Berlin

Datum der Promotion: 9.12.2016

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	viii
Abstract	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.1.1 Wie wird DNA zum Protein?.....	2
1.1.2 Genregulation: Welche DNA kann und darf zum Protein werden?	2
1.2 Die <i>cis</i> -regulatorische Landschaft.....	5
1.3 Wachstum und Entwicklung	8
1.3.1 Extremitätenentwicklung.....	8
1.3.2 AER	9
1.3.3 ZPA.....	10
1.3.4 <i>Hox</i> -Gene	10
1.4 <i>PITX1</i>	12
1.4.1 Liebenberg-Syndrom	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material.....	16
2.1 Geräte und Zubehör	16
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.3 Chemikalien.....	17
2.4 Puffer und Lösungen	18
2.4.1 Isolierung genomischer DNA	19
2.4.2 Southern Blot	19
2.4.3 Maus-Embryonale Stammzellkultur	20
2.4.4 Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	21
2.4.5 X-Gal-Färbung von Embryonen	22

2.5	Klonieren	22
2.5.1	Enzyme	22
2.5.2	Vektorsysteme	23
2.5.3	Bakterienstamm	23
2.5.4	PCR Utensilien.....	23
2.5.5	Ladders.....	23
2.5.6	Zellkultur/Maus-ES-Zellkultur.....	23
2.6	Erzeugung und Zucht von Mäusen.....	24
2.7	PC-Programme/Internet–Datenbanken	25
3	Methoden.....	26
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
3.1.1	Gelelektrophorese.....	26
3.1.2	DNA-Isolation.....	26
3.1.3	Amplifikation von DNA-Abschnitten	26
3.2	4C-Sequenzierung.....	30
3.3	Klonierungstechniken	31
3.3.1	pBluescript-Vektor.....	31
3.3.2	Berechnung des Vektor-Insert-Verhältnisses.....	32
3.3.3	LacZ-Kassette.....	32
3.3.4	pGK frt-Vektor	33
3.3.5	Kultivierung von Bakterien	33
3.3.6	Transformation von Bakterien	34
3.4	Durchführung der embryonalen Stammzellkultur	34
3.4.1	Allgemeines	34
3.4.2	Embryonale Fibroblasten	35
3.4.3	Maus-ES-Zellkultur	36
3.4.4	Southern Blot Methode	40

3.5	Histologische Methoden	42
3.5.1	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	42
3.5.2	Herstellung von DIG markierten Sonden	42
3.5.3	Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	43
3.5.4	X-Gal-Färbung von Embryonen	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Primersequenz	46
4.2	PCR.....	46
4.3	Verdau mit NotI	47
4.4	Erste Kolonie-PCR	48
4.5	Verdau PacI/NheI	48
4.6	Zweite Kolonie-PCR	49
4.7	Transfektion.....	50
4.8	Southern Blot.....	50
4.9	Maus-Präparation und LacZ-Färbung.....	52
4.9.1	Konstrukte A-H.....	55
4.10	Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung	65
5	Diskussion	72
6	Schlussfolgerung.....	77
	Anhang	79
	Bibliographie.....	81
	Eidesstattliche Versicherung	87
	Curriculum Vitae	88
	Danksagung	90

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Regulatorische Elemente lenken die Genexpression	5
<i>Abbildung 2:</i> Die Genwüste zentromerisch des <i>Hoxd</i> -Clusters	7
<i>Abbildung 3:</i> Die Genwüste zentromerisch des <i>Hoxd</i> -Clusters in Aktion.....	7
<i>Abbildung 4:</i> Die Maus-Extremität	9
<i>Abbildung 5:</i> Ein Schaltermechanismus im <i>Hoxd</i> -Cluster.....	12
<i>Abbildung 6:</i> Der Vektor pBluescript II KS+	31
<i>Abbildung 7:</i> Der Vektor pGK frt	33
<i>Abbildung 8:</i> Die Klonierungsschritte	37
<i>Abbildung 9:</i> Der Aufbau des Southern Blots	42
<i>Abbildung 10:</i> PCR	47
<i>Abbildung 11:</i> NotI-Verdau	47
<i>Abbildung 12:</i> Erste Kolonie-PCR.....	48
<i>Abbildung 13:</i> Verdau mit PacI/NheI.....	49
<i>Abbildung 14:</i> Zweite Kolonie-PCR	49
<i>Abbildung 15:</i> Der Southern Blot	51
<i>Abbildung 16:</i> Southern Blot der Enhancer-Kandidaten	52
<i>Abbildung 17:</i> Ausschnitte aus der Region um <i>PITX1</i>	53
<i>Abbildung 18:</i> Überblick über Maus-Embryonen verschiedener Inserts	54
<i>Abbildung 19:</i> Konstrukt A	56
<i>Abbildung 20:</i> Konstrukt B	57
<i>Abbildung 21:</i> Konstrukt C	58
<i>Abbildung 22:</i> Konstrukt D	59
<i>Abbildung 23:</i> Konstrukt E	60
<i>Abbildung 24:</i> Konstrukt F	61

<i>Abbildung 25: Konstrukt G</i>	62
<i>Abbildung 26: Konstrukt H</i>	63
<i>Abbildung 27: hs1473</i>	64
<i>Abbildung 28: WMisH von Pitx1, Tag E10.5</i>	66
<i>Abbildung 29: WMisH von Pitx1, Tag E11.5</i>	67
<i>Abbildung 30: WMisH von Pitx1, Tag E12.5</i>	68
<i>Abbildung 31: Die verschiedenen Expressionsmuster an E11.5</i>	69
<i>Abbildung 32: Neurog1-Expression</i>	70
<i>Abbildung 33: Cxcl14-Expression</i>	70
<i>Abbildung 34: Smad5-Expression</i>	71
<i>Abbildung 35: Spock1-Expression</i>	71

Zusammenfassung

Das Humangenomprojekt lieferte der Menschheit vor etwas mehr als zehn Jahren die Entschlüsselung ihres eigenen Erbguts. Um aus dem neugewonnenen Wissen Rückschlüsse ziehen zu können, bedarf es neben einer kontinuierlichen Erforschung der entdeckten Gene auch eines Verständnisses der Flut an Wechselwirkungen, die diesen Mikrokosmos regulieren. Einsicht in die Wechselwirkungen bereitet den Boden für eine Fülle an Anwendungen in der Humanmedizin und darüber hinaus. In vorliegender Arbeit wurde das Gen *PITX1* untersucht, welches für die korrekte Entwicklung der hinteren Extremität verantwortlich ist. Wird es in dieser Funktion gestört und z.B. in der vorderen Extremität unerwartet hochreguliert, entwickelt sich eine als homeotische Transformation bekannte Störung, die als Liebenberg-Syndrom bekannt ist¹. Die entstehende vordere Extremität ähnelt dabei dem Aussehen nach einem Arm, entwickelt aber morphologische Charakteristika der hinteren Extremität².

In dieser Arbeit wurden neun potentiell regulatorische Abschnitte (Enhancer) aus dem Genom um *PITX1* ausgewählt. Sie wurden mithilfe eines LacZ-Reporterkonstrukts auf ihre Funktion *in vivo* hin untersucht. Dazu wurden sie über verschiedene Klonierungsschritte und Transfektion in embryonale Stammzellen eingebracht, die in Mäuse verpflanzt wurden. Die resultierenden Embryonen wurden vor Austragung entnommen und an Tag E11.5 mit einer Lösung behandelt, die bei erfolgreicher Klonierung und gleichzeitiger regulatorischer Aktivität der Abschnitte eine blaue Färbung hervorrief.

Aus den Versuchen resultierten verschiedene, teils überlappende Expressionsmuster, die auf eine vielgestaltige regulatorische Aktivität der untersuchten Kandidaten hinweisen. Die Expression trat auch an Stellen auf, die nicht mit *PITX1* in Verbindung gebracht werden. Trotz einer erfolgreich verlaufenen Klonierung ließ sich kein eindeutiger *PITX1*-Enhancer identifizieren. Zu vermuten bleibt, dass entweder ein einzelner Enhancer verantwortlich ist, aber durch Art des Versuchsaufbaus unentdeckt blieb, oder dass das Zusammenwirken mehrerer Enhancer *in vivo* für die korrekte *PITX1*-Expression verantwortlich ist. Wie die Vielfalt an Expressionsmustern zu der räumlich und zeitlich sehr umschriebenen *PITX1*-Expression führen könnte, muss eingehender untersucht werden.

Abstract

The human genome was sequenced more than ten years ago, still the diversity of gene regulation remains to be elucidated. A plethora of regulatory elements has been found to direct the human genome, the rules that govern this territory are slowly being revealed. In this paper, we aim to better understand the regulatory landscape surrounding the homeotic gene *PITX1*, which has been shown to drive development of the hind limb, and, when ectopically expressed, the forelimb in what has come to be known as the Liebenberg-Syndrome^{1,2}.

We selected eight regulatory elements we believed to be enhancers of *PITX1* after reviewing conservation tracks, histone modifications and 4C Data from our lab. These were then cloned along with a reporter construct, transfected into embryonic stem cells and transplanted into a mouse. The resulting embryos were harvested on day E11.5 and treated with a staining solution which is metabolized by the reporter gene only when the particular enhancer is active, thus indicating its area of influence.

All the Enhancers involved show some sign of staining, though none of the shown expression patterns completely overlaps with the *PITX1*-pattern anticipated. This discrepancy may be owed in part to the setup, as the single main enhancer of *PITX1*, should it exist, may have been shrouded. Also, several enhancers acting simultaneously may in fact drive the expression of *PITX1*, a concept that cannot be investigated with this method. Thus, further research is necessary to fully comprehend genomic interaction at this locus.

Einleitung

1.1 Allgemeines

Der Bauplan unseres Körpers ist im menschlichen Genom festgeschrieben, und dieses zu sequenzieren ist immer günstiger geworden: der Preis fiel von US \$2 000 000 im Jahr 2007 auf etwa US \$1 000 im Jahr 2016. Diese Entwicklung bietet erstmals die Chance, die Basenabfolge im Genom jedes Individuums zu entschlüsseln. Daraus ergeben sich weitreichende Möglichkeiten personalisierter Medizin beispielsweise im Bereich Prävention, Diagnostik und Therapie, deren Vor- und Nachteile sich bereits heute bemerkbar machen. Um jedoch aus dem Wissen um die etwa drei Milliarden Basenpaare eines Genoms auf den untersuchten Menschen schlussfolgern zu können, bedarf es eines detailreichen Verständnisses der molekularen Wechselwirkungen.

Das Fundament ist bereits geschaffen: Das Humangenomprojekt, später das 1000-Genomes Project sowie weitere, auch private Unternehmungen, kartierten das menschliche Genom und stellten diese Daten der Öffentlichkeit zur freien Verfügung. Anfangs konzentrierte sich die Forschung auf den kodierenden Bereich des Genoms, die etwa 1,5% der DNA, die Gene enthielten. Dies geschah aus mehreren Gründen: Man hielt Gene für den funktionell relevantesten Teil des Genoms und konnte mit der Zeit ihren Aufbau und Wirkung besser verstehen. Auch ließen sich über den Ableseprozess der DNA und die daraus folgende Herstellung von Proteinen in der Zelle Vorhersagen machen, die experimentell untermauert oder widerlegt werden konnten. Dieser Ansatz war sehr erfolgreich.

Im Jahr 2004 wurde das internationale Konsortium „Encyclopedia of DNA Elements“ (ENCODE) gegründet mit dem Ziel der systematischen Analyse des nicht-kodierenden Teil des Genoms³. Aus dem Projekt wurden 2012 mehrere Studien veröffentlicht. Eines der bemerkenswertesten Ergebnisse war, dass circa 80% des Genoms eine biologische Funktion zu besitzen scheint⁴, was der gängigen Meinung widersprach, dass nicht-kodierende Sequenzen unwichtiger *junk DNA* entsprächen. Diese „Genwüsten“ zwischen den bekannten Genen enthalten demnach zahllose *cis*-regulatorische Elemente: sogenannte Enhancer, Silencer, Insulator und regulatorische RNAs, welche die Expression der proteinkodierenden Gene regulieren.

1.1.1 Wie wird DNA zum Protein?

Drei Milliarden mal reihen sich im menschlichen Genom die Basenpaare Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin scheinbar zufällig aneinander und bilden so die Bibliothek für alle Vorgänge im Organismus. Benötigt dieser nun für einen bestimmten Vorgang, z.B. den Abbau von Fettreserven, den Aufbau eines Hormons oder die Synthese von Zellverknüpfungen bestimmte Proteine, kann in vielen Zellen die gesuchte Information aus der DNA abgelesen werden. Dazu wird die DNA aus ihrer Speicherform, dem Heterochromatin, abgewickelt, durch den Prozess der *Transkription* abgelesen und in Form einer prä-mRNA kopiert, welche die genaue Spiegelversion des Gens darstellt. Diese wird in verschiedenen Schritten bearbeitet, um die sogenannten Introns herauszuschneiden, die verbleibenden Exons zusammenzufügen und anschließend die reife mRNA zu stabilisieren. Sie kann nun aus dem Zellkern geschleust und in der ihn umgebenden Zellflüssigkeit von bestimmten Zellbestandteilen als Bauvorlage für das gewünschte Protein genutzt werden. In diesem *Translation* genannten Geschehen lagern sich mehrere Enzyme an die mRNA an und beginnen, sie abzulesen. Jeweils drei abgelesene Basenpaare bilden zusammen das Äquivalent einer Aminosäure. Werden etwa 50 bis 100 dieser Aminosäuren aneinandergereiht, spricht man von einem Protein.

1.1.2 Genregulation: Welche DNA kann und darf zum Protein werden?

Wie Regulationsmuster auf der Ebene einzelner Zellen zu einer gleichförmigen räumlichen, zeitlichen und anzahlmäßigen Genexpression führen, ist nur grob bekannt. Betrachtet man im experimentellen Rahmen, also *in vitro*, einzelne Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, Enhancern oder weiteren regulatorischen Elementen, laufen diese sehr unspezifisch ab. Im lebenden Organismus jedoch, also *in vivo*, ist das Resultat des regulatorischen Zusammenspiels eine gleichmäßige, identisch wiederkehrende und gegen variable Umwelteinflüsse gewappnete Entwicklung des Embryos. Einige dieser Elemente werden in Abbildung 1 dargestellt.

Es gibt verschiedene regulatorische Ebenen von Genexpression. Diese lassen sich grob in *cis* und *trans* unterteilen. *Cis*-regulatorisch (von lat. *cis* „diesseits“) sind demnach die Elemente, die sich innerhalb des regulierten Stranges befinden, wie z.B. Promotoren, Enhancer, Repressoren und Isolatoren. Als *trans*-regulatorische (von lat. *trans* „hinüber“) Elemente werden beispielsweise Transkriptionsfaktoren bezeichnet, da sie in der Zelle beweglich sind und so verschiedene Stränge und Zellkompartimente erreichen können. Das Wechselspiel der beteiligten Akteure ist nach unterschiedlich strengen Regeln

geordnet, die dem Ziel dienen, einerseits den erlangten evolutionären Fortschritt eines Organismus zu erhalten und andererseits die Anpassung an stetig wechselnde Lebensbedingungen zu ermöglichen. Evolutionäre Faktoren scheinen sich dabei leichter auf regulatorische Elemente auszuwirken als auf die Gensequenz⁵.

1.1.2.1 Promotoren

Der Promotor liegt am 5'-Ende, also „stromaufwärts“ eines Gens und bildet dessen Transkriptionsstartpunkt (TSS), indem er die Anlagerung der RNA-Polymerasen und weiterer Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Eine erfolgreiche Anlagerung dieses Transkriptionsapparates führt jedoch ohne den Beitrag regulatorischer Elemente nur zu basalen Mengen an mRNA. Eukaryotische Promotoren können sich sehr stark unterscheiden, besitzen jedoch eine als Core-Promotor bezeichnete Kernsequenz, die unmittelbar vor dem TSS liegt und deren transkriptionelle Aktivität maßgeblich beeinflussen.

1.1.2.2 Insulator

Insulator (Isolierende Elemente) hemmen den Einfluss der transkriptionellen Umgebung eines Gens auf die Expression eines anderen Gens. In Wirbeltieren wurden Insulator erstmals 1993 beschrieben⁶. Inzwischen werden zwei Typen unterschieden^{7,8}: Enhancer-blockierende und Barriere-bildende Isolatoren. Erstere liegen zwischen regulatorischen Elementen und Genen, sie inhibieren die Wirkung dieser Elemente auf die Genexpression und schaffen so unabhängig regulierte Abschnitte. Barriere-bildende Isolatoren verhindern die Ausbreitung von kondensiertem Chromatin, welches regulatorische Elemente sonst unterdrücken würde⁹.

1.1.2.3 Enhancer

Enhancer sind kurze, einige hundert bis etwa tausend Basenpaare lange DNA-Abschnitte, die durch das Binden von Promotoren und z.B. Transkriptionsfaktoren die Transkription regulieren. Bei der Entdeckung von Enhancern¹⁰ wurde festgestellt, dass sie Transkription unabhängig von ihrer Lage, Orientierung und Entfernung zum Gen beeinflussen können. Dabei können sie bis zu eine Megabase (mb), also eine Million Basenpaare (bp) entfernt liegen¹¹. Um über so große Entfernungen Einfluss auszuüben, bildet die DNA eine Schleife, welche Enhancer und Promotor in räumliche Nähe zueinander bringt¹²⁻¹⁴. Das menschliche Genom enthält etwa eine Million Enhancer¹⁵, im Schnitt beeinflussen etwa fünf Enhancer einen Promotor¹⁶. Das Expressionsmuster eines

Gens kann kleiner sein als die Summe der Muster der beteiligten Enhancer, weil sie sich gegenseitig beeinflussen^{17,18}.

Funktionell ähnliche Enhancer liegen bei unterschiedlichen Spezies oft^{19,20}, aber nicht immer²¹, im gleichen genomischen Abschnitt. Allerdings kann die Vorhersage von Enhancerfunktion nicht allein am Ausmaß der Konservierung zwischen verschiedenen Spezies orientiert sein²², beispielsweise sind einige Enhancer des Herzens schwach konserviert und trotzdem aktiv²³. Hinzu kommt, dass die regulatorische Landschaft ständigem Umbau unterworfen ist, beispielsweise können bereits kleinere Änderungen einer nicht-regulierenden Basensequenz neue Enhancer generieren²⁴ oder entfernen.

1.1.2.4 Silencer

Silencer teilen im Allgemeinen viele Gemeinsamkeiten mit Enhancern²⁵, wirken jedoch repressiv auf die Genexpression. Es wird vermutet, dass der Unterschied zwischen beiden nur in den Cofaktoren liegt, die sie rekrutieren²⁶. Sie können synergistisch agieren²⁷ und wirken wie Enhancer häufig unabhängig von Orientierung und Lage zu dem Promotor, welchen sie beeinflussen.

1.1.2.5 Chromatinmarks

Chromatin wird der Komplex aus DNA und bestimmten Proteinen genannt, um welche die DNA aufgewickelt (*kondensiert*) wird, 50% dieser Proteine sind Histone. Durch Kondensation kann der DNA-Strang um etwa das 10-50 000fache verkürzt werden, was besonders im Zuge der Zellteilung geschieht. In diesem Zustand kann die DNA jedoch erschwert abgelesen werden, weshalb sie zu diesem Zweck wieder dekondensiert werden muss. Epigenetische Modifikationen der Histone können die Zugänglichkeit des Chromatins verändern und dadurch die Genexpression beeinflussen²⁸. Dies geschieht beispielsweise durch Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung, welche spezifische Wirkungen haben. So steht beispielsweise die Methylierung H3K3me1/2 und die Acetylierung H3K27ac für einen aktiven Enhancer, H3K27me3 und H3K4me1 für Enhancer, die noch aktiviert werden müssen^{29,30}. Histonmodifikationen von Enhancern werden früh in der Entwicklung erstellt und angepasst, sobald spezifische Zelllinien differenzieren. Ihr Vorhandensein kann dem tatsächlichen Genexpressionsmuster zeitlich vorauslaufen³¹.

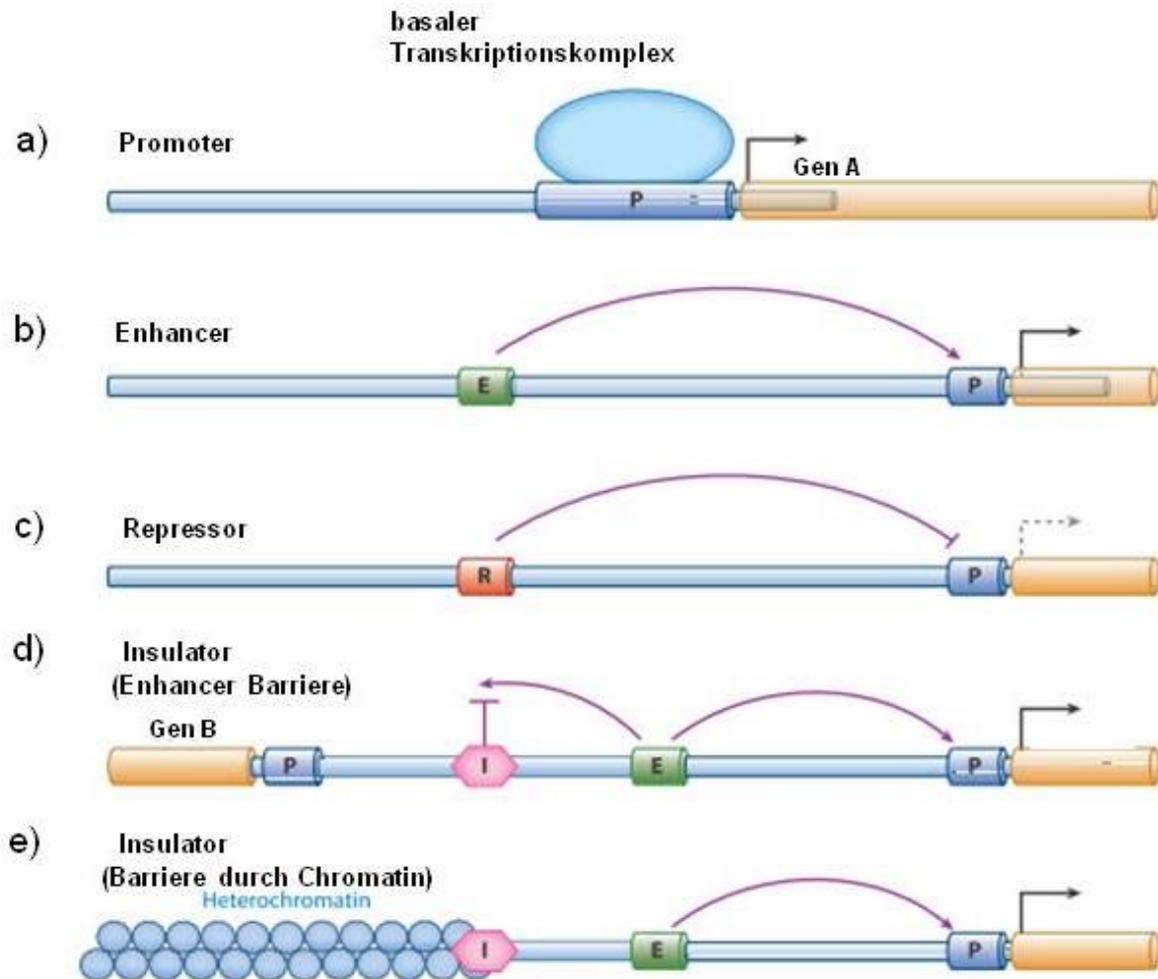


Abbildung 1: Regulatorische Elemente lenken die Genexpression³²

- a) Der Promotor P ermöglicht Expression des Gens A.
- b) Der Enhancer E führt zur Expression des Gens.
- c) Der Repressor R verhindert die Expression des Gens.
- d) Der Insulator I hemmt die Wirkung des Enhancers E auf den linken Promotor.
- e) Der Insulator I verhindert Chromatin-Kondensation, das Gen wird exprimiert.

1.2 Die cis-regulatorische Landschaft

Die Genregulation wird maßgeblich durch unabhängige regulatorische Bereiche gelenkt, die *Topologically Associated Domains* (TADs). Sie unterteilen das gesamte Genom in etwa 1 mb große Bereiche, welche sogar mit dem Lichtmikroskop erkennbar sein können³³. Ihre Grenzen liegen in unterschiedlichen Zelltypen häufig an derselben chromosomalen Stelle und sind zwischen Mensch und Maus hochkonserviert^{34,35}. Werden diese Grenzen in ihrer Funktion gestört, kommt es zu einem Übergreifen der Regulation auf benachbarte regulatorische Domänen, und damit häufig zu einer Missbildung³⁶.

Die Interaktionen innerhalb einer TAD sind relativ unspezifisch, Enhancer können prinzipiell alle Gene regulieren, die sich innerhalb ihres Aktionsradius befinden³⁷ und dieser kann bis mehrere hundert Kilobasen groß sein³⁸. Es kommt dabei nicht zu festen Bindungen sondern vielmehr zu kurzen Interaktionen³⁹, wobei die Potenz eines Enhancers nicht durch seine Fähigkeit zur gezielten Annäherung charakterisiert wird, sondern vielmehr durch das Aufrechterhalten einer Bindung, falls sie zustande kommt. Die gewisse Beliebigkeit der Interaktionen wird dadurch unterstrichen, dass im Rahmen einer schnellen Reaktion auf einen Stimulus ein „Überschwappen“ der spezifischen Aktivierung eines Gens auf unbeteiligte Nachbargene auftreten kann⁴⁰⁻⁴⁴.

In den letzten Jahren wurden effektive Möglichkeiten entwickelt, dieses Zusammenspiel zu erforschen, angefangen mit 3C⁴⁵, über das als Basis für diese Arbeit verwendete 4C⁴⁶ hin zu 5C, Hi-C⁴⁷ und weiteren⁴⁸. Ihnen ist gemein, dass sie Interaktionen zwischen verschiedenen chromosomalen Abschnitten in unterschiedlicher Auflösung zeigen. Bei Betrachtung der Interaktion mithilfe solcher Techniken zeigen sich in „Genwüsten“ häufig einzelne besonders aktive Inseln regulatorischer Elemente. Sie scheinen mittels Schleifenbildung der DNA genomische Entfernungen überbrücken zu können, um ihre regulatorische Funktion auszuüben¹²⁻¹⁴. Dieses Bild einer Inselgruppe mitsamt regulierter Gene führte zur Prägung des Begriffs *regulatorischer Archipel*⁴⁹ (Abbildung 2, 3).

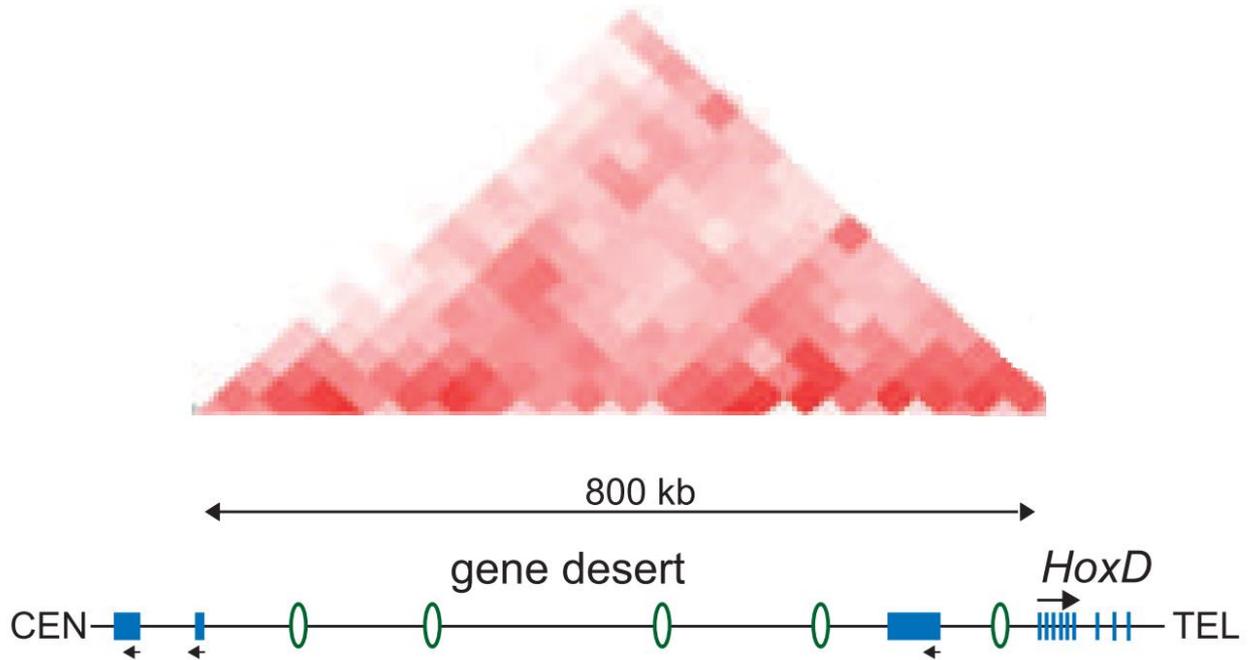


Abbildung 2: Die Genwüste zentromerisch des *Hoxd*-Clusters⁴⁹

Blau: Einzelne Gene. Grün: Regulatorische Inseln. In der Zusammenschau ergibt sich das Bild eines regulatorischen Archipels, dessen Interaktionen auf die TAD begrenzt bleiben (rote Pyramide).

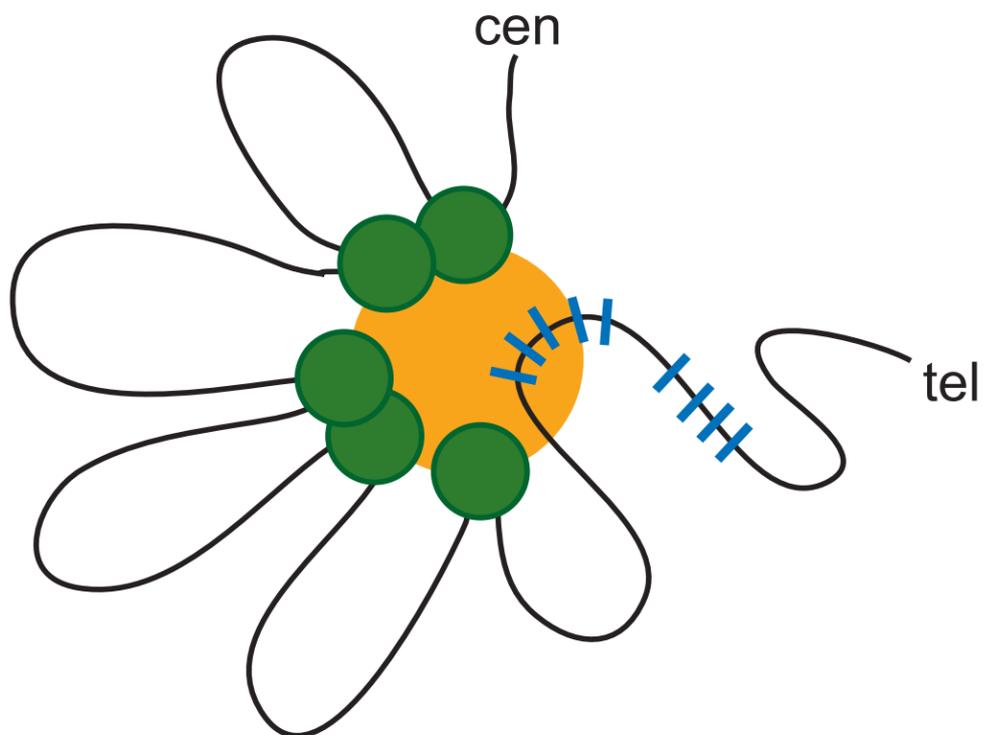


Abbildung 3: Die Genwüste zentromerisch des *Hoxd*-Clusters in Aktion⁴⁹

Schleifenbildung führt zur Annäherung regulatorischer Elemente (Grün) an den Ort verstärkter Genexpression (Orange) des Hox-Clusters (Blau).

1.3 Wachstum und Entwicklung

1.3.1 Extremitätenentwicklung

In der Entwicklung des Embryos werden drei Keimblätter ausgebildet, das Ekto-, Meso- und Entoderm. Nach Anlage der Primärachse des Embryos kommt es sehr früh zur Ausbildung der Extremitätenanlage. Dabei bildet sich aus dem lateralen Plattenmesoderm eine Extremitätenknospe⁵⁰, die dann zur Extremität heranwächst. Bei Wirbeltieren werden die Extremitäten paarig angelegt und zur Fortbewegung oder als Greifwerkzeuge genutzt. Bei Vertebraten werden dabei Vorder- und Hinterextremitäten unterschieden, bei Tetrapoden entwickelte sich Fünffingrigkeit (Pentadaktylie). Die Entwicklung von Extremitäten geschieht bei der Maus etwa zwischen dem 9. und 13. Tag, beim Menschen in der Zeit zwischen der 5. und 8. Woche. Diese Entwicklung beginnt mit der Ausstülpung der Extremitäten, indem sich sowohl das schmale Ektoderm sowie das darunter liegende Mesoderm vorwölben. Dabei werden drei Achsen unterschieden, die proximo-distale (Schultern-Fingerspitze), die anterior-posteriore (Daumen-fünfter Finger) und die dorso-ventrale (Handaußenseite-Handinnenfläche). Die Entwicklung läuft in allen drei Achsen simultan ab und ist räumlich und zeitlich stark vernetzt. Einige der Faktoren, die diese Vernetzung bewirken, werden im Folgenden angesprochen. Dabei können sie zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung eine dafür tragende Rolle spielen, zu anderen jedoch nebensächlich sein oder eine andere Funktion aufweisen⁵¹.

Es bilden sich drei Abschnitte der Extremität aus, wie Abbildung 4 zu entnehmen ist: Stylo-, Zeugo- und Autopod. Dabei wandert die spätere Muskulatur von den Somiten in die Extremitätenknospe⁵². Später kommt es zur Apoptose der Zellen zwischen den Finger- und Zehenanlagen, damit ist die Extremitätenentwicklung weitgehend abgeschlossen.

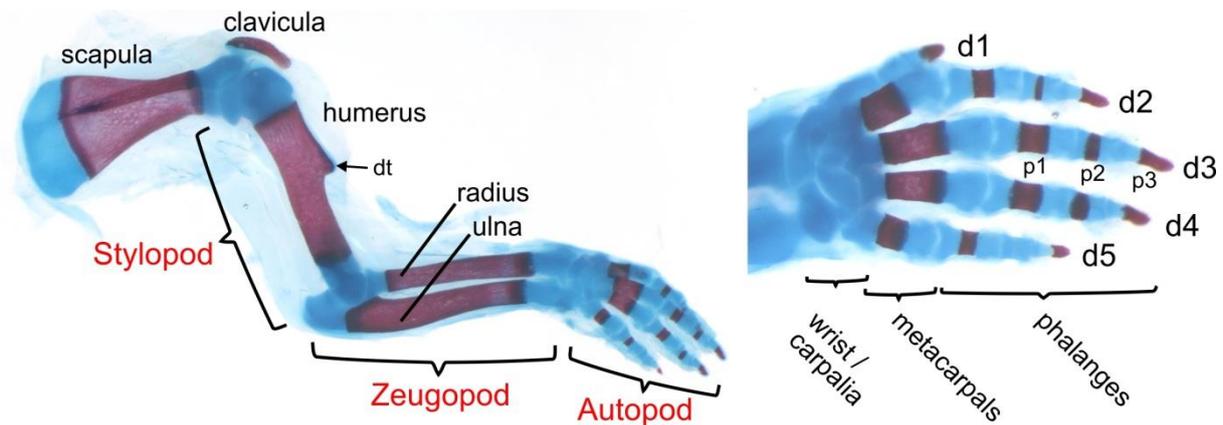


Abbildung 4: Die Maus-Extremität⁵³

Wie die Maus-Extremität besteht auch die menschliche Extremität aus Stylo-, Zeugo- und Autopod.

Die starke Reproduzierbarkeit der zeitlichen und räumlichen Entwicklung erfolgt aufgrund des konzertierten Wirkens mehrerer regulatorischer Elemente und Schlüsselgene, die in spezifischen Bereichen der Extremitätenknospe exprimiert werden. Die wichtigsten Bereiche sind dabei die apikale Randleiste (Apical Ectodermal Ridge, AER) sowie die Zone polarisierender Aktivität (ZPA).

1.3.2 AER

Bei der Knospung der Extremitäten ist das Mesoderm von einer dünnen Lage Ektoderm überzogen, dessen distales Ende leicht verdickt ist. Dies ist die AER, eine vorübergehende embryonale Struktur, die bei Geburt nicht mehr nachweisbar⁵⁴, aber in der Entwicklung der proximo-distalen Achse einer Extremität von großer Bedeutung ist. Saunders und Gasseling zeigten 1948 im *Journal of Experimental Biology*, dass früh in den Bereich der Hühner-AER eingebrachte Markersubstanzen nach Entwicklung der Extremität entlang der Proximo-Distalen Achse verstreut liegen⁵⁵. Die Extremität entwickelte sich fehlerhaft oder gar nicht, wenn sie das apikale Ektoderm früh entfernten. Dies ist umso gravierender, je früher es geschieht. Bei Entfernen dorsaleren Ektoderms war dies nicht der Fall.

Ihre Wirkung entfaltet die AER durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factors, Fgf), von denen bisher 22 identifiziert wurden. Die häufigsten im Bereich der AER vorkommenden Fgfs sind Fgf4, 8, 9 und 17. Diese Signale zu entfernen verursacht Mißbildungen^{56,57}, welche jedoch durch Einbringen von Fgf-besetzten Perlen verhindert werden können⁵⁸. Fgf8 ist dabei der charakteristische Marker für die AER. Seine Expression überschneidet sich zeitlich und räumlich am stärksten mit der AER und

geht dieser etwas voraus^{59,60}. Scheinbar ist jedoch für die Entwicklung vor allem die Gesamtdosis an Fgfs zu einem gegebenen Zeitpunkt entscheidend, nicht jedoch der Beitrag eines einzelnen Fgf⁶¹.

Direkt unter der AER liegt die Progress-Zone. Sie besteht aus mesenchymalen Stammzellen, die im Zuge der Extremitätenentwicklung ausdifferenzieren und dadurch einen großen Teil der Extremität formen. Die AER fördert dabei das Auswachsen der Progress-Zone, welches stoppt, sobald das AER entfernt wird oder seine Funktionalität verliert⁶².

1.3.3 ZPA

Die ZPA beeinflusst die Entwicklung der Extremitäten vor allem in anteroposteriorer Richtung. Sie wurde 1968 von Saunders und Gasseling entdeckt⁶³, als sie beim Verpflanzen verschiedener Extremitätenabschnitte auf eines stießen, was zu einer gespiegelten Extremitätenmorphologie führte. Wolpert formulierte 1981 das Modell der „Französischen Fahne“, wonach der Konzentrationsgradient eines von diesem ZPA ausgehenden, damals noch unbekanntem Moleküls in drei Stufen vorkommt (Schematisch blau-weiß-rot, wie die Tricolore) und so die drei Strahlen im Flügel eines Hühnerembryos formt. Dieses Molekül wurde 1993 entdeckt und Sonic Hedgehog (Shh) getauft⁶⁴.

1.3.3.1 Shh

Sonic Hedgehog (*Shh*) ist ein Schlüsselgen der Extremitätenentwicklung⁶⁵, der Entstehung des ventralen Neuralrohrs sowie der ventralen Somiten⁶⁶ und ist der prominenteste und am besten erforschte Vertreter der Familie der Hedgehog (Hh) Proteine. Es wird in der ZPA gebildet und diffundiert in das umliegende Gewebe. Dort induziert es durch Bindung an den Rezeptor Patched (Ptc) den intrazellulären Hedgehog-Signalweg. Die Mechanismen der Signaltransduktion der Hedgehog-Familie scheinen sich seit der Trennung der Wirbeltiere von den Wirbellosen vor etwa einer Milliarde Jahren⁶⁷ in beiden unabhängig weiterentwickelt zu haben. Daher ist anzunehmen, dass die Anlage und frühe Ausprägung von Extremitäten phylogenetisch sehr alt ist.

1.3.4 Hox-Gene

Die *Hox*-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren und sind für die Gliederung der kranio-kaudalen Körperachse des Embryos zuständig. Zusätzlich bestimmen sie den Ort sowie den Typ von Extremitäten, die gebildet werden. Sie sind in vier Gruppen angeordnet,

HoxA-D, unterteilt in 13 homologe Blöcke mit insgesamt 39 Genen, welche vermutlich aus Tandem-Genkopierungen hervorgegangen sind. Die Gene sind linear angeordnet und werden in ebendieser Reihenfolge abgelesen. Dieses Phänomen der *Kollinearität* besagt, dass ihre Reihenfolge direkt mit dem Zeitpunkt und der Region ihrer Expression korreliert. Gene am 3'-Ende werden zu einem frühen Zeitpunkt anterior z.B. in der Nähe des Kopfes exprimiert, während Gene am 5'-Ende später und posterior exprimiert werden. Gene derselben paralogen Gruppe werden zum selben Zeitpunkt und am selben Ort exprimiert. Wird ihre Reihenfolge oder die regulatorische Region verändert, resultiert dies in veränderter Genexpression. Die *Hox*-Gene sind im sogenannten *Hox*-Cluster organisiert, der von zwei TADs mit einer Gesamtgröße von etwa 1,3 mb reguliert⁴⁹ wird. Dadurch wird die Extremitätenentwicklung in zwei unabhängigen Phasen geteilt^{68,69} und durch unterschiedliche Enhancergruppen auf beiden Seiten des Genclusters kontrolliert^{34,49,70}. Der Wechsel zwischen den Phasen wird durch einen Schalter im zentralen *Hox*-Cluster vollzogen (Abbildung 5). Dieser Schalter besteht aus den Genen *Hoxd 9-11*, welche von der frühen telomerischen Regulation zur späten zentromerischen wechseln. Der Bereich zwischen beiden TADs entwickelt sich zum Handgelenk. Das Ende der frühen Phase geht fließend in den Beginn der späten Phase über⁶⁹. Das Vorkommen unterschiedlicher regulatorischer Module deutet darauf hin, dass proximale und distale Anteile der Extremitäten unterschiedliche Entwicklungsgeschichten haben.

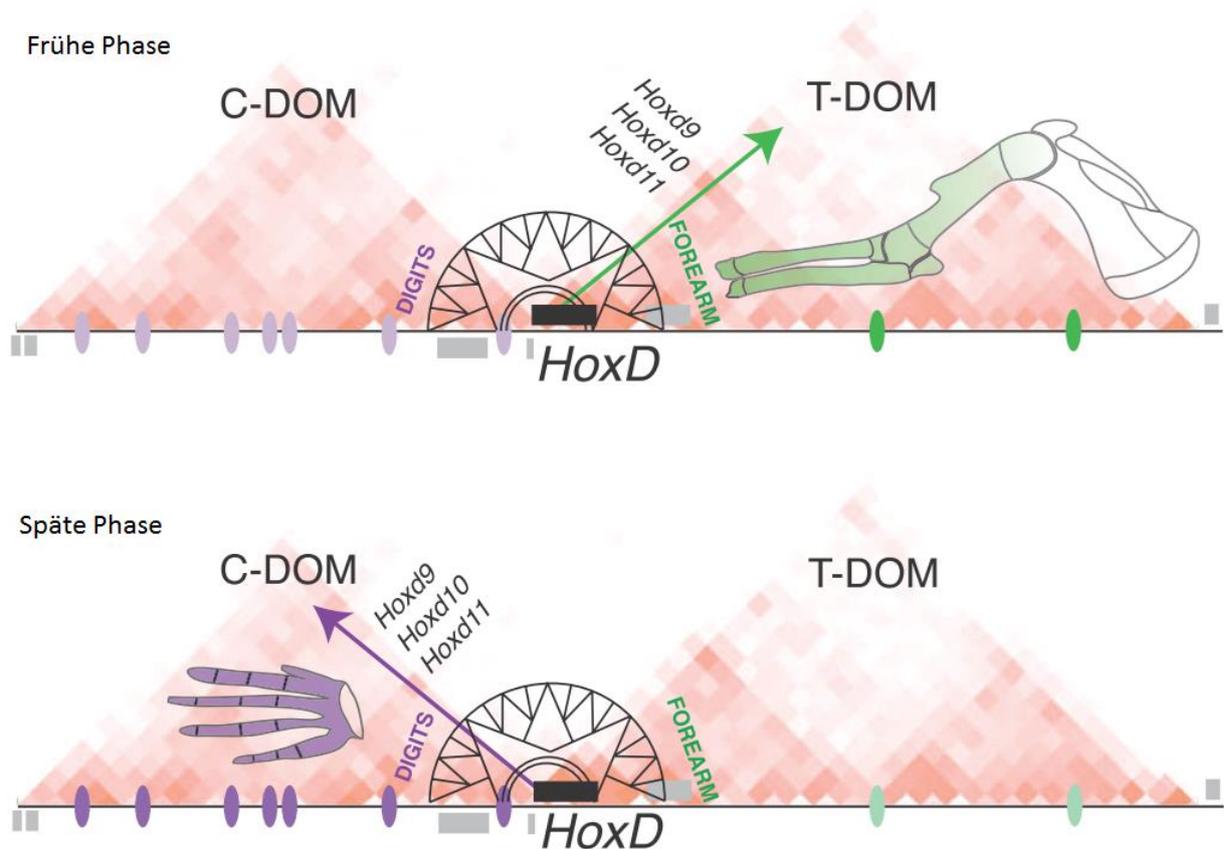


Abbildung 5: Ein Schaltermechanismus im *Hoxd*-Cluster⁶⁹

Der *Hoxd*-Cluster wird von zwei unabhängigen Topologically Associated Domains (TAD, rote Pyramiden) reguliert. Seine korrekte Transkription hängt von einem schalterähnlichen Verhalten der zentral gelegenen Gene *Hoxd* 9-11 ab. Dabei wird in der frühen Phase vor allem der Arm und Unterarm geprägt (Grün), in der späten die Hand und Fingerglieder (Violett). C-Dom (Zentromerische Domäne), T-Dom (Telomerische Domäne), Digits (Finger), Forearm (Unterarm).

1.4 PITX1

Das Gen für den *paired-type homeodomain* Transkriptionsfaktor 1 (*PITX1*) liegt auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 5 und wird von einer etwa 300 kb großen potentiell regulatorischen Region flankiert. Diese Region enthält einen hohen Anteil an konservierten nicht-kodierenden Sequenzen. *PITX1* spielt eine tragende Rolle in der Entwicklung der hinteren Gliedmaßen⁷¹. In Mäusen führt eine komplette Inaktivierung von *Pitx1* (auch *Ptx1*, *Backfoot* genannt) zu schweren kraniofazialen Missbildungen, Hypophysendefekten und neonataler Sterblichkeit, möglicherweise durch die pleiotrope Rolle des Gens in anderen Geweben^{72,73}. Im Detail bewirken die Hypophysendefekte, dass Ilium und Knie keine Knorpelflächen zeigen und lange Knochen unterentwickelt sind. Die Gliedmaßen behalten jedoch ihre molekulare Identität bei, soweit dies durch

Tbx5-Expression in den vorderen und *Tbx4*-Expression in den hinteren Gliedmaßen beschrieben werden kann. Dieses Expressionsmuster ist für beide Gene typisch⁷⁴.

Da *Tbx4* in *Pitx1*-null Mäusen herunterreguliert ist⁷², zeigt sich die mögliche Bedeutung von *Pitx1* für die *Tbx4*-Expression und die Entwicklung der hinteren Extremität. Ohne den Einfluss von *Pitx1* kommt es hier zur phänotypischen Angleichung an die vordere Extremität⁷³.

Wird das Gen z.B. durch *cis*-regulatorische Veränderung nur vermindert abgelesen, kommt es zu gerichteter Asymmetrie mit rechtsseitiger Abschwächung, beispielsweise in Bezug auf die rechtsseitige Femurverkleinerung^{72,75}. Möglicherweise kompensiert das vorrangig linksseitig exprimierte *Pitx2* bei Ausfall von *Pitx1* die Abschwächung⁷⁶.

Für die Erforschung von *PITX1* hat sich der Stichling als besonders populärer Modellorganismus erwiesen: Bei der Larve des Salzwasserstichlings zeigt sich die *Pitx1*-Expression in Maul, Unterkiefer und im sich entwickelnden Beckendorn⁷⁷. Dieser Beckendorn scheint einen Schutz gegen Fressfeinde im Meer zu sein. Der Beckendorn ist bei Süßwasserstichlingen in mehreren voneinander abgetrennten Populationen von Alaska bis Island komplett oder teilweise verloren, was auf evolutionäre Vorteile zurückzuführen sein könnte^{78,79}. Da dieser Verlust nicht mit Veränderungen von Maul oder Unterkiefer einhergeht, wie bei kompletter *Pitx1* Missexpression zu erwarten wäre⁷⁷, scheint es, als wäre *Pitx1* vorrangig in bestimmten Geweben im Becken runterreguliert, nicht jedoch im ganzen Körper. Aus diesem Gedankenansatz hat sich eine Forschungsbewegung zur Ergründung der regulatorischen Landschaft von *PITX1* entwickelt.

1.4.1 Liebenberg-Syndrom

Liebenberg beschrieb 1973 das heute nach ihm benannte Liebenberg-Syndrom (MIM 186550) im Menschen¹. Es ist mit einer genomischen Umgestaltung der Region um *PITX1* und der nachfolgenden Fehlexpression des Gens in der oberen Extremität assoziiert. Beispielsweise kann die Deletion des Nachbargens *H2AFY* sowie eines zugehörigen Barriereelements den vorher in anderem genomischen Kontext aktiven Enhancer *hs1473* verlagern^{2,80}, und *PITX1* daher durch *Enhancer Adoption*⁸¹ fehlreguliert werden.

Der Phänotyp wird autosomal-dominant vererbt und betrifft die obere Extremität, wobei die Arme eine teilweise homeotische Umwandlung zu Beinen durchlaufen. Solche Transformationen von einem Körperteil in einen anderen wurden bereits bei

verschiedenen Tieren, z.B. *Drosophila*^{82,83} und der Maus^{84,85} beobachtet. Beim Liebenberg-Syndrom zeigt das Ellenbogengelenk Ähnlichkeiten mit dem Kniegelenk: der distale Humerus ist abgeflacht, besitzt zwei Epikondylen und zeigt einen Knochenkern, der in Lage und Größe Ähnlichkeit mit der Patella aufweist. Das Olecranon ist hypoplastisch oder nicht vorhanden und die proximale Ulna sowie der proximalen Radius sind abgeflacht, was an ein Tibiaplateau erinnert. Die Mittelhandknochen Os Triquetrum und Os Pisiforme können zu einem Knochen verschmelzen und ähneln damit zum Teil dem Calcaneus des Fußes, ebenso wie sich Os Lunatum und Os Scaphoideum durch Vereinigung dem Talus des Fußes angleichen. Die Metacarpalen der Hand entsprechen zum Teil den Metatarsalen des Fußes.

Neben den aufgeführten Knochen- und Gelenkveränderungen gibt es auch spezifische Veränderungen, die das Bindegewebe und Muskeln betreffen. Wie bei den Knochendeformitäten hängt deren Ausprägung vom Schweregrad der Erkrankung ab. Beispielsweise können die für den Arm charakteristischen Muskulus extensor digiti minimi und der M. extensor carpi radialis fehlen².

In Ihrer Summe führen diese Veränderungen zu leichten aber schmerzlosen Beeinträchtigungen im Leben der Patienten. So ist der Arm in den meisten Gelenken nur eingeschränkt bewegbar⁸⁰. Neben dem muskuloskelettalen Phänotyp sind keine weiteren Veränderungen bekannt. Wird *PITX1* in der hinteren Extremität überexprimiert, folgt eine normale Entwicklung⁷¹. Der Phänotyp des Liebenberg-Syndroms lässt sich ebenfalls in Hühnern⁸⁶ und Mäusen^{2,71} nachweisen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die regulatorische Umgebung von *PITX1* ist noch nicht hinreichend erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es, innerhalb der Vielfalt regulatorischer Elemente auf Enhancer zu fokussieren und weitere solcher Elemente neben dem bekannten hs1473 zu entdecken. Es soll ein 15 mb großer Abschnitt um *PITX1* systematisch auf mögliche Enhancer untersucht werden, um geeignete Kandidaten zu identifizieren. Dazu werden Konservierung zwischen Spezies, H3K27ac-peaks und intrachromosomale Interaktionen (4C-Daten) untersucht. Für jeden Enhancer-Kandidaten wird ein Reporterkonstrukt generiert, indem der Bereich vor ein LacZ-Reportergen kloniert und anschließend in Stammzellen eingebracht wird. Es wird die Methode der flippasegestützten Transfektion einer sterilen C2-Stammzellkultur gewählt, da sie im Vergleich zur Mikroinjektionstechnik höhere Effizienz, einen spezifischen Insertionslokus sowie eine viel geringere Rate an Mehrfachkopien aufweist. In der Folge wird eine unnötig hohe Anzahl an Versuchstieren und Kosten vermieden.

Nach erfolgreicher Transfektion werden die Stammzellen mit Blastozysten aggregiert und in eine Maus verpflanzt. Aus den Blastozysten entstehen hochchimäre Mäuse. Im zellulären Kontext können spezifische Transkriptionsfaktoren an den potentiellen Enhancer binden. Falls er als solcher fungiert, wird die Expression des LacZ-Reporters initiiert, und im Expressionsbereich des Enhancers zeigt sich nach Zugabe von X-Gal eine Blaufärbung. Deckt sich die Färbung mit dem erwarteten Muster, hier *PITX1*-Expression, deutet dies auf eine mögliche Funktion als Enhancer dieses Gens. Der Ansatz, regulatorische Domänen um Gene herum mittels eines Reporterkonstrukts wie dem hier verwendeten LacZ zu erforschen, ist erprobt.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

Gerät	Zusatz	Hersteller
Binokular	MZ 12	Leica, Heerbrug, Schweiz
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cycle HEPA 100	Thermo Fischer, Schwerte, D
Feinwaagen	FI 1500	Thermo Fischer, Schwerte, D
	AT 20	Mettler Toledo, Gießen, D
Glasröhrchen (Southern Blot)		WHEATON Industries, USA
Kameras	Axio Cam MRC5	Karl Zeiss, Jena, D
	E.A.S.Y. 440 K	Herolab, Wiesloch, D
Netzchen (WISH)	BD Falcon Cell Strainer	BD Bioscience, Heidelberg, D
Röntgenkassette	HypercassetteTM	GE Amersham, GB
Sterilbank	HERA safe KS 12	Thermo Scientific, USA
Spektralphotometer	NanoDropTM 2000c	Thermo Scientific, USA
	NanophotometerTM	Implen, München, D
Thermal Cyclers	2700	Applied Biosystems, USA
Thermomixer Compact 5350 für 1,5 ml		Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbäder	ED-5	Julabo, Seelbach, D
	1008	GFL, Burgwedel, D
Neubauer Zellzählkammer	Tiefe 0,10 cm; 2,5 µm	Birker, Friedrichsdorf, D
Zentrifugen	Biofuge Pico	Thermo Scientific, USA
	5417/5415	Eppendorf, Hamburg, D
	DuPont Sorvall RC-5	Miami, USA
	Avanti J E	Beckman-Coulter, Krefeld, D
	Megafuge 1.0	Heraeus, England

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatz	Hersteller
96-well-Platte		Wallac, Shelton, USA
Polypropylenbeutel		Roth, Karlsruhe, D
Glaspipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Fortuna, München, D
Gefrieröhrchen	Cryo.S PP	Greiner, Frickenhausen, D
Pasteurpipette	3 ml	Brand, Wertheim, D

Material	Zusatz	Hersteller
Reaktionsgefäße	0,5 ml-, 1,5 ml-, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 96-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen/-schalen	75-, 150-, 200 cm ² ; 6 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Pipetten	StripetteR	Costar, New York, USA
Zellsieb	40 µm	BD Falcon, Heidelberg, D

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alcian Blau	Sigma, München, D
Ampicillin	MPI Mol. Genetik, Berlin, D
Biozym	Oldendorf, D
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim, D
Dextran Sulfat 40%	Sigma, München, D
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
DPBS (Zellkultur)	Lonza, Köln, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt, D
Ethanol; pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml	Roth, Karlsruhe, D
Fetales Kalberserum (FCS)	Gibco, Darmstadt, D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Formamid, pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd 25%	Sigma, München, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Heparin (H 3149)	Sigma, München, D
HISS (hitzeinaktiviertes Kälberserum)	Gibco, Darmstadt, D
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D

Chemikalie	Hersteller
L-Glutamin	Cambrex, Wiesbaden, D
Levamisol #L9756	Sigma, München, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, D
Maleinsäure	Sigma, München, D
Mercaptoethanol	Fluka, München, D
Methanol, pro analysis	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, München, D
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Proteinase K (stock 20 mg/ml)	Boehringer, Ingelheim, D
Salzsäure (HCl, 37%)	Merck, Darmstadt, D
t-RNA (Typ III baker's yeast)	Sigma, München, D
Triton X-100	Sigma, München, D
Trypsin	Cambrex/Gibco, Wiesbaden, D
Tween20	Roth, Karlsruhe, D

2.4 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung der Lösungen/Puffer wurde, wenn nicht gesondert aufgeführt, H₂O bidest verwendet.

Puffer/Lösung	Herstellung
6x Ladepuffer für Agarosegele H ₂ O (DEPC)	15 g Sucrose, 0,175 g Orange G mit H ₂ O ad 50 ml 0,1% DEPC, H ₂ O, inkubieren und autoklavieren
LB-Medium (Luria Bertani)	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; pH 7,4, autoklavieren
PBS (10x)	Für 1 L: 80g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ PO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O (DEPC) ad 1 L auffüllen, pH 7,4
PBST	Einfach PBS, 0,1% Tween20
4% PFA/PBS	40 g PFA in 1 L PBS durch Erhitzen lösen; pH 7,4
<i>Pfu</i> -Puffer 10x mit MgSO ₄	200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 1% TritonX-100, 20 mM MgSO ₄

2.4.1 Isolierung genomischer DNA

Puffer/Lösung	Herstellung
Tail-Tip-Puffer	8,5 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5, 17 ml 0,5M EDTA, 17ml 5 M NaCl, 21,25 ml 20% SDS, ad 500 ml mit H ₂ O
Lösung A	109,5 g Saccharose, 5 ml 1 M MgCl ₂ , 10 ml
TritonX100	1 M Tris-HCl (pH 8,0), ad 1 L mit H ₂ O, autoklavieren
Lösung B	40 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 12 ml 0,5 M Na-EDTA, 15 ml 1 M NaCl, ad 95 ml mit H ₂ O, autoklavieren, anschließend Zugabe von 5 ml 20% SDS
Lösung C	5 M Natriumperchlorat (100 g in 142 ml H ₂ O lösen), nicht autoklavieren
TE (pH 8,0)	1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 100 ml mit H ₂ O, autoklavieren

2.4.2 Southern Blot

Puffer/Lösung	Herstellung
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl
1 M NaPi (Church-Stock-Puffer)	Für 1 L: 142 g Na ₂ HPO ₄ (= 1 M di-Natriumhydrogen phosphat oder 178 g di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat), pH 7,2 mit H ₃ PO ₄ , autoklavieren
10x DIG1	Für 1 L: 116.1 g Maleinsäure (1 M), 87.7 g NaCl (1.5 M), pH 7.5 mit NaOH, autoklavieren
Blocking Reagenz	Blocking Reagenz (Roche #11363514910) lösen zu 10% w/v in 1x DIG, autoklavieren, Aufbewahrung bei 4 °C
Church-Waschpuffer	1 L: 40 ml 1 M NaPi, 50 ml 20% SDS, ad 1 L
Church-Hybridisierungspuffer	50 ml 1 M NaPi, 35 ml 20% SDS, 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 100 ml
DIG3	0,1 M Tris (pH 9,5), 0,1 M NaCl
Anti-Dig-AP Fab-Fragments	Roche, Mannheim, D

2.4.3 Maus-Embryonale Stammzellkultur

Volumen	Substanz
---------	----------

Fibroblasten-/Feederzell-Medium

Für 550 ml

500 ml	DMEM-Medium (4,5 mg/ml Glucose, ohne Natrium Pyruvat)
55 ml	FCS
5,5 ml	100x Glutamin
5,5 ml	100x Penicillin (5 U/ml)/Streptomycin (5 µg/ml)

2x Einfriermedium für Feeder-Zellen (20% FCS/20% DMSO)

Für 100 ml

60 ml	DMEM-Medium, 4,5 mg/ml Gluc, ohne Natrium Pyruvat
20 ml	FCS
20 ml	DMSO

Lagerung bei -20 °C

ES-Zell-Medium (15% FCS, 1000 U/ml LIF)

Für 500 ml

400 ml	Knockout DMEM (4,5 mg/ml Glucose mit Natrium Pyruvat)
75 ml	ES-Zell getestetes FCS-Medium
5 ml	100x Glutamin, 200 mM
5 ml	100x Penicillin (5 U/ml)/Streptomycin (5 µg/ml)
5 ml	100x Nicht-essentielle Aminosäuren
5 ml	100x 10 mM β-Mercaptoethanol in PBS
5 ml	100x Nucleoside
50 µl	LIF (10 ⁷ U/ml)

Volumen	Substanz
<i>2x Einfriermedium für ES-Zellen (20% FCS/20% DMSO)</i>	
Für 100 ml	
60 ml	Knockout DMEM-Medium
20 ml	FCS
20 ml	DMSO
Lagerung bei -20 °C	
0,1% Gelatine-Lösung	2% Gelatine mit H ₂ O zu 0,1% lösen, Sterilfiltration, Lagerung bei 4 °C
100x β-Mercaptoethanol (2-ME):	7 µl 14,3 M 2-ME zu 10 ml PBS Lösung (10 mM)
Lysepuffer	10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,2 % SDS, Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml)

2.4.4 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Puffer/Lösung	Herstellung
Alkalischer Phosphatase-Puffer	12ml 5M NaCl, 30ml 1M MgCl ₂ , 6ml 10% Tween20, 60 ml 1 M Tris (pH 9,5), 300 mg Levamisol, ad 600 ml mit H ₂ O
Hybridisierungspuffer	25 ml Formamid, 12,5 ml 20x SSC (pH 4,5), 25 µl Heparin, 500 µl 10% Tween20, H ₂ O (DEPC) ad 50 ml
MABT 5x	100 ml Maleinsäure [1 M, pH 7,5], 30 ml NaCl [5 M], 10 ml 10% Tween 20, ad 200 ml mit H ₂ O
PBST/Glycin	2 mg/ml Glycin
PBST/Levamisol	500 mg Levamisol auf 1 L PBST
4% PFA/PBS/0,2% Glutaraldehyd/1% EDTA:	50ml 4% PFA/PBS, 400µl Glutarald.(25%)
(final fixation)	500 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0
(first fixation) +0,1% Tween	500 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, 500 µl 10% Tween20
Proteinase K Puffer	1 ml Tris [1 M, pH 7,0], 0,1 ml EDTA [0,5 M], ad 50ml mit H ₂ O (DEPC)

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Herstellung</u>
RIPA-Puffer	2,5 ml SDS 10%, 15 ml NaCl [5 M], 5 ml NP40, 2,5 g Deoxycholat, 1 ml EDTA [0,5 M], 25 ml Tris [1 M, pH 8,0], ad 500 ml mit H ₂ O (DEPC)
RNase-Lösung	5 ml NaCl [5 M], 500 µl Tris [1 M, pH 7,5], 500 µl 10% Tween20, ad 50 ml H ₂ O
RNase A-Lösung	50 ml RNase-Lösung, 500 µl 10mg/ml RNase-stock
SSC 20x	175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat, H ₂ O ad 1 L (pH 7,0)
SSC/FA/T	100 ml 20x SSC, 500 ml Formamid, 10 ml Tween20 (10%), ad 1 L mit H ₂ O

2.4.5 X-Gal-Färbung von Embryonen

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Herstellung</u>
Fixierungslösung	2,7 ml Formaldehyd (37%), 0,2% Glutaraldehyd in 10 ml PBS (10x), 0,2ml NP40 (10%), H ₂ O ad 100ml
X-Gal Färbelösung	1 mg/ml X-Gal, 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 2 mM MgCl ₂ , Eisenlösung zuletzt zufügen, 1x PBS (bidest) ad 50 ml

2.5 Klonieren

2.5.1 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

<u>Restriktionsenzyme</u>	<u>Hersteller</u>
EcoRV (10 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NheI (10 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NotI (10 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PacI (10 U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Spezifische Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.5.2 Vektorsysteme

Vektorbezeichnung	Hersteller
HspLacZ-pBluescript II KS+_MOD	Arbeitsgruppen-intern
pBluescript	von der Abteilung Entwicklungsgenetik, MPIMG
pGK frt	Promega, Madison, USA

2.5.3 Bakterienstamm

Für die Klonierungsschritte wurde Escherichia Coli (E. Coli) Top10 (Invitrogen, Darmstadt, D) verwendet.

2.5.4 PCR Utensilien

PCR-Material	Hersteller
10x Taq-Puffer	Biotherm, Fermentas, Köln/St. Leon-Rot, D
50 mM Magnesiumchlorid	Biotherm, Köln, D
dNTP Set (100 mM)	GE Healthcare, Wien, Österreich Fermentas, St. Leon-Rot, D
Expand Long PCR System	Roche, Mannheim, D
Phusion-PCR Set	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
<i>Pfu</i> -Polymerase (circa 5 U/μl)	Eigenherstellung am MPI für Molekulare Genetik
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	Eigenherstellung am MPI für Molekulare Genetik

2.5.5 Ladders

DNA Längenstandards	Hersteller
100 bp Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
100 bp + Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
1 kb Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
1 kb + Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA Molecular Weight Marker	Roche, Mannheim, D (DIG labeled 0.081, 8,57 kb)

2.5.6 Zellkultur/Maus-ES-Zellkultur

Chemikalie	Hersteller
DMEM, 4,5 mg/ml Glucose ohne Sodium-Pyruvat	Lonza, Köln, D

Chemikalie	Hersteller
Knockout DMEM, 4,5 mg/ml Glucose ohne Natrium-Pyruvat	Gibco, Darmstadt, D
ES-Zell-Serum	Lonza, Köln, D
D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Lonza, Köln, D
Gelatine (2%)	Sigma, München, D
Glutamin (100x)	Lonza, Köln, D
H ₂ O	Lonza, Köln, D
LIF (Murine Leukemia Inhibiting Factor 107 U/ml)	Gibco, Darmstadt, D
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Darmstadt, D
Mitomycin C	Sigma, München, D
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Darmstadt, D
Nukleoside (100x)	Chemicon, Schwalbach, D
OptiMEM	Gibco, Darmstadt, D
Penicillin (5 U/ml)/ Streptomycin (5 U/ml) (100x)	Lonza, Köln, D
Trypsin-EDTA (0,5 g/l)	Gibco, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma, München, D

2.6 Erzeugung und Zucht von Mäusen

Nach Verpaarung der Mäuse zählte der Tag des Vaginalplugs als Embryonalstadium E0.5. Dabei wurden die Tiere im Tierhaus des MPI für Molekulare Genetik gehalten. Dr. Lars Wittler führte diese Arbeit mithilfe von Mäusen des Stammes NMRI/CD1 durch. Die Genehmigung für den Tierversuch ist erteilt laut Ergänzungsantrag zum Tierversuchsvorhaben G 0247/13 (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin).

2.7 PC-Programme/Internet-Datenbanken

Programme	Verwendung (Internetadresse)
ApE	Plasmid Editing (http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/)
Axio Vision 4.6	Digitale Photoaufnahmen
biogps	Auswertung der Expressionsmuster (http://www.biogps.org)
Easy Win32	Geldokumentation
Emouseatlas	Auswertung der Expressionsmuster (http://www.emouseatlas.org)
Eurexpress	Auswertung der Expressionsmuster (http://www.eurexpress.org)
Programme	Verwendung (Internetadresse)
IGV (Vers. 2.3.12)	Primerdesign (http://www.broadinstitute.org/software/igv/)
MGI	Auswertung der Expressionsmuster (http://www.informatics.jax.org)
Primer3	Primerdesign (http://frodo.wi.mit.edu/)
Reverse Complement	Primerdesign (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html)
UCSC	Primerdesign (http://genome.ucsc.edu/)
Vista Enhancer Browser	Hs1473 (http://enhancer.lbl.gov/frnt_page_n.shtml)

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle ihrer Länge nach auf einem Gel aufgetrennt. Dazu können verschiedene Gele verwendet werden, für diese Arbeit nur einprozentige Agarosegele. Die Herstellung erfolgte durch Erhitzen von Agarosepulver in einfachem Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), diese wird nach Zugabe von Ethidiumbromid in eine abgedichtete Acrylglasform gegeben. Dabei bildet ein entnehmbarer Kamm Taschen für die Proben, die nach Abkühlen des Gels befüllt werden können. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die in den Proben enthaltenen DNA-Moleküle zum positiv geladenen Pol. Kleine, geladene Moleküle sind dabei schneller als große, ungeladene. Anschließend macht das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid die DNA unter einer UV-Lampe sichtbar. Die Banden können so bei Bedarf gezielt aus dem Gel extrahiert werden.

3.1.2 DNA-Isolation

3.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur DNA-Isolation aus Bakterien wurden kommerzielle Bausätze nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde für kleine Probenmengen das Mini-Präparations-Kit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, D) verwendet, im größeren Maßstab das Midi-Präparations-Kit Nucleobond (Macherey-Nagel, Düren, D).

3.1.2.2 Aufreinigung von weiteren DNA-Fragmenten

Um PCR-Ansätze und gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente aufzureinigen wurde das Gel-/PCR-Extraktionskits Nucleo Spin der Firma Macherey-Nagel (Düren, D) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

3.1.3 Amplifikation von DNA-Abschnitten

3.1.3.1 Primer/Primerdesign

Bei dem Entwurf der Primer wurde vor allem darauf geachtet, dass Primer nicht mit sich selber binden und im Genom einmalig vorkommen. Mithilfe der Primer3-Software (Version 0.4.0) wurden als weitere Kriterien eine Primergröße von 18 bis 22 Basenpaaren und eine Schmelztemperatur von 58 °C bis 62 °C festgelegt. Für die Klonierung wird

ihnen eine NotI-Schnittstelle (5'...GC[^]GGCCGC...3') sowie einigen eine atata-Sequenz angefügt. Weiterhin wurden Primer für die Erfolgskontrolle mittels Kolonie-PCR entworfen, von denen der eine etwa 300-400 bp vor Ende des zu synthetisierenden DNA-Abschnitts bindet, der andere in der LacZ-Kassette. Ein weiteres Primerpaar zur Kontrolle des zweiten Klonierungsschrittes wurde im letzten Abschnitt der LacZ-Kassette sowie auf dem Abschnitt des pGK frt-Vektors gewählt. Mithilfe des Ensembl Genome Browser Blast-Programmes wurden die Primer auf ihr Bindungsverhalten im Genom untersucht. Die vom Hersteller gelieferten Primer wurden zu Stammlösungen verarbeitet, indem sie mithilfe von bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt wurden. Verwendet wurden Verdünnungen dieser Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 pm/μl.

3.1.3.2 Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) beruht auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnitts, der von zwei gegenläufigen Primern begrenzt wird. Um eine größere Spezifität in der Amplifizierung zu erhalten, wurde die Annealingtemperatur nahe der Primerschmelztemperatur gewählt. Ein starkes Abweichen von der Schmelztemperatur führt zu einer geringeren Spezifität der Primer und kann in unspezifischen Nebenprodukten resultieren.

Es wurden für die Amplifikation erworbene Phusion-Polymerase sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik hergestellte *Taq*-Polymerase verwendet. Zusätzlich wurde ein Expand Long Template PCR-Kit mit *Taq/Pfu*-Polymerase verwendet. Die Polymerasen unterscheiden sich: Die *Taq*-Polymerase generiert Überhänge aus A-Nukleotiden an den 3'-Enden der DNA-Doppelstränge, besitzt aber keine Fehlerkorrekturfunktion. Die *Pfu*-Polymerase amplifiziert mit einer sehr hohen Genauigkeit durch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, und generiert dabei glatte DNA-Doppelsträngen ohne Überhänge. Die Phusion® Polymerase weist eine hohe Amplifizierungsrate auf (1 kb in 15-30 Sekunden), kann unter der Verwendung eines speziellen GC-Puffers GC-reiche Regionen sehr gut vervielfältigen und produziert glatte DNA-Doppelsträngen.

Tabelle: Long Range PCR (Roche)

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
circa 150 ng	DNA
1,5 µl	DMSO (optional)
5 µl	10x expand long template Buffer 1 (preheated)
7 µl	dNTPs (2,5 mM)
2 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0,5-1 µl	DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O (bidest)

Tabelle: Cyclcr-Programm

<u>Zyklen</u>	<u>Melting (94 °C)</u>	<u>Annealing (60 °C)</u>	<u>Elongation (68 °C)</u>	<u>Cooldown (4 °C)</u>
1x	2:00			
10x	0:10	0:30	3:30	
20x	0:15	0:30	3:30*	
1x			7:00	
				∞

*je Zyklus +0:20

Tabelle: Phusion PCR

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
circa 50 ng	DNA
2,5 µl	DMSO (optional)
10 µl	5x Phusion HF-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
3 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
3 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O (bidest)

Tabelle: Cycler-Programm

<u>Zyklen</u>	<u>Melting (98 °C)</u>	<u>Annealing (70 °C)</u>	<u>Elongation (72 °C)</u>	<u>Cooldown (10 °C)</u>
1x	0:30			
10x	0:10	0:30*	1:00	
30x	0:10	0:30	1:00	
1x			7:00	
				∞

*je Zyklus -1 °C

Um das PCR-Ergebnis zu optimieren, wurde die Konzentration der DNA verändert, DMSO zugegeben sowie die Annealing-Temperatur variiert. Die Elongationszeit wurde der Länge des Produkts angepasst und betrug durchgängig zwei Minuten bei Produkten bis drei Kilobasen Länge. Anschließend wurden 50 µl der Probe mit 4 µl Ladepuffer vermischt und auf einprozentige Agarosegele (0,25 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Um die Proben aufzutrennen, wurde für 45-120 Minuten eine Spannung von 100-150 V angelegt. Zur Größenreferenz wurden DNA-Längenstandards der Firma Fermentas verwendet.

3.1.3.3 Kolonie-PCR

Der Erfolg der Transformation wird mittels Kolonie-PCR überprüft. Sie zeigt, ob das gewünschte Insert aufgenommen und in richtiger Orientierung im Genom eingefügt wurde. Eine Probe der zu untersuchenden Bakterienkultur wird als Ausgangsmaterial verwendet, und mit einer sterilen Pippetenspitze zuerst auf eine Agar-Platte, und dann in ein mit PCR-Reagenzien vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt. Ein Kolonie-PCR-Primer bindet dabei innerhalb des Inserts, ein vektorspezifischer Primer außerhalb.

Tabelle: Kolonie-PCR Reaktion

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
2 µl	10x DNA-Polymerase Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,4 µl	3´-Primer (10 pmol/µl)
0,4 µl	5´-Primer (10 pmol/µl)
0,25 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 20 µl	H ₂ O (bidest)

Tabelle: Cyclor-Programm

Zyklen	Melting (96 °C)	Annealing (55 °C)	Elongation (72 °C)	Cooldown (4 °C)
1x	5:00			
25x	0:30	0:30	2:00	
1x			7:00	

∞

3.2 4C-Sequenzierung

Circularized Chromosome Conformation Capture, kurz 4C, ist eine Methode zur Bestimmung genomischer Interaktionen zwischen Chromosomenabschnitten und einer bestimmten Sequenz, dem sogenannten Viewpoint. Das Vorgehen basiert auf der 3C Technik⁴⁵, bei der auf die Fixierung der noch unbekannteren Interaktionen mit Formaldehyd ein Verdau mit Restriktionsenzymen folgt. Die Schnittstellen der weiterhin fixierten DNA-Stränge werden anschließend unter dafür förderlichen Bedingungen ligiert und mithilfe von PCR amplifiziert. Durch Sequenzierung oder Microarray ist eine qualitative oder quantitative Analyse möglich.

Bei der 4C-Methode kann im Gegensatz zu 3C das gesamte Genom auf Interaktionen mit der gewünschten Sequenz untersucht werden⁸⁷. Anders als bei 3C ist nur die Kenntnis eines der beiden Interaktionspartner notwendig, also des Viewpoints. Die Häufigkeit von zufälligen Interaktionen nimmt mit der Nähe zum Viewpoint zu, da die Faltung der DNA solche Interaktionen begünstigt. Der Restriktionsverdau erfolgt mithilfe eines Frequent Cutters, z.B. DpnII, oder eines Rare Cutters wie z.B. HindIII. Frequent Cutter erkennen eine vierbasige Sequenz, die im Durchschnitt alle 256 bp auftritt, Rare Cutter dahingegen eine sechs Basen lange Sequenz, die nur etwa alle 4000 bp auftritt. Die Entscheidung für eines der Restriktionsenzyme hat Einfluss auf die Auflösung, die Reproduzierbarkeit und den Aufwand des Versuchs. Die Ergebnisse einer 4C-Sequenzierung sind in hohem Grade und über weite genomische Strecken reproduzierbar, sagen allerdings nichts über die funktionelle Ebene der dokumentierten Interaktionen aus. Die Detektion von vielen Interaktionen mithilfe von 3C-Techniken weist nicht notwendigerweise eine Schleifenbildung nach. Dasselbe Signal wäre auch messbar, wenn die Interaktion durch kompakte, aber hochvariable Konformationen der DNA zustande käme⁸⁸. Da es jeweils nur zwei Interaktionen je Zelle gibt und für eine belastbare statistische Auswertung eine hohe Anzahl an Interaktionen benötigt wird, muss die Untersuchung an Millionen von Zellen erfolgen.

3.3 Klonierungstechniken

3.3.1 pBluescript-Vektor

Fünf Mikrogramm des pBluescript-Vektors (Abbildung 6) wurden durch Restriktionsenzyme aufgetrennt und mithilfe des Gel-/PCR-Extraktionskits Nucleo Spin der Firma Macherey-Nagel (Düren, D) aufgereinigt. Die mittels PCR hergestellten DNA-Fragmente wurden zuerst über T4-Ligation der NotI Schnittstellen in den Vektor pBluescript kloniert. Vorangegangen war eine Dephosphorylierung des pBluescript-Vektors, um die sog. *sticky ends* des Vektors von einer Religation abzuhalten, wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für zehn Minuten bei 37 °C, das Enzym wurde danach für 15 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle: Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors

Menge	Substanz
15 µg	linearisierter Vektor
2 µl	10x SAP-Puffer
1 µl	Fast AP
ad 20 µl	H ₂ O (bidest)

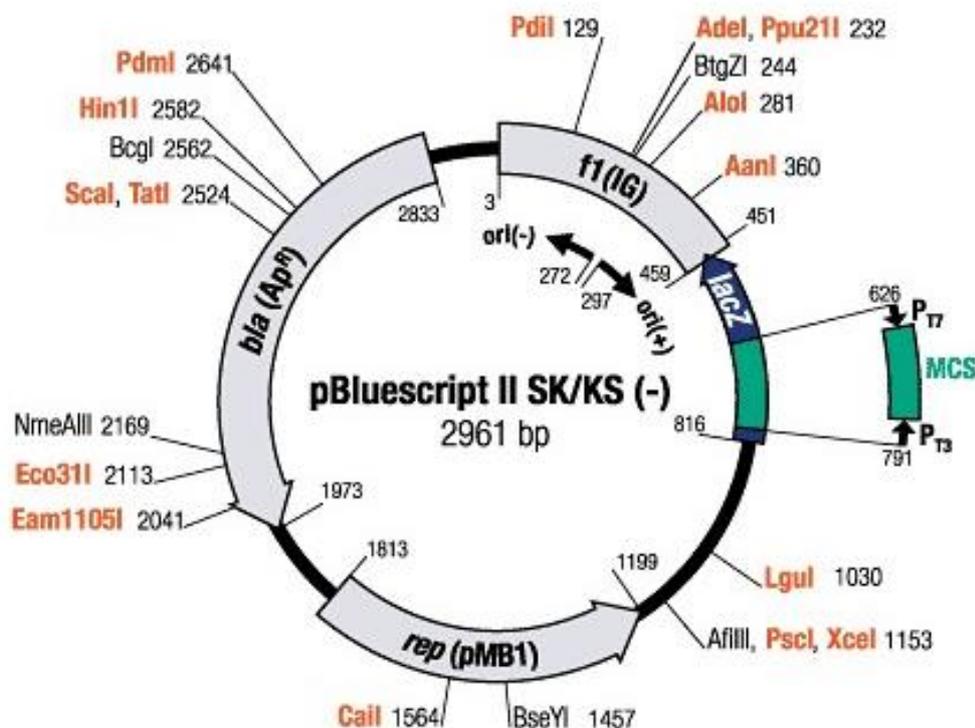


Abbildung 6: Der Vektor pBluescript II KS⁺⁸⁹

3.3.2 Berechnung des Vektor-Insert-Verhältnisses

$$\left(\frac{50 \text{ ng Vektor} \times XY \text{ kb Fragment}}{XY \text{ kb Vektor}} \right) \times 5 = \text{ng Insert, die bei 50 ng Vektor eingesetzt werden müssen}$$

Tabelle: Ligation eines linearisierten Vektors mit einem DNA-Fragment

Menge	Substanz
50 ng	linearisierter Vektor
Xy ng	Insert
2 µl	T4 Ligase-Pufffer (10x)
1 µl	ATP (10 mM)
1 µl	PEG 4000
1 µl	T4 DNA-Ligase
ad 20 µl	H ₂ O (bidest)

Der Ligationsansatz inkubierte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bis zum nächsten Tag bei 16 °C im Wasserbad. Die anschließende Transformation wurde mit dem Bakterienstamm *E.Coli* durchgeführt und der Erfolg des Versuchs durch eine Kolonie-PCR überprüft.

3.3.3 LacZ-Kassette

Zum ursprünglichen Insert wurden mithilfe des pBluescript Vektors das *LacZ*-Reporter gen (*E.Coli*) kloniert. Es kodiert für das Enzym β -Galactosidase, welches X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl umsetzt. Dieses dimerisiert nach Oxidation und zeigt daraufhin eine Blaufärbung. Diese Färbung wurde in vorliegender Arbeit an ganzen Embryonen durchgeführt. Die Embryonen von transgenen Mäusen in den Embryonalstadien 10.5, 11.5 sowie 12.5 wurden in einfachem PBS (bidest) gewaschen und bei 4 °C fixiert (E10.5 30 Minuten, E11.5 40 Minuten, E12.5 50 Minuten). Nach fünfminütigem Waschen mit einfachem PBS wurden die Embryonen entweder für eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gefärbt. Die Färbung variierte von Embryo zu Embryo, aufgrund unterschiedlicher Diffusionsvorgänge der Färbelösung, einer variierenden Anzahl von Insertionen des Reportervektor-Konstrukts in das Maus-Genom und unterschiedlichem Grad von Chimärismus, weshalb sich die Inkubationszeiten je nach Embryo unterscheiden. Die Präparate wurden nach mehrmaligem Waschen mit

PBS erneut fixiert (2% PFA/0,2% Glutaraldehyd) und bei 4 °C gelagert. Die Dokumentation erfolgte innerhalb weniger Tage an einem Binokular unter der Verwendung der AxioVision 4.6 Software. Diese Methode ist in unserer Arbeitsgruppe erprobt⁹⁰.

3.3.4 pGK frt-Vektor

Der Zwischenvektor pBluescript wurde mit PacI und NheI verdaut, um das Konstrukt zu gewinnen. Die Probe wurde im Rahmen einer Gelelektrophorese aufgereinigt und mittels T4-Ligation in den Zielvektor pGK frt kloniert (Abbildung 7). Im Regelfall wurden drei bis fünf Mikrogramm Plasmid-DNA verdaut. Extrahierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

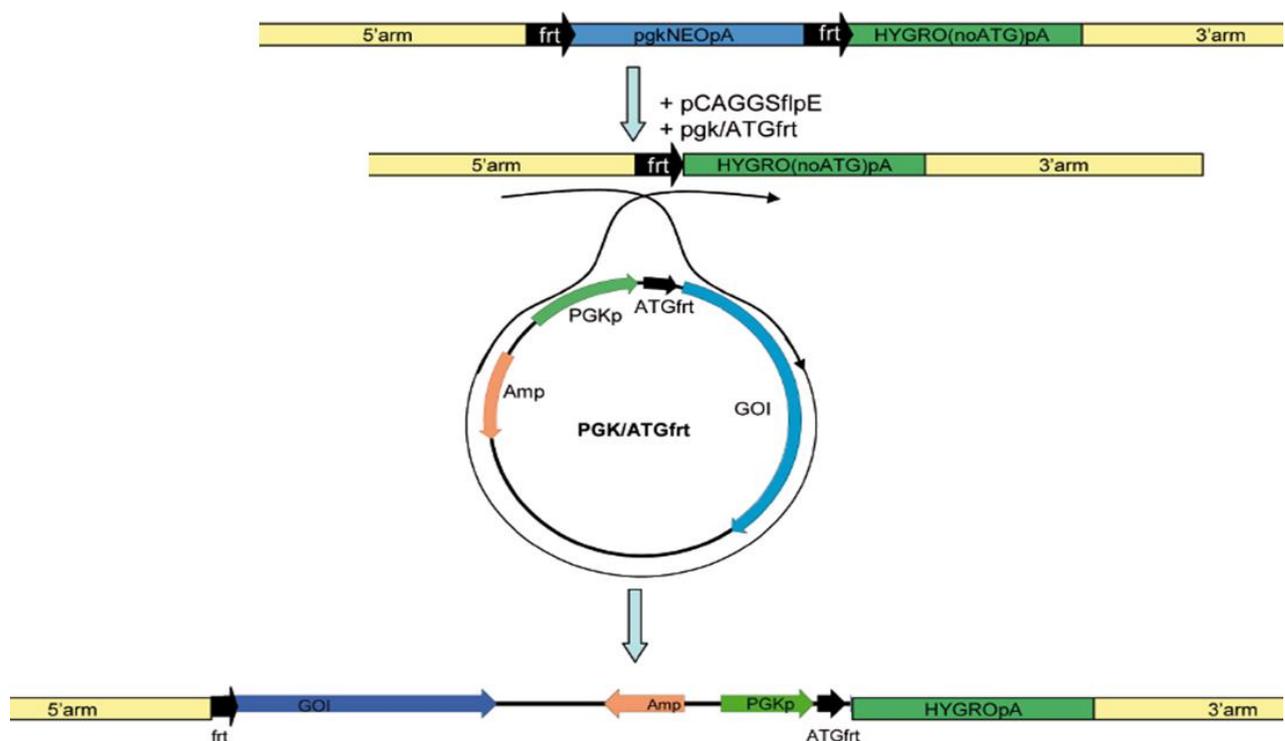


Abbildung 7: Der Vektor pGK frt⁹¹

3.3.5 Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden bei 37 °C auf mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzten LB-Platten oder in flüssigem LB-Medium inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden bei 190 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt.

Ein Milliliter einer Bakterienkultur wurde mit 0,8 Milliliter einer 87% Glycerinlösung vermischt, wodurch die Lagerung bei -80 °C möglich wurde. Eine erneute Vermehrung dieser Glycerinkultur erfolgte durch steriles Animpfen eines geeigneten Mediums und inkubation bei 37 °C.

3.3.6 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation von Bakterien werden Bakterienkulturen bei wechselnden Temperaturen mit einem Ligationsansatz konfrontiert, um die Aufnahme der fremden DNA in das bakterielle Genom zu ermöglichen. Um 100 µl einer Bakterienkultur für zehn Mikroliter einer Ligationslösung empfänglich zu machen, wurde die Kultur für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für anderthalb- bis zwei Minuten erfolgte eine Erwärmung auf 42 °C, dann wurde der Reaktionsansatz für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Milliliter LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und die Probe bei circa 190 rpm für 30 Minuten geschüttelt. Das Ausplattieren fand auf LB-Platten mit Ampicillin (50 µg/ml) statt, woraufhin die LB-Platten über Nacht bei 37 °C oder zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

3.4 Durchführung der embryonalen Stammzellkultur

3.4.1 Allgemeines

Die kultivierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) werden in einem undifferenzierten Zustand gehalten. Dazu wurden sie auf mitoseinhibierten Maus-Fibroblasten (Feederzellen) ausplattiert und LIF (leukemia inhibitory factor, ein Zytokin) hinzugefügt. Petrischalen und Platten wurden bei 37 °C mit steriler, 0,1% Gelatinelösung beschichtet, damit die Feeder-Zellen auf einem gleichmäßigen Untergrund wachsen. Die Gelatinelösung wurde nach 30 Minuten entfernt und die Gefäße steril getrocknet.

3.4.1.1 Auftauen von Zellen

Gefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch wirkt, wurden die Zellen gleich darauf in fünf Milliliter Medium überführt. Diese Suspension wurde fünf Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert, überschüssiges Medium entfernt und das entstandene Pellet (Sediment) in frischem Medium resuspendiert. Die Menge des dabei verwendeten Mediums hing von der gewünschten Zelldichte und der Aussaatfläche ab. Diese Zellsuspension wurde bei 37 °C und 5% CO₂-Sättigung unter regelmäßigem Mediumwechsel im Brutschrank kultiviert.

3.4.1.2 Einfrieren von Zellen

Um Zellen auf den Einfriervorgang vorzubereiten, wurden die Kulturen mit DPBS gewaschen und entsprechend dem Volumen Trypsin hinzugegeben. Die Kultur wurde für sechs Minuten im Brutschrank inkubiert, anschließend die entstandene Zellsuspension aufgenommen und für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer

bestimmten Menge Medium resuspendiert, so dass eine Zellkonzentration zwischen 2×10^6 (ES-Zellen) und 5×10^6 (Feeder-Zellen) entstand. 0,5 ml dieser Suspension wurden in Kryoröhrchen überführt, mit 0,5 Milliliter 2x Einfriermedium versetzt und mithilfe eines isolierten Gefäßes langsam bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Nach einem Tag erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff.

3.4.1.3 Trypsinbehandlung von ES-Zellen

Um Zellen von ihrem Untergrund zu lösen wurde das Medium abgesaugt, die Zellkultur zweimal mit DPBS gewaschen und ein Milliliter Trypsin zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ wurde das Trypsin durch Zugabe von einem Milliliter Medium inaktiviert und die Zellsuspension in weitere fünf Milliliter Medium überführt. Mithilfe der Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und eine Anzahl von etwa 500 000 Zellen auf eine 6-well-Platte mit Feeder-Zellen ausgesät.

3.4.2 Embryonale Fibroblasten

ES-Zellkulturen benötigen zum Wachsen eine einschichtige Wachstumsunterlage von mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen), die deren Differenzierung verhindern. Für die ES-Zellkultur-Experimente wurden CD1-Fibroblasten-Zellen und DR4-Mitomycin-behandelte Fibroblasten-Zellen als Feeder-Zellen verwendet, die von Dr. H. Schrewe (Abteilung Entwicklungsgenetik, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) zur Verfügung gestellt wurden. Die $2,5 \times 10^6$ Feeder-Zellen/Gefrieröhrchen wurden als Passage 3-5 im Stickstofftank weggefroren.

Bei Bedarf wurden die Zellen bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut und in fünf Milliliter Feederzell-Medium überführt, um die Wirkung des DMSO abzuschwächen. Die Zellsuspension wurde fünf Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das entstandene Pellet in einer dem Ausplattieren angemessenen Menge Medium resuspendiert.

3.4.2.1 Herstellung von Feeder-Zellen

Für die Herstellung von embryonalen Feeder-Zellen wurden heterozygote Mäuse im Stadium 13.5 oder 14.5 benötigt. Dabei wurde für die Herstellung von DR4-Feedern männliche TgDR41JaeJ mit weiblichen C57BL6J (FEM Charité) verkreuzt, ihre Nachkommen am entsprechenden Tag post conceptionem getötet und nach Präparation des Uterus und der extraembryonalen Membranen in PBS gegeben. Köpfe und Weichteile wurden entfernt, das Skelett mit PBS gewaschen und in kleine etwa zwei bis

drei Millimeter große Würfel geschnitten. Die Würfel wurden in 50 Milliliter Falcons transferiert und je nach Anzahl der Embryonen 5-20 Milliliter Trypsin-EDTA hinzugefügt. Die Falcons wurden in zwei Arbeitsgängen je kurz zentrifugiert, wieder durchmischt, und dann für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der zähen DNA wurde das Medium durchmischt und dadurch die Zellen resuspendiert. Nach Hinzufügen des doppelten Volumens an Feeder-Zell-Medium wurde das Äquivalent von zwei bis drei Embryonen auf 15 cm-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen als Passage 0 eingefroren.

3.4.2.2 Vermehrung von Feeder-Zellen

Zur Vermehrung der Feeder-Zellen wurden diese in einer Dichte von $3-4 \times 10^6$ auf 2x 75 cm² Flaschen ausgesät und inkubiert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Sobald die Zellen konfluiert waren, wurden sie 1:4 geteilt und für weitere zwei bis drei Tage inkubiert. Je nach Bedarf können die Zellen (Passage 2) in größeren Flaschen weiter vermehrt werden oder sofort Teilungsinaktiviert werden. Dies geschah durch Behandlung mit Mitomycin C (Sigma-Aldrich #M4287, Steinheim, D).

3.4.2.3 Inaktivierung von Feeder-Zellen

Für eine 150 cm² Flasche wurden nach Entfernen des vorhandenen Mediums 200 µl Mitomycinlösung (0,1 mg/ml Mitomycin, 5% DMSO in zwei Millilitern PBS) in 20 Milliliter Feeder-Zell-Medium gegeben. Die Zellen wurden anschließend mindestens zwei Stunden inkubiert, das Medium anschließend aspiriert und fachgerecht entsorgt. Die Flaschen wurden dreimal mit 20 Milliliter 1x PBS gewaschen, die Zellen mit 10 Milliliter Trypsin abgelöst und nach Inaktivierung des Trypsins unter Gebrauch der Neubauerkammer ausgezählt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden Menge Medium in einer Anzahl von etwa $2,5 \times 10^6$ bei -80 °C mithilfe eines isolierten Behälters langsam eingefroren, und am nächsten Tag im Stickstofftank eingelagert.

3.4.3 Maus-ES-Zellkultur

Mittels des pBluescript Vektors wurde der jeweilige Enhancer-Kandidat stromaufwärts eines Hsp68-Minimalpromotors und einer LacZ-Kassette kloniert. Durch anschließende Insertion in den PGK frt-Vektor wurde ein dort verankertes Ampicillinresistenzgen aktivierbar, welches die Selektion erfolgreicher Klone ermöglichte. Zusätzlich wurde ein Promotor für eine Hygromycin-Resistenz angefügt. Das gesamte Konstrukt wurde zu

diesem Zeitpunkt von Flippase-Recombinase-Target-Sequenzen (frt) flankiert, welche durch eine Flippase-Rekombinase (flp) erkannt, und in ein modifiziertes *Col1A1*-Allel der C2-Zellen inseriert wurden. Durch den eingebrachten Promotor wurde eine dort bereits vorhandene Hygromycin-Kassette aktiviert und ermöglicht eine abermalige Selektion. Die C2-Zellen entstanden durch Verkreuzung der Maus-Stämme C57B/6 und 129svJae, und können nach diploider ES-Zell-Aggregation in Blastozysten injiziert werden. Eine vollständige Insertion wurde anschließend durch einen Southern Blot verifiziert. Eine Übersicht der erfolgten Klonierungsschritte ist in nachstehender Abbildung 8 zu sehen.

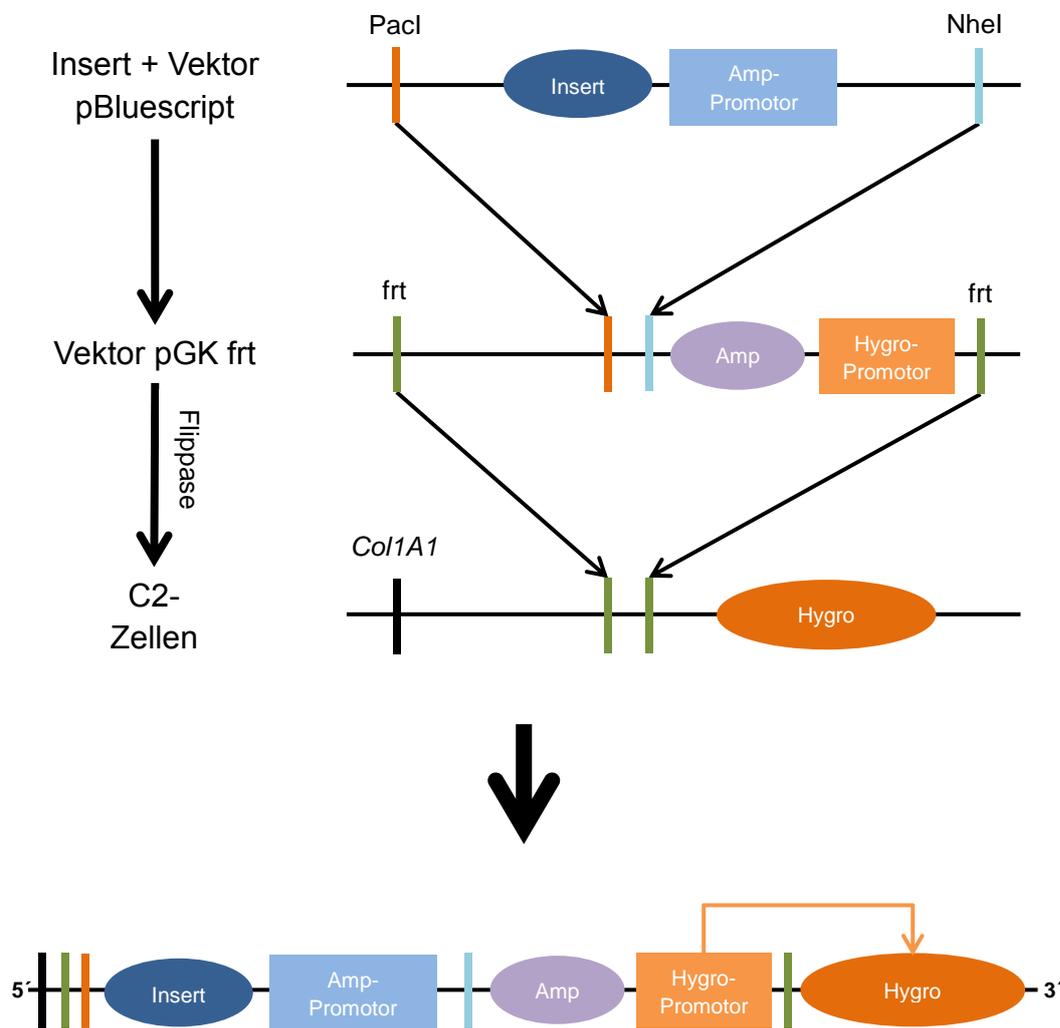


Abbildung 8: Die Klonierungsschritte

Klonierung einer Zielsequenz in den COL1A1-nahen Locus von C2-Zellen über Zwischenschritte mit den Vektoren pBluescript und pGK frt. Pacl, Nhel: Restriktionsenzyme. Insert: Enhancerkandidat. frt: flippase recognition target, Enzymerkennungssequenz für Flippase. Amp: Ampicillinresistenz. Hygro: Hygromycinresistenz. COL1A1: Genlocus in der Nähe des Insertionsbereichs.

3.4.3.1 Herstellung von Nährzellschichten und Aussäen von C2-Zellen

Die ES-Zellen wurden auf Nährzellschichten kultiviert, die aus Mitomycin C behandelten Feeder-Zellen bestanden. Nach Auftauen der Feeder-Zellen bei 37 °C wurden fünf Milliliter ES-Zell-Medium hinzugefügt und die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Es wurden je Well zwei Milliliter dieser Suspension hinzugefügt und bei 37 °C für mindestens drei Stunden belassen. Die C2-Zellen wurden meist am nächsten Tag aufgetaut und ausgesät. Dazu wurde das vorhandene Feeder-Zell-Medium entfernt und mit ES-Zell-Medium mit LIF (50 µl LIF [10⁷ U/ml] auf 500 ml ES-Medium) ersetzt.

Tabelle: Volumen- und Mengenverhältnisse von Feeder-Zellen

Schale/well-Platte	Wachstumsfläche (cm ²)	Zellanzahl
60-mm-Schale	28	1x 10 ⁶
96-well	0,3	1x 10 ⁴ /well = 1x 10 ⁶ /Platte
48-well	0,75	3x 10 ⁴ /well = 1x 10 ⁶ /Platte
24-well	2	8x 10 ⁴ /well = 2x 10 ⁶ /Platte
12-well	3,8	1,5x 10 ⁵ /well = 1,8x 10 ⁶ /Platte
6-well	9,6	4x 10 ⁵ /well = 2,4x 10 ⁶ /Platte

3.4.3.2 Arbeiten mit embryonalen Stammzellkulturen

ES-Kulturen wurden unter täglichem Mediumwechsel bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator gelagert. Sie wachsen im Gegensatz zu Feeder-Zellen in dichten Zellkolonien, so dass die Zellgrenzen schwer zu erfassen sind. Bei der Ausplattierung der Feeder-Zellen und ES-Zellen muss auf ein richtiges Dichteverhältnis geachtet werden, um eine Ausdifferenzierung der Stammzellen zu verhindern. C2-Zellen wurden auf 6-well-Platten ausplattiert und transfiziert, jedoch auf 6-cm-Schalen mit Hygromycin selektiert.

Tabelle: Volumen- und Mengenverhältnisse von Feeder- und ES-Zellen

Zellen	Medium	Kulturschale	Dichte
Feeder-Zellen	1,5 Milliliter	6-well (9,6 cm ²)	3x 10 ⁵ Zellen/well
Es-Zellen (C2)	2 Milliliter	6-well (9,6 cm ²)	0,58-1,75x 10 ⁶ Zellen/well

3.4.3.3 Transfektion

Der pGK-flippase-recognition-target-Vektor (pGK frt) enthält zwei frt-Sequenzen, welche das klonierte Insert flankieren. Mit Hilfe der Rekombinase Flippase (flp) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann an diesen Stellen die Kassette ausgeschnitten und in die Embryonalen Stammzellen eingebracht werden. Am Tag vor der Transfektion wurden DR4-Feeder-Zellen in einer Konzentration von 3×10^5 auf ein 6-well-Platte aufgebracht. Am Tag der Transfektion wurde das Medium zwei Stunden vorher ausgewechselt. In einem Reaktionsgefäß wurden 25 µl Lipofektamin 2000 mit 110 µl OptiMEM gemischt und fünf Minuten stehen gelassen. In einem zweiten Gefäß wurden sieben Mikroliter des DNA-Konstrukts mit einem Mikroliter pCAGGS-flpE und 125 µl OptiMEM vermischt. Das Gemisch wurde tröpfchenweise zum Lipofektamin gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden 1,25 ml des Stamm-Zell-Mediums (mit LIF, ohne Penicillin/Streptomycin) hinzugefügt und die Menge auf eine Kammer des 6-well-Platte gegeben, welche nun für vier Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Die transfizierten ES-Zellen wurden trypsinisiert und im Verhältnis 1:1 und einem Endvolumen von je drei ml ES-Medium (mit LIF) auf zwei 6-cm-Schalen aufgeteilt. Die Selektion durch Hygromycin wurde am nächsten Tag begonnen.

3.4.3.4 Selektion der ES-Zellen

Die Selektion positiver Klone erfolgt einen Tag nach Transfektion unter Verwendung von Hygromycin (150 µg/ml) und dauerte zwischen sieben und zehn Tagen. Transfizierte Zellen wurden dazu mit Trypsin behandelt, mit einer Neubauerkammer gezählt und etwa 3×10^5 je 60 mm-Platte ausgesät. Das zur Selektion erforderliche Hygromycin wurde mit dem Medium täglich erneuert, wodurch gleichzeitig abgestorbene Klone und Stoffwechselprodukte entfernt werden konnten.

3.4.3.5 Auswahl positiver ES-Zell-Klone

Um den Nährboden für die selektierten Klone vorzubereiten, wurde am Vortag eine flache 96-well-Platte gelatinisiert und mit 1×10^4 Feeder-Zellen/well bestückt. Tags darauf wurde eine runde 96-well-Platte mit 30 µl Trypsin/well bis 37 °C aufgewärmt. Die Klone wurden zweifach mit vier Millilitern DPBS gewaschen, dann drei Milliliter DPBS hinzugegeben und die Klone aus der Sterilbank entnommen. Dort wurden sie mithilfe einer Pipette vom Untergrund gelöst, vorsichtig aufgesogen und in die vorbereitete 96-well-Platte mit Trypsin überführt. Nach sechs Minuten bei 37 °C wurde das Trypsin durch die Zugabe von 60 µl ES-Zell-Medium inaktiviert und die Zellsuspension durchmischt. Die gepickten

Klone wurden auf eine flache 96-well-Platte mit Feedern übertragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Unter täglichem Mediumwechsel wurden die Zellen vermehrt, indem sie bei entsprechender Dichte auf eine 48-well-Platte und von dort auf eine 12-well-Platte expandiert wurden. Anschließend wurde $\frac{1}{4}$ der Zellen auf eine 6-cm-Platte verbracht und zur DNA-Gewinnung genutzt, die restlichen $\frac{3}{4}$ wurden auf eine weitere 6-cm-Platte ausgesät, um bei entsprechender Dichte in drei Gefrier Röhrchen bei -80 °C eingefroren zu werden.

3.4.3.6 DNA-Präparation der ES-Zellklone

Zur Präparation der ES-DNA wurde das Medium nach drei Tagen entfernt. Die Zellen konnten anschließend zweimal mit DPBS gewaschen und in zwei Milliliter vorgewärmter Lysis Puffer mit 0,2 mg/ml Proteinase K gegeben werden. Sie wurden dann über Nacht bei 55 °C inkubiert. Der zähflüssige Puffer wurde am nächsten Tag mit 200 µl 8 M LiCl und zwei Millilitern Isopropanol vermischt. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde abpipettiert, mit 70% Ethanol gewaschen und für zehn Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der neue Überstand wurde ebenfalls abpipettiert, die Röhrchen getrocknet und das DNA-Pellet in 100 µl Aqua bidest gelöst. Die Zielkonzentration für den folgenden Southern Blot betrug 1 µg/µl.

3.4.4 Southern Blot Methode

Die Southern Blot Methode⁹² weist mithilfe einer markierten Sonde spezifische DNA-Fragmente nach. Die dafür notwendige DNA stammt aus den expandierten C2-Zellen, die benötigte Sonde wurde hergestellt. Die DNA-Proben wurden über Nacht mit dem Restriktionsenzymen SacI, PaeI/NheI oder EcoRV verdaut.

Tabelle: Restriktionsverdau der DNA Proben zur Southern Blot Methode (30 µl Ansatz)

Menge	Substanz
10 µl	C2-DNA
3 µl	spezifischer Puffer für PaeI/NheI oder EcoRV (10x)
2 µl	PaeI/NheI oder EcoRV (10 u/µl)
ad 30 µl	H ₂ O (bidest)

Die Proben mit den DNA-Fragmenten liefen bei 90 V für mindestens fünf Stunden auf einem Agarosegel, um die Fragmente gleichmäßig aufzutrennen. Dabei wurde der Fortschritt regelmäßig unter UV-Licht kontrolliert, und nach erfolgreicher Auftrennung ein

Foto gemacht. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur für 30 Minuten denaturiert und zweimal für 20 Minuten neutralisiert. Die DNA-Proben wurden über Nacht mittels Nasstransfer auf eine Nylon-Membran übertragen, wie in Abbildung 9 veranschaulicht. Diese Membran wurde zuvor auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit 10x SSC befeuchtet. Der Blotaufbau erfolgte in einer Wanne. Auf einen leicht erhabenen Block wurde dazu eine Lage Whatman-Papier gelegt, deren Enden in 10x SSC eintauchten. Zwei weitere Lagen Whatman-Papier wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls befeuchtet, hierauf kam das Gel mit der oberen Seite nach unten. Entstandene Luftblasen wurden mit einem Glasstab ausgerollt. Die befeuchtete Nylon-Membran wurde nun oben auf das Gel gelegt und mit zwei weiteren zugeschnittenen Lagen Whatman-Papier bedeckt. Der Versuchsaufbau wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, die auf der Oberseite manuell gefenstert wurde. So konnten dort aufgelegte Papierhandtücher und ein Gewicht durch den Flüssigkeitstransport einen geradlinigen Transfer gewährleisten, während die Folie Verdunstung verhinderte. Am nächsten Tag wurden mit einem weichen Graphitstift zur späteren Orientierung die Geltaschen auf der Nylon-Membran markiert und die Proben anschließend prä-hybridisiert. Nach einer Neutralisation der Membran mit 50 mM NaPi für fünf Minuten wurde sie in trockenes Whatman-Papier eingeschlagen und für zwei Stunden auf 80 °C erhitzt, wodurch die DNA an der Membran fixiert wurde. Hiernach wurden die Proben im Glasröhrchen hybridisiert, indem die Membran mit H₂O (bidest) angefeuchtet, mit der Transferseite nach innen in das Röhrchen eingebracht und eine Stunde lang bei 65 °C und zehn Umdrehungen pro Minute mit 25ml Church-Hybridisierungslösung behandelt wurde. In Abhängigkeit der Markierungseffizienz wurden 4-12 µl Sonde für den *COL1A1*-Lokus mit 25 Millilitern Hybridisierungspuffer vermischt und im Wasserbad für zehn Minuten auf 100 °C erhitzt. Der erste Hybridisierungspuffer wurde entfernt und durch diese Mischung ersetzt. Die Proben wurden nun über Nacht bei 65 °C bei zehn Umdrehungen pro Minute hybridisiert. Am nächsten Tag wurde diese Lösung entfernt und die Membranen mit Church-Waschpuffer für zehn Minuten bei zehn Umdrehungen pro Minute und 65 °C gewaschen. Die Membranen wurden dann entnommen und für zehn Minuten in frischem Waschpuffer und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen. Die Membran wurde anschließend für fünf Minuten in 1x DIG1/0,3% TWEEN equilibriert und in einem Plastikbeutel mit zehn Millilitern Blocking-Puffer DIG2 (Verdünnung des Blocking Reagenzes 1:10 in 1x DIG1) eingeschweißt und 30 Minuten lang stark geschüttelt. Nun wurde der Blocking-Puffer mit Anti-Dig-Lösung (1:20 000 in

DIG1) ersetzt und erneut 30 Minuten lang stark geschüttelt. Anschließend konnte die Membran bei Raumtemperatur zweimal für 20 Minuten in 1x DIG1/0,3% Tween und für fünf Minuten in DIG3-Lösung gewaschen werden. Sie wurde mit der DNA nach oben in eine Röntgenkassette gelegt und bei Dunkelheit für fünf bis zehn Minuten in wenigen Millilitern CDPstar-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt, ein Röntgenfilm für 5-20 Minuten exponiert und der Film automatisch entwickelt.

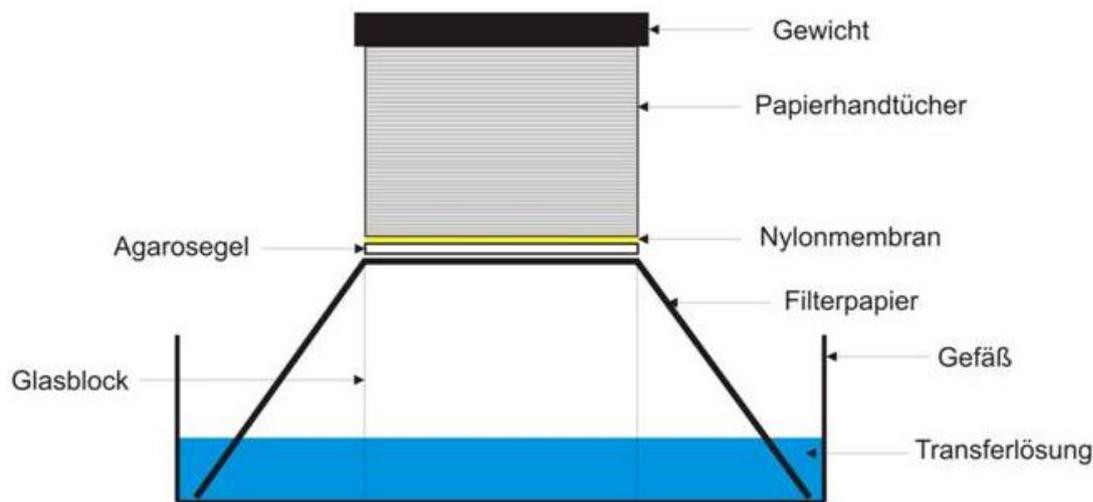


Abbildung 9: Der Aufbau des Southern Blots⁹³

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 RNA *in situ* Hybridisierung

Mit der RNA *in situ* Hybridisierung wird mRNA in Embryonen nachgewiesen. Eine zum spezifischen DNA-Abschnitt komplementäre und DIG-markierte Sonde weist das Expressionsniveau qualitativ und semiquantitativ nach. Die Quantifikation kann dabei nur in Proben desselben Experiments verglichen werden. Hat die Sonde an den DNA-Abschnitt gebunden, werden DIG-Antikörper hinzugegeben. Aufgrund der Kopplung an alkalische Phosphatase sind sie farblich durch eine enzymatische Reaktion detektierbar.

3.5.2 Herstellung von DIG markierten Sonden

Um eine DIG markierte RNA-Sonde herzustellen, wurden Primer von mindestens 400 bp Länge im Umfeld des Gens definiert. Für die PCR wurde cDNA verwendet, das Produkt anschließend aufgereinigt und in den pTA GFP-Vektor kloniert. Da dieser einen T7- und Sp6-Promotor aufweist, kann eine Sonde unabhängig von der Orientierung des Inserts hergestellt werden. Die Sondentranskription und DIG-Markierung erfolgte mithilfe eines DIG RNA Labeling Kits.

Tabelle: Herstellung von DIG markierten Sonden

Menge	Substanz
200 ng	aufgereinigtes PCR-Produkt
2 µl	DIG RNA Labeling Mix (10x)
2 µl	Transkriptionspuffer (10x)
1 µl	RNAse Inhibitor
2 µl	RNA Polymerase (Sp6, T7) 2 U/µl
ad 20 µl	H ₂ O (DEPC)

Tabelle: Primersequenz der Sonde

Primer	Sequenz
Fragment	s. Anhang
Forward Primer	CCCGTGAAGTGAATGTAGGG
Reverse Primer	CTCTCCTGGCTCGACTCTTG

Nach zwei Stunden bei 37 °C war die Transkription beendet, und die DNA wurde mithilfe von zwei Mikrolitern DNase I bei 37 °C in 15 Minuten abgebaut. Zur Unterbrechung der Reaktion wurden zwei Mikroliter 0,2M EDTA (pH 8,0) addiert, und nach Zugabe von H₂O (DEPC) bis auf ein Volumen von 100 µl zehn Mikroliter 4M LiCl (DEPC) sowie 300 µl hundertprozentiger Ethanol (-20 °C) hinzugefügt. Durch mindestens dreißigminütige Lagerung bei -80 °C konnte die Sonden-DNA ausgefällt werden. Ein DNA-Pellet entstand nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C sowie zweimaliger Waschung mit 75% Ethanol (DEPC). Es wurde in 100 µl DEPC resuspendiert, und nach Qualitätssicherung mittels Agarosegel bei -80 °C gelagert.

3.5.3 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Die Whole Mount *in situ* Hybridisierung (WM*ish*) dient dazu, die Expression eines spezifischen Gens, hier *Pitx1*, in ganzen Maus-Embryonen (E10.5 bis E12.5) zu visualisieren. Dazu wurden die Embryonen in PBS/DEPC präpariert und über Nacht bei 4 °C in 4% PFA/PBS fixiert. Am nächsten Tag wurden sie zweimal für 30 Minuten bei 4 °C in PBST/DEPC gewaschen und dehydriert, indem sie für jeweils zehn Minuten einer aufsteigenden Methanolkonzentration ausgesetzt wurden (je einmal 25%, 50%, 75%, zweimal 100%). Daraufhin wurden sie bei -20 °C in reinem Methanol gelagert. Für den Versuch wurden gewünschte Embryonen wiederum jeweils zehn Minuten in einer absteigenden Methanolkonzentration rehydriert (je einmal 75%, 50%, 25% Methanol/PBST/DEPC, zweimal PBST/DEPC) und für eine Stunde und bei 4 °C mit sechsprozentigem Wasserstoffperoxid/PBST gebleicht. Die Embryonen wurden dreimal

mit PBST/DEPC gewaschen und bei Raumtemperatur mit Proteinase K verdaut, um das Gewebe für die Hybridisierung zugänglicher zu machen. Die Maus-Stadien E10.5 bis E11.5 wurden mit 10 µg/ml Proteinkinase für drei Minuten und das Stadium E12.5 mit 20 µg/ml für fünf Minuten inkubiert. Die Proteinase wurde durch zweimaliges Waschen mit PBST/Glycin [2 mg/ml] für je fünf Minuten inaktiviert, und die Embryonen zweimal je fünf Minuten mit PBST/DEPC, dreimal fünf Minuten mit RIPA-Puffer und dreimal je fünf Minuten mit PBST/DEPC gewaschen. Anschließend wurden sie für 20 Minuten in 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd/0,1% Tween20 fixiert, dreimal fünf Minuten in PBST, dann je einmal zehn Minuten in PBST/Hybridisierungspuffer (1:1) und zehn Minuten in Hybridisierungspuffer gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer für eine Dauer von ein bis drei Stunden bei 65 °C. Die Denaturierung erfolgte drei bis fünf Minuten bei 80 °C. Zur Hybridisierung wurden ein Milliliter einer Mischung (100:1) von Hybridisierungspuffer und transfer-DNA [100 µg/ml] mit zehn Mikrolitern der Sonde [0,1-1 µg/ml] vermischt, über Nacht zu den Embryonen gegeben und diese bei 65 °C inkubiert. Die überschüssige Sonde wurde am nächsten Tag entfernt und die Embryonen zweimal je 30 Minuten mit 65 °C warmem Hybridisierungspuffer gewaschen. Danach wurden die abgekühlten Embryonen für fünf Minuten mit Hybridisierungspuffer/RNase-Lösung (1:1) gewaschen und bei 37 °C ein RNase-Verdau (100 µg RNase A) für zweimal 30 Minuten durchgeführt, um ungebundene Sonde zu entfernen. Dem schloss sich eine Waschung mit SSC/FA/T bei 65 °C an. Dabei wurden die Embryonen zweimal fünf, dreimal zehn und sechsmal 20 Minuten gewaschen und danach bei Raumtemperatur umgepuffert. Dafür wurden sie einmal zehn Minuten in 1:1 SSC/FA/T/1x MABT und zweimal zehn Minuten in MABT gewaschen. Mit Blockierlösung (10% Boehringer blocking reagent in MABT) wurden mithilfe einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur unspezifische DIG-Antikörper-Bindungsstellen abgedeckt, und die Embryonen über Nacht mit Anti-DIG-FAB-Antikörper in einprozentigem BBR/MABT (1:5000) geschwenkt. Die Embryonen wurden für dreimal fünf Minuten und achtmal 30 Minuten in PBST/Tetramisol [500 mg/L] gewaschen und dadurch ungebundener Antikörper entfernt. Nach einer schüttelnden Lagerung über Nacht bei 4 °C wurden die Embryonen dreimal 20 Minuten in ALP-Puffer gelagert und dann im Dunkeln schwenkend bei Raumtemperatur in BM Purple AP Substrat gegeben. Dabei variierte die Inkubationszeit aufgrund der Signalintensität der jeweiligen Sonde. Die Fixierung erfolgte in dreimal zehn Minuten mit ALP-Puffer, dann wurden die Embryonen bei 4 °C in 4% PFA/PBS/5 mM EDTA/0,2% Glutaraldehyd aufbewahrt. Die Fotodokumentation erfolgte mithilfe der Software AxioVision 4.6.

3.5.4 X-Gal-Färbung von Embryonen

Die X-Gal-Färbung von Embryonen greift auf das durch das *LacZ*-Gen (*E.Coli*) kodierte Enzym β -Galactosidase zurück. Dieses setzt X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl um. Letzteres oxidiert und zeigt dabei eine dunkelblaue Färbung.

Die Embryonen transgener Mäuse wurden dazu in PBS (bidest) gewaschen, und bei 4 °C fixiert. Im Stadium E10.5 waren dies 30 Minuten, bei E11.5 40 Minuten und bei E12.5 50 Minuten. Anschließend wurden die Embryonen für fünf Minuten mit PBS gewaschen und unter Lichtausschluss mithilfe von X-Gal eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur gefärbt. Die resultierende Färbung variierte aufgrund der Diffusionsstärke der Lösung und dem Erfolg der Konstruktinsertionen. Die Inkubationsdauer wurde daher dem Einzelfall angepasst. Hiernach wurden die Embryonen mehrmals mit PBS gewaschen und bei 4 °C in 4% PFA fixiert. Innerhalb weniger Tage erfolgte mithilfe der AxioVision Software die Fotodokumentation an einem Binokular.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden neun ausgewählte potentielle Enhancer des Gens *PITX1* mithilfe eines LacZ-Reporterkonstrukts auf ihre Funktion *in vivo* hin untersucht. Sie wurden durch mehrere Klonierungsschritte in Stammzellen eingebracht und die Stammzellen anschließend in Mäuse verpflanzt. Die resultierenden Embryonen wurden mit X-Gal-Lösung behandelt, und wiesen bei erfolgreicher Klonierung eine Färbung der aktiven Region auf.

Es zeigten sich verschiedene, teils überlappende Expressionsmuster der einzelnen Abschnitte. Die Expression trat auch an Stellen auf, die nicht mit *PITX1* in Verbindung gebracht werden. Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden dargelegt.

4.1 Primersequenz

Als Enhancer-Kandidaten wurden Bereiche ausgewählt, die phylogenetisch besonders konserviert sind, p300 Peaks aufweisen und durch hohe Interaktion in den 4C-Daten auffallen. Diese Bereiche wurden zur besseren Durchführbarkeit in einer Spanne von etwa 1000 Basenpaaren gefasst, dann mithilfe des UCSC Genome Browser flankierende Primersequenzen bestimmt. Wenn diese Primersequenzen die bereits in den Methoden erwähnten Kriterien erfüllten, wurden sie bei Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, D) bestellt und das sogenannte Template mithilfe kommerzieller PCR-Kits synthetisiert. Es gab insgesamt 14 Kandidaten, von denen aus verschiedenen Gründen nur vier für die Stammzellkultur verwendet wurden, die Konstrukte A, C, G und H. Des Weiteren werden in dieser Arbeit auch Konstrukte aufgeführt, bei denen der Autor nicht an den Klonierungsschritten beteiligt war, sondern erst bei den Southern Blots, Präparationsschritten sowie bei der Fotodokumentation mitwirkte. Gemeinsam wurden sie alphabetisch benannt, entsprechend ihrer Position in der Genwüste telomerisch von *PITX1* (Siehe Basenpaar-Annotation im Anhang). Die Information zu *PITX1*-regulatorischen Domänen, wie von Bing Ren zur Verfügung gestellt¹⁶, wurden erst nach Auswahl der 14 Kandidaten bekannt, flossen dann jedoch bei der Fokussierung auf vier Kandidaten für die ES-Zellarbeit ein.

4.2 PCR

Nach der mithilfe bestellter Primer durchgeführten PCR wurde der jeweilige Interessenbereich via Gelelektrophorese von der restlichen Probe getrennt (Abbildung 10). Wenn die Banden der PCR den erwarteten Längen entsprachen, wurden sie aus

dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Da bei einigen Konstrukten die PCR nicht funktionierte, wurde der gewählte Bereich überprüft und gegebenenfalls mit neuen Primern synthetisiert, um beispielsweise übersehene Schnittstellen für Restriktionsenzyme auszuschließen. Zusätzlich wurden die Reaktionsbedingungen kontrolliert und angepasst, indem Zeit und Temperatur der einzelnen PCR-Stufen verändert und DMSO zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurden.

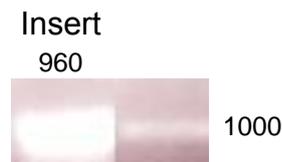


Abbildung 10: PCR

Die PCR-Banden eines Beispiel-Konstrukts. Es entspricht nach Überprüfung mittels 1 kb+-Ladder der erwarteten Länge und wird anschließend extrahiert und aufgereinigt.

4.3 Verdau mit NotI

Die aus dem Agarosegel extrahierte DNA wurde anschließend durch einen NotI-Verdau für die Ligation mit dem pBluescript vorbereitet. Der Verdau ist exemplarisch gezeigt (Abbildung 11). pBluescript wurde ebenfalls mit NotI verdaut, dann dephosphoryliert, um die vorzeitige Religation seiner *sticky ends* zu verhindern.



Abbildung 11: NotI-Verdau

Beim exemplarisch gezeigten NotI-Verdau werden die PCR-Produkte für die Ligation mit pBluescript vorbereitet. Der 1 kb+-Ladder wurde entsprechend der bandenlängen beschriftet.

4.4 Erste Kolonie-PCR

pBluescript wurde einzeln mit den Konstrukten A-H ligiert und anschließend mittels einer Transformation in *E. Coli*-Bakterien eingebracht. Die so veränderten Kolonien wiesen eine Ampicillinresistenz auf, über die sie selektiert wurden. Nach erfolgreicher Anzucht wurden die Kolonien mittels einer Kolonie-PCR auf die korrekte Orientierung des Inserts innerhalb des Vektors geprüft, indem ein Primer aus der potentiellen Enhancersequenz heraus auf die LacZ-Kassette zeigte, der andere aus dieser Kassette in Richtung des Inserts. Die resultierende Bandenlänge ist je Insert spezifisch und hängt von der Lage des ersten Primers ab (Abbildung 12).

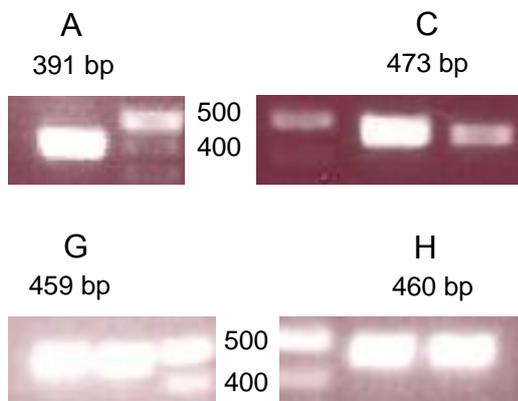


Abbildung 12: Erste Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wird mithilfe zwei aufeinander gerichteter Primer die Insertion und korrekte Orientierung der Inserts überprüft. Anhand der durchgängig verwendeten 1 kb+-Ladder lässt sich die Bandenlänge vergleichen.

4.5 Verdau PacI/NheI

Nach erfolgreicher Kolonie-PCR konnten aus einer Reihe von Klonen der am besten Geeignete ausgewählt und mittels Anzucht in Nährmedium vervielfacht werden. Mittels MINI oder MIDI wurden anschließend die Vektoren vermehrt und extrahiert, darunter auch das gewünschte pBluescript. Dieses wurde nun mittels der Restriktionsenzyme PacI und NheI zertrennt, um Insert und den hinzugefügten Hygromycin-Promotor für die Ligation mit dem pGK frt-Backbone vorzubereiten. Da pGK frt mit zwei unterschiedlichen Enzymen linearisiert wurde, gibt es keine vorzeitige Annäherung der Enden und eine Dephosphorylierung ist nicht notwendig. Im exemplarisch gezeigten Verdau (Abbildung 13) ist neben dem jeweiligen Konstrukt bereits der pGK frt-backbone (3,57 kb) zu sehen, da der Verdau nachträglich erstellt wurde.

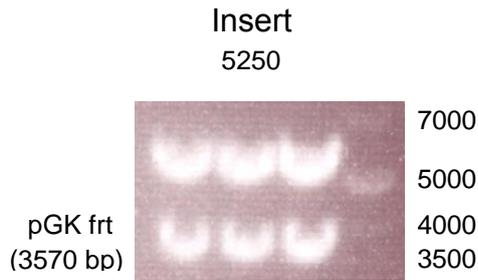


Abbildung 13: Verdau mit PacI/NheI

Im exemplarisch gezeigten PacI/NheI-Verdau ist unter der gewünschten Insertbande auch eine zweite Bande sichtbar. Dies ist der pGK frt-Vektor

4.6 Zweite Kolonie-PCR

Nach der Ligation des jeweiligen Inserts in den zweiten Backbone wurde der neue Vektor über eine Transformation in E.Coli-Bakterien eingebracht und diese wiederum mit Ampicillin auf erfolgreiche Insertion selektiert. Um die korrekte Orientierung zu prüfen, wurde eine zweite Kolonie-PCR durchgeführt, bei der der erste Primer aus LacZ heraus, der zweite aus dem Backbone hinein zeigt. Dadurch beträgt die Bandenlänge bei allen Konstrukten genau 540 bp (Abbildung 14). War die Kolonie-PCR erfolgreich, wurden die entsprechenden Kolonien vervielfältigt und mittels MINI und MIDI der pGK frt-Vektor extrahiert.

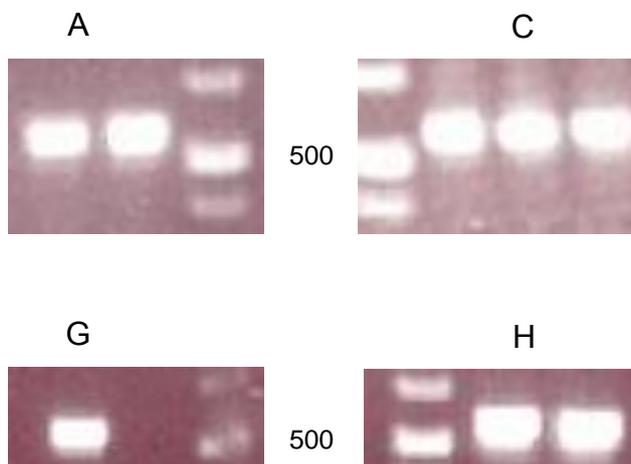


Abbildung 14: Zweite Kolonie-PCR

Bei der zweiten Kolonie-PCR werden zwei neue Primer verwendet. Der Erste zeigt aus der LacZ-Kassette auf den neuen Backbone pGK frt, der Zweite aus diesem heraus auf den ersten Primer. So entstand für alle Inserts dieselbe Bandenlänge von 540 bp.

4.7 Transfektion

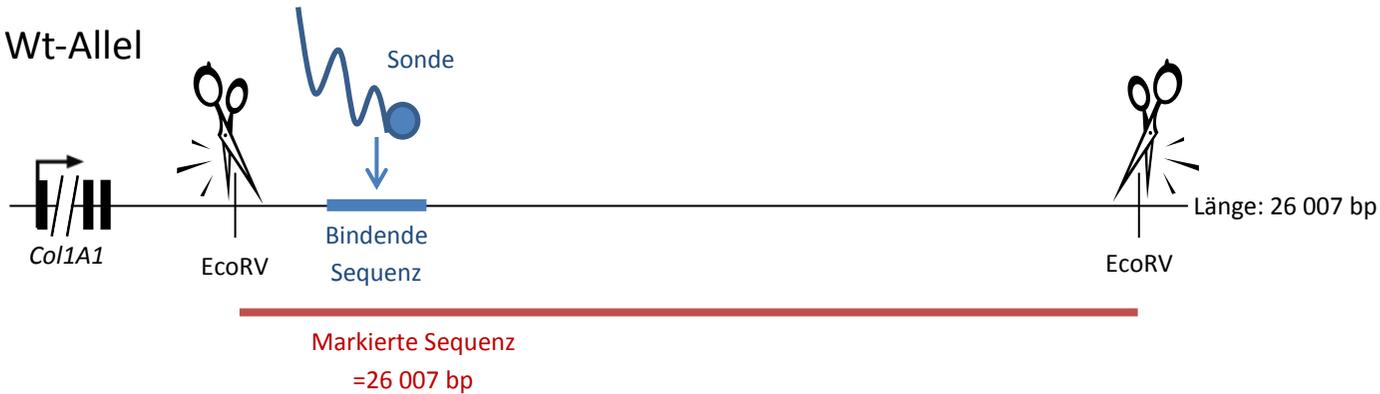
Vier Mikrogramm des jeweiligen Vektors wurden benutzt, um eine Kultur aus embryonalen Stammzellen mithilfe einer Flippase zu transfizieren, nachdem die Zellen auf eine Lage embryonaler Fibroblasten ausgesät worden waren. Die transfizierten Zellen wurden nach einigen Tagen Zellkultur mittels Hygromycin selektiert, da ein Hygromycin-Resistenzgen in einem Allel der C2-Stammzellen bereits vorhanden. Für seine Expression bedarf er jedoch des Minimalpromotors, welcher zusammen mit dem Konstrukt inseriert wurde. Nach einer langen Selektionsphase von etwa sieben bis zehn Tagen, bei der ein Großteil der Stammzellen stirbt, zeigten sich einige Kolonien resistenter Klone. Sie wurden im Folgenden entnommen und in einzelnen Kulturschalen zu größeren Verbänden vermehrt. Schrittweise wurden die Kolonien in größere Kulturschalen expandiert und zum Schluss lysiert, um die DNA zu extrahieren. Einige der Zellen wurden vorher für zukünftigen Gebrauch bei -80 °C eingefroren und im Stickstofftank gelagert.

4.8 Southern Blot

Mit der gewonnenen DNA wurde ein Southern Blot durchgeführt, um mithilfe einer spezifischen Sonde für den *COL1A1*-Lokus, welche im Insertionslokus bindet, die erfolgreiche Insertion des Konstrukts in die Stammzell-DNA nachzuweisen. Dabei sprechen bei Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRV, PaeI/NheI und SacI lange Banden für den Wildtyp oder ein nicht inseriertes Konstrukt, kürzere Banden für eine erfolgreiche Insertion. Der Verdau mit EcoRV wird in Abbildung 15 stellvertretend erläutert, da der Verdau mit PaeI/NheI nur für das Konstrukt H erfolgte, und wie der Verdau mit SacI (Konstrukt D, Hs1473) im Prinzip dem mit EcoRV (Konstrukte A-C, E-G) gleicht. Die Ergebnisse des Southern Blots werden in Abbildung 16 dargestellt.

A

Wt-Allel



B



Modifiziertes
Allel

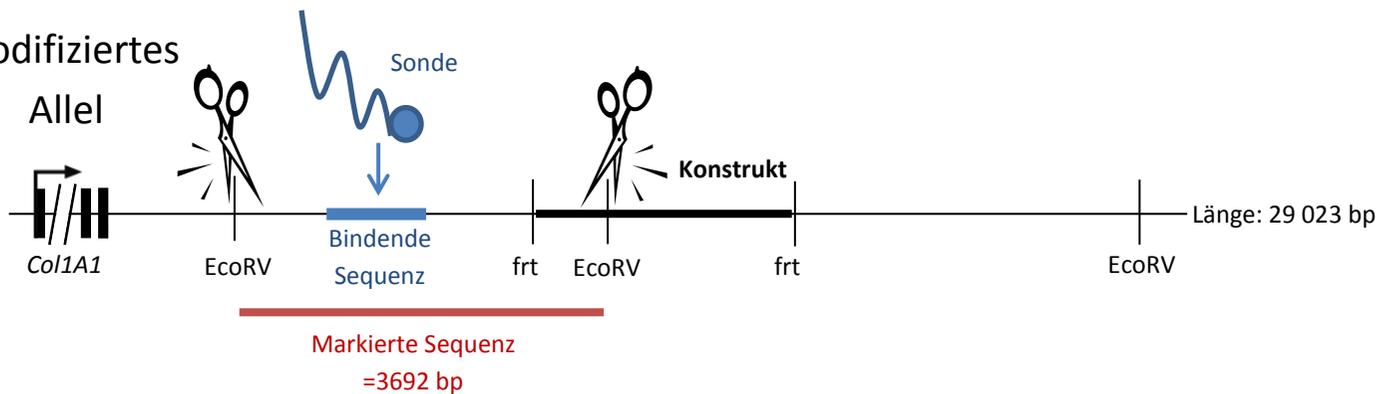


Abbildung 15: Der Southern Blot

Beide Allele in C2-Stammzellen: **A** Wildtyp (Wt) und modifiziertes Allel. Das Restriktionsenzym EcoRV trennt die Stränge an bekannten Schnittstellen. Die Sonde bindet an eine definierte Sequenz, und wird über Chemolumineszenz nachgewiesen. Im Wildtypallel beträgt die Länge der so markierten Sequenz 26 007 Basenpaare. Bei erfolgreicher Insertion des Konstrukts verkürzt sich die markierte Sequenz auf 3692 Basenpaare, da eine zusätzliche EcoRV-Schnittstelle eingebracht wird. Beide Banden lassen sich im Southern Blot **B** anhand eines Längenmaßes differenzieren. Eine fehlerhafte Bande ist sichtbar.

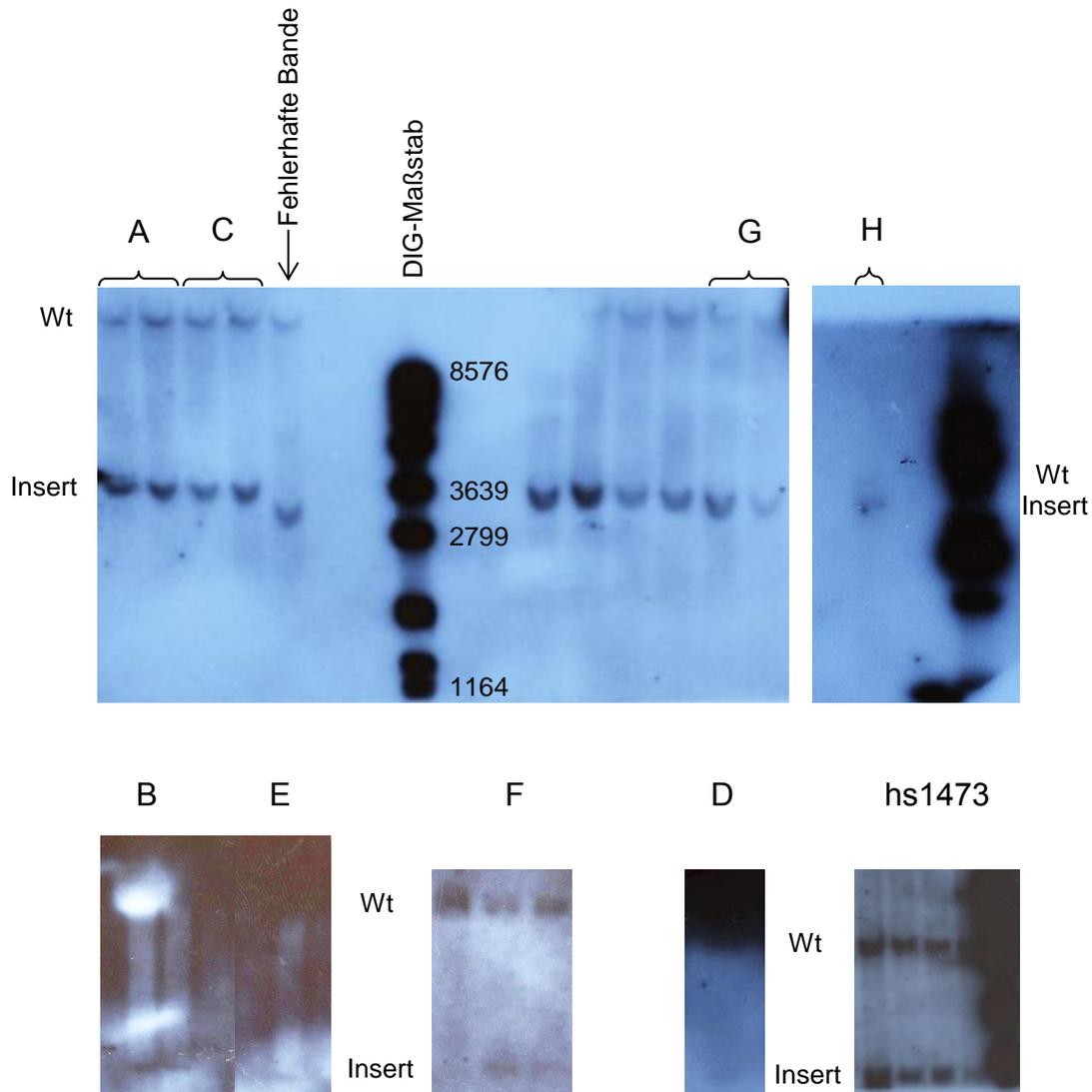


Abbildung 16: Southern Blot der Enhancer-Kandidaten

Die Banden der Inserts entsprechen den erwarteten Längen. Eine fehlerhafte Bande ist neben Konstrukt C sichtbar, das entsprechende Insert wurde nicht weiter verwendet.

4.9 Maus-Präparation und LacZ-Färbung

Abhängig von einer korrekten Bandenlänge im Southern Blot wurden die eingefrorenen Zellen erneut ausgesät, aggregiert und in Ammen eingebracht. Die entstehenden Embryonen wurden am Tag E11.5 entnommen. Bei Behandlung mit X-Gal zeigten sie aufgrund der Aktivität des LacZ-Konstrukts eine Blaufärbung in betroffenen Arealen. Es wurden im Verlauf dieser Arbeit 22 Mäuse verwendet.

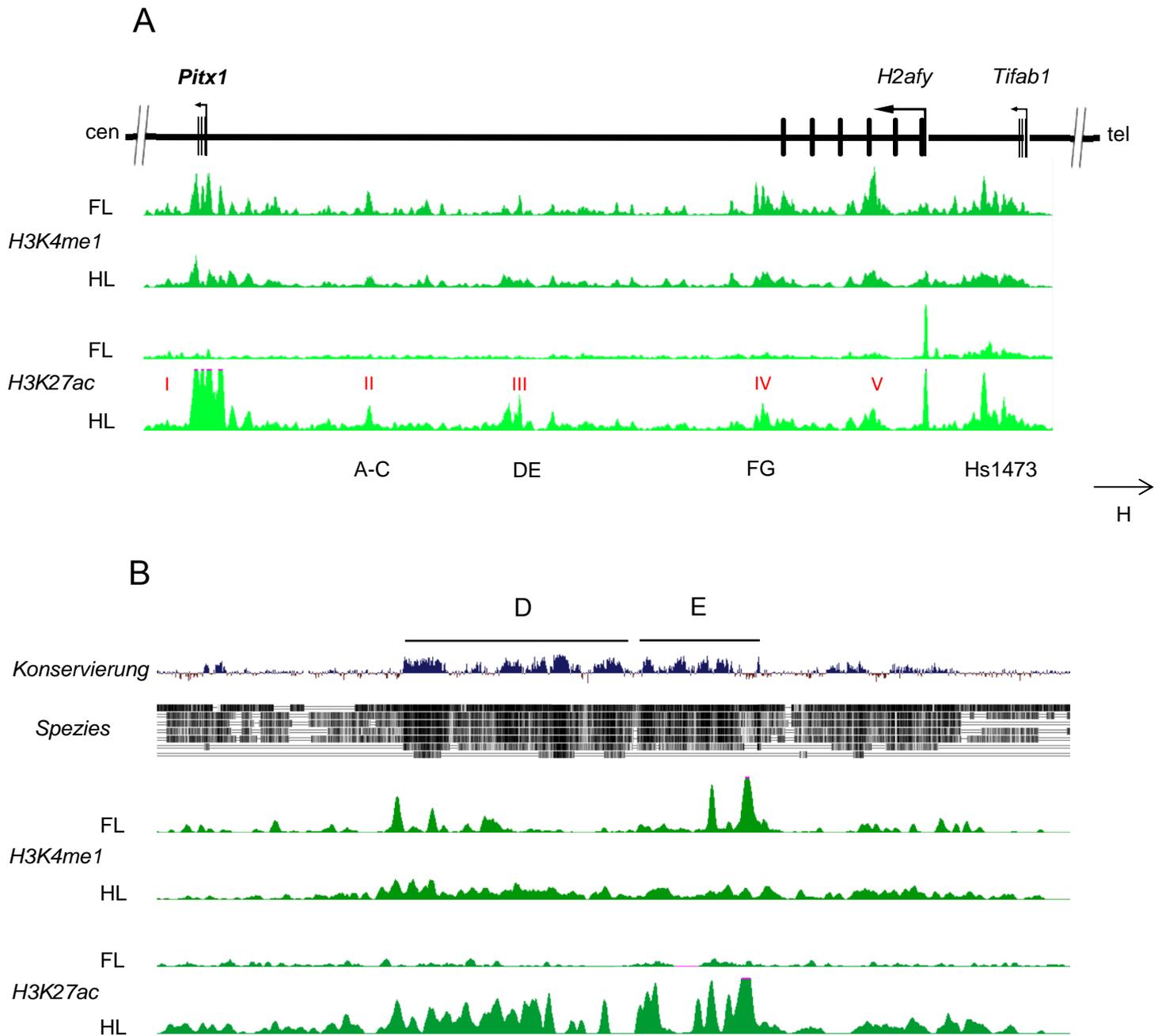


Abbildung 17: Ausschnitte aus der Region um PITX1

A Die Konstrukte A-H, der Enhancer *hs1473* sowie ihr Bezug zur Region zwischen *Pitx1* und dem Nachbargenen *H2afy*, *Tifab1*. Zusätzlich unveröffentlichte ChIP-Seq Daten aus unserem Labor (grün), welche die Chromatinmarkierungen H3K4me1 (aktiver oder inaktiver Enhancer) und H3K27ac (aktiver Enhancer), getrennt für vordere (FL) und hintere (HL) Extremität zeigen. In der hinteren Extremität ist H3K27ac besonders häufig. I-V (rot): römische Nummerierung der Islands.

B Der etwa 20 kb große Bereich zeigt Island III und den angrenzenden Abschnitt. Hier liegen die Konstrukte D und E, ein kleiner Bereich des Islands wird nicht abgedeckt. Bereiche mit starker Konservierung sind sichtbar, die genaue Konservierung zwischen den Spezies Ratte, Mensch, Orang-Utan, Hund, Pferd, Opossum und Huhn ist in dieser Reihenfolge darunter gezeigt. Die ChIP-Seq Daten aus unserem Labor (grün) zeigen H3K4me1 an (aktive und inaktive Enhancer). Eine verstärkte Enhanceraktivität in der hinteren Extremität gegenüber der vorderen wird durch Spitzen von H3K27ac angezeigt. Aufgrund praktischer Aspekte der PCR konnte kein Konstrukt über den gesamten Lokus D und E synthetisiert werden.

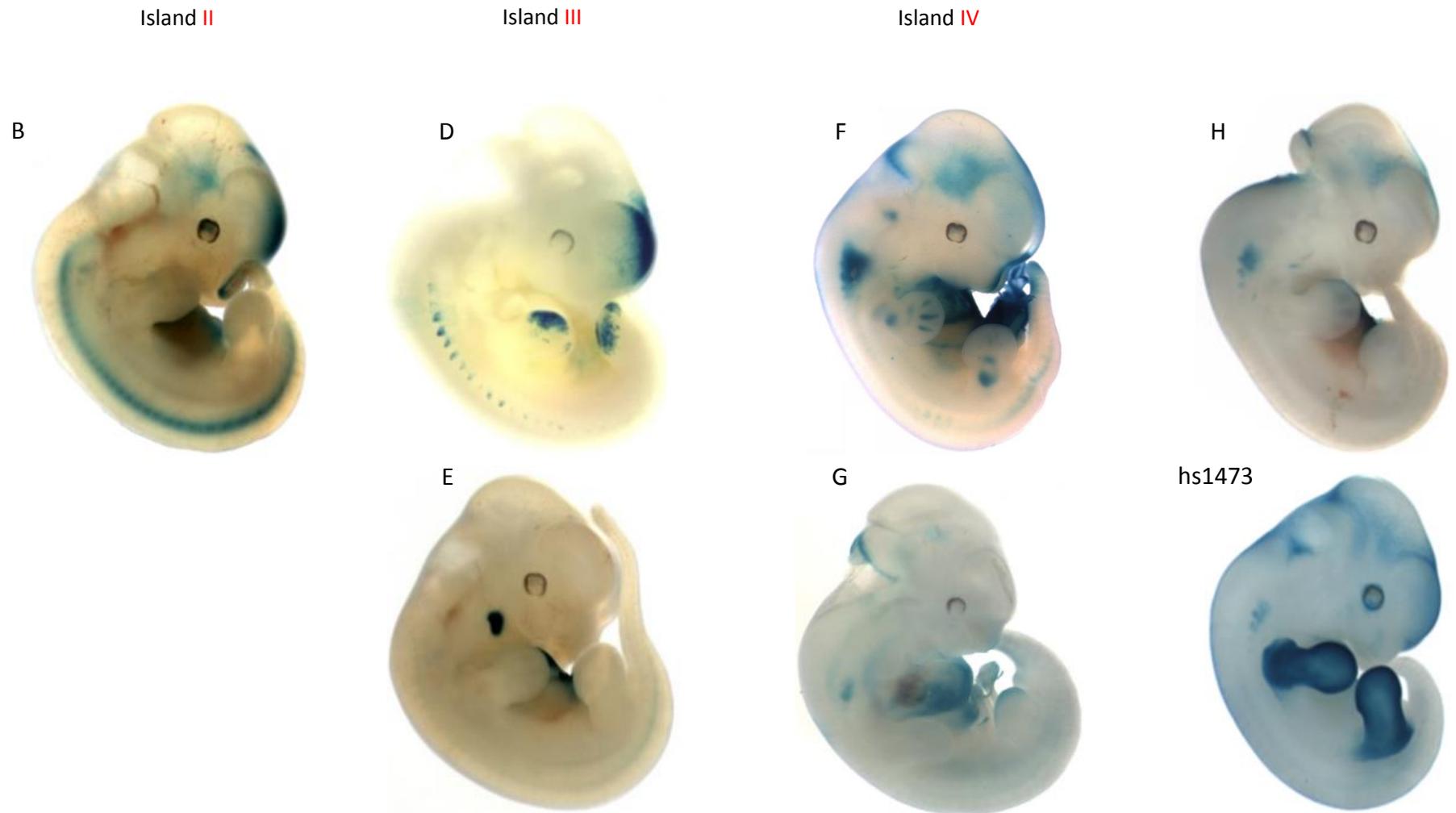


Abbildung 18: Überblick über Maus-Embryonen verschiedener Inserts
Durch Insertion des entsprechend benannten Abschnittes entstandene Expressionsmuster in Mäusen, Stadium E11.5. Zusätzlich ist der Enhancer hs1473 desselben Stadiums gezeigt. Auf die hier fehlenden Konstrukte A und C wird im Anschluss eingegangen.

4.9.1 Konstrukte A-H

Einen Überblick über die verwendeten Konstrukte und ihre Position im Verhältnis zu den umliegenden Genen gibt Abbildung 17. Im Folgenden soll die LacZ-Färbung der Mäuse beschrieben werden, wie sie in Abbildungen 18-27 dargestellt wird. Sie tritt konstruktübergreifend vor allem in den Extremitäten, dem Spinalkanal sowie den zervikalen (halsnahen) Somiten auf, ist jedoch auch in zahlreichen weiteren Arealen zu finden.

In der Maus des Konstrukts A zeigt sich eine leichte Blaufärbung an den Spitzen der vorderen und hinteren Extremität sowie im Bereich des Spinalkanals mit Betonung der zervikalen Somiten. Das Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar. Bei dem Konstrukt B liegt die Färbung im Bereich des Spinalkanals, mittlerer Gehirnteile sowie der rostralen Kalotte. Der Embryo zum Konstrukt C zeigt eine Färbung an den vorderen und hinteren Extremitäten sowie dem Spinalkanal. Dies ist wie bei Konstrukt A der einzige entwickelte Embryo seines Wurfes. Konstrukt D zeigt die Blaufärbung in Rippen bis hinab zur Lendenwirbelsäule. Hinzu kommen vordere Schädelanteile im Bereich der Stirn sowie eine diffuse, mosaikähnliche Zeichnung an den Spitzen beider Extremitäten. Für das Konstrukt E findet sich nur eine diffuse Rückenmarksfärbung, im Vergleich dazu jedoch eine sehr klar abgegrenzte Unterkieferfärbung. Das Konstrukt F weist eine der eindeutigsten Extremitätenfärbungen auf. Dabei zeigen sich mehrere blaue Areale im Verlauf der Hauptachse beider Extremitäten. In der hinteren Extremität sind dies zwei kleine Felder etwa auf Höhe des Ober- und der zwei Unterschenkelknochen sowie angedeutete Zehenstrahlen. In der vorderen Extremität ist neben einer Färbung im Bereich des Schulterblatts auch eine etwa auf Höhe der drei Ober- und Unterarmknochen sichtbar, sowie davon ausgehend die Strahlen der Fingerglieder zwei, drei und vier. Zusätzlich zeigen sich Färbungen im Somiten, mit Betonung des zervikalen Abschnittes sowie im Bereich der Hypophyse, des Mittelhirns und der Nackenfalte. Der Expressionsbereich des Konstrukts G liegt im Bereich der Spitze der hinteren Gliedmaße sowie der zervikalen Somiten, der Nackenfalte mit einem breiten Areal im Bereich der thorakalen Organe. Bei dem Insert H kommt es zur Expression in den zervikalen Somiten. Die Extremitäten zeigen keine Färbung, dafür jedoch Mesencephalon und Nackenfalte. Hs1473 weist im Zeitverlauf eine deutliche, fast seitengleiche Expression im Mesenchym beider Extremitäten auf, mit Betonung der Randbereiche. Am Tag E10.5 zeigt sich im oberen Abdomen ein Expressionsbereich. Der Spinalkanal ist ebenfalls blau gefärbt, anfänglich eine Vielzahl von Somiten, ab Tag E11.5 kranialer in Richtung Atlas (erster

Halswirbel) weichend. Hinzu kommt die Expression in der Nackenfalte und mittleren Hirnanteilen.

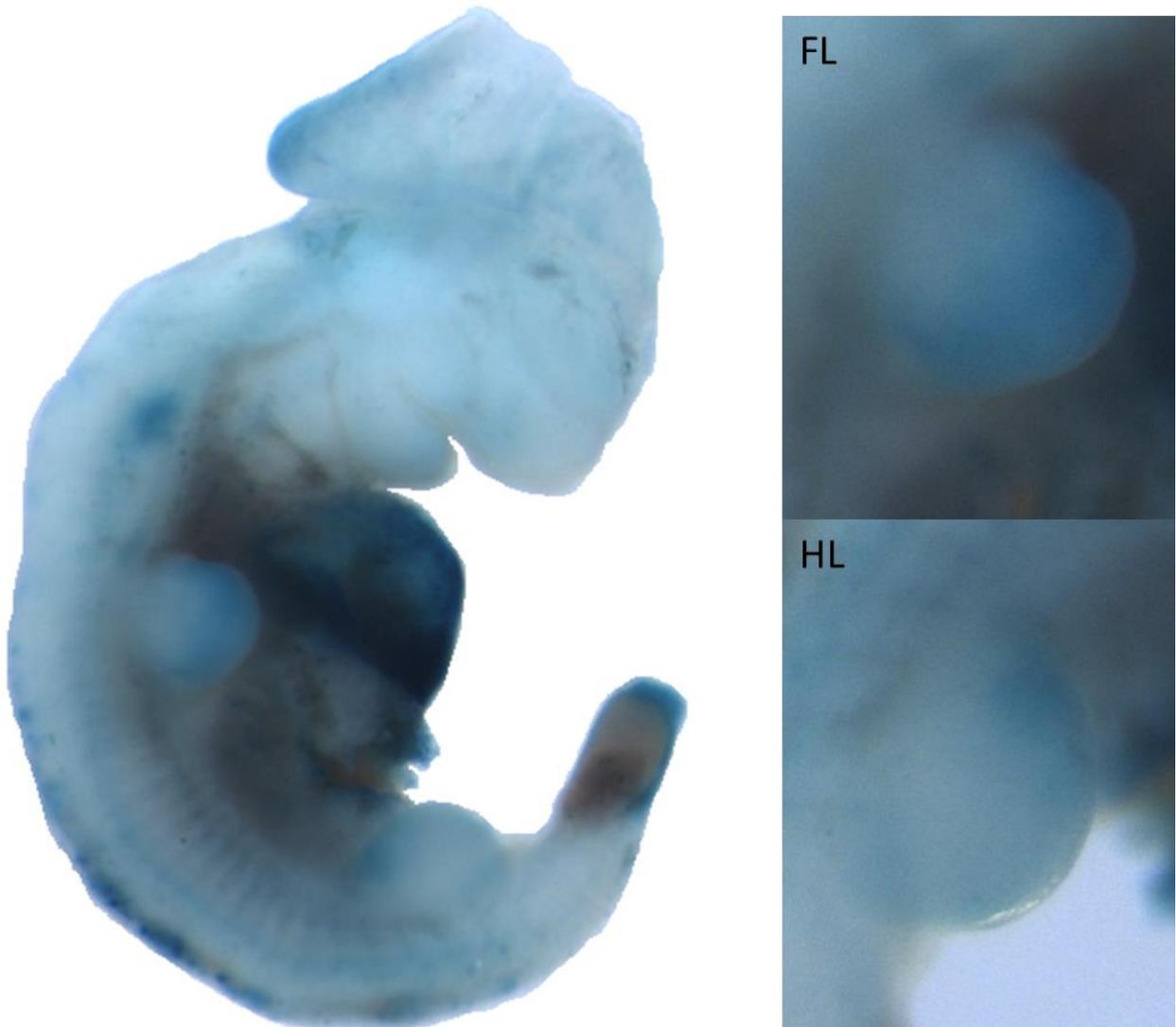


Abbildung 19: Konstrukt A

Für das Konstrukt A zeigt sich eine leichte Blaufärbung an den Somiten, den apikalen vorderen Extremitäten sowie den kranialen Anteilen der hinteren Extremitäten sowie im Bereich des Spinalkanals/ersten Somiten. Das Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar. Auf die hier und im Konstrukt C aufgetretenen Schwierigkeiten wird in der Diskussion näher eingegangen.

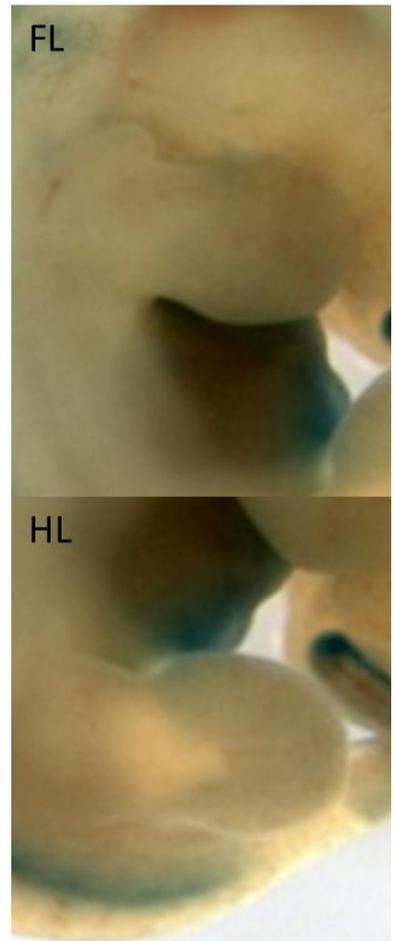


Abbildung 20: Konstrukt B

Für das Konstrukt B zeigt sich eine Färbung des Spinalkanals und mittlerer Gehirnanteile sowie der rostralen Kalotte/forebrain.

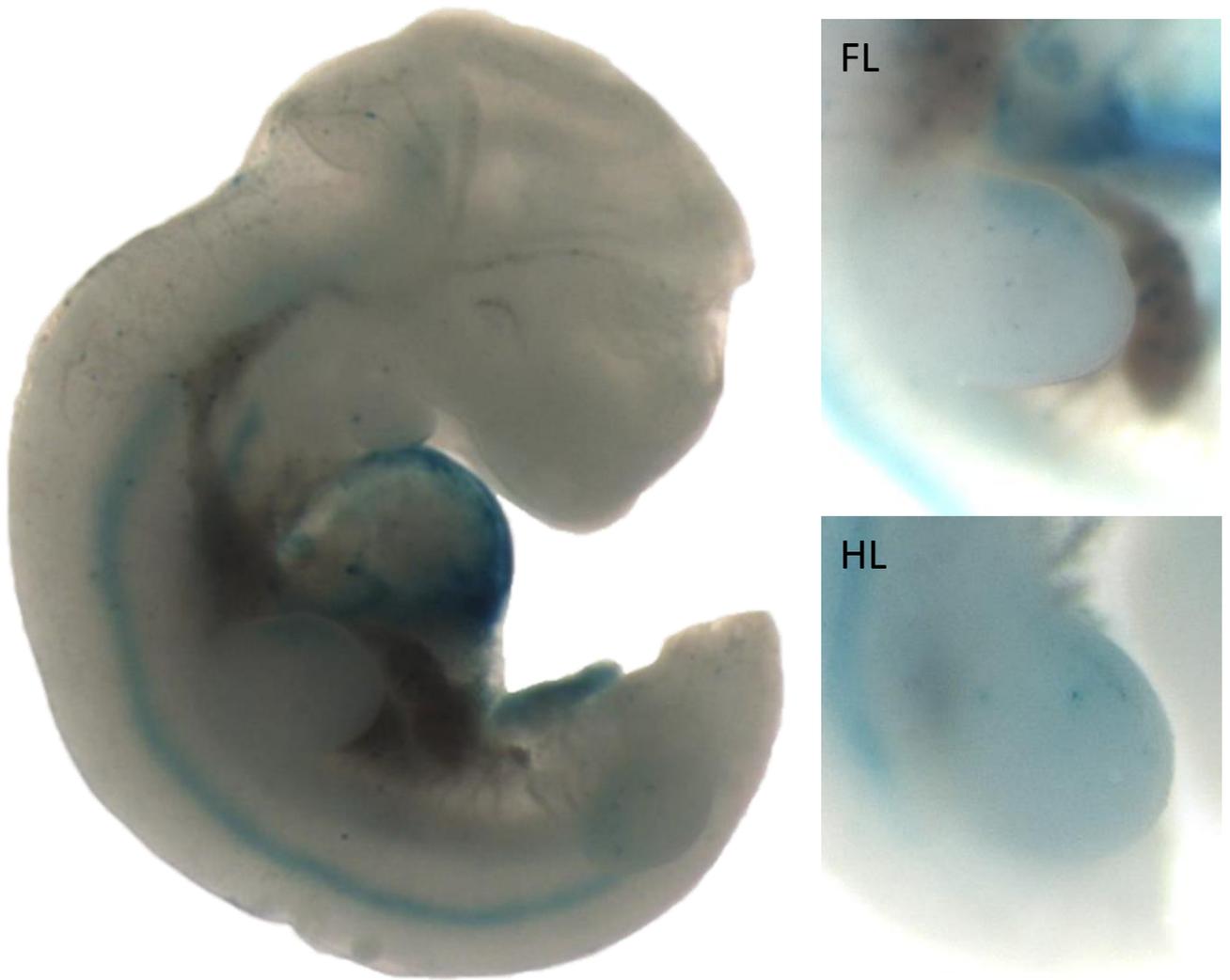


Abbildung 21: Konstrukt C

Der Embryo des Konstrukts C zeigt eine Färbung an den kranialen vorderen und hinteren Extremitäten sowie dem Spinalkanal. Dies war der Einzige entwickelte Embryo seines Wurfs, die Schwanzspitze wurde beim Präparieren abgetrennt. Das Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar. Auf die hier und im Konstrukt A zugrunde liegenden Probleme wird in der Diskussion näher eingegangen.

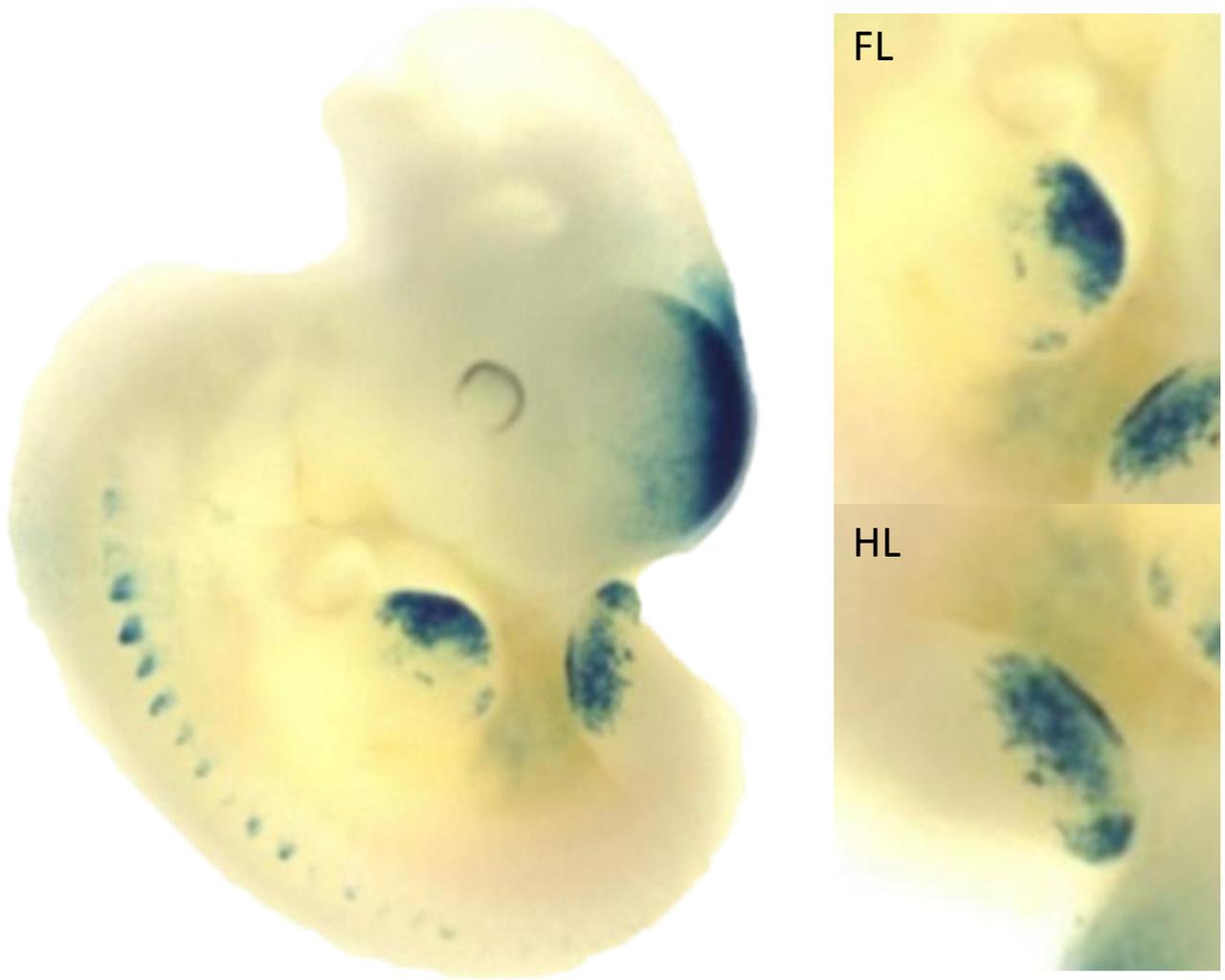


Abbildung 22: Konstrukt D

Bei dem Konstrukt D zeigt sich an der Wirbelsäule, an vorderen Kalottenanteilen sowie apikal an beiden Extremitäten eine diffuse, mosaikähnliche Zeichnung.

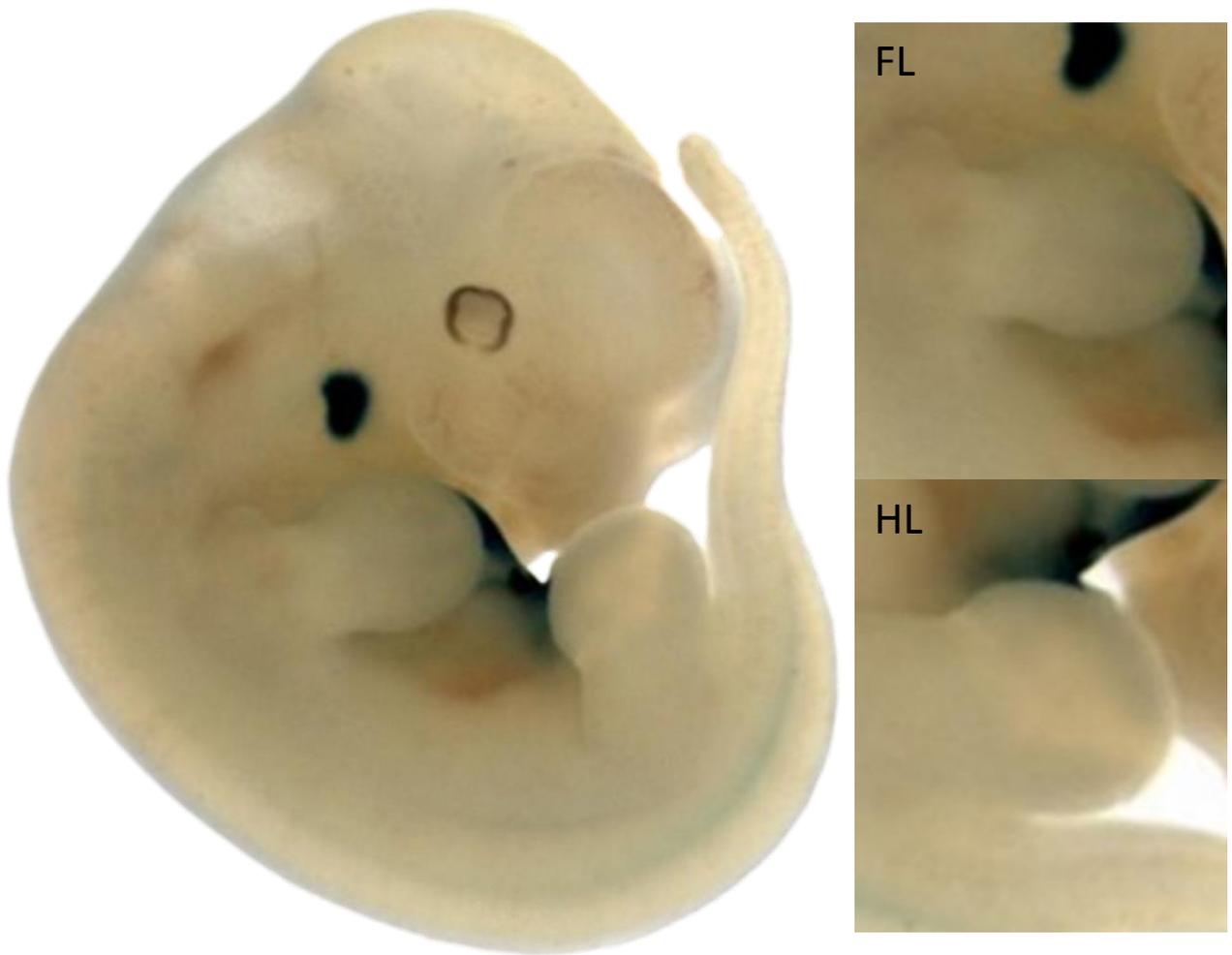


Abbildung 23: Konstrukt E

Beim Konstrukt E ist eine leichte Rückenmarksfärbung sichtbar, dazu eine klar abgegrenzte Mandibula.

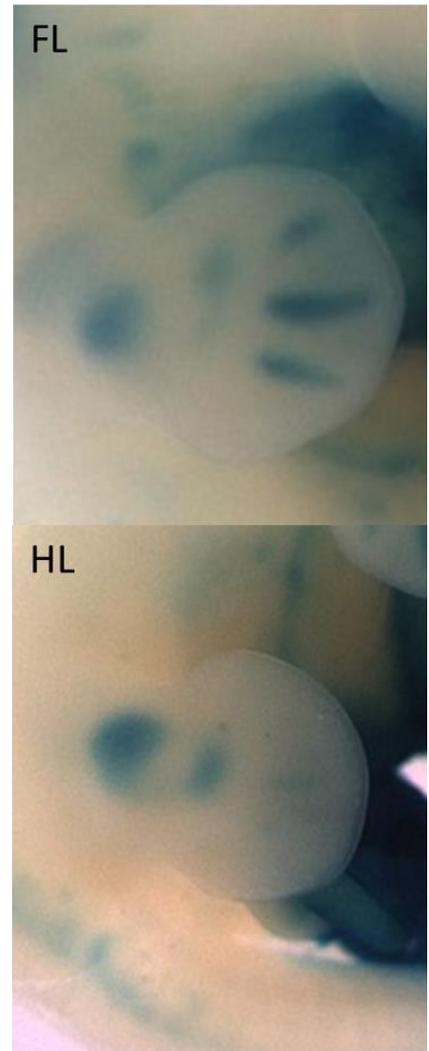
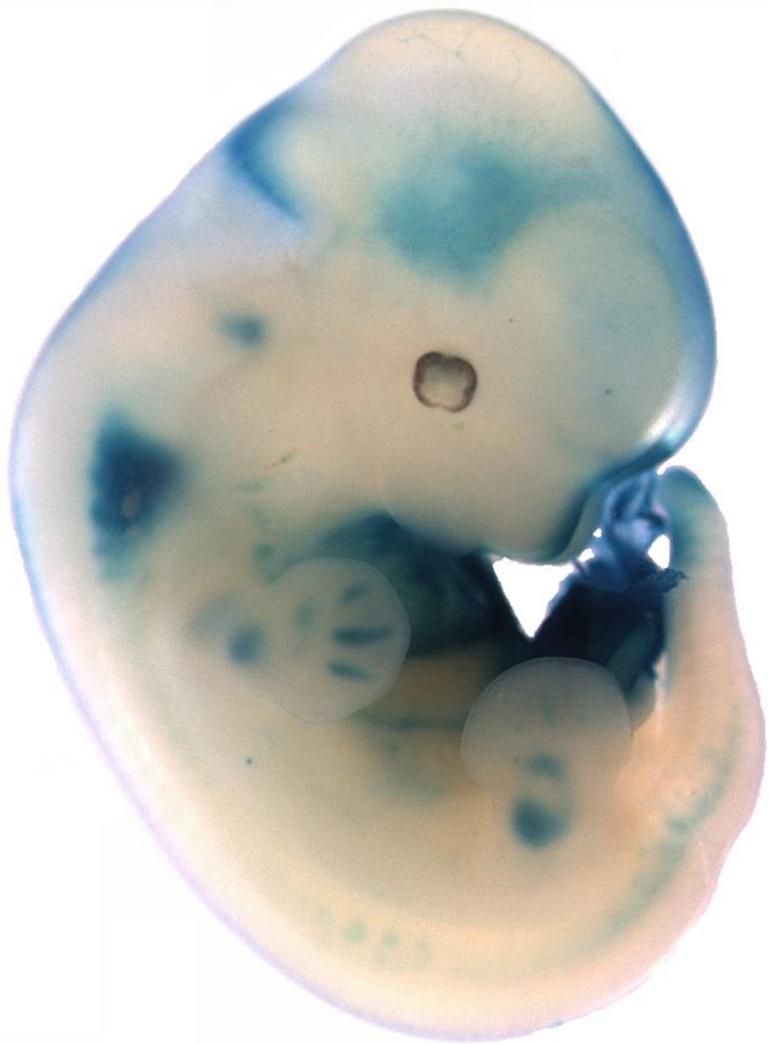


Abbildung 24: Konstrukt F

Bei dem Konstrukt F ist eine stark umschriebene Expression im Bereich der vorderen und hinteren Extremität sichtbar. In der Vorderen zeigen sich drei Kerne, sowie drei Fingerstrahlen. In der Hinteren zeigen sich zwei Kerne. Zusätzlich lassen sich Farbumschläge im Spinalkanal, besonders im Bereich der zervikalen Somiten erkennen, sowie im Bereich der Hypophyse, des Mittelhirns und der Nackenfalte.

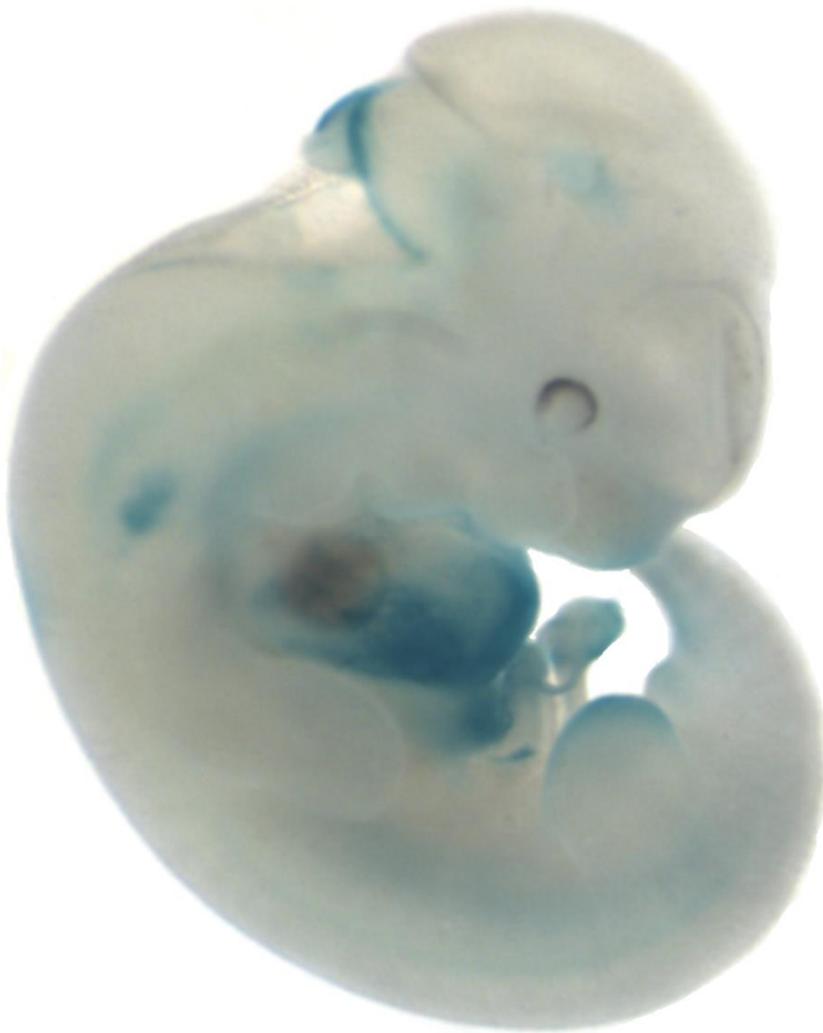


Abbildung 25: Konstrukt G

Bei dem Konstrukt G kommt es zur Expression im Bereich der apikalen hinteren Gliedmaße sowie der zervikalen Somiten, Nackenfalte und thorakaler Organe.

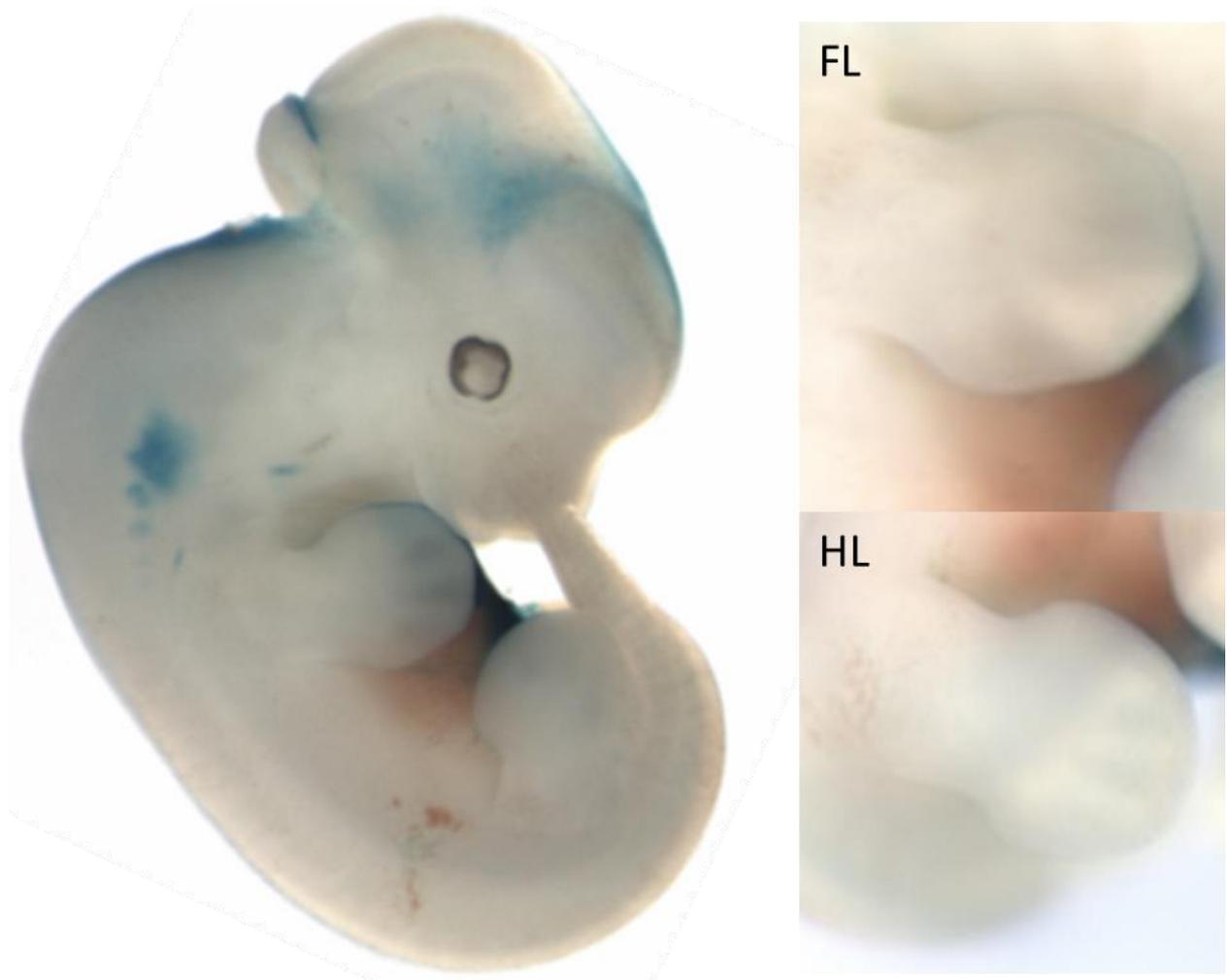


Abbildung 26: Konstrukt H

Bei dem Konstrukt I kommt es zur Expression in den zervikalen Somiten, die Extremitäten zeigen keine Färbung, dafür jedoch Mesencephalon und Nackenfalte.

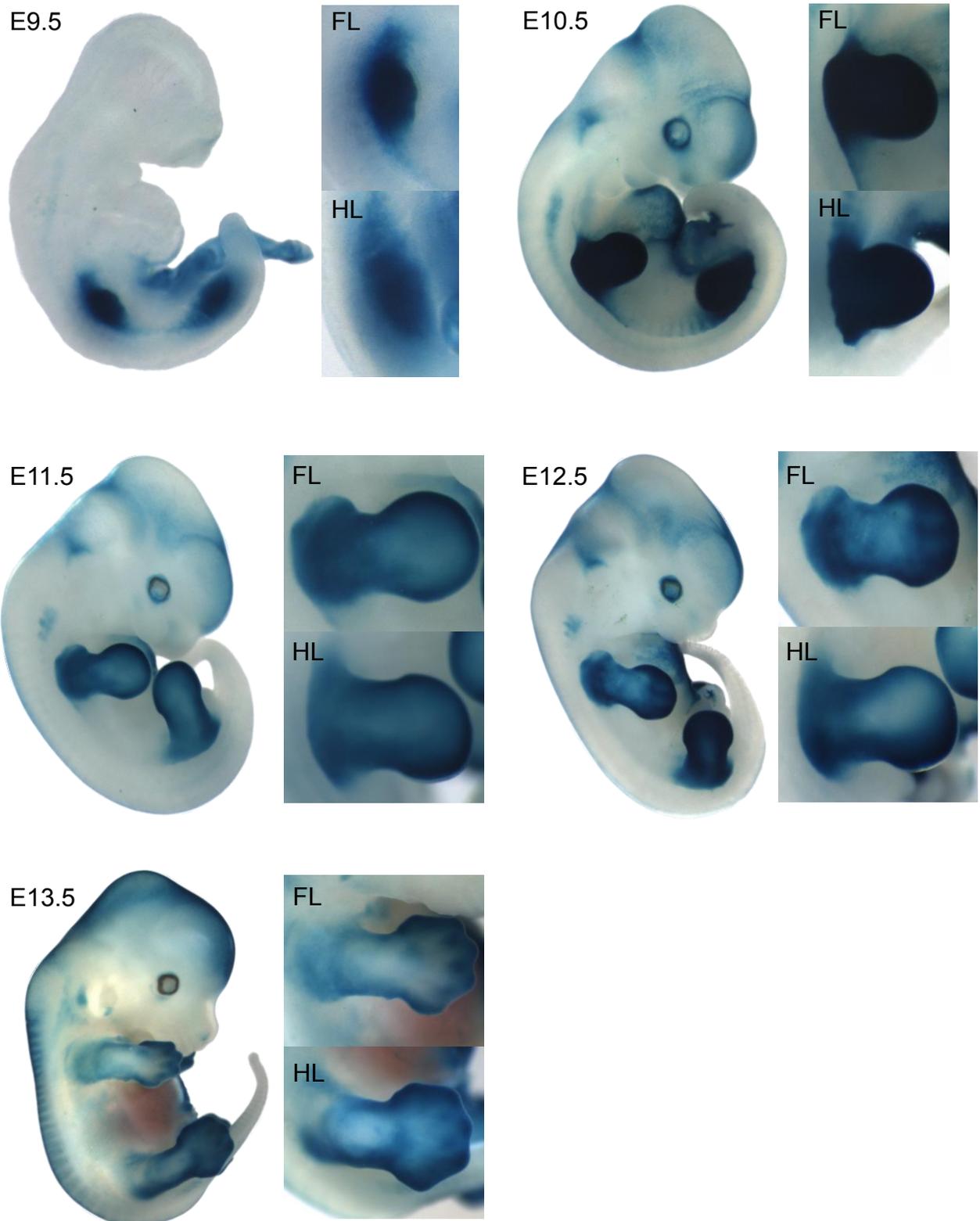


Abbildung 27: hs1473

Bei Änderungen der TADs kann sich der Genabschnitt Hs1473 als potenter Enhancer des PITX1-Gens erweisen. Hier sind Embryonen der entsprechenden Stadien gezeigt, bei denen Pitx1 ektop unter anderem in der vorderen Gliedmaße exprimiert wird. Die maximale Expression tritt zwischen E9.5-E13.5 auf und ist im Zeitverlauf deutlich in allen Extremitäten sichtbar. Hinzu kommt ab E9.5-E12.5 Abdomen und ab E9.5-E13.5 Spinalkanal, hier ab E10.5 mit Betonung der zervikalen Somiten, der Nackenfalte und mittlerer Hirnanteile. In den Extremitäten ist die Expression von Anfang an stark im Mesenchym, mit etwas dunklerem Randbereich.

4.10 Whole Mount *in situ* Hybridisierung

Um die Expression des LacZ-Reporterkonstrukts mit der natürlichen *Pitx1*-Expression vergleichen zu können, wurde letztere mittels WM*is*H in Wildtyp-Mäusen dargestellt (Abbildung 28-30). Dazu werden die präparierten und in mehreren Schritten vorbereiteten Mäuse der Stadien E10.5-E12.5 mit einer RNA-Sonde hybridisiert, diese anschließend abgewaschen und ungebundene Sonde mittels RNA-Verdau entfernt. Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für DIG-Antikörper wurden diese hinzugefügt und nach weiteren Waschschrinen mittels spezifischer Anti-DIG-Fab-Antikörper gebunden. Nach Zugabe eines für den zweiten Antikörper spezifischen Substrats kam es daraufhin an den Bindungsstellen der Sonde zu Farbumschlägen, welche fotografisch dokumentiert werden konnten.

Ein Vergleich der natürlichen *Pitx1*-Expression mit den einzelnen Konstrukten sowie hs1473 wird in Abbildung 31 gezeigt. Auf Unterschiede zu den natürlichen Expressionsmustern der benachbarten Gene *Neurog1*, *Cxcl14*, *Smad5* und *Spock1* (Abbildung 32-35) wird in der Diskussion näher eingegangen.

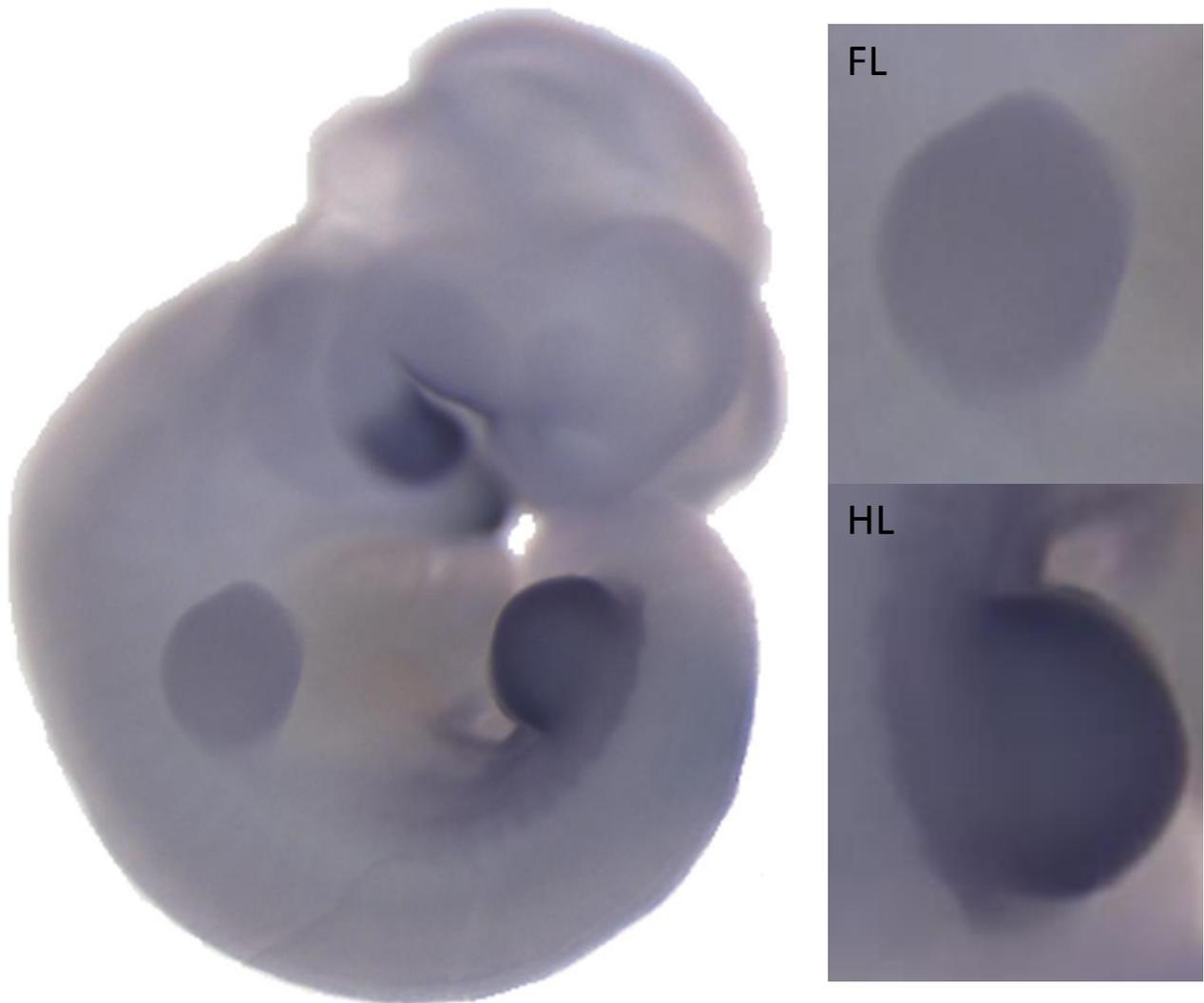


Abbildung 28: WMisH von Pitx1, Tag E10.5

Die Expression liegt im Bereich der hinteren Extremität, leicht im Bereich der vorderen Extremität sowie mandibulär. Die Expression wird anschließend mittels LacZ-Reporterkonstrukt mit der Expression der einzelnen Enhancer-Kandidaten verglichen.

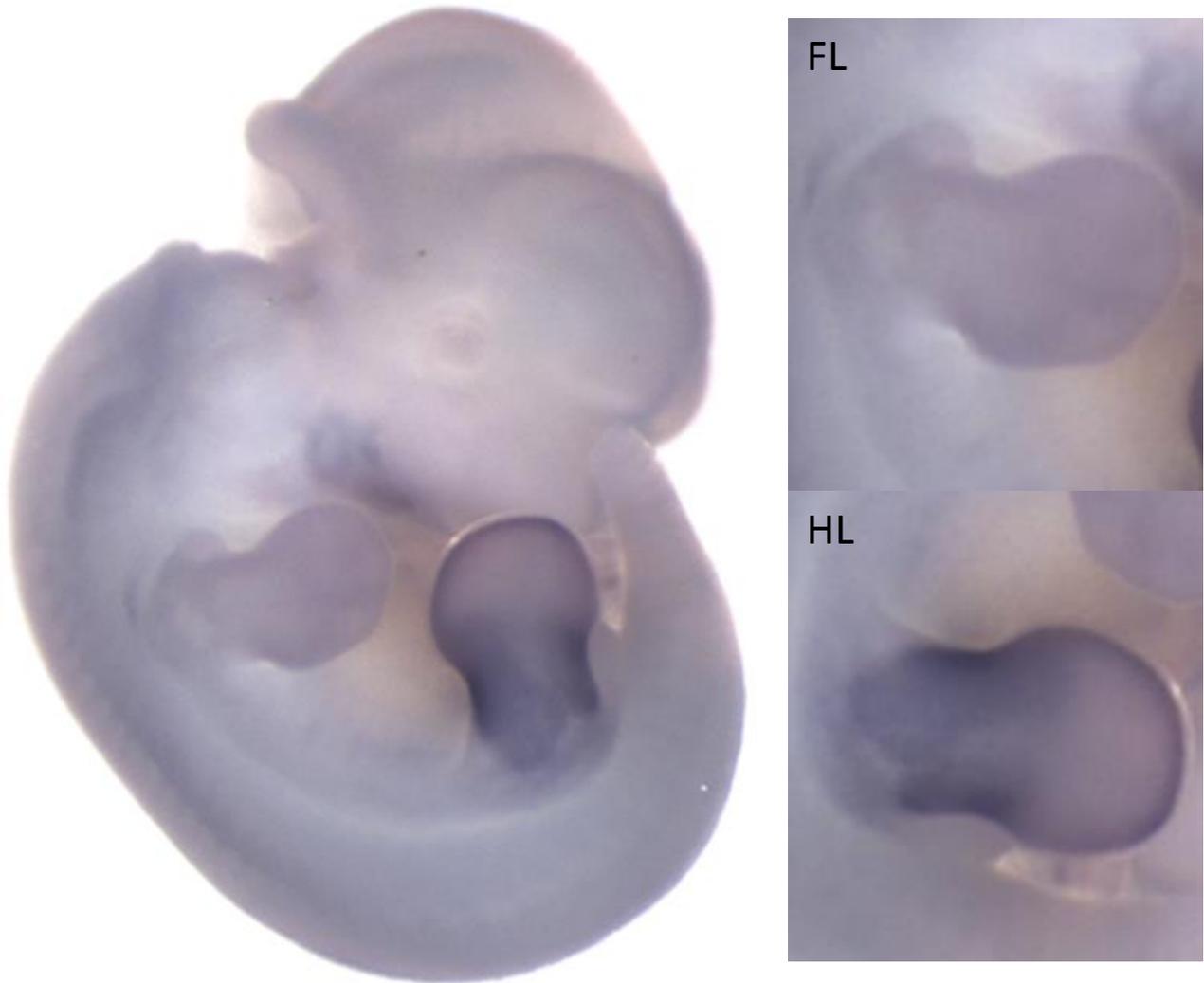


Abbildung 29: WMisH von *Pitx1*, Tag E11.5

Die Expression liegt im Bereich der hinteren Extremität, leicht im Bereich der vorderen Extremität sowie schwach mandibulär. Die Expression wird anschließend mittels LacZ-Reporterkonstrukt mit der Expression der einzelnen Enhancer-Kandidaten verglichen.

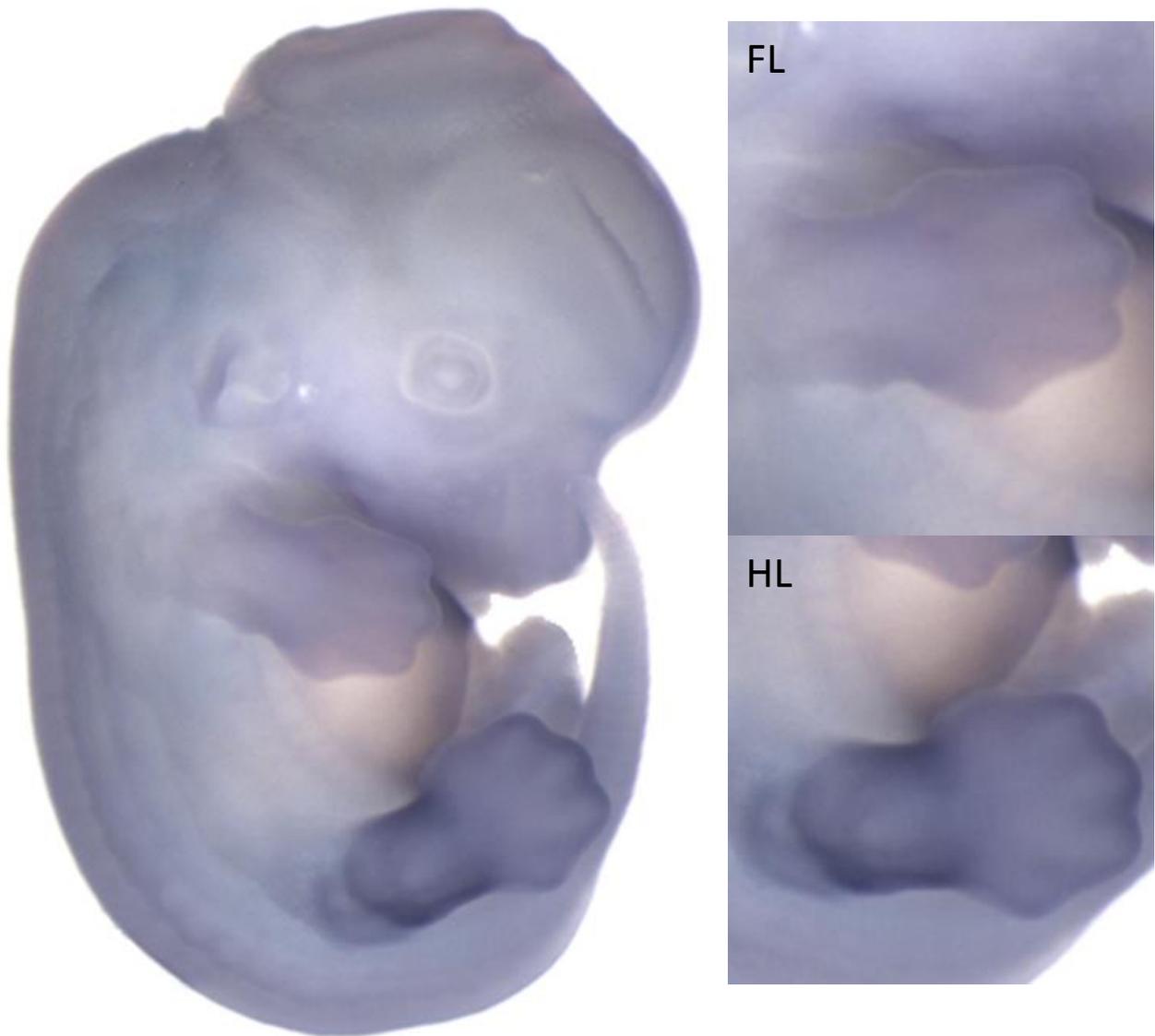


Abbildung 30: WMisH von Pitx1, Tag E12.5

Die Expression liegt im Bereich der hinteren Extremität und leicht im Bereich der vorderen Extremität. Die Expression wird anschließend mittels LacZ-Reporterkonstrukt mit der Expression der einzelnen Enhancer-Kandidaten verglichen.

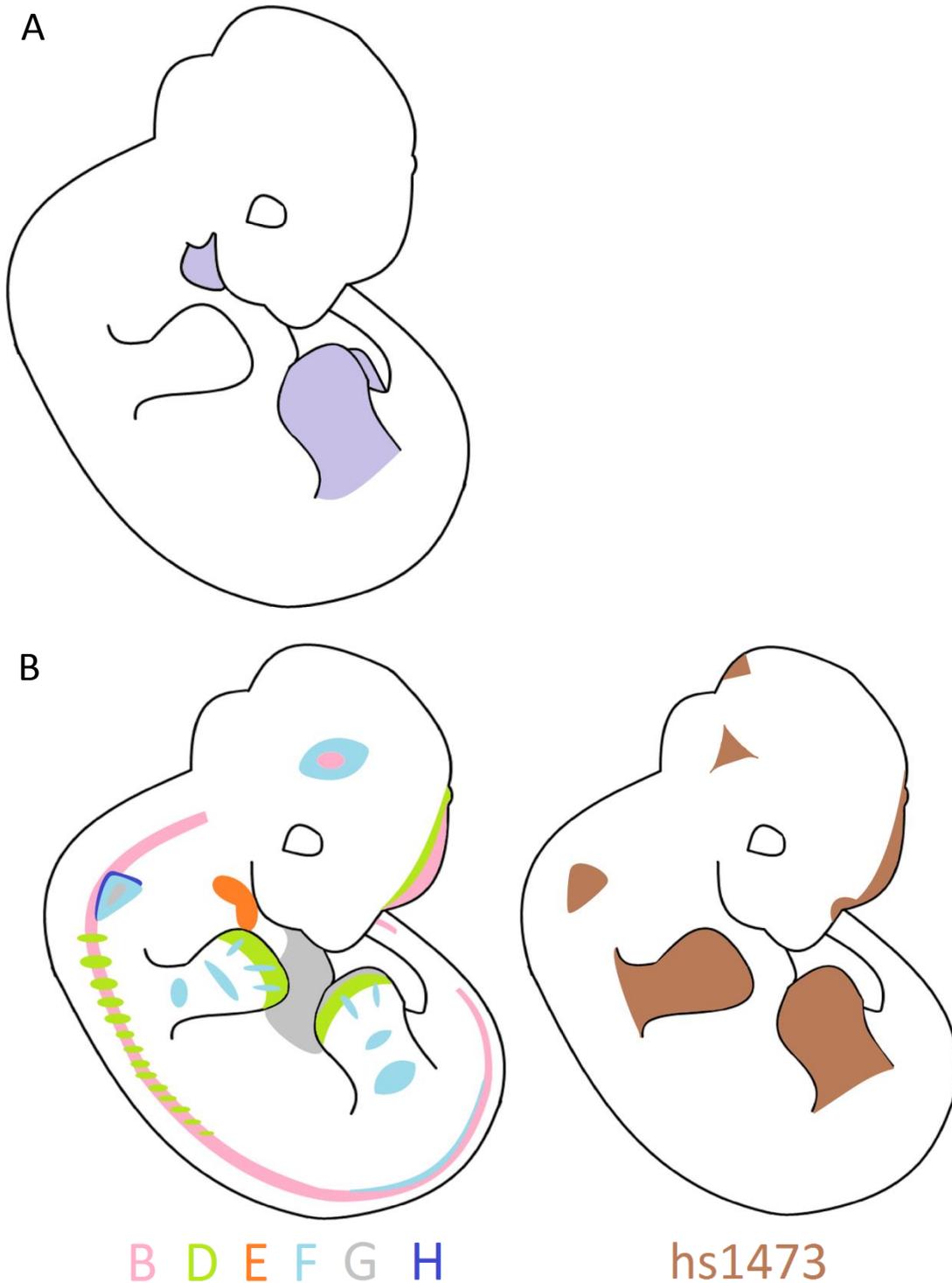


Abbildung 31: Die verschiedenen Expressionsmuster an E11.5

A Darstellung der Pitx1-Expression (violett), welche vor allem in der hinteren Extremität sowie mandibulär auftritt.

B Darstellung der Expressionsmuster der Konstrukte B (malve), D (grün), E (orange), F (hellblau), G (grau), H (dunkelblau) welche teilweise überlappen. Zusätzlich wird daneben das Expressionsmuster von hs1473 (braun) dargestellt. Wie im Diskussionsteil eingehender besprochen wird, überlappen von den hier gezeigten Konstrukten D, E, F, G und hs1473 zum Teil mit Pitx1. Die Konstrukte B und H überlappen leicht mit der Genexpression von Neurog1, wie im Folgenden dargestellt. Konstrukt G und hs1473 ähneln der Cxcl14-Expression.



Abbildung 32: Neurog1-Expression⁹⁴

In situ Hybridisierung am Tag E11.5 zeigt eine Expression im Bereich des Spinalkanals sowie im Mesencephalon.



Abbildung 33: Cxcl14-Expression⁹⁵

RNA in situ Hybridisierung eines Maus-Embryonen am Tag E11.5 zeigt eine Expression im Bereich des Spinalkanals, der Extremitäten und der Schlundbögen.



Abbildung 34: Smad5-Expression⁹⁴

RNA in situ Hybridisierung eines Maus-Embryonen am Tag E11.5 zeigt eine Expression im Bereich der vorderen und hinteren Gliedmaße sowie im forebrain.

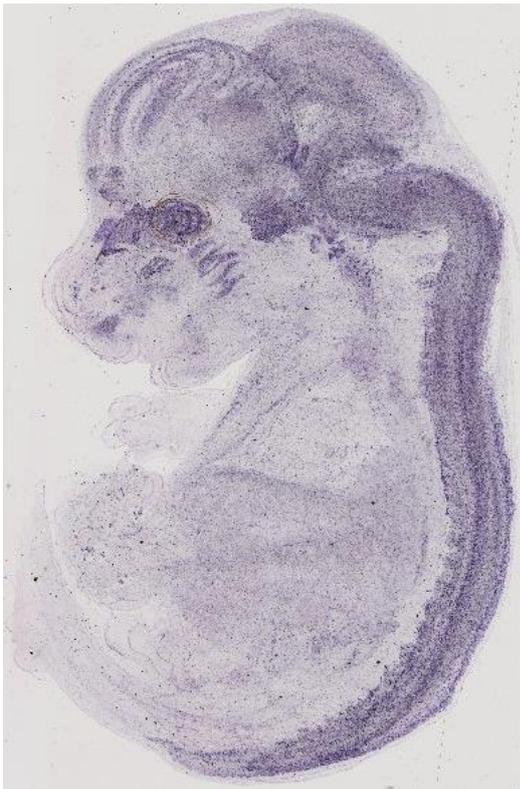


Abbildung 35: Spock1-Expression⁹⁶

Pseudo-wholemount-Technik bei der mehrere Schnitte übereinander projiziert werden. Sichtbar ist eine Expression an Tag E14.5, die das ZNS mit Spinalkanal umfasst.

5 Diskussion

Vor Fertigstellung des Human Genome Projekts wurde vom Menschen als „Krone der Schöpfung“ erwartet, dass er ein Vielfaches der Gene anderer Spezies aufweisen würde, dabei reichten einige Schätzungen bis 120 000⁹⁷ und darüber hinaus⁹⁸. Eine hohe Anzahl an Genen sollte die Komplexität und Dominanz unserer Spezies erklären. Inzwischen ist deutlich, dass der Mensch mit etwas über 20 000 Genen nur einen Bruchteil des erwarteten Wertes besitzt, und damit weniger als die Banane⁹⁹.

Nun drängt sich die Ansicht auf, zumindest die Regulation unseres Genoms müsse komplexer sein als die der meisten Lebewesen. Ob sich diese Erwartung bewahrheitet?

Die zentrale Frage dieser Arbeit lautet: „Inwiefern wird *PITX1* durch Enhancer in seiner Umgebung reguliert?“. Um mehr darüber zu erfahren, wurde diese Umgebung unter anderem mit 3-C-basierten Techniken und ChIP-Seq untersucht. Insgesamt wurde eine 15 mb große Region um das Gen überprüft, und acht potentiell als Enhancer wirksame Sequenzen für die Klonierung ausgewählt, weil ihre verstärkte Interaktion mit *PITX1* auf mögliche regulatorische Eigenschaften hinweist. Sie wurden dann durch Klonierungsschritte in C2-Stammzellen eingebracht, die anschließend in Mäusen zu Embryonen heranreifen. Die Embryonen wurden am Tag E11.5 entnommen, die anschließende Färbung ermöglichte es, wirksame Enhancer zu erkennen und erlaubte die Visualisierung ihrer Expressionsmuster.

Die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte zeigten alle eine LacZ-Färbung, was auf eine erfolgreiche Durchführung der gesamten Klonierung schließen lässt. Ihre Expressionsmuster ähneln zum Teil der natürlichen Expression von *Pitx1* in Mäusen. Sie sind vielfältig und teilweise überlappend, zeigen jedoch kein mit der *in vivo*-Expression von *Pitx1* deckungsgleiches Muster, wie es in dieser Arbeit mittels der WMisH dargestellt wurde. Möglicherweise ist also kein spezifischer Enhancer für *Pitx1* unter den untersuchten Konstrukten. Dafür wären mehrere Gründe plausibel. Da die Länge der Kandidaten aufgrund praktischer Beschränkungen bei den Klonierungsschritten meist auf wenige Kilobasen beschränkt war, decken die untersuchten Regionen keine Island komplett ab. Zusätzlich kann prinzipiell jeder beliebige Bereich der TAD, der zwischen zweihundert und einigen tausend Basenpaaren lang ist, als Enhancer fungieren. Angesichts dieser Vielfalt möglicher Bereiche schien daher zu Beginn der Arbeit eine Beschränkung auf wenige Bereiche notwendig und mündete in acht favorisierte

Kandidaten. Diese Form der Selektion führte zur Auswahl von Regionen, welche sich nun nach der Klonierung als potentielle Enhancer darstellen.

Es musste abgewogen werden, ob einige der acht Enhancer möglicherweise die umliegenden Gene regulieren. Dazu wurde jedes Gen zwischen *Pitx1* und *Spock1* untersucht, insgesamt ein Bereich von etwa 1,5 mb. Zu dem Zweck wurden Genexpressionsprofile von Mäusen der Stadien E11.5, wenn vorhanden, mit den E11.5 Embryonen der klonierten Enhancer verglichen. Diese Profile stammten von den Online-Datenbanken (vgl. Kapitel 2.7). Vor allem die vier Gene *Neurog1*, *Cxcl14*, *Smad5* und *Spock1* zeigten in diesen Datenbanken eine Expression in Bereichen, die bei den klonierten Enhancern ebenfalls angefärbt wurden, so z.B. ZNS, Spinalkanal und den Extremitäten. Bei genauerem Vergleich jedoch stellt sich heraus, dass nur die Expressionsmuster von *Neurog1*, *Cxcl14*, *Smad5* und *Spock1* genauer nachgebildet werden.

Die entsprechende Färbung von *Neurog1* liegt im Bereich des zentralen Nervensystems inklusive Spinalkanal, ähnlich dem Konstrukt B. Allerdings fehlt die im Konstrukt aufgetretene Färbung der rostralen Kalotte/forebrain bei der *Neurog1*-Expression. B liegt zwischen *Pitx1* und *H2afy*, damit trennt es eine Sequenz von 350 kb von *Neurog1*. Solch eine Distanz ist von Enhancern prinzipiell überbrückbar, B könnte also allein oder im Verbund mit anderen Enhancern an der Regulation beteiligt sein. Auch die Konstrukte F, H sollen in diesem Zusammenhang erwähnt werden, da sie eine ähnliche Färbung im Bereich des Kopfes aufweisen wie bei *Neurog1*. Die Färbung des Spinalkanals fällt allerdings spärlicher aus. Die Bewertung potentiell regulatorischer Beziehungen zu *Neurog1* ist ähnlich der von Konstrukt B.

Cxcl14 ist vor allem im Spinalkanal und den Schlundbögen sowie den Extremitäten exprimiert. Die klonierten Enhancer sind in den Schlundbögen nicht aktiv, wohl aber im Bereich des Spinalkanals. Aus diesem Grund ist eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Das Konstrukt G ist in diesem Zusammenhang am ehesten heranzuziehen, da es eine thorakale-, thorakospinale- und eine Extremitätenfärbung der Hinterläufe aufweist. Allerdings fehlt eine Färbung der Schlundbögen und der vorderen Extremität. *Smad5* ist in beiden Extremitäten sowie in vorderen Hirnanteilen exprimiert. Damit ähnelt das Muster vor allem dem Konstrukt D, obwohl dort zusätzlich mehrere thorako-lumbale Somiten gefärbt sind. Das Konstrukt F ähnelt der *Smad5*-Expression zum Teil, allerdings ist die Extremitätenfärbung hier umschriebener und der zervikale Spinalkanal ist zusätzlich gefärbt.

Spock1 zeigt eine Färbung vor allem im Bereich des ZNS mit Spinalkanal. Darin ähnelt es dem Konstrukt B, wobei hier eine Färbung der Augen ausbleibt. Die Distanz zwischen beiden beträgt etwa zwei Megabasen, eine regulatorische Beziehung ist demnach prinzipiell möglich, auch wenn eine Überbrückung einer solchen Distanz bisher nicht beschrieben wurde.

Der bereits entdeckte Enhancer hs1473 ähnelt in seinem Expressionsmuster *Pitx1*, *Smad5* und *Cxcl14*. Sein Expressionsmuster schließt sowohl vordere als auch hintere Extremität ein, obwohl er in den hier gezeigten ChIP-Seq Daten nur eine aktive Signatur in der hinteren Extremität aufweist. Dies könnte auf die Durchführung der Methode *in vitro* zurückzuführen sein. Möglicherweise induziert er im natürlichen Kontext als Hauptakteur eine gerichteter Expression. Das Konzept eines Hauptenhancers, welcher für die Expression eines Gens verantwortlich ist, wurde z.B. durch Störung der ZPA Regulatory Sequence (ZRS), dem Hauptenhancer für *Shh*, demonstriert¹⁰⁰. Die anderen Gene zeigen neben der Färbung in den untersuchten Bereichen keine ausreichende Expression in anderen für sie typischen Arealen, und sind daher vernachlässigbar. Demnach ist neben *Pitx1*, *Neurog1*, *Cxcl14* und *Spock1* vermutlich kein anderes Gen der TAD an den gezeigten Expressionsmustern beteiligt.

Denkbar bleibt, dass einer der hier erwähnten Enhancer eine größere Bedeutung für die *Pitx1*-Expression besitzt, als gezeigt werden konnte. Eine Veränderung der genomischen Architektur, wie sie in dieser Methode in Kauf genommen wurde, kann die natürliche Expression der untersuchten Konstrukte einschränken. Es wäre sinnvoll, mit selektiven Deletionen der potentiellen Enhancer, beispielsweise sgRNA knockout mithilfe von CRISPR/Cas, die Kandidatenregionen selektiv und *in vivo* zu deletieren, um ohne größere Beeinflussung der umgebenden Region mögliche Effekte zu beobachten¹⁰¹. Mit derselben Methode wäre auch eine sequentielle Deletion des Bereichs um das Nachbarn *H2AFY* denkbar, welche das isolierende Element in diesem Bereich identifizieren könnte, dessen Deletion in einigen Patienten zur Adoption von Hs1473 durch *PITX1* führte².

Auch die Konstrukte D, E und F zeigen ein *Pitx1*-ähnliches Expressionsmuster. Konstrukt D zeigt jedoch zusätzlich eine Färbung in der vorderen Extremität, welche nur die apikalen Anteile des Mesenchyms bis hin zur AER erfasst und daher nicht mit der regulären *Pitx1*-Expression übereinstimmt. Zusätzlich ist diese Färbung diffus verteilt, diese Extremitätenfärbung rührt möglicherweise von der Aggregation der Stammzellen, bei der immer ein gewisser Anteil unveränderter Stammzellen im Embryo verbleibt

(Mosaik). Diese tragen kein Reporterkonstrukt und zeigen daher kein Färbeverhalten. Dieser Umstand könnte sich bei der Präparation weiterer Embryonen ändern und ein solideres Färbungsmuster hervorbringen.

Die deutliche Begrenzung der Unterkieferfärbung des Konstrukts E deutet auf eine sehr spezifische Wirkung dieses Abschnitts hin. Es ist denkbar, dass dieser gerichtete Einfluss sich durch Wechselwirkungen mit mehreren anderen Enhancern auch auf andere Gene richten kann, beispielsweise *Pitx1*. Die Konstrukte D und E liegen in Island III direkt nebeneinander, überspannen zusammen etwa 7,5 kb und konnten aufgrund dieser Größe bei der PCR nicht gemeinsam kloniert werden. Dies sollte bei nachfolgenden Versuchen geschehen. Nur so könnte eine potentiell synergistische Funktion untersucht werden. Diese Synergie verbände ein *Pitx1*-ähnliches Extremitätenmuster mit einer sehr definierten Expression.

Das Konstrukt F ist neben Hs1473 ein weiterer deutlicher Enhancer. Die sichtbaren Färbungen in beiden Extremitäten könnten in der vorderen Extremität das anatomische Äquivalent von Skapula, Humerus und Radius/Ulna darstellen. In der hinteren Extremität zeigen sich zwei Kerne, möglicherweise Femur und Tibia/Fibula sowie angedeutete Zehenstrahlen. Wie bei den Konstrukten A, C und D zeigt F eine Expression in der vorderen Extremität, was dem Expressionsprofil von *Pitx1* widerspricht. Möglicherweise können die Konstrukte A, C, D, E, F und G in einem passenden Umfeld trotzdem eine *Pitx1*-ähnliche Expression bedingen, wenn beispielsweise eine Vielfalt an Enhancern kooperiert. Sie alle zeigen eine Expression der hinteren Extremität und darüber hinaus. In dem Fall ihrer Kooperation würden sowohl Elemente des knöchernen Stützapparats als auch des Bindegewebes und damit ein großer Teil der Extremität beeinflusst.

Das Konstrukt H zeigt eine den anderen Konstrukten ähnliche Färbung, jedoch in geringerer Ausprägung.

Da kein einzelner Enhancer ein deutliches *Pitx1*-ähnliches Expressionsmuster hervorrief, ist möglicherweise nicht nur ein einzelner, sondern die Kooperation mehrerer Enhancer für die gerichtete Expression verantwortlich. In einigen Fällen führt die Interaktion einer Vielzahl an Enhancern zu einem streng abgrenzbaren Expressionsmuster, welches eine geringere Ausdehnung haben kann als die Summe der einzelnen Muster^{17,18}.

Zu bedenken bleibt, dass es Diskrepanzen zwischen der *in vitro* und *in vivo* Funktion eines Enhancers gibt¹⁰² und der Ansatz mit Reporterkonstrukt zwar vielfach erprobt, jedoch nicht ohne Nachteile ist. Die Versuche sind nicht *in vivo* möglich und die Eindringtiefe sowie Erfolg der Färbung sind wegen der Abhängigkeit von Zeit und

Zusammensetzung der Färbelösung nicht immer reproduzierbar. Aufgrund der Aggregation der transfizierten ES-Zellen mit einigen unveränderten ES-Zellen ist jedes Tier nur ein Mosaik, also eine Mischung aus wildtyp- und transgenen Zellen. Daher zeigt ein kleiner, aber individuell schwer bestimmbarer Teil jedes entstehenden Embryos kein Färbeverhalten, weshalb je Konstrukt mehrere Mäuse für eine beurteilbare Färbung notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurden, wenn möglich, repräsentative Embryonen für die Darstellung ausgewählt.

Möglicherweise ist der fehlende Nachweis eines Enhancers auch darauf zurückzuführen, dass nicht-kodierende RNA (ncRNA) eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt. Nur etwa ein Fünftel der Transkription im menschlichen Genom geht von Proteinkodierenden Genen aus¹⁰³, der verbleibende Teil führt zu ncRNA. Diese ist in der Lage, Genexpression eigenmächtig zu steuern, indem sie beispielsweise RNA Polymerase II¹⁰⁴, Transkriptionsfaktoren oder epigenetische Modifikationen¹⁰⁵ beeinflusst. Diese Elemente wurden bei der Untersuchung der regulatorischen Aktivität von *Pitx1* nicht eingeschlossen, obwohl sie vielleicht eine wichtige Rolle darin spielen. Es zeigt sich, dass in der etwa 2,1 mb großen *Pitx1*-TAD des Maus-Genoms eine einzelne bekannte ncRNA (Gm10782) im Bereich zwischen den Elementen Hs1473 und H liegt. Ihre Funktion ist nicht bekannt. ncRNA könnte eine bedeutende Rolle bei der *PITX1*-Expression einnehmen, deren Umfang noch zu ergründen ist.

Bei den ES-Zellen, welche auch für die Konstrukte A und C verwendet wurden, fanden wir bei späteren Versuchen Trisomien. Da Trisomien in einer Stammzellpopulation unweigerlich auftreten und die Stammzellen mit Trisomien zum Teil schneller wachsen als ohne, können sie mit der Zeit selektiv angehäuft werden, bis ein immer größerer Anteil der Stammzellen Trisomien trägt. Wie viele es zum Zeitpunkt der Aggregation der Konstrukte A und C waren, ist nicht bekannt. Je nach Chromosom sind Trisomien in der Lage, einen Embryo schwer zu schädigen oder lebensunfähig zu machen. Bei beiden Embryonen scheint eine Wachstumsretardation aufgetreten zu sein, die Wiederholung der Klonierung ist daher angebracht.

6 Schlussfolgerung

Es wurde in vorliegender Arbeit kein Hauptenhancer für *PITX1* gefunden. Dies kann mehrere Gründe haben. Möglicherweise waren die Kriterien zur Auswahl potentiell regulatorischer Elemente nicht ausreichend, und ein potenter Enhancer wurde übersehen. Ein Vergleich der Daten aus 3C-basierten Techniken, Chromatinmarkierungen und Konservierung schien jedoch zu Beginn vorliegender Arbeit ein günstiger Weg zu sein, um solche Enhancer-Kandidaten zu identifizieren. In zukünftigen Versuchen wäre das Augenmerk auch auf den Bereich von Island I zu richten, da dessen Klonierung bisher noch nicht erfolgt ist, sowie auf die Inserts A und C, da diese aufgrund von Problemen mit der Stammzelllinie nicht präzise dargestellt werden konnten. Zur Vermeidung dieser Probleme wäre bei nachfolgenden Versuchen beispielsweise eine Karyotypisierung der ES-Zellen zu erwägen, bevor diese transfiziert werden.

Auch Hs1473 und Konstrukt F stellen weiterhin einen potentiellen Enhancer für *PITX1* dar. Ebenso ist denkbar, dass die Islands mit Kloniersequenzen abgedeckt werden müssten, um eine Funktion auszuschließen. Dabei wäre zwecks Minimierung des Aufwands anzustreben, die jeweilige Sequenz möglichst groß (>5 kb) zu wählen, sofern dies nicht durch die PCR limitiert wird. Dies könnte beispielsweise bei gemeinsamer Klonierung der Konstrukte D und E erfolgen.

Weiterhin ist wie bei dem Enhancer ZRS, der die *Shh*-Expression steuert¹¹, denkbar, dass *PITX1*-Expression durch einen räumlich weiter entfernt liegenden Enhancer gesteuert wird. Im Fall von *Shh* liegt dieser Enhancer circa 1 mb entfernt, dies ist eine der größten bisher bekannten Entfernungen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine Umgebung von etwa 15 mb untersucht, welche in beide Richtungen über die TAD von *Pitx1* hinausreicht. Eine regulatorische Wirkung von Elementen außerhalb dieses Bereichs ist wegen der Entfernung und der Lage außerhalb der TAD jedoch höchst unwahrscheinlich. Von den acht abschließend klonierten Bereichen liegt nur H außerhalb der Islands I-V. Von den restlichen, nicht für Klonierung ausgewählten Enhancer-Kandidaten liegen drei noch innerhalb der betreffenden TAD, telomerisch von *Pitx1* im Bereich um *Smad5* (circa 1,6 mb von *Pitx1*) und *Spock1* (circa 2 mb von *Pitx1*). Da sie in dieser Arbeit nicht vollständig kloniert wurden, kommen sie prinzipiell für weiterführende Untersuchungen infrage. Details zu diesen Kandidaten sind im Anhang angegeben (I, J, K). Von den restlichen drei potentiellen Enhancern liegen zwei weit zentromerisch von

Pitx1, der andere telomerisch jenseits von *Spock1*. Diese Bereiche liegen außerhalb der erst später bekannt gewordenen TAD. Ihr Einfluss auf *Pitx1* scheint daher unwahrscheinlich.

Eine mögliche regulatorische Beziehung zwischen Konstrukt B und *Neurog1*, *Cxcl14* und *Spock1* sollte weiter untersucht werden, ebenso zwischen *Smad5* und Konstrukt D. Bei einem Fokus auf ncRNA sollte die Konservierung zwischen Spezies bei der Auswahl der Kandidaten nicht mehr beachtet werden, da sie bei ncRNA eine untergeordnete Rolle spielt. Deren Konservierung besteht nicht zwangsläufig in der Basensequenz, sondern häufig in der sich bildenden Sekundärstruktur, da diese auf die Funktion einer ncRNA größeren Einfluss ausübt¹⁰⁶.

Diese Arbeit stellt mehrere mögliche Enhancer aus der *cis*-regulatorischen Umgebung von *Pitx1* dar und diskutiert ihre Bedeutung. Es scheint möglich, dass einige prominente Enhancer alleine, oder mehrere Enhancer gemeinsam *Pitx1* regulieren, immerhin beträgt das durchschnittliche Enhancer:Gen-Verhältnis im Maus-Genom etwa 5:1¹⁶. Eine Vielzahl an Enhancern steht auch nicht im Widerspruch zu einem räumlich und zeitlich sehr eng umschriebenen Expressionsmuster^{17,18}. Für die zukünftige Erforschung dieses Abschnittes sind weitere Versuche nötig, einige Vorschläge dazu wurden bereits unterbreitet. Wie viele regulatorische Elemente sind an der *in vivo* *PITX1*-Expression beteiligt? Sind es mehrere oder nur einer, und liegen diese Regionen innerhalb der TAD, wie erwartet? Die Klärung dieser Fragen hätte auch einen Erkenntnisgewinn über *PITX1* hinaus zur Folge und könnte gegebenenfalls zum allgemeinen Verständnis von Genregulation und ihrer Erforschung beitragen. Davon sind weitgreifende Veränderungen, unter anderem für Diagnostik und Therapie einer Vielzahl an Leiden zu erwarten.

Anhang

Primersequenzen der Konstrukte A-I

Für die Bandenlänge in der Kolonie-PCR muss zu dem hier angegebenen Abschnitt des Inserts jeweils 160 bp addiert werden, welche auf dem LacZ-Abschnitt liegen. Unterstrichen sind die vom Autor von Anfang an klonierten Konstrukte sowie die vor ihren Primern liegende *atat*-Sequenz und NotI-Schnittstelle. Die *Pitx1 in situ* Sonde ist angefügt.

A

1285 bp chr13:55,998,269-55,999,675
Forward: *atat*GCGGCCGCGAGGCTCACCTCCCTTCTCT
Reverse: *atat*GCGGCCGCCCACGACCTCCATCAGGAAAT
Col Primer A: CTGGTCACAACATCCACAGG (231 bp)

B

5286 bp chr13:55,998,491-56,003,776
Forward: ATACGCGGCCGCGCACGTCTCTGCCTGTCCTGTG
Reverse: ATATGCGGCCGCGGAATTCCTAGGGCGAGACCA

C

2465 bp chr13:56,001,083-56,003,547
Forward: *atat*GCGGCCGCCCAAGGGCTTAACAGCACTC
Reverse: *atat*GCGGCCGCGCACTGGTCCTCAACTTTCC
Col Primer C: TGTTGATGGGGAACACATTG (313 bp)

D

4786 bp chr13:56,057,388-56,062,173
Forward: ATACGCGGCCGCTGGTGTAGGCGGAAGATCT
Reverse: ATACGCGGCCGCTCTCTGCAGGCTATGATGGC

E

2488 bp chr13:56,062,458-56,064,945
Forward: GATTCCATCCACGTTTGGAC
Reverse: AGGGGTCATCAGGAGACAGG
Col Primer E: TTGGTTTCTTCCGGCTGTAG (205 bp)

F

4925 kb Chr13: 56,167,110-56,172,034
Forward: GACCACAGGCCACCGTCTTG
Reverse: GGTGACAAATGGAGCATGGACA

G

955 bp chr13:56,169,750-56,170,796
Forward: *atat*GCGGCCGCGACTTCTTGGGCACTCTTGG
Reverse: *atat*GCGGCCGCCAGGCATGCTTTGTGATGTC
Col Primer G: tgtgtgttctaagctgcgttac (299 bp)

H

1147 bp chr13:56,854,031-56,855,250
Forward: *atat*GCGGCCGCGAGCAAAGTCAGGAACTC
Reverse: *atat*GCGGCCGCTCCGAGCTCAGTCTCCAG
Col Primer H: ttgctacctggagagtctga (300 bp)

Hs1473

1395 bp chr13:56,260,908-56,262,302
Forward: GAGCACGGGTATGGATCATT
Reverse: TCATATGGCTCCATCCTTGTC

Nicht untersuchte Kandidaten

I

1571 bp chr13:56,336,799-56,338,586
Forward: *atat*GCGGCCGCATGAAGAGAACCCCCAGACC
Reverse: *atat*GCGGCCGCAGCAGGACCCATTAAGAGCA
Col Primer I: taaacgtggtcacaggcaaa (356 bp)

J

1364 bp chr13:57,945,633-57,947,122
Forward: *atat*GCGGCCGCTTGCTTGCTTGCTTGATTG
Reverse: *atat*GCGGCCGCACAGCTTCCTCCAGCTATTG
Col Primer J: caagtgtgagaaaaggttagcc (398 bp)

K

1406 bp chr13:58,050,707-58,052,180
Forward: *atat*GCGGCCGCTGGAGCATTACAGCAGAG
Reverse: *atat*GCGGCCGCTCAGCCAGCTTATTCATTGG
Col Primer K: aaagcccgactacctagc (400 bp)

Pitx1 in situ Sonde

CCCGTGAAGTGAATGTAGGGAACCTGGAGGCCCTGGGATCGTTCACCCGGTCAAG
AACCGAGGCGCCCTCTCCTAGCCCGACCCGTCCGAGTGCACGCGGGCGCGGATC
ACTGCTGGAGTTTACGCCTGGCTGAGGATGGCTGCGTCGCCGAGGATCTGGCGTT
TGCGCTGGATTAGCCTAAGGTCCCGGGATGCCAGGAAGAGCCCAGCAGCACTGA
GCTCTGGAGCCGCACACTTGAGGCCACTGAGCCGCAGCTGGCCGAGGCCAGCCA
GCAGCAGGAGGAGAAGGGCTCAGCTCTGAGTTCCCAGCCCCAAGCTTAGCCGC
TAGCCCGGCCCTCTGCTCCACTCTGGGTCCAGGAGGTGGCCCAGCGAACAGCCC
CCTTCTCCACTGTCCGCCTGCCCGTGCAAGAGTCGAGCCAGGAGAG

Bibliographie

- 1 Liebenberg, F. A pedigree with unusual anomalies of the elbows, wrists and hands in five generations. *S Afr Med J* **47**, 745-748 (1973).
- 2 Spielmann, M., Brancati, F., Krawitz, P. M., Robinson, P. N., Ibrahim, D. M., Franke, M., Hecht, J., Lohan, S., Dathe, K., Nardone, A. M., Ferrari, P., Landi, A., Wittler, L., Timmermann, B., Chan, D., Mennen, U., Klopocki, E. & Mundlos, S. Homeotic arm-to-leg transformation associated with genomic rearrangements at the PITX1 locus. *Am J Hum Genet* **91**, 629-635, doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.014 (2012).
- 3 Consortium, E. P. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* **306**, 636-640, doi:10.1126/science.1105136 (2004).
- 4 Consortium, E. P., Bernstein, B. E., Birney, E., Dunham, I., Green, E. D., Gunter, C. & Snyder, M. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74, doi:10.1038/nature11247 (2012).
- 5 Rebeiz, M., Pool, J. E., Kassner, V. A., Aquadro, C. F. & Carroll, S. B. Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a Drosophila population. *Science* **326**, 1663-1667, doi:10.1126/science.1178357 (2009).
- 6 Chung, J. H., Whiteley, M. & Felsenfeld, G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila. *Cell* **74**, 505-514 (1993).
- 7 Negre, N., Brown, C. D., Shah, P. K., Kheradpour, P., Morrison, C. A., Henikoff, J. G., Feng, X., Ahmad, K., Russell, S., White, R. A., Stein, L., Henikoff, S., Kellis, M. & White, K. P. A comprehensive map of insulator elements for the Drosophila genome. *PLoS Genet* **6**, e1000814, doi:10.1371/journal.pgen.1000814 (2010).
- 8 Gaszner, M. & Felsenfeld, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**, 703-713, doi:10.1038/nrg1925 (2006).
- 9 Chetverina, D., Aoki, T., Erokhin, M., Georgiev, P. & Schedl, P. Making connections: insulators organize eukaryotic chromosomes into independent cis-regulatory networks. *Bioessays* **36**, 163-172, doi:10.1002/bies.201300125 (2014).
- 10 Banerji, J., Rusconi, S. & Schaffner, W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308 (1981).
- 11 Lettice, L. A., Heaney, S. J., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E. & de Graaff, E. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* **12**, 1725-1735 (2003).
- 12 Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**, 60-63 (1998).
- 13 Bulger, M. & Groudine, M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* **13**, 2465-2477 (1999).
- 14 Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A. & Cavalli, G. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* **148**, 458-472, doi:10.1016/j.cell.2012.01.010 (2012).
- 15 Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., Ye, Z., Lee, L. K., Stuart, R. K., Ching, C. W., Ching, K. A., Antosiewicz-Bourget, J. E., Liu, H., Zhang, X., Green, R. D., Lobanenkov, V. V., Stewart, R., Thomson, J. A., Crawford, G. E., Kellis, M. & Ren, B. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**, 108-112, doi:10.1038/nature07829 (2009).
- 16 Shen, Y., Yue, F., McCleary, D. F., Ye, Z., Edsall, L., Kuan, S., Wagner, U., Dixon, J., Lee, L., Lobanenkov, V. V. & Ren, B. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* **488**, 116-120, doi:10.1038/nature11243 (2012).
- 17 Barolo, S. & Levine, M. hairy mediates dominant repression in the Drosophila embryo. *EMBO J* **16**, 2883-2891, doi:10.1093/emboj/16.10.2883 (1997).
- 18 Perry, M. W., Boettiger, A. N. & Levine, M. Multiple enhancers ensure precision of gap gene-expression patterns in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13570-13575, doi:10.1073/pnas.1109873108 (2011).
- 19 Hare, E. E., Peterson, B. K., Iyer, V. N., Meier, R. & Eisen, M. B. Sepsid even-skipped enhancers are functionally conserved in Drosophila despite lack of sequence conservation. *PLoS Genet* **4**, e1000106, doi:10.1371/journal.pgen.1000106 (2008).
- 20 Cande, J., Goltsev, Y. & Levine, M. S. Conservation of enhancer location in divergent insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14414-14419, doi:10.1073/pnas.0905754106 (2009).

- 21 Kalay, G. & Wittkopp, P. J. Nomadic enhancers: tissue-specific cis-regulatory elements of yellow have divergent genomic positions among *Drosophila* species. *PLoS Genet* **6**, e1001222, doi:10.1371/journal.pgen.1001222 (2010).
- 22 Visel, A., Prabhakar, S., Akiyama, J. A., Shoukry, M., Lewis, K. D., Holt, A., Plajzer-Frick, I., Afzal, V., Rubin, E. M. & Pennacchio, L. A. Ultraconservation identifies a small subset of extremely constrained developmental enhancers. *Nat Genet* **40**, 158-160, doi:10.1038/ng.2007.55 (2008).
- 23 Blow, M. J., McCulley, D. J., Li, Z., Zhang, T., Akiyama, J. A., Holt, A., Plajzer-Frick, I., Shoukry, M., Wright, C., Chen, F., Afzal, V., Bristow, J., Ren, B., Black, B. L., Rubin, E. M., Visel, A. & Pennacchio, L. A. ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat Genet* **42**, 806-810, doi:10.1038/ng.650 (2010).
- 24 Eichenlaub, M. P. & Ettiwiller, L. De novo genesis of enhancers in vertebrates. *PLoS Biol* **9**, e1001188, doi:10.1371/journal.pbio.1001188 (2011).
- 25 Ogbourne, S. & Antalis, T. M. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* **331** (Pt 1), 1-14 (1998).
- 26 Kulkarni, M. M. & Arnosti, D. N. cis-regulatory logic of short-range transcriptional repression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **25**, 3411-3420, doi:10.1128/MCB.25.9.3411-3420.2005 (2005).
- 27 Sertil, O., Kapoor, R., Cohen, B. D., Abramova, N. & Lowry, C. V. Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **31**, 5831-5837 (2003).
- 28 Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. & Allis, C. D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 983-994, doi:10.1038/nrm2298 (2007).
- 29 Consortium, E. P., Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P. J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., Denoeud, F., Reymond, A., Kapranov, P., Rozowsky, J., Zheng, D., Castelo, R., Frankish, A., Harrow, J., Ghosh, S., Sandelin, A., Hofacker, I. L., Baertsch, R., Keefe, D., Dike, S., Cheng, J., Hirsch, H. A., Sekinger, E. A., Lagarde, J., Abril, J. F., Shahab, A., Flamm, C., Fried, C., Hackermuller, J., Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Tanzer, A., Washietl, S., Korbel, J., Emanuelsson, O., Pedersen, J. S., Holroyd, N., Taylor, R., Swarbreck, D., Matthews, N., Dickson, M. C., Thomas, D. J., Weirauch, M. T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K. G., Sung, W. K., Ooi, H. S., Chiu, K. P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M. L., Valencia, A., Choo, S. W., Choo, C. Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T. G., Brown, J. B., Ganesh, M., Patel, S., Tammanna, H., Chrast, J., Henrichsen, C. N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaoz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Loytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., Program, N. C. S., Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing, C., Washington University Genome Sequencing, C., Broad, I., Children's Hospital Oakland Research, I., Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T. H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J. N., Yu, Y., Ruan,

- Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., de Bakker, P. I., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyraes, E., Hallgrimsdottir, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B. & de Jong, P. J. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816, doi:10.1038/nature05874 (2007).
- 30 Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E. & Ren, B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**, 311-318, doi:10.1038/ng1966 (2007).
- 31 Cui, K., Zang, C., Roh, T. Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W. & Zhao, K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* **4**, 80-93, doi:10.1016/j.stem.2008.11.011 (2009).
- 32 Noonan, J. P. & McCallion, A. S. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**, 1-23, doi:10.1146/annurev-genom-082509-141651 (2010).
- 33 Eagen, K. P., Hartl, T. A. & Kornberg, R. D. Stable Chromosome Condensation Revealed by Chromosome Conformation Capture. *Cell* **163**, 934-946, doi:10.1016/j.cell.2015.10.026 (2015).
- 34 Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S. & Ren, B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376-380, doi:10.1038/nature11082 (2012).
- 35 Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Bluthgen, N., Dekker, J. & Heard, E. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**, 381-385, doi:10.1038/nature11049 (2012).
- 36 Lupianez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., Spielmann, M., Visel, A. & Mundlos, S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* **161**, 1012-1025, doi:10.1016/j.cell.2015.04.004 (2015).
- 37 Li, G., Ruan, X., Auerbach, R. K., Sandhu, K. S., Zheng, M., Wang, P., Poh, H. M., Goh, Y., Lim, J., Zhang, J., Sim, H. S., Peh, S. Q., Mulawadi, F. H., Ong, C. T., Orlov, Y. L., Hong, S., Zhang, Z., Landt, S., Raha, D., Euskirchen, G., Wei, C. L., Ge, W., Wang, H., Davis, C., Fisher-Aylor, K. I., Mortazavi, A., Gerstein, M., Gingeras, T., Wold, B., Sun, Y., Fullwood, M. J., Cheung, E., Liu, E., Sung, W. K., Snyder, M. & Ruan, Y. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* **148**, 84-98, doi:10.1016/j.cell.2011.12.014 (2012).
- 38 Kleinjan, D. J. & Coutinho, P. Cis-ruption mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. *Brief Funct Genomic Proteomic* **8**, 317-332, doi:10.1093/bfgp/elp022 (2009).
- 39 Nora, E. P., Dekker, J. & Heard, E. Segmental folding of chromosomes: a basis for structural and regulatory chromosomal neighborhoods? *Bioessays* **35**, 818-828, doi:10.1002/bies.201300040 (2013).
- 40 Spitz, F., Gonzalez, F. & Duboule, D. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* **113**, 405-417 (2003).
- 41 Zuniga, A., Michos, O., Spitz, F., Haramis, A. P., Panman, L., Galli, A., Vintersten, K., Klasen, C., Mansfield, W., Kuc, S., Duboule, D., Dono, R. & Zeller, R. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev* **18**, 1553-1564, doi:10.1101/gad.299904 (2004).
- 42 Cajiao, I., Zhang, A., Yoo, E. J., Cooke, N. E. & Liebhaber, S. A. Bystander gene activation by a locus control region. *EMBO J* **23**, 3854-3863, doi:10.1038/sj.emboj.7600365 (2004).
- 43 Lower, K. M., Hughes, J. R., De Gobbi, M., Henderson, S., Viprakasit, V., Fisher, C., Goriely, A., Ayyub, H., Sloane-Stanley, J., Vernimmen, D., Langford, C., Garrick, D., Gibbons, R. J. & Higgs, D. R. Adventitious changes in long-range gene expression caused by polymorphic structural

- variation and promoter competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21771-21776, doi:10.1073/pnas.0909331106 (2009).
- 44 Ebisuya, M., Yamamoto, T., Nakajima, M. & Nishida, E. Ripples from neighbouring transcription. *Nat Cell Biol* **10**, 1106-1113, doi:10.1038/ncb1771 (2008).
- 45 Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. & Kleckner, N. Capturing chromosome conformation. *Science* **295**, 1306-1311, doi:10.1126/science.1067799 (2002).
- 46 Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. & de Laat, W. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet* **38**, 1348-1354, doi:10.1038/ng1896 (2006).
- 47 Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragooczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S. & Dekker, J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326**, 289-293, doi:10.1126/science.1181369 (2009).
- 48 Simonis, M., Kooren, J. & de Laat, W. An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat Methods* **4**, 895-901, doi:10.1038/nmeth1114 (2007).
- 49 Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., de Laat, W., Spitz, F. & Duboule, D. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* **147**, 1132-1145, doi:10.1016/j.cell.2011.10.023 (2011).
- 50 Pearse, R. V., 2nd, Scherz, P. J., Campbell, J. K. & Tabin, C. J. A cellular lineage analysis of the chick limb bud. *Dev Biol* **310**, 388-400, doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.002 (2007).
- 51 Benazet, J. D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Goncalves, A., Martin, J. F., Zuniga, A., Naef, F. & Zeller, R. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* **323**, 1050-1053, doi:10.1126/science.1168755 (2009).
- 52 Johnson, R. L. & Tabin, C. J. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**, 979-990 (1997).
- 53 Epstein, C. J., Erickson, R. P. & Wynshaw-Boris, A. *Inborn Errors of Development*. 2013 edn, (2008).
- 54 Guo, Q., Loomis, C. & Joyner, A. L. Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Dev Biol* **264**, 166-178 (2003).
- 55 Saunders, J. W., Jr. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool* **108**, 363-403 (1948).
- 56 Lewandoski, M., Sun, X. & Martin, G. R. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-463, doi:10.1038/82609 (2000).
- 57 Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M. & Goldfarb, M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, 246-249 (1995).
- 58 Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. & Martin, G. R. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-587 (1993).
- 59 Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* **14**, 1377-1389 (2000).
- 60 Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. & Joyner, A. L. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137-1148 (1998).
- 61 Lu, P., Minowada, G. & Martin, G. R. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development* **133**, 33-42, doi:10.1242/dev.02172 (2006).
- 62 Summerbell, D. A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *Development* (1974).
- 63 Saunders, J. & Gasseling, M. *Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry*. pp. 78-97 (Williams & Wilkins, 1968).
- 64 Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. & Tabin, C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416 (1993).
- 65 Benazet, J. D. & Zeller, R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001339, doi:10.1101/cshperspect.a001339 (2009).
- 66 Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* **22**, 2454-2472, doi:10.1101/gad.1693608 (2008).

- 67 Hedges, S. B. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**, 838-849, doi:10.1038/nrg929 (2002).
- 68 Tarchini, B. & Duboule, D. Control of Hoxd genes' collinearity during early limb development. *Dev Cell* **10**, 93-103, doi:10.1016/j.devcel.2005.11.014 (2006).
- 69 Andrey, G., Montavon, T., Mascrez, B., Gonzalez, F., Noordermeer, D., Leleu, M., Trono, D., Spitz, F. & Duboule, D. A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs. *Science* **340**, 1234167, doi:10.1126/science.1234167 (2013).
- 70 Spitz, F., Herkenne, C., Morris, M. A. & Duboule, D. Inversion-induced disruption of the Hoxd cluster leads to the partition of regulatory landscapes. *Nat Genet* **37**, 889-893, doi:10.1038/ng1597 (2005).
- 71 DeLaurier, A., Schweitzer, R. & Logan, M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev Biol* **299**, 22-34, doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.055 (2006).
- 72 Lanctot, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M. L. & Drouin, J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* **126**, 1805-1810 (1999).
- 73 Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A. S., Izpisua-Belmonte, J. C. & Rosenfeld, M. G. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* **13**, 484-494 (1999).
- 74 Gibson-Brown, J. J., Agulnik, S. I., Chapman, D. L., Alexiou, M., Garvey, N., Silver, L. M. & Papaioannou, V. E. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev* **56**, 93-101 (1996).
- 75 Marcil, A. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* **130**, 45-55, doi:10.1242/dev.00192 (2003).
- 76 Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L. A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M. R. & Blum, M. The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-1234 (1999).
- 77 Shapiro, M. D., Marks, M. E., Peichel, C. L., Blackman, B. K., Nereng, K. S., Jonsson, B., Schluter, D. & Kingsley, D. M. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* **428**, 717-723, doi:10.1038/nature02415 (2004).
- 78 Reist, J. D. Selective predation upon pelvic phenotypes of brook stickleback, *Culaea inconstans*, by northern pike, *Esox lucius*. *Canadian Journal of Zoology* (1980).
- 79 Giles, N. The possible role of environmental calcium levels during the evolution of phenotypic diversity in Outer Hebridean populations of the Three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Zoology* **199** (1983).
- 80 Mennen, U., Mundlos, S. & Spielmann, M. The Liebenberg syndrome: in depth analysis of the original family. *J Hand Surg Eur Vol*, doi:10.1177/1753193413502162 (2013).
- 81 Lettice, L. A., Daniels, S., Sweeney, E., Venkataraman, S., Devenney, P. S., Gautier, P., Morrison, H., Fantes, J., Hill, R. E. & FitzPatrick, D. R. Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease. *Hum Mutat* **32**, 1492-1499, doi:10.1002/humu.21615 (2011).
- 82 Shimell, M. J., Simon, J., Bender, W. & O'Connor, M. B. Enhancer point mutation results in a homeotic transformation in *Drosophila*. *Science* **264**, 968-971 (1994).
- 83 Emerald, B. S. & Roy, J. K. Homeotic transformation in *Drosophila*. *Nature* **389**, 684, doi:10.1038/39500 (1997).
- 84 Horan, G. S., Wu, K., Wolgemuth, D. J. & Behringer, R. R. Homeotic transformation of cervical vertebrae in Hoxa-4 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12644-12648 (1994).
- 85 Wellik, D. M. & Capecchi, M. R. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* **301**, 363-367, doi:10.1126/science.1085672 (2003).
- 86 Logan, M. & Tabin, C. J. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-1739 (1999).
- 87 Splinter, E., de Wit, E., van de Werken, H. J., Klous, P. & de Laat, W. Determining long-range chromatin interactions for selected genomic sites using 4C-seq technology: from fixation to computation. *Methods* **58**, 221-230, doi:10.1016/j.ymeth.2012.04.009 (2012).
- 88 Fudenberg, G. & Mirny, L. A. Higher-order chromatin structure: bridging physics and biology. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 115-124, doi:10.1016/j.gde.2012.01.006 (2012).
- 89 stratagene. *pBluescript II SK+/-* (<http://www.xenbase.org/other/static/methods/vector-files/pBSSKplus.jsp>), 2015).
- 90 Lohan, S. *Analyse von genomischen Aberrationen mit hochauflösender Array-CGH bei Patienten mit Fehlbildungen der Extremitäten* dr. rer. nat. thesis, FU Berlin, (2012).
- 91 in *Thermo Scientific Open Biosystems Gene Targeting Kits* (Thermo Scientific, 2009).

- 92 Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517 (1975).
- 93 Nawipiro. *Southern Blot*, (2013).
- 94 Yokoyama, S., Ito, Y., Ueno-Kudoh, H., Shimizu, H., Uchibe, K., Albin, S., Mitsuoka, K., Miyaki, S., Kiso, M., Nagai, A., Hikata, T., Osada, T., Fukuda, N., Yamashita, S., Harada, D., Mezzano, V., Kasai, M., Puri, P. L., Hayashizaki, Y., Okado, H., Hashimoto, M. & Asahara, H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell* **17**, 836-848, doi:10.1016/j.devcel.2009.10.011 (2009).
- 95 Garcia-Andres, C. & Torres, M. Comparative expression pattern analysis of the highly conserved chemokines SDF1 and CXCL14 during amniote embryonic development. *Dev Dyn* **239**, 2769-2777, doi:10.1002/dvdy.22413 (2010).
- 96 Richardson, L., Venkataraman, S., Stevenson, P., Yang, Y., Moss, J., Graham, L., Burton, N., Hill, B., Rao, J., Baldock, R. A. & Armit, C. EMAGE mouse embryo spatial gene expression database: 2014 update. *Nucleic acids research* **42**, D835-844, doi:10.1093/nar/gkt1155 (2014).
- 97 Liang, F. e. a. Gene Index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature Genetics* **25**, 239 - 240 (2000).
- 98 Comings, D. E. The structure and function of chromatin. (1972).
- 99 D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J. M., Baurens, F. C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., McKain, M. R., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbeguie, A. M. D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E., Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poirion, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievert, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A. M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J. C., Quetier, F., Yahiaoui, N. & Wincker, P. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* **488**, 213-217, doi:10.1038/nature11241 (2012).
- 100 Klopocki, E., Ott, C. E., Benatar, N., Ullmann, R., Mundlos, S. & Lehmann, K. A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J Med Genet* **45**, 370-375, doi:10.1136/jmg.2007.055699 (2008).
- 101 Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
- 102 Ahituv, N., Zhu, Y., Visel, A., Holt, A., Afzal, V., Pennacchio, L. A. & Rubin, E. M. Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PLoS Biol* **5**, e234, doi:10.1371/journal.pbio.0050234 (2007).
- 103 Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Dutttagupta, R., Willingham, A. T., Stadler, P. F., Hertel, J., Hackermuller, J., Hofacker, I. L., Bell, I., Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. & Gingeras, T. R. RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* **316**, 1484-1488, doi:10.1126/science.1138341 (2007).
- 104 Goodrich, J. A. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews* (2006).
- 105 Halley, P., Kadakkuzha, Beena M., Faghihi, Mohammad A., Magistri, M., Zeier, Z., Khorkova, O., Coito, C., Hsiao, J., Lawrence, M. & Wahlestedt, C. Regulation of the Apolipoprotein Gene Cluster by a Long Noncoding RNA. *Cell Reports* **6**, 222-230, doi:10.1016/j.celrep.2013.12.015 (2014).
- 106 Torarinsson, E. Thousands of corresponding human and mouse genomic regions unalignable in primary sequence contain common RNA structure. *Genome Research* **16**, 885-889, doi:10.1101/gr.5226606 (2006).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johann Philipp Hüttner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die *cis*-regulatorische Landschaft von *PITX1*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos dafür, dass ich am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik unter seiner Leitung dieses Thema bearbeiten durfte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Malte Spielmann. Er hat es in zahlreichen großen und kleinen Gesprächen immer wieder verstanden, neue Ideen aufzuzeigen, mich zu fordern und zu motivieren. Er half mir beim Erlernen wissenschaftlichen Denkens und der kompakten, verständlichen Präsentation des erarbeiteten Wissens.

Für die Hinführung zu diesem Institut danke ich Prof. Dr. Karl Sperling, dessen letzte offizielle Vorlesungsreihe ich im Rahmen meines Studiums glücklicherweise besuchen konnte. Seine Neugier und Begeisterung waren ansteckend und führten mich mit der Zeit zum Fokus dieser Arbeit.

Der ganzen AG Mundlos danke ich für Beistand bei Misserfolgen, die Beantwortung zahlreicher Fragen, für die Hilfebereitschaft und viele schöne Stunden im Labor. Nennen möchte ich dabei Denise Emmerich, Sinje Geuer, Martin Franke, Katerina Kraft, Anja Will, Norbert Brieske, Asita Stiege, Nicole Rösener und Monika Osswald. Danke für die Zusammenarbeit!

Meine Eltern und mein Bruder sind immer für mich da, dafür bin ich dankbar.

Zuletzt bedanke ich mich bei Linda, ohne deren Geduld und Liebe diese Arbeit vielleicht nicht entstanden wäre. Auch meinem Sohn Wilhelm, der während dieser Arbeit dazu stieß, danke ich für jedes Lachen und alles, was er mir noch beibringen wird.