

**Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Max Planck Institut
für molekulare Genetik,
Abteilung Entwicklungsgenetik,
Berlin**

**Funktionelle Charakterisierung
regulatorischer Gene
bei der Bildung der Wirbelsäule der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
SOLVEIG MÜLLER
Tierärztin aus Neuenburg am Rhein**

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3263

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Herrmann
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Epithelium, Mesoderm, Spinal Cord, Somites, Wnt Proteins, Transcription Factors,
Embryonic Stem Cells, Signal Transduction, Cell Line, Tumor, Mice, Embryonic
Development

Tag der Promotion: 24.02.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-590-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungen und Symbole	a
1. Einleitung	1
1.1. Die Embryogenese.....	1
1.2. Der Mausembryo als Wirbeltiermodellorganismus.....	1
1.3. Die Gastrulation im Mausembryo.....	2
1.4. Parakrine Faktoren in der Embryogenese.....	5
1.5. Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) im Mausembryo	6
1.6. Somitogenese im Mausembryo.....	7
1.7. Genregulatorische Netzwerke bei der Bildung von paraxialem Mesoderm und der Somitogenese.....	8
1.8. Embryonale Stammzellen (ES Zellen) und P19 Embryonale Carcinoma Zellen (P19 EC Zellen) als Arbeitsmodell	10
1.9. Die RNA-Interferenz-Technik.....	11
1.10. Zielsetzung.....	13
2. Material, Tiere und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Geräte	14
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3. Chemikalien/Reagenzien.....	15
2.1.4. Reagenzsysteme/Kits.....	18
2.1.5. Immunreagenzien.....	18
2.1.6. Enzyme	19
2.1.7. Zellen.....	19
2.1.8. Wirtssysteme	20
2.1.9. Medien.....	20
2.1.10. Agarplatten	21
2.1.11. Software	21
2.1.12. Lösungen.....	21
2.1.13. Oligonukleotide.....	24
2.1.14. DNA-Sequenzierungen/Oligonukleotid-Bestellungen	26
2.2. Tiere.....	26
2.2.1. Haltung des Versuchstieres Maus	26
2.2.2. Tierversuchsanträge.....	26
2.2.3. Eingesetzte transgene Mäuse	26
2.2.4. Herstellung von Embryopulver	27
2.2.5. Isolation von Mausembryonen.....	27
2.2.6. Lyse von genomischer DNA aus Mausembryobiopsien	27
2.2.7. Fixierung von Mausembryonen	28
2.3. Methoden, allgemein.....	28
2.3.1. DNA-Methoden.....	28
2.3.2. Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	28
2.3.3. Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen	30

2.3.4. Präparation von genomischer DNA durch Lyse aus Zellen auf einer 48-Titer Zellkulturschale	30
2.3.5. Subklonierung von DNA-Fragmenten.....	30
2.3.6. RNA-Methoden; Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen.....	33
2.3.7. Zellkultur-Methoden.....	33
2.3.8. Kulturbedingungen	33
2.4. Methoden, speziell	35
2.4.1. Immunhistochemie (IHC) von P19 EC Zellen mit den Antikörpern (AK) Cdh1, Vim und Oct4	35
2.4.2. Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion (sqPCR)	36
2.4.3. Luziferase-Assay mit der Zugabe von Wnt3a oder SB216763 (Gsk3 β -Inhibitor)	37
2.4.4. Differenzierung von P19 EC Zellen mit DMSO nach McBurney et al., (1982).....	38
2.4.5. Klonierung des DNA-Konstrukts sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA ...	39
2.4.6. Transfektion des DNA-Konstrukts sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA mit Lipofektamin™ 2000	39
2.4.7. Microarray-Chip Analyse, „Illumina® TotalPrep™ Amplifikation Kit“.....	40
2.4.8. Mixl1,- Nrarp- und Tnfrsf19- shRNA-mir-knockdown-Konstrukte.....	41
2.4.9. Klonierung und pronukleare Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 mit Tnfrsf19 in voller Länge sowie als dominant negativer Rezeptor	45
2.4.10. Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit Uncx4.1 und eGFP	47
3. Ergebnisse	51
3.1. Charakterisierung von P19 EC Zellen	51
3.2. Analyse der Aktivierbarkeit der Wnt-Signalkaskade in P19 EC Zellen.....	53
3.3.1. Identifizierung von entwicklungspezifischen Genen bei Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO.....	55
3.4. Gezielte Überexpression mit Tbx6 in P19 EC Zellen	57
3.4.1. Identifizierung von entwicklungspezifischen Genen bei Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO und Überexpression von Tbx6	58
3.4.2. Vergleichende Analyse von Tbx6-überexprimierenden Zellen zu Kontrollzellen.....	59
3.4.3. Vergleichende Analyse von DMSO induzierten P19 EC Zellen und DMSO-induzierten Tbx6-überexprimierenden P19 EC Zellen	62
3.5. Expressionsanalyse nach Herunterregulierung (knockdown) in vitro von Mixl1/Nrarp/Tnfrsf19	62
3.6. Funktionelle Analyse von Tnfrsf19 in vivo durch Herunterregulierung der Expression (knockdown) und Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit dem Marker Uncx4.1	66
3.7. Funktionelle Analyse von Tnfrsf19 in vivo durch Überexpressionsversuche und Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit dem Marker Uncx4.1 sowie eGFP	68
4. Diskussion	73
4.1. P19 EC Zellen exprimieren Cdh1 und Oct4	73
4.2. Die Wnt-Signalkaskade ist durch die Zugabe von Wnt3a oder Gsk3 β -Inhibitor in P19 EC Zellen nicht induzierbar.....	74
4.3. Identifizierung entwicklungspezifischer Gene nach Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO und/oder Überexpression von Tbx6.....	76

4.3.1. Durch Zugabe von DMSO (1%) differenzieren P19 EC Zellen in Richtung Mesoderm	77
4.3.2. Eine Tbx6-Überexpression begünstigt die Differenzierung von P19 EC Zellen in Richtung präsomitisches Mesoderm	78
4.3.3. Regulation der Expression von 12 Genen durch 3-tägige Differenzierung mit DMSO oder Überexpression mit Tbx6	79
4.3.4. Verstärkter Einfluss auf die Differenzierung von P19 EC Zellen durch eine zusätzliche Tbx6-Überexpression bei gleichzeitiger DMSO-Induktion	81
4.4. Die Tbx6-Überexpression hat einen positiven Einfluss auf die Kontrollgene Mixl1 und Nrarp.....	82
4.5. Versuch der Funktionsanalyse von Mixl1 und Nrarp mittels RNA-Interferenz durch eingesetzte shRNA-mir-Konstrukte	83
4.6. Funktionsanalyse von Tnfrsf19	84
4.6.1. Die TNF-Genfamilie und die Bedeutung von Tnfrsf19	84
4.6.2. Die Bedeutung des NFκB-Signalwegs im Bezug zu Tnfrsf19 und Somitogenese	85
4.6.3. In vivo Genfunktionsverlust- und Genfunktionsgewinnexperimente mit Tnfrsf19	86
5. Zusammenfassung	89
6. Summary	91
7. Literaturverzeichnis	93
8. Anhang	105
8.1. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden gegenüber P19 EC Kontrollzellen	105
8.2. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden und zusätzlich Tbx6 überexprimieren zu P19 EC Kontrollzellen	108
8.3. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die Tbx6 überexprimieren zu P19 EC Kontrollzellen	112
9. Liste von vorab veröffentlichten Ergebnissen	114
10. Danksagung	115

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AF488	AlexaFluor488
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
β-ME	β-Mercaptoethanol
Cdh1	Cadherin 1
cDNA	komplementäre DNA
CIP	alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (engl. calf intestine phosphatase)
CMV	Cytomegalovirus
cRNA	komplementäre RNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dig	Digoxigenin
DII	delta-like 1
DMEM	Zellkulturnährmedium "Dulbecco`s modified Eagle`s Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Dulbecco`s phosphate buffered solution)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4 Dithiothreitol
Dvl	Dishevelled
E	Embryonic day
EC	Embryonic Carcinoma
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	grün fluoreszierendes Protein, verbessert (engl. enhanced green fluorescence protein)

Abkürzungen und Symbole

ES Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Foetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
Frz	Frizzled
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutamin
Glut	Glutaraldehyd
Gsk3 β	Glykogen synthase kinase 3beta
h	Stunde(n)
Hes7	hairy and enhancer of split 7
HPRT	Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyltransferase
hygro	Hygromycin
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Bakterienmedium (Luria Bertani-Medium)
Lfng	lunatic fringe
LIF	leukemia inhibitory factor
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein
MCS	Multiple Klonierungsstelle in Vektoren (engl. multiple cloning site)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messengerRNA)
Nanog	Nanog homeobox
NF κ B	nuclear factor kappa B
Notch1	Notch gene homolog 1
Oct4	Octamer 4, Synonym Pou 5f1
OD260/280	Optische Dichte bei 260/280 nm Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster (engl. open reading frame)
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. polymerase chain reaction)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyzeratkinase
pH	neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rcf	relative Zentrifugalkraft (engl. relative centrifugal force)
RD	Restriktionsverdau (engl. restriction digest)

Abkürzungen und Symbole

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNaseOUT	Rekombinierte Ribonuklease Hemmer
RT	Reverse Transkriptase/Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunde(n)
snai1	snail homolog 1
Sol.	Solution
sqPCR	semiquantitative PCR
SSC	Natriumcitratpuffer (engl. sodium citrate sodium chloride buffer)
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Tail, Brachyury
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tbx6	T-box factor 6
TE	TRIS-EDTA Puffer
Tnfrsf19	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TritonX-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tryp	Trypsin
Twist1	twist gene homolog 1, Twist
ün	über Nacht
Uncx4.1	UNC homeobox
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolett
Vim	Vimentin
Wnt	wingless related MMTV integration site

Weitere Abkürzungen und Symbole basieren auf dem Internationalen Einheitensystem.

1. Einleitung

1.1. Die Embryogenese

Ein Organismus in seiner Komplexität entwickelt sich aus der befruchteten Eizelle (Zygote). Die gesamte Information für die vollständige Entwicklung eines Organismus ist in dieser Zelle enthalten. Um die Entwicklung, die Embryogenese, zu steuern, bedarf es eines koordinierten Systems an aktivierenden und inhibierenden Einflüssen. Die Analyse der molekularen Kontrollmechanismen für Zellwachstum-, Differenzierung und -spezialisierung in verschiedene Zelltypen und Organe ist Schwerpunkt der Entwicklungsgenetik. Die ersten Zellteilungen der Zygote, die Furchungsteilungen, resultieren im Morulastadium, das sich durch 8-32 einzelne Zellen (Blastomere) auszeichnet, die als kugeligem Zellhaufen angeordnet sind. In diesem Stadium sind die Zellen totipotent („zu allem befähigt“); sie können sich in der Gebärmutter zu einem kompletten Individuum entwickeln. Im Säuger differenzieren die Morulazellen in eine äußere (Trophoblast) und eine innere Zellschicht (ICM, „inner cell mass“). Die Zellen der ICM der Blastozyste sind pluripotent („zu vielem befähigt“), sie besitzen die Fähigkeit, in die Zellen der drei primären Keimblätter (Ekto-, Meso- und Entoderm) zu differenzieren. Im weiteren Verlauf der Embryogenese entwickeln sich aus diesen primären Keimblättern die verschiedenen Organsysteme und Strukturen des Organismus. Aus Ektoderm entwickeln sich Haut, Nervensystem und Sinnesorgane. Blutgefäßsystem, Herz, Nieren, Körpermuskulatur und die Wirbelsäule entstehen aus dem Mesoderm. Das Entoderm differenziert zu den Epithelien der Atmungsorgane, der Verdauungsorgane sowie zu Leber, Schilddrüse und Pankreas. Diese Differenzierungsprozesse folgen einem streng kontrollierten Ablauf, gesteuert durch Signalmoleküle, Zell-Zell-Interaktionen und Transkriptionsprogramme.

1.2. Der Mausembryo als Wirbeltiermodellorganismus

Zum Erforschen von Entwicklungsprozessen und ihren dazu gehörigen molekularen Mechanismen sind Modellorganismen in der Entwicklungsgenetik von großer Wichtigkeit. Sie dienen als Modellsysteme, die als Vergleich zu der Entwicklung des Menschen herangezogen werden können. Neben den entwicklungs-genetisch relevanten Modellorganismen Zebrafisch (*Danio rerio*), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) ist die Maus (*Mus musculus*) der bedeutendste Modellorganismus für das Studium der Säugetierentwicklung. Die Maus steht evolutionär dem Menschen am nächsten und bietet durch ihren im Vergleich zu anderen Wirbeltieren kurzen Lebenszyklus von 9 Wochen (von der Befruchtung bis zum fertilen Stadium), durch

Würfe mit vielen Nachkommen und ihrer geringen Größe ein gut zu untersuchendes Forschungsmodell. Daher wird die Maus als Modellorganismus für genetische Analysen vielfach genutzt. Molekulargenetische Untersuchungsmöglichkeiten gestatten ein detailliertes Studium der Embryonalentwicklung dieser Spezies.

1.3. Die Gastrulation im Mausembryo

Eine erfolgte Befruchtung lässt sich anhand des Vorhandenseins eines Vaginalpfropfes („plug“) bei der weiblichen Maus feststellen. Dies entspricht Tag 1 nach der Befruchtung (Embryonic day 1; E1). 3,5 Tage nach der Befruchtung hat sich in der frühen Embryogenese die Blastozyste entwickelt. Sie ist noch nicht im Uterus implantiert und besteht aus zwei epithelialen Zellschichten, dem äußeren Trophoblasten und der ICM. Aus dem Trophoblasten entwickeln sich extraembryonale Strukturen wie die Placenta fetalis, während der eigentliche Embryo aus Anteilen der inneren Zellmasse entsteht (Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. und Smith, J., 2000). 4,5-5 Tage nach der Befruchtung beginnt die Implantationsphase der Blastozyste in den Uterus, welche nach 6 Tagen abgeschlossen ist. Aus der ICM formt sich darauf das primitive Entoderm und der Epiblast. Das primitive Entoderm entwickelt sich zu Teilen des extraembryonalen Gewebes, während der Epiblast zum eigentlichen Embryo wird. Das anteriore viszerale Entoderm (AVE) induziert als wichtiges Signalzentrum die Vorderhirnanlage durch die Expression verschiedener Antagonisten der Signalmoleküle Wnt, BMP4 und Nodal. Das Blastoderm des Mausembryos ist zylinderförmig, so dass der Epiblast, umschlossen von einer extraembryonalen, viszeralen Entodermis, die Proamnionhöhle umgibt. Die zukünftige dorsale Seite des Embryos ist der Proamnionhöhle zugewandt; sie weist nach innen (siehe Abb. 1.1.) (Beddington, R. S. et al., 1998). Mit Bildung des Primitivstreifens (E6,5), der zunächst als eine Verdickung am zukünftigen posterioren Ende des Embryos zu erkennen ist, beginnt die Gastrulation (Beddington, R. S. et al., 1998, Tam, P. P. et al., 1997). In der frühen Gastrula wandern proliferierende Epiblastzellen durch den Primitivstreifen und bilden das Mesoderm und in der Region des anterioren Primitivstreifens das definitive Entoderm zusammen mit dem axialen Mesentoderm. Das definitive Entoderm verdrängt dabei das primitive Entoderm. Am anterioren Ende des Primitivstreifens entsteht als Organisationszentrum des Embryos der Primitivknoten (engl. node). Die Neuralplatte entwickelt sich aus dem äußeren Keimblatt, dem Ektoderm. 8,5 Tage nach der Befruchtung sind die Neurulation, die Auffaltung der anterioren Neuralplatte zu Neuralfalten und parallel dazu die Organogenese mit der Herzentwicklung bereits eingeleitet. In der folgenden Entwicklung erfährt der Embryo eine Drehung, die dazu führt, dass weitere Entwicklungsprozesse des Embryos, nun umhüllt von extraembryonalen Membranen,

1. Einleitung

stattfinden. 9 Tage nach der Befruchtung ist die primäre Gastrulation vollendet (Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. und Smith, J., 2000).

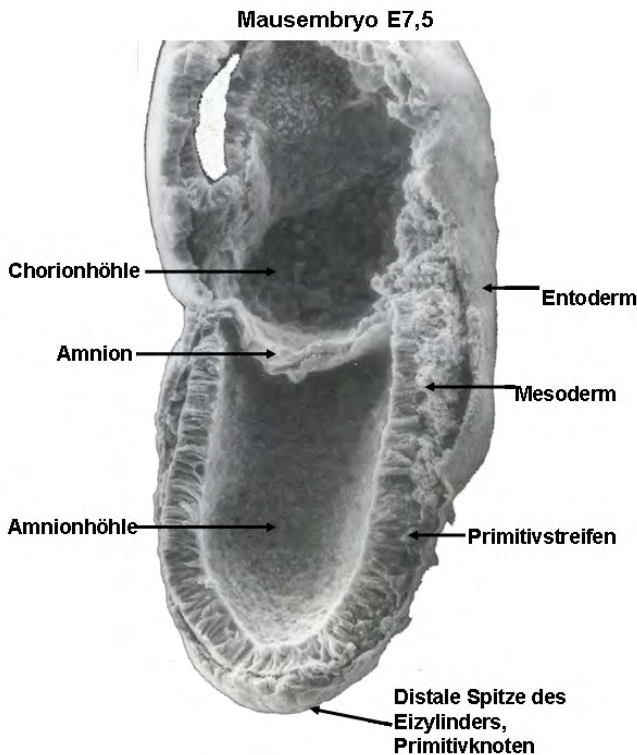
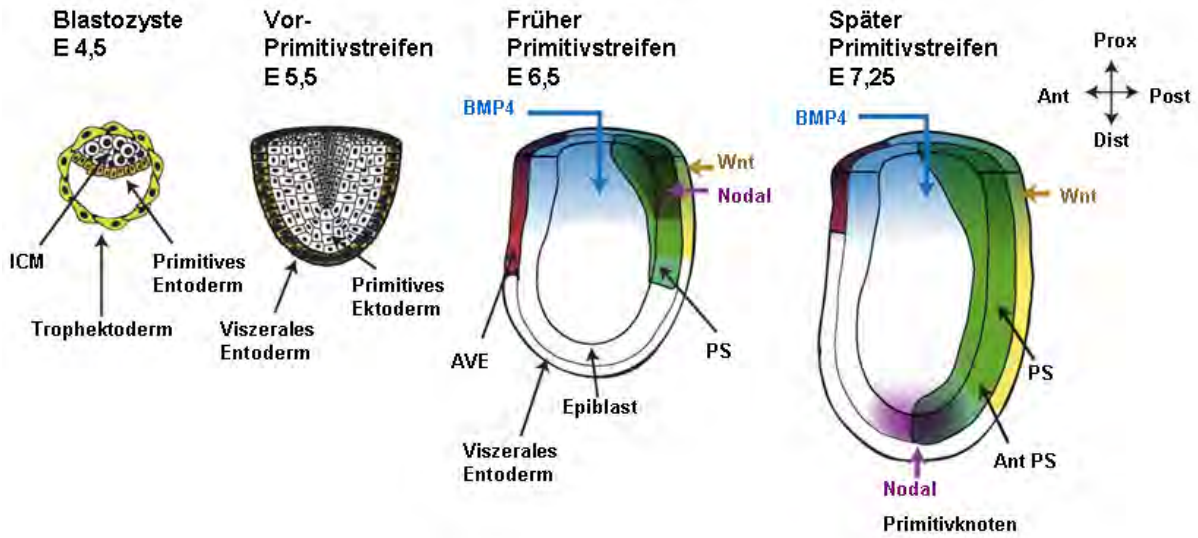


Abb. 1.1.: Gastrulation im Mausembryo; schematische Darstellung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Mausembryos zum Zeitpunkt E7,5

Zum Zeitpunkt E4,5 (4,5 Tage nach der Befruchtung) besteht die Blastozyste aus der inneren Zellmasse (ICM), dem primitiven Entoderm und dem Trophektoderm. Kurze Zeit nach Implantation der Blastozyste in den Uterus (E4,5-5) beginnt die ICM stark zu proliferieren und zu differenzieren und formt das primitive Ektoderm (E5,5). Das primitive Entoderm differenziert zu viszeralem und parietalem Entoderm. Durch Apoptose der inneren Zellschicht des primitiven Ektoderms bildet sich die Proamnionhöhle, welche von Epithelzellen, die den Epiblasten bilden, umgeben ist. Die Oberfläche des Epiblasten ist von einer Schicht viszeralen Entoderms umgeben. Das erste erkennbare Zeichen der Gastrulation ist die Bildung des Primitivstreifens am zukünftigen posterioren Ende des Embryos (E6,5). Fortlaufend entwickelt sich der Primitivstreifen in Richtung des distalen Endes des Embryos (E7,25).

In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ist Meso- und Entoderm voneinander zu unterscheiden, sowie der Primitivstreifen und der Knoten zu erkennen. Auch das Amnion, sowie Amnion- und Chorionhöhle lassen sich voneinander abgrenzen (E7,5). Die Gastrulation erfolgt aufgrund regionaler Unterschiede in der Expression verschiedener Signalmoleküle- BMP4, Wnt und Nodal- in sog. Signalzentren wie dem Anterioren Viszeralem Entoderm und dem posterioren Epiblast. (Ant = Anterior, AVE = Anteriore Viszerale Entoderm, Dist = Distal, ICM = Inner Cell Mass, Post = Posterior, Prox = Proximal, PS = Primitivstreifen) (schematische Darstellung nach P.Gadue, 2005; bearbeitete rasterelektronenmikroskopische Darstellung; entnommen aus G.C.Schoenwolf (2001)).

1. Einleitung

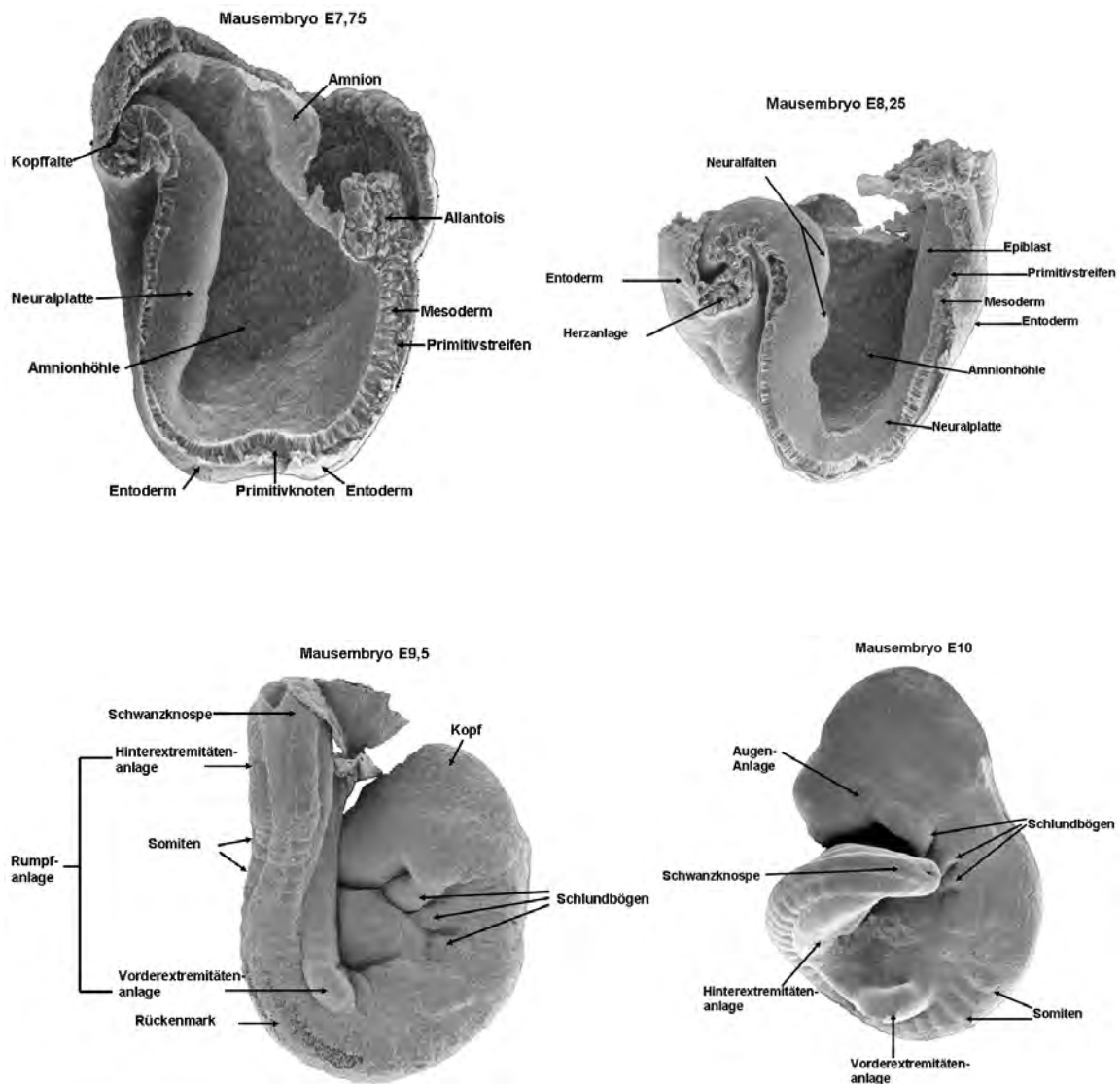


Abb. 1.2.: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Mausembryonen zum Zeitpunkt E7,75- E10

E7,75: Medianschnitt, durch den Primitivstreifen gewanderte Epiblastzellen haben Ento- und Mesoderm gebildet, am anterioren Ende des Primitivstreifens ist der Knoten entstanden, die Neuralplatte hat sich aus dem Ektoderm entwickelt, eine Kopffalte ist bereits erkennbar; Allantois, Amnion sowie Amnionhöhle sind noch darstellbar **E8,25:** Medianschnitt, Neuraalfalten sowie eine Herzanlage sind nun erkennbar, die zukünftige dorsale Seite des Embryos (Epiblasten) ist der Amnionhöhle noch zugewandt und weist nach innen **E9,5:** Lateralansicht, das Kaudalende ist nach links gerichtet, der Embryo hat sich bereits gedreht, der Kopf mit den Schlundbögen, der Rumpf mit Vorder- und Hinterextremitätenanlage und die Schwanzknospe sind angelegt, sowie Somiten und Rückenmark **E10:** Dorsolateralansicht, das Kaudalende ist nach links gerichtet, die Augenanlage ist zu erkennen, die Schlundbögen, Vorder- und Hinterextremitätenanlage sowie Somiten und die Schwanzknospe sind deutlicher ausgeprägt (bearbeitete Darstellung; entnommen aus G.C.Schoenwolf, 2001).

1.4. Parakrine Faktoren in der Embryogenese

Parakrine Faktoren steuern viele musterbildende Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung und -spezialisierung während der Embryogenese. Die meisten dieser Faktoren können anhand ihrer Molekülstruktur vier großen Proteinfamilien zugeordnet werden. Zwei dieser Proteinfamilien und ihre Signaltransduktionswege werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Die Gruppe der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) gehört zu der großen Proteinfamilie der *transforming growth factors β* (TGF β s). Neben dem Aufbau des primären Körperplans des Embryos sind BMPs an der Entwicklung nahezu aller Organe und Gewebe beteiligt (Hogan, B. L., 1996, Massague, J., 2000, Massague, J. et al., 2000). Nodal, ein weiteres Mitglied der TGF β -Familie, wird während der Gastrulation exprimiert und ist für die Entwicklung von Meso- und Endodem, für die Etablierung der Körperachse, sowie ihrer Links-Rechts-Asymmetrie essentiell (Schier, A. F., 2003, Varlet, I. et al., 1997, Conlon, F. L. et al., 1994, Zhou, X. et al., 1993). Über die Bindung an Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren oder Aktivin-Rezeptoren werden Smad-Proteine aktiviert, welche abhängig von der Kombination aktivierter Smads, die Transkription in der Zelle aktivieren oder inhibieren.

Die *wingless-related MMTV integration site* (Wnt)-Proteine gehören zur Familie sekretierter Signalproteine, die in der Maus aus 19 verschiedenen Mitgliedern besteht (Nusse, R. et al., 1992, Wodarz, A. et al., 1998). Durch Wnts werden unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert. Der erste aufgeklärte Wnt-Signalweg wird als kanonischer Wnt-Signalweg bezeichnet (Wodarz, A. et al., 1998). In Wirbeltieren reguliert er wesentliche Prozesse der Somitogenese. Der kanonische Wnt-Signalweg wird durch die Bindung des Wnt-Proteins an einen transmembranen Rezeptorkomplex- bestehend aus den Proteinen *low density lipoprotein receptor-related protein* (Lrp) und *Frizzled* (Frz)- aktiviert. Dieser überträgt das Signal auf das intrazelluläre Protein *Dishevelled* (Dvl), einen Inhibitor der *Glykogen-synthase-kinase3 β* (Gsk3 β) (siehe Abb. 1.3. rechts). Gsk3 β bildet mit den Proteinen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) und *Axin* den β -Catenin-Inaktivierungskomplex. Solange der kanonische Wnt-Signalweg inaktiv ist, phosphoryliert Gsk3 β β -Catenin (β -Cat). Der β -Cat-Inaktivierungskomplex ist somit aktiviert, β -Cat wird abgebaut (siehe Abb. 1.3. links). Wenn Dvl nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs Gsk3 β inhibiert, reichert sich β -Cat im Zytoplasma an und transloziert in den Zellkern. Durch die Stabilisierung β -Catenins kann es nun im Zellkern mit Transkriptionsfaktoren der *transcription factor/lymphoid enhancer binding factor* (TCF/Lef)-Familie interagieren und so eine Aktivierung von Wnt-Zielgenen bewirken (siehe Abb. 1.3. rechts).

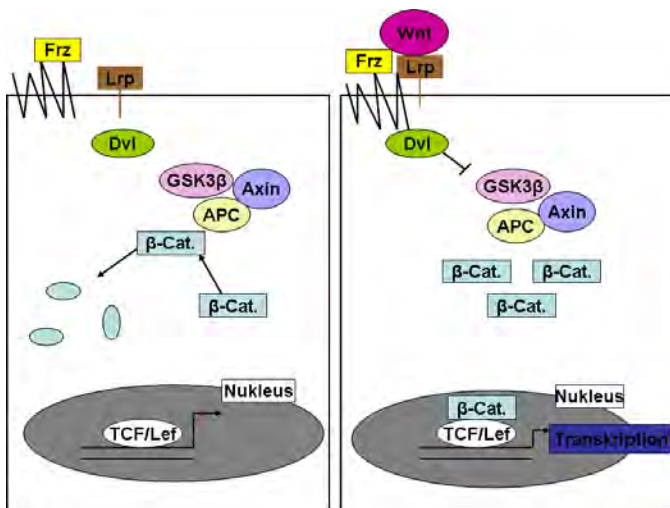


Abb. 1.3.: Überblick über den kanonischen Wnt-Signalweg.

Ohne eine Aktivierung durch den Wnt-Signalweg wird β -Catenin phosphoryliert und degradiert durch einen Komplex aus GSK3 β , APC und Axin. Gleichzeitig wird die Expression von Wnt-Zielgenen unterdrückt.

Nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs über einen Rezeptorkomplex bestehend aus dem 7 Transmembranhelixrezeptor Frz und dem Corezeptor Lrp inhibiert Dvl Gsk3 β , so dass sich β -Catenin im Zytoplasma anreichert und in den Zellkern transloziert. Dort interagiert es mit den Transkriptionsfaktoren TCF/Lef und unterstützt die Aktivierung von Wnt-Zielgenen.

1.5. Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) im Mausembryo

Zentraler Vorgang der Gastrulation ist das Einwandern von Epiblastzellen durch den Primitivstreifen. Damit dieser Teil der Entwicklung vollzogen werden kann, müssen sich die Zellen aus dem epithelialen Verband lösen und mesenchymale Eigenschaften annehmen. Der Übergang einer Zelle vom Epithel zum Mesenchym nennt man eine epitheliale mesenchymale Transition (EMT) (Greenburg, G. et al., 1982). Das Mesenchym als embryonales Bindegewebe entsteht durch Loslösung von Zellen aus den 3 Keimblättern, vorrangig aus dem Mesoderm. Durch Veränderung ihrer epithelialen Zellpolarität, hervorgerufen durch einen Abbau an Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen (Bsp. *cadherin*, Cdh1), können die Zellen sich so aus dem festen epithelialen Zellverband lösen. Sie erfahren eine Reorganisation ihres Zytoskeletts hin zu einem überaus motilen und mesenchymalen Phänotyp. Die EMT ist ein hoch konservierter, fundamentaler Entwicklungsprozess, welcher die Morphogenese vielzelliger Organismen steuert und unter dem Einfluss verschiedener Signalmoleküle (z.B. Wnt, TGF β) steht. Die EMT ist neben der Formation von Meso- und Entoderm noch von Bedeutung für eine weitere Anzahl an essentiellen Entwicklungsprozessen wie Somitogenese, Bildung der Neuralleiste, Organogenese und Fibrosen (Thiery, J. P., 2002). Bei der Tumprogression und Metastasierung von Karzinomzellen spielt die EMT eine ebenso große Rolle, ohne die Karzinomzellen sich nicht aus dem Zellverband des Primärtumors lösen könnten, um dann per Blutkreislauf in weitere Organe zu gelangen und dort Sekundärtumore zu bilden (Thiery, J. P., 2003).

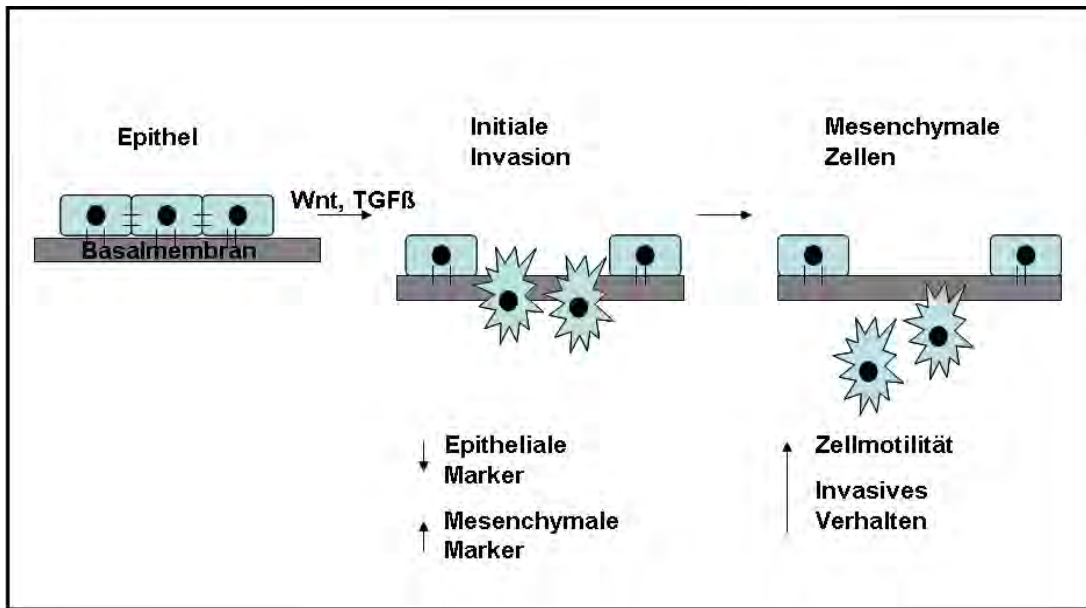


Abb. 1.4.: Modell der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT).

Epithelzellen sind untereinander und auf der darunter liegenden Basalmembran durch Zelladhäsionsmoleküle fest verankert. Durch bestimmte Signalmoleküle (Bsp. Wnt, TGFβ) lösen sich die Zellen aus ihrem epithelialen Zellverband und werden motil und invasiv. Epitheliale Marker werden herunterreguliert, während mesenchymale Marker dabei hochreguliert werden.

1.6. Somitogenese im Mausembryo

Während der Embryogenese von Wirbeltieren ist die Entwicklung der anterior-posterioren Körperachse ein zentraler Prozess. Innerhalb der Achsenentwicklung bildet sich eine für die Wirbeltiere charakteristische segmentale Organisation des Körperbauplans heraus. Das morphologisch als erstes sichtbare segmentierte Gewebe im Wirbeltierembryo ist das paraxiale Mesoderm (PXM), das im Verlauf der Achsenbildung von anterior nach posterior paarige Blöcke epithelialer Zellen, die Somiten, bildet. Sie sind die Vorläuferstrukturen der Wirbelkörper, Skelettmuskulatur und der dorsalen Dermis (Pourquie, O., 2003).

Der Bereich des paraxialen Mesoderms, aus dem neue Somiten entstehen, wird als präsomitisches Mesoderm (PSM) bezeichnet. Dieser mesenchymale Zellverband am Kaudalende des Embryos weist zunächst kein segmentales Muster auf. Er entsteht während der Gastrulation, indem eine mesenchymale Proliferationszone, die Schwanzknospe, kontinuierlich paraxiale Mesodermzellen produziert. Somiten besitzen eine anterior-posteriore und eine dorso-ventrale Polarität. Der eigentliche Wirbelkörper entsteht aus der vorderen Hälfte des einen Somitenpaares und der hinteren Hälfte des davor liegenden Somitenpaares, wobei nur der ventromediale Teil des Somiten, das Sklerotom, an der Entstehung des Wirbelkörpers beteiligt ist. Aus dem dorsolateralen Abschnitt der Somiten, dem Dermatomyotom, entstehen Muskulatur und dorsale Dermis (Wolpert, L., Beddington, R.,

Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. und Smith, J., 2000). Je nach Tierart ist der Zeitabschnitt zur Bildung eines Somitenpaares unterschiedlich lang und dauert bei der Maus 120 min. Die Gesamtzahl der Somitenpaare in der Maus beträgt 60-65.

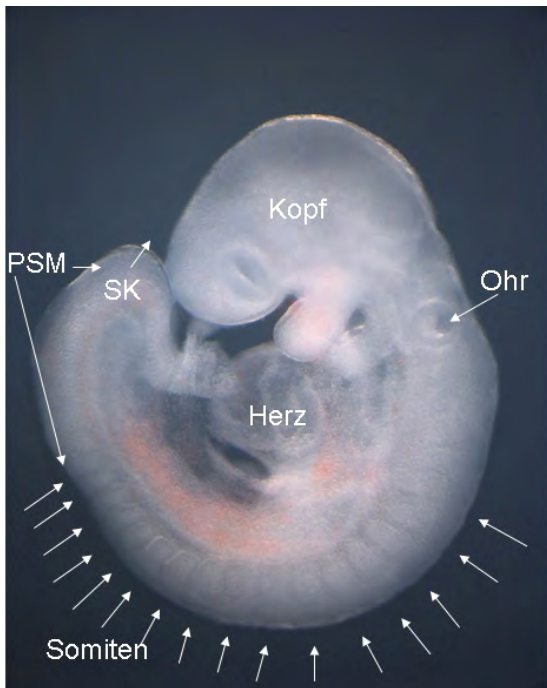


Abb. 1.5.: 9,5 Tage alter Mausembryo.

Kopf und Rumpf sind bereits angelegt, der Schwanz wird aus der Schwanzknospe (SK) durch kaudale Verlängerung (Pfeil) gebildet. Die Segmentation ist anhand der Somiten erkennbar (Pfeile); das präsomitische Mesoderm (PSM) am kaudalen Ende des Embryos zeigt an, dass der lumbosakrale Bereich des Rumpfes noch nicht vollständig segmentiert ist. (Bild: Bernhard G. Herrmann, Ralph Spörle, MPIMG)

1.7. Genregulatorische Netzwerke bei der Bildung von paraxialem Mesoderm und der Somitogenese

Die regelmäßige Somitenbildung beruht auf einem molekularen Oszillator, der „Segmentation Clock“, der als „Schrittmacher“ im PSM aktiv ist. Gene, die am Oszillator beteiligt sind, weisen im PSM eine oszillierende Expression auf. Während eine Expressionswelle über das PSM läuft, wird ein Somitenpaar gebildet (Pourquie, O., 2001, Pourquie, O., 2003). Die „Segmentation Clock“ erzeugt periodische Signale, die zur regelmäßigen Ausbildung der Somitengrenzen beitragen.

Notch gene homolog 1 (Notch1) und sein Ligand *delta-like 1* (Dll1) werden im PSM exprimiert. Sie spielen eine Rolle bei der Bildung von Grenzstrukturen zwischen einzelnen Somiten (Conlon, R. A. et al., 1995, Hrabe de Angelis, M. et al., 1997). Gene der Notch-Signalkaskade, die ein zyklisches Expressionsmuster zeigen, sind *lunatic fringe* (Lfng) und *hairy and enhancer of split 7, 1* (Hes7, Hes1) (Aulehla, A. et al., 1999, Bessho, Y. et al., 2001, Evrard, Y. A. et al., 1998, Forsberg, H. et al., 1998, Jouve, C. et al., 2000, McGrew, M. J. et al., 1998, Zhang, N. et al., 1998).

Neben den zyklisch exprimierten Genen des Notch-Signalwegs wird auch der Wnt-Signalweg in den Ablauf der „Segmentation Clock“ miteinbezogen. Die Expression von

Axin2, einem Inhibitor des Wnt-Signalwegs, oszilliert im PSM des Mausembryos außer Phase mit den zyklischen Genen des Notch-Signalwegs (Aulehla, A. et al., 2003). Zudem führt die Inaktivierung des Wnt-Signalwegs auch zu einem Abbruch der oszillierenden *Lfng*-Expression (Aulehla, A. et al., 2003). *Brachyury* (T), ein direktes Zielgen von Wnt3a, sowie *T-box6* (Tbx6) als Zielgen von T sind für die Bildung von Mesoderm und Spezifizierung von PSM essentiell (Herrmann, B. G. et al., 1990, Chapman, D. L. et al., 1998, Yamaguchi, T. P. et al., 1999, Arnold, S. J. et al., 2000, Chapman, D. L. et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor Tbx6 ist Mitglied einer Genfamilie, die in der Regulation von Entwicklungsprozessen involviert ist. Tbx6 ist im Primitivstreifen und PSM exprimiert (Chapman, D. L. et al., 1996). Die Aktivität von Tbx6 ist für die Spezifizierung und Segmentierung des PSM und damit für die Somitendifferenzierung notwendig. Entsprechend führt reduzierte Tbx6-Aktivität zu unvollständiger Segmentierung und Defekten in der Somitogenese (Chapman, D. L. et al., 1998, Chapman, D. L. et al., 2003).

Wnt3a kontrolliert über T und Tbx6 die Spezifizierung von PSM und die Migration von Zellen des Primitivstreifens und der Schwanzknospe (Yoshikawa, Y. et al., 1997, Yamaguchi, T. P. et al., 1999, Hofmann, M. et al., 2004).

UNC homeobox (Uncx4.1) ist ein Gen, das unter anderem im kaudalen Teil des Somiten und im Sklerotom exprimiert ist. Mäuse mit einer Zielmutation von Uncx4.1 entwickeln Defekte in der Wirbelsäule sowie in den Rippen (Mansouri, A. et al., 1997, Mansouri, A. et al., 2000).

Das grün fluoreszierende Protein (GFP, engl. green fluorescent protein) ist ein aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliertes Protein (Shimomura, O. et al., 1962). Dieses Protein kann bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoreszieren. Es ermöglicht durch seine Fluoreszenz nach genspezifischen Fusionen mit anderen Proteinen die direkte Beobachtung der Verteilung dieser Proteine.

Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 (Tnfrsf19), ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie (Hu, S. et al., 1999) und *Troy*, eine Transkriptvariante von Tnfrsf19, das sich durch einen um 68 Aminosäuren längeren C-Terminus im Zytoplasma unterscheidet (Kojima, T. et al., 2000), wurden bisher noch nicht auf eine Funktion in der Somitogenese analysiert. Bei Microarray-Analysen wurde erkannt, dass Troy im posterioren PSM stark exprimiert wird, während der Somitogenese aber auf das Dermomyotom begrenzt bleibt (Buttitta, L. et al., 2003). Tnfrsf19 ist zudem ein Zielgen des Wnt-Signalwegs, es weist im PSM eine oszillierende Expression auf (Dequeant, M. L. et al., 2006). Eine weitere Microarray-Analyse bestätigte Tnfrsf19 als Zielgen von Wnt, da dessen Expression in Wnt3a-Nullmutanten herunterreguliert ist (Dunty, W. C., Jr. et al., 2008). Da Troy den JNK- und NFκB-Signalweg aktiviert (Eby, M. T. et al., 2000, Kojima, T. et al., 2000), könnten diese Signalwege bei der Somitogenese eine Rolle spielen.

1.8. Embryonale Stammzellen (ES Zellen) und P19 Embryonale Carcinoma Zellen (P19 EC Zellen) als Arbeitsmodell

Die Etablierung embryonaler Stammzellen (ES Zellen) aus in vitro kultivierten Mausblastozysten wurde erstmals erfolgreich vor fast drei Jahrzehnten durchgeführt (Evans, M. J. et al., 1981, Martin, G. R., 1981). ES Zellen, gewonnen aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten, ließen sich unzählige Passagen lang kultivieren (Evans, M. J. et al., 1981, Martin, G. R., 1981). Diese ES Zellen sind pluripotent, sie können alle Gewebe aus Endo-, Meso- und Ektodermzellen bilden, einschließlich der Keimzellen (Bradley, A. et al., 1984, Robertson, E. et al., 1986).

Um die Pluripotenz embryonaler Stammzellen zu erhalten, ist die Zugabe von leukaemia inhibitory factor (LIF), einem hämatopoetischen Regulator, der die Proliferation leukämischer Zellen unterdrückt, nötig (Simpson, R. J. et al., 1988, Williams, R. L. et al., 1988, Gearing, D. P. et al., 1987). Eine Alternative ist die Kultivierung der Stammzellen auf einer Fibroblastenzellschicht (Evans, M. J. et al., 1981, Martin, G. R., 1981). Diese sogenannten „Feeder“-Zellen sind embryonalen Ursprungs und sekretieren ebenso LIF (Stewart, C. L. et al., 1992).

P19 Embryonale Carcinoma Zellen (P19 EC Zellen) wurden als pluripotente Stammzellen (Rossant, J. et al., 1982) aus murinen Teratokarzinomen gewonnen (McBurney, M. W. et al., 1982, Stevens, L. C., 1970, McBurney, M. W., 1976). Ihre Fähigkeit, in serumhaltigem Medium ohne Feederzellen unzählige Passagen zu überleben und nicht zu differenzieren (Martin, G. R. et al., 1975, Nicolas, J. F. et al., 1976), ihre hohe Teilungsrate und ihr schnelles Wachstum bieten bei Studien über die frühe Embryonalentwicklung ein alternatives Arbeitsmodell zu ES Zellen. Eine Differenzierung in Richtung Neuroektoderm durch Zugabe von Retinsäure (Jones-Villeneuve, E. M. et al., 1982) und in Richtung Mesoderm durch Zugabe von DMSO ist möglich (McBurney, M. W. et al., 1982). Voraussetzung der Differenzierung von P19 EC Zellen ist die vorangegangene Haltung als nicht adhätierende Aggregate, sogenannter embryoid bodies, die der frühen Differenzierung im Embryo ähneln. Wenn die Zellen wieder auf Kulturschalen adhätieren können, sind sie in der Lage in Gewebe aller drei Keimblätter zu differenzieren (Martin, G. R. et al., 1975).

Die Transkriptionsfaktoren *POU domain, class 5, transcription factor 1* (Pou5f1, Synonym Oct4) und *Nanog homeobox* (Nanog) sind essentiell für die Erhaltung charakteristischer Eigenschaften von ES Zellen. Pou5f1 wird in ES Zellen, im Epiblasten, im noch nicht implantierten Embryo und in den Keimzellen exprimiert. Er ist ein Marker für ES Zellen, der die Differenzierung in Trophektodermzellen inhibiert, die Differenzierung zu primitivem Entoderm und den Keimblättern aber fördert (Okamoto, K. et al., 1990, Pesce, M. et al., 2001, Scholer, H. R. et al., 1990). Nanog, das zusammen mit Pou5f1 agiert, inhibiert die

Differenzierung in Richtung primitivem Entoderm und der drei Keimblätter und schränkt somit die Wirkung von Pou5f1 auf die Differenzierung ein (Chambers, I. et al., 2003, Mitsui, K. et al., 2003).

EC- wie auch ES Zellkulturen stellen eine nützliche Quelle pluripotenter Stammzellen dar, um zelluläre und molekulare Aspekte früher embryonaler Entwicklung zu untersuchen. P19 EC Zellen und ES Zellen werden in der Entwicklung und Differenzierung von gleichen molekularen Mechanismen beeinflusst (McBurney, M. W., 1993) und lassen sich demnach auch gut für vergleichende Studien heranziehen.

1.9. Die RNA-Interferenz-Technik

Eine häufig genutzte Technik, um biologische Funktionen von Proteinen genauer definieren zu können, ist die Untersuchung des Phänotyps eines Organismus mittels einer Funktionsverlustanalyse des entsprechenden Gens. Mit Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi, RNA Silencing)-Technik (Guo, S. et al., 1995) und der Bedeutung von doppelsträngiger (ds)RNA (Fire, A. et al., 1998) wurde ein Durchbruch bei der Erforschung von inhibierter Genexpression und deren Folgen im Organismus erzielt. Das Einsetzen sequenzspezifischer dsRNA blockiert die Translation homologer Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) in den Zielzellen, was durch die folgende Degradierung der mRNA zu einer Verringerung der Translationsrate spezifischer Proteine führt (Fire, A. et al., 1998). Die gesamte RNA-Interferenz-Technik basiert auf sogenannten „small RNAs“, zu denen u.a. „micro RNAs“ (miRNAs) und „small interfering RNAs“ (siRNAs) gehören. „Small RNAs“ entstehen aus dsRNA-Molekülen nach Prozessierung durch Enzyme des RNase-III-Typs. Sie sind in der Lage, die Genexpression durch die Hybridisierung an die mRNA des Zielgens zu minimieren („knockdown“). miRNAs und siRNAs unterscheiden sich kaum in ihrer Funktion, jedoch in ihrer Biogenese (Doench, J. G. et al., 2003, Zeng, Y. et al., 2003) .

Die Biogenese der 22 Nukleotid langen miRNA beruht auf der Aktion zweier RNAsen. Nach Transkription von endogenen miRNAs oder „short hairpinRNA-mir“ (shRNA-mir) RNAs von einem knockdown-Konstrukt durch die RNA Polymerase II wird die sogenannte „pri-miRNA“ im Nukleus durch das RNase-III-Enzym Drosha geschnitten, das zur Generierung einer 60-70 Nukleotid langen „pre-miRNA“ mit charakteristischem 2 Nukleotid-3'-Überhang führt. Nach Transport der „pre-miRNA“ ins Cytoplasma bindet das RNase-III-Enzym Dicer an den 2 Nukleotid-3'-Überhang und schneidet die „pre-miRNA“. Ein miRNA-Doppelstrang ist entstanden, der mit dem Enzymkomplex RNA induced silencing complex (RISC) interagieren kann. In diesem Enzymkomplex wird ein miRNA-Strang durch das Enzym Argonaute-2 abgebaut (Hammond, S. M., Caudy, A.A., Hannon, G.J., 2001), während der reife miRNA-

Strang an spezifische Stellen der Ziel-mRNA bindet und so die Herunterregulierung der Gen-Expression bewirkt.

Die effektive Einsetzbarkeit der RNA-Interferenz-Technik auf post-transkriptionaler Ebene ist nach Etablierung in Pflanzen, Pilzen und Wirbellosen auch bei kleinen Wirbeltieren (Zebrafisch) nachgewiesen worden (Hamilton, A. J. et al., 1999, Zamore, P. D. et al., 2000, Elbashir, S. M. et al., 2001, Li, Y. X. et al., 2000). Durch Einsatz von so genannten (sh)RNAs wurde der Nachweis einer Unterdrückung der spezifischen Genexpression in kultivierten Säugerzellen erbracht (Paddison, P. J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., Conklin, D.S., 2002).

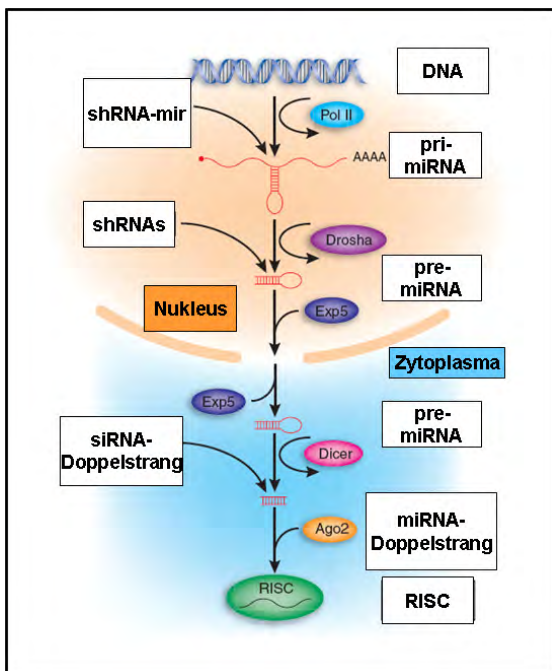


Abb. 1.6.: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz-Technik.

Endogen wird DNA durch die RNA Polymerase II (Pol II) zur pri-miRNA. Nach Schneiden des Enzyms Droscha wird die pre-miRNA über den Faktor Exportin-5 (Exp5) vom Nucleus ins Zytoplasma transportiert. Dort wird sie durch das Enzym Dicer zu einem miRNA-Doppelstrang geschnitten. Nach Abbau eines Stranges durch Argonaute-2 (Ago2), wird der antisense Strang in den Proteinkomplex RISC inkorporiert. RISC kann so an homologe mRNA binden. Diese als Ziel-mRNA gekennzeichnete mRNA wird endonukleär in Fragmente zerschnitten und abgebaut. Nach Degradierung der homologen mRNA löst sich der RISC-Komplex und kann einen neuen Zyklus durchlaufen. Innerhalb dieses Prozesses kann im Zuge der RNA-Interferenz-Technik die shRNA-mir RNA auf Höhe der RNA Polymerase II eingesetzt werden und den folgenden Zyklus durchlaufen. shRNAs werden vom Nucleus ins Zytoplasma transportiert und dort direkt von Dicer geschnitten. Ein siRNA-Doppelstrang kann direkt im Zytoplasma zugesetzt werden, um dort nach Ago2-Einfluss in den RISC-Komplex inkorporiert zu werden. (miRNA=microRNA, shRNAs=small hairpin RNAs, shRNA-mir=small hairpin RNA-microRNA, siRNA=small interfering RNA, RISC=RNA-inducing silencing complex) (Darstellung nach Cullen, 2005)

1.10. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung molekularer Regelnetzwerke in der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) und der Somitogenese durch eine Charakterisierung der daran beteiligten Gene. Eine Analyse der Bedeutung einzelner Gene sowie der sie beeinflussenden Signalkaskaden sollte die Mechanismen aufschlüsseln, die bei der Embryogenese und auch der Somitogenese zusammenwirken.

Als Zellkulturmodell pluripotenter Stammzellen sollten P19 EC Zellen dienen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte nach einer Charakterisierung der P19 EC Zellen mittels einer Antikörpermarkierung die gezielte Aktivierung der Wnt-Signalkaskade untersucht werden. Die Wnt-Signalkaskade ist ein bei der EMT wichtiges Regelnetzwerk. Eine Aktivierung dieser Signalkaskade sollte eine gezielte Induktion der P19 EC Zellen in Richtung Mesoderm ermöglichen. Die Etablierung einer gezielten Aktivierung einer EMT in den P19 EC Zellen sollte Einblicke in die dabei ablaufenden molekularen Vorgänge während der Differenzierung ermöglichen.

Alternativ sollte eine Differenzierung zu Mesoderm mittels Zugabe von DMSO sowie einer Tbx6-Überexpression in P19 EC Zellen untersucht werden. Tbx6, als essentieller Regulator des präsomitischen Mesoderms (PSM), sollte eine spezifischere Differenzierung des Mesoderms in Richtung PSM ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte mittels einer Microarray-Analyse eine größere Übersicht über die sich in ihrem Expressionsniveau verändernden Gene dieser in Richtung Mesoderm induzierten P19 EC Zellen ermöglicht werden. Einzelne Gene sollten dabei näher auf ihre Funktion hin im Mausembryo analysiert werden. Untersuchungen mithilfe der RNA-Interferenz-Technik sowie durch Überexpression dieser einzelnen Gene sollten eine potentielle Funktion bei EMT und Somitogenese aufklären. Durch Ganzpräparat in situ-Hybridisierungen im Mausembryo sollten die Wirkungsweise dieser potentiellen Gene dargestellt werden.

2. Material, Tiere und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Folgende speziellen Geräte wurden in dieser Arbeit verwendet:

Geräte	Firma
Abi7900HT Fast Real Time PCR Maschine	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Agilent 2100 BioAnalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn)
Axiomager Z1	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert S100	Zeiss (Oberkochen)
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Biorad (München)
Gelelektrophoresezubehör E831	Consort (AGS, Heidelberg)
Illumina BeadStation	Illumina (San Diego, USA)
Kameraaufsatz auf Stereomikroskope	Zeiss (Oberkochen)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies (Wien, Österreich)
Mikrobiologischer Brutschrank	Binder (Tuttlingen)
Mikrowellenofen	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
Nanophotometer	Implen (München)
Neubauer Zählkammer	GLW (Würzburg)
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
Roller-Mixer	Progen Scientific Ltd (South Yorkshire, UK)
Schüttelinkubator	Multitron (Stuttgart)
Schüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
Stereomikroskop DM/LHC, MZ 75, MZ 95	Leica Microsystems (Wetzlar)
Stereomikroskop V12 mit AxioCam	Zeiss (Oberkochen)
Sterilwerkbank	Heraeus (Hanau)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellkulturbrutschrank	Heraeus (Hanau)
Zentrifugen 5415 R, 5810 R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Kryo-Einfrierbehälter	Nalgene (Hereford/UK)
Einmalpipetten, gestopft	Corning (Wiesbaden)
Elektroporationsküvette (0,1 cm)	Biorad (München)
Filterpapier	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Gefrierplastikröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Gelkammern	NeoLab (Heidelberg)
Netzeinsätze („Netwells“)	Corning (Wiesbaden)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Objektträger mit 4-Kammer-Aufsatz („CultureSlides“)	BD Biosciences (Heidelberg)
Pasteurpipetten aus Glas	Fisherbrand (Schwerte)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym (Hamburg)
Plastikpetrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsröhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Phase Lock Gel™ Heavy-Reaktionsröhrchen (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spritzenfilter	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Zellkulturschalen (Ø 35 mm, 60 mm, 100 mm)	Corning (Wiesbaden)
Zellkulturschalen (12-Titer, 48-Titer, 96-Titer)	Corning (Wiesbaden)

2.1.3. Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
ACG-Nukleotide	Roche (Mannheim)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammonium Acetat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)
β-ME (β-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Bacto-Hefe-Extrakt	Beckton Dickinson GmbH (Heidelberg)

2. Material, Tiere und Methoden

Bactotrypton	Beckton Dickinson GmbH (Heidelberg)
BCIP (5-Bromo4chloro3indolylphosphat)	Roth (Karlsruhe)
Biotin-16-UTP	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Hamburg)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Invitrogen (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
DEPC (Diethylpyrokarbonat)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
dH ₂ O, demineralisiert	Millipore GmbH (Schwalbach)
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich (Hamburg)
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium)	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
DNase I Puffer	Qiagen (Hilden)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Desoxyribonukleosidtriphosphate Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)	Invitrogen (Karlsruhe)
DPBS (Dulbecco`s phosphate buffered solution)	Cambrex Bio Science Vervieres (Verviers/ Belgien) ehemals Bio Whittaker Europe
DTT (1,4 Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
EtBr (Ethidiumbromid)	Roth (Karlsruhe)
EtOH (Ethanol)	Merck (Darmstadt)
FCS (Fetal Calf Serum)	Invitrogen (Karlsruhe)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Gelatine-Lösung	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Glykogen	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Gsk3 β -Inhibitor SB 216763	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Glutamin	Cambrex Bio Science Vervieres (Verviers/ Belgien) ehemals Bio Whittaker Europe
Glycerol (100%)	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
H ₂ O, RNase frei	Qiagen (Hilden)

2. Material, Tiere und Methoden

H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Roth (Karlsruhe)
Heparin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Hygromycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (Darmstadt)
KHPO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt)
Lammserum	Invitrogen (Karlsruhe)
LIF (Leukaemia Inhibitory Factor)	Chemicon (Hofheim)
Lipofektamin™2000	Invitrogen (Karlsruhe)
MetOH (Methanol)	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck (Darmstadt)
NaAc (Natriumacetat)	Merck (Darmstadt)
Na ₃ Citrat Dihydrat	Merck (Darmstadt)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O (Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat)	Merck (Darmstadt)
NaOH (Natronlauge)	Merck (Darmstadt)
NEAA (Non Essential Amino Acids)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Nitroblau Tetrazolium Salz	Roth (Karlsruhe)
Opti-MEM® I (Reduced Serum Media, Modifikation des DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Bio Science Vervieres (Verviers/ Belgien) ehemals Bio Whittaker Europe
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
RDD Puffer	Qiagen (Hilden)
RLT Puffer	Qiagen (Hilden)
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Fluka (Buchs, CH)
Tris	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Wnt3a	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

2. Material, Tiere und Methoden

Xylencyanol	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Zitronensäure	Merck (Darmstadt)
2x Rapid Ligationspuffer	Promega (Mannheim)
10x Taq DNA-Polymerasepuffer	Promega (Mannheim)
10x Transkriptionspuffer	Roche (Mannheim)
12 kb Plus-DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4. Reagenzsysteme/Kits

Reagenzsysteme/Kits	Firma
Gateway BP Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Gateway LR Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Illumina TotalPrep™ Amplifikation Kit	Applied Biosystems/Ambion (Austin, USA)
Dual-Luciferase® Reporter Assay-Kit	Promega (Mannheim)
RNeasy-Mini RNA-Isolation Kit	Qiagen (Hilden)
Qiafilter Midi-, Maxi-Plasmid Purification Kit	Qiagen (Hilden)
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaprep Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen (Karlsruhe)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)

2.1.5. Immunreagenzien

Immunreagenzien	Firma
Polyklonaler Schaf-anti-Digoxigen Antikörper (α Dig AP)	Roche (Mannheim)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Maus IgG (Oct4)	Abcam (Cambridge, UK)
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Maus IgG (Cdh1)	BD Biosciences (Heidelberg)
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Maus IgG (Vim)	Abcam (Cambridge, UK)

2. Material, Tiere und Methoden

Polyklonaler sekundärer Antikörper Ziege-anti-Maus IgG (Cy5)	Abcam (Cambridge, UK)
Polyklonaler sekundärer Antikörper Ziege-anti-Maus IgG (AF488)	Invitrogen (Karlsruhe)
Power Sybr®Green Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Streptavidin-Cy3	Illumina (San Diego, USA)

2.1.6. Enzyme

Enzyme	Firma
Alkaline Phosphatase Calf Intestinal (CIP)	Promega (Mannheim)
DNA Polymerase (Klenow-Enzym)	Promega (Mannheim)
Dnase I	Qiagen (Hilden)
Gateway® LR/BP Clonase II	Invitrogen (Karlsruhe)
PrimeSTAR® HS DNA-Polymerase	Takara (Potsdam)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Restriktionsenzyme	Promega (Mannheim)
Rnase H	Invitrogen (Karlsruhe)
Rnase Out	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	Promega (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	Promega (Mannheim)

2.1.7. Zellen

Zellen	Herkunft	Referenz
P19 Embryonale Carcinoma Zellen (P19 EC Zellen)	Embryonale Stammzellen aus murinen Teratokarzinomen, European Collection of Cell Cultures, Katalognummer 95102107, Salisbury Wiltshire, UK	(Jones-Villeneuve, E. M. et al., 1982, McBurney, M. W. et al., 1982, McBurney, M. W. et al., 1982)
F1G4 Embryonale Stammzellen (F1G4 ES Zellen)	Embryonale Stammzellen aus den murinen Inzuchtstämmen 129xC57BL/6F1, Zelllinie G4; Dr. Andras Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto,	(George, S. H. et al., 2007)

	Kanada	
--	--------	--

2.1.8. Wirtssysteme

Name	Firma
DH5 α , elektrokompetente Zellen	Invitrogen (Karlsruhe)
TOP10, elektrokompetente Zellen	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.9. Medien

Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung von Bakterienkulturen:

Name	Menge
Bactrotrypton	10 g
Bacto-Hefe Extrakt	5 g
NaCl	10 g
NaOH	entspr. Menge, um auf pH 7,2 einzustellen
dH ₂ O	auffüllen auf 1 l

Zusammensetzung des P19 EC Mediums zur Kultivierung muriner P19 EC Zellen:

Name	Menge
DMEM mit 4,5 mg/ml Glucose	440 ml
FCS	50 ml
Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin (50 μ g/ml)	5 ml
Glutamin (200 mM) in 0,85% NaCl-Lösung	5 ml
β -ME (100 μ M)	3,5 μ l

Zusammensetzung des ES Mediums zur Kultivierung muriner F1G4 ES Zellen:

Name	Menge
DMEM mit 4,4 mg/ml Glucose	410 ml
FCS	75 ml
Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin (50 μ g/ml)	5 ml
Glutamin (200 mM) in 0,85% NaCl-Lösung	5 ml
NEAA (MEM)	5 ml
β -ME (100 μ M)	3,5 μ l

Zusammensetzung des Mediums zur Kryokonservierung von P19 EC bzw. F1G4 ES Zellen:

Name	Menge
Kulturmedium	90%
DMSO	10%

2.1.10. Agarplatten

Name	Zusammensetzung
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin
Kanamycin-Agarplatten	LB-Medium, 25 µg/ml Kanamycin
Chloramphenicol-Agarplatten	LB-Medium, 50 µg/ml Chloramphenicol

2.1.11. Software

Software	Firma
2100 Expert Software	Agilent Technologies (Waldbronn)
AxioVision V4.6	Zeiss (Oberkochen)
LAS (Leica Application Suite)	Leica Microsystems (Wetzlar)
MicroWin 2000 Luminometersoftware	Microsoft (Unterschleißheim)
Primer Express® qRT-PCR software v3.0,1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Illumina BeadStudio Data Analysis Software	Illumina (San Diego, USA)

2.1.12. Lösungen

für den allgemeinen Laborbedarf:

Ampicillin: 100 mg/ml Ampicillin in EtOH (50%)

10x DNA-Auftragspuffer: für 50 ml: 25 ml 100-prozentiges Glycerol, 5 ml 0,5 M EDTA, 20 ml dH₂O, 50 mg Xylencyanol, 75 mg Bromphenolblau; zur endgültigen Benutzung 50x verdünnt.

12kb DNA-Marker: für 200 µl: 10 µl DNA-Marker (1 µg/µl), 20 µl 10x Ladepuffer, 170 µl dH₂O.

EB-Puffer: 10mM TrisHCl, pH 8,5

70% EtOH: 100% EtOH, verdünnt mit dH₂O

10 mM dNTPs: für 2 ml: 100 µl 200 mM dATP, 100 µl 200 mM dCTP, 100 µl 200 mM dGTP, 100 µl 200 mM dTTP in dH₂O

50x TAE: 242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA und 57,1 ml Eisessig auf 1l mit dH₂O aufgefüllt (pH 8,0).

1x TAE: 50x TAE verdünnt mit dH₂O 1:50

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 8,0.

TrisHCl: für 500 ml: 60,57 g Tris in H₂O; pH-Einstellung mit HCl.

für die Zellkultur/Immunhistochemie:

FCS: Foetales Kälberserum, hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C

0,2% Triton X-100/DPBS: 1 ml 10-prozentiges Triton-X , 49 ml DPBS

für die pronukleare Injektion:

Injektionspuffer: 0,1 mM EDTA, 5 mM TrisHCl pH 7,4

für Lyse genomischer DNA:

Laird`s Lysispuffer: 200 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 100 mM TrisHCl pH 8,3

0,1x TE-Puffer: TE-Puffer verdünnt 1:10 mit dH₂O

für die Ganzpräparat in situ-Hybridisierung:

BCIP: 50 µg/µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat Toluidinium-Salz in 100% Dimethylformamid

DEPC-H₂O-Hyb (2 Vol.): 250 ml Formamid, 125 ml 20x DEPC-SSC (pH5,0), 25 ml 20% SDS RNA, 500 µl HefenRNA und 500 µl Heparin, mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt

DEPC-H₂O: dH₂O wird mit 0,1% Diethylpyrokarbonat (DEPC) für 12 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend autoklaviert.

DEPC-H₂O-PBS: für 1 l: 950ml DEPC-H₂O+ 50 ml 20xPBS

DEPC-H₂O-PBST: 0,1% Tween-20, nach dem Autoklavieren von DEPC-PBS beigefügt.

20x DEPC-SSC (pH 5,0): 88,23 g Na₃-Citrat Dihydrat und 175,32 g NaCl, auf ein Endvolumen von 1l DEPC-H₂O aufgefüllt. Der pH durch Zugabe von Zitronensäure, verdünnt mit DEPC-H₂O auf pH 5,0 eingestellt.

0,2% Glutaraldehyd/4% PFA/DEPC-H₂O-PBST: 4% PFA/DEPC-H₂O-PBST mit 0,2% Glutaraldehyd

Glycin (1/1000 Vol.): 200 µg/µl Glycin, in DEPC-H₂O gelöst

Glycin/DEPC-H₂O-PBST: DEPC-H₂O-PBST mit Glycin (2 mg/ml)

HefenRNA: 50 µg/µl HefenRNA, in DEPC-H₂O gelöst.

Heparin: 50µg/ml Heparin in DEPC-H₂O gelöst.

6% H₂O₂/DEPC-H₂O-PBST: DEPC-H₂O-PBST mit 6% H₂O₂

Lammserum: hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C

NBT: 75 µg/µl Nitroblau Tetrazolium-Salz in 70% (v/v) Dimethylformamid

NTMT: 429,5 ml H₂O, 50 ml 1 M TrisHCl pH 9,5, 10 ml 5 M NaCl, 10 ml 2,5 M MgCl₂, 500 µl Tween-20

MetOH-DEPC-H₂O-PBST (25%/50%/75%): MetOH (100%), verdünnt mit DEPC-H₂O-PBST zum Erhalt erwünschter Konzentrationen

20x PBS: für 1 Liter: 160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na₂HPO₄H₂O, 4,8 g KHPO₄ wurden in dH₂O gelöst; Einstellung auf pH 7,0 mit NaOH und HCl; autoklaviert.

4% PFA/PBS (1 Vol.): 4 g PFA wird in 100 ml DEPC-H₂O-PBS bei 60°C für ca. 1 h gelöst, danach auf Eis gekühlt und steril filtriert.

4% PFA/DEPC-H₂O-PBST: 4 g PFA wird in 100 ml DEPC-H₂O-PBST bei 60°C für ca. 1 h gelöst, danach auf Eis gekühlt und steril filtriert.

Proteinase K (1/1000 Vol.): 10 µg/µl Proteinase K wird in DEPC-H₂O gelöst

Proteinase K/DEPC-H₂O-PBST: DEPC-H₂O-PBST mit Proteinase K (10 µg/µl)

Sol.1: 500 ml Formamid, 250 ml 20xSSC pH 5,0, 50 ml 20% SDS mit H₂O auf 1 l auffüllen

Sol.3T: 500 ml Formamid, 100 ml 20x SSC pH 5,0, 1 ml Tween-20 mit H₂O auf 1 l auffüllen
 20% SDS RNA: 200 g SDS RNA wurden in 1 l H₂O durch Erhitzen aufgelöst und daraufhin steril filtriert.

TBST (10x): 81,8 g NaCl, 2 g KCl, 30,3 g Tris mit H₂O auf 900 ml auffüllen und lösen, mit 37% HCl pH 7,5 einstellen und mit H₂O auf 1 l auffüllen, autoklavieren und 10 ml Tween-20 zugeben.

2.1.13. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für PCR-Versuche, sqPCR, qRT-PCR und als Sequenzierprimer eingesetzt:

Name	Basenabfolge	Funktion/ Produktgröße
AS 138	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	GAPDH-primer, sqPCR/ 452bp
AS 139	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	
AS 140.1	5' AGCCATTGCCAAGTACATCC 3'	Cdh1-primer, sqPCR/ 133bp
AS 141.1	5' AAAGACCGGCTGGGTAAACT 3'	
AS 249	5' GCTTCCCTGGTTAAGCAGTACA 3'	HPRT-primer, qRT-PCR/ 71bp
AS 250	5' GAGAGGTCCTTTTCACCAGCAA 3'	
AS 187	5' ATGGGATCCAAGCCAATGTA 3'	Tbx6-primer endogen, qRT-PCR/ 105bp
AS 188	5' ACTTCAATGCGGATGCTACC 3'	

2. Material, Tiere und Methoden

AS 187	5' ATGGGATCCAAGCCAATGTA 3'	Tbx6-primer transgen, qRT-PCR/ 148bp
AS 235	5' CAACAGATGGCTGGCAACTA 3'	
L 2	5' AAGCAGCAAGCATATGCAGCTAGTTTAA CACATTA 3'	Uncx 4.1-primer, Ganzpräparat in situ- Hybridisierung/ 2200bp
U 5	5' ACTCCGCCAGTTCCGCCCAT TCT 3'	
SM 4a	5' CGACAGACCATGTACCCAGA 3'	Mixl1-primer, quantitative RT-PCR/ 147bp
SM 5a	5' TGAGGATAAGGGCTGAAATGA 3'	
SM 7a	5' GCTACACATCGCCGCTTT 3'	Nrarp-primer, qRT-PCR/ 143bp
SM 8a	5' GGGAAGGTACAGCAGAGACG 3'	
SM 15	5' GTTCTCCCCTACCTCCAG 3'	Tnfrsf19-primer, qRT-PCR/ 98bp
SM 16	5' AAATTCAGCGCAGATGGAAC 3'	
SM 30	5' AGCGGCCAATAGCAGCTTTGC 3'	Puromycin-primer, zur Genotypisierung knockdown positiver Klone/ 547bp
SM 31	5' CCTTCCATCTGTTGCTGCG 3'	
YC 43	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'	eGFP-primer, Ganzpräparat in situ- Hybridisierung/ 717bp
YC 44	5' CTTGTACAGCTCGTCCATGCC 3'	
LW 299	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGCACTCAAGGTCCTACCTCTACACAGG 3'	Amplifizierung der ORFs von Tnfrsf19 als dominant-negativer Rezeptor/ 643bp
LW 301	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCCTTCACAGTGAGACAGAGGGATGG 3'	
LW 299	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGCACTCAAGGTCCTACCTCTACACAGG 3'	Amplifizierung der ORFs von Tnfrsf19 in voller Länge /1251bp
LW 303	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCGGCATCCTGGAAGGCTGTGGGC 3'	
LW 224	5' ATTGTCACCTCAAGTGTATGG 3'	Sequenzierprimer
LW 239	5' ATAGAAGACACCGGGAC 3'	Sequenzierprimer
LW 281	5' CAAAAGACGGCAATATGGTGG 3'	Sequenzierprimer
LW 298	5' AGTGAAGGTGGCTGTTGGG 3'	Sequenzierprimer
M13 for	5' GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA TGTG 3'	Sequenzierprimer
M13 rev	5' CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGG CTCG 3'	Sequenzierprimer

2.1.14. DNA-Sequenzierungen/Oligonukleotid-Bestellungen

DNA-Sequenzierungen sowie Oligonukleotid-Bestellungen wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

2.2. Tiere

2.2.1. Haltung des Versuchstieres Maus

Mäuse des Auszuchtstammes NMRI (Naval Medical Research Institute, Bethesda, USA) wurden von der Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen) bzw. aus der institutseigenen Zucht (Tierhaus des MPI für molekulare Genetik, Berlin) bezogen. Die Mäuse wurden bei 22°C, bei 50-70% relativer Luftfeuchte und einem Licht/Dunkelrhythmus von jeweils 12 h gehalten. Sie bekamen Wasser und Qualitätsfutter (ssniff® M-Z, Soest) ad libitum.

2.2.2. Tierversuchsanträge

Die tierexperimentellen Arbeiten waren vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) unter der Projektnummer G0248/03 mit den Ergänzungsanträgen „Funktionelle Genanalyse“ sowie „Funktionelle Promoteranalyse in Mausembryonen“ genehmigt.

2.2.3. Eingesetzte transgene Mäuse

Für den knockdown-Versuch von Tnfrsf19 (siehe 3.6., Tab.3.3.) wurde jeweils eine Maus (NMRI-Stamm) im Rahmen der Tetraploidaggregationstechnik sowie der Laserinjektion eingesetzt und 8 Embryonen (E10,5) präpariert. Die verwendeten Techniken und Methoden der Tetraploidaggregation basieren auf der Arbeit von Nagy, A. (Nagy, A. et al., 2003). Die verwendeten Techniken und Methoden der Laserinjektion basieren auf den Herstellerangaben „XYClone, Laser Ablation System“ von Hamilton Thorne Biosciences (Beverly, USA). Beide Techniken wurden im Tierhaus durch Karol Macura (technischer Assistent, MPI für molekulare Genetik, Berlin) durchgeführt.

Im Rahmen der pronuklearen Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstruktes LW #350 „G1“ (siehe 3.7., Tab.3.4.) mit Tnfrsf19 als vermutlich dominant negativer Rezeptor wurden 5 Mäuse (Maus #7 - #11, NMRI-Stamm) und 35 Embryonen (E9,5) präpariert. Die Embryonen #1, #3, #5 der Maus #11, sowie Embryo #2 der Maus #10 wurden als positiv genotypisiert (siehe 2.4.8.8.). Die Embryonen #1 und #3 der Maus #11 wurden ebenso durch die Farbreaktion in der Schwanzspitze des Embryos basierend auf dem DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 „G1“ (siehe 2.4.9.) als transgen detektiert (siehe Abb. 3.17.).

Im Rahmen der pronuklearen Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstruktes LW #350 „H3“ (siehe 3.7., Tab.3.5.) mit Tnfrsf19 in voller Länge wurden 6 Mäuse (Maus #1 - #6, NMRI-Stamm) eingesetzt und 43 Embryonen (E9,5) präpariert. Die Embryonen #5, #6, #8 und #14 der Maus #4 wurden als positiv genotypisiert (siehe 2.4.8.8.). Embryo #6 der Maus #4 wurde ebenso durch die Farbreaktion in der Schwanzspitze des Embryos basierend auf dem DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 „H3“ (siehe 2.4.9.) als transgen detektiert (siehe Abb. 3.18.). Die verwendete Methode der pronuklearen Mikroinjektion der DNA basieren auf der Arbeit von Nagy, A. (Nagy, A. et al., 2003) und wurden im transgenen Labor des Tierhauses durch Dipl. Ing. Ingo Voigt (Biotechnologe und Leiter der transgenen Einheit, MPI für molekulare Genetik, Berlin) vorgenommen.

2.2.4. Herstellung von Embryopulver

Die Herstellung von Embryopulver zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen bei der Ganzpräparat in situ-Hybridisierung erfolgte mit E12,5-E14,5 Mausembryonen, die nach der Präparation bei -20°C eingefroren worden waren. 25 Embryonen wurden in einem möglichst kleinen Volumen von eiskaltem PBS homogenisiert. Sodann wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min mit 10000 rcf in einer Zentrifuge bei 4°C pelletiert, 2x mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert. Das Präzipitat wurde nun auf Filterpapier ausgebreitet, luftgetrocknet, fein gemörsert und bei 4°C gelagert.

Die Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen/Embryonen wurde durch die Tötungsanzeige T 0215/04 legitimiert.

2.2.5. Isolation von Mausembryonen

Nach einem Tragezeitraum von E9,5/10,5 wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Der Uterus wurde aus der Maus herauspräpariert und bis zur Weiterbehandlung in PBS auf Eis aufbewahrt. Dann wurden die Embryonen aus dem Uterus in kaltem PBS in einer Petrischale freipräpariert. Nach Freilegen der Embryonen wurden diese zur möglichen späteren Genotypisierung getrennt voneinander in Kryoröhrchen mit einer 4%PFA/PBS-DEPC-H₂O-Lösung (siehe 2.1.12.) überführt.

2.2.6. Lyse von genomischer DNA aus Mausembryobiopsien

Der Kopf des zu untersuchenden Mausembryos oder extraembryonale Hüllmembranen (Amnion und Serosa) wurden in bei 56°C in 250 µl Laird`s Lysispuffer mit ProteinaseK (20 mg/ml, direkt vor Gebrauch hinzupipettiert) bei leichtem Schwenken aufgelöst. Am darauffolgenden Tag wurden 250 µl Isopropanol hinzupipettiert, das Reaktionsröhrchen

leicht hin und her geschwenkt und die ausfallende DNA mit Hilfe einer Pipettenspitze in 250 µl TE (1x) überführt. Durch kontinuierliches Schütteln der Reaktionsröhrchen im Thermomixer bei 37°C löste sich die DNA langsam in TE auf und konnte dann bei 4°C aufbewahrt und zu je 1 µl/Genotypisierungs-PCR eingesetzt werden.

2.2.7. Fixierung von Mausembryonen

Die Embryonen wurden ün bei 4°C in einer 4%PFA/PBS-DEPC-H₂O-Lösung rollend fixiert. Die Dehydratisierungsschritte wurden im 4°C Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen (siehe 2.1.12.) auf dem Roller-Mixer durchgeführt. Die einzelnen Teilschritte sind im Folgenden aufgelistet:

Lösungen	Inkubationszeiten
DEPC-H ₂ O- PBST	2x 10 min
25% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
50% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
75% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
100% MetOH	2x 10 min

Die Embryonen wurden mindestens für eine Nacht bei –20°C in 100% MetOH bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3. Methoden, allgemein

2.3.1. DNA-Methoden

Die verwendeten Techniken und Methoden basieren, soweit nicht anders beschrieben, auf Sambrook, J. et al. (Sambrook, J., Maniatis, T. , Fritsch, E.F., 1989).

2.3.2. Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

2.3.2.1. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde unter den empfohlenen Salz- und Temperaturbedingungen durchgeführt (Herstellerangaben bzw. Sambrook, J. et al., (Sambrook, J., Maniatis, T. , Fritsch, E.F., 1989). Es wurden 500 ng bis 1 µg DNA mit 6 U Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20-50 µl für 1-2 h inkubiert. Um bessere

Enzymaktivitäten zu erzielen wurde zu jedem Restriktionsansatz BSA (100 µg/ml) hinzugefügt.

2.3.2.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Restriktionsverdauete DNA wurde in einem Agarosegel für analytische und präparative Zwecke in Gegenwart von EtBr elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelkonzentration lag zwischen 0,7-2%, je nach Größe der zu erwarteten Fragmente. Die Agarose wurde in 1x TAE suspendiert, zum Kochen gebracht und nach Abkühlen auf 50°C mit EtBr-Lösung (10 µg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in eine Gelkammer mit eingehängtem Kamm gegossen, nach Festwerden der Agarose in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer gelegt, so dass der Puffer das Gel überschichtet; der Kamm wurde entfernt. Die Proben wurden mit 1/5 an 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard wurde eine 12kb-Plus-DNA-Leiter benutzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei Spannungen zwischen 45 V und 120 V. Die DNA-Fragmente wurden durch Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) analysiert und fotografiert.

2.3.2.3. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um eine Beschädigung der DNA durch Strangbrüche zu verhindern, wurden die zu isolierenden Banden bei langwelligem Licht identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in 2 ml Reaktionsröhrchen gesammelt. Die Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Agarosegel erfolgte mittels „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ oder mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers. Das Präzipitat wurde in H₂O oder EB-Puffer aufgenommen.

2.3.2.4. Phenol-Chloroform-Aufreinigung von DNA nach einem Restriktionsendonukleaseverdau

Um die DNA von Enzymen und Salzen nach einem Restriktionsverdau zu reinigen, wurden „Phase Lock Gel™ Heavy“ Reaktionsröhrchen 1 min bei 14100 rcf zentrifugiert, so dass die Gelphase im Reaktionsröhrchen auf den Boden desselben sank. Dem Restriktionsverdau der DNA wurde unter einem Abzug nach Auffüllen seines Volumens auf ein Endvolumen von 200 µl Phenol und Chloroform (gelöst 24:1 in Isoamylalkohol) zu je 100 µl dazugegeben, diese 400 µl in das Reaktionsröhrchen mit der Gelphase überführt, gut miteinander vermischt und 5 min bei 14100 rcf abzentrifugiert. Daraufhin wurden weitere 200 µl Chloroform hinzupipettiert, das Röhrchen leicht geschüttelt und nochmals 5 min bei 14100 rcf abzentrifugiert. Die flüssige Phase über der Gelphase wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt.

2.3.2.5. NaAc-Fällung von DNA nach Phenol-Chloroform-Aufreinigung

Mit der NaAc-Fällung wurde die DNA aus der abgenommenen flüssigen Phase nach der Phenol-Chloroform-Aufreinigung als Pellet wiedergewonnen und konnte in einer gewünschten Volumenmenge eluiert werden. Dazu wurde 1/10 an Ausgangsvolumens NaAc (3 M, pH 4,6) und das 2,5-fache des Ausgangsvolumens an 100-prozentigem EtOH hinzupipettiert, gut miteinander vermischt und bei 16100 rcf in einer Zentrifuge 20-30 min zentrifugiert. Das daraufhin sichtbar werdende DNA-Pellet wurde nach Abnehmen des Flüssigkeitsüberstandes in 50 µl 70-prozentigem EtOH gewaschen und dazu nochmals 3 min bei 16100 rcf zentrifugiert. Danach wurde der EtOH abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet konnte dann in gewünschter Menge an H₂O aufgenommen und bei – 20°C aufbewahrt werden.

2.3.3. Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen

Die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem (3 ml Kulturen), mittlerem (50-150 ml Kulturen) und großem Maßstab (200-500 ml Kulturen) erfolgte mit Hilfe von Qiagen-Mini-, Midi- und Maxi-Säulen nach Angaben des Herstellers.

2.3.4. Präparation von genomischer DNA durch Lyse aus Zellen auf einer 48-Titer Zellkulturschale

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Laird's Lysispuffer (+0,1 mg/ml Proteinase K) pro Schale bei 37°C üN in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die lysierten Zellen aus der 48-Titerplatte in 1,5 ml Röhrchen überführt und je 200 µl Isopropanol hinzupipettiert, langsam ca. 10 min bei RT vermischt und 10 min bei 16100 rcf abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden die lysierten Zellen mit 70% EtOH gewaschen und danach 10 min bei RT getrocknet. Nachdem die DNA in 50 µl 0,1x TE aufgenommen wurde und üN bei 37°C sich vollständig auflösen konnte, wurde sie bei 4°C aufbewahrt oder ca. 20 µl für den Restriktionsverdau eingesetzt.

2.3.5. Subklonierung von DNA-Fragmenten

2.3.5.1. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden, um eine Religation zu verhindern, vor der Ligation dephosphoryliert. Dies geschah mit Hilfe des Enzyms Alkaline Phosphatase Calf Intestinal 30 min bei 37°C (1 U CIP für 20 pmol Vektor).

2.3.5.2. Erzeugung von DNA-Fragmentenden ohne Basenüberhang mittels eines Klenow-Fragments

Bei DNA-Fragmentenden ohne passende Restriktionsstelle in einem Vektor wurden Enden ohne Basenüberhänge mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym, 1 U/ μ g DNA) erzeugt. Dies geschah in Gegenwart von dNTPs (33 μ M) im Taq-DNA-Polymerasepuffer für 15 min bei 25°C. Anschließend wurde EDTA (10 mM) hinzugegeben und die Reaktion durch Inkubation bei 75°C für 20 min inaktiviert.

2.3.5.3. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 1 U T4-DNA Ligase. Linearisierte und gegebenenfalls dephosphorylierte Vektor-DNA (10-50 ng) wurde mit einem zwei- bis fünffachem Überschuss an isoliertem DNA-Fragment in einem Endvolumen von 10 μ l eingesetzt. Nach Zugabe von 2x Rapid Ligationpuffer wurde der Ansatz mindestens 10 min bei RT inkubiert.

2.3.5.4. Transformation von elektrokompentenen Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurde ein Elektroporationsgerät benutzt. Die elektrokompentenen DH5 α -Zellen (50 μ l) wurden auf Eis aufgetaut und 2 μ l des Ligationansatzes hinzugegeben. Nach 1 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Bei einer Spannung von 1,6 kV, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 μ F wurden die Zellen elektroporiert. Sofort danach wurden 300 μ l LB-Medium in die Küvette pipettiert. 50-250 μ l dieser Suspension wurden je nach Resistenz der Plasmid-DNA auf Ampicillin-, Kanamycin- oder Chloramphenicol-Agarplatten ausplattiert.

2.3.5.5. Anlegen von Glycerolstocks

Um Bakterienkulturen längerfristig zu konservieren, wurden 300 μ l von \bar{u} N angeimpftem Medium (3 ml-150 ml Kulturen) mit 700 μ l 50-prozentigem, autoklaviertem Glycerol in einem sterilem Gefrierplastikröhrchen gut vermischt und bei -80°C gelagert.

Bei Bedarf konnten eingefrorene Kulturproben steril entnommen und eine kleine Menge zur Beimpfung von Flüssigkulturen genutzt werden.

2.3.5.6. Polymerase Kettenreaktion (Saiki, R. K. et al., 1988)

Die Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur in vitro Vermehrung (Amplifikation) definierter DNA-Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-

Polymerase. Sie erlaubt den schnellen, empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen an DNA oder RNA. Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Schritte:

Denaturierung doppelsträngiger DNA in Einzelstränge.

Anlagerung (Annealing) von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs.

Polymerisierung (Neubildung) der doppelsträngigen DNA ausgehend von den Primern mit Hilfe des Enzyms Taq-DNA-Polymerase sowie der vier Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

2.3.5.7. Standard Polymerase Kettenreaktion

Für einen PCR-Ansatz einer Standard-PCR wurden folgende Komponenten verwendet:

PCR-Komponenten	50 µl Ansatz
10x Taq-DNA-Polymerasepuffer	5 µl
dNTPS (10 mM)	1 µl
Oligonucleotid 1 (10 µM)	0,25 µl
Oligonukleotid 2 (10 µM)	0,25 µl
Taq-DNA-Polmerase (1 U/µl)	0,2 µl
cDNA (5-50 ng/µl)	1 µl
dH ₂ O	42,3 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Für die Vervielfältigung der DNA (Schritte 2-4) wurden 30-35 Zyklen durchgeführt. Für eine Standard-PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	15 sek
3. Annealing	45°C- 65°C	15 sek
4. Elongation	72°C	2 min
5. abschl. Elongation	72°C	7 min

Die PCR-Amplifikate wurden für die weitere Bearbeitung (Sequenzierungen, Restriktionsverdau oder Ligationsreaktionen) über „Wizard PCR Clean-Up System“ oder „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (siehe 2.1.4.).

2.3.6. RNA-Methoden; Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus murinen Zellen, die adhären auf 60 mm großen Zellkulturschalen konfluent gewachsen waren, oder aus murinen Zellaggregaten, entnommen aus 100 mm großen Zellkulturschalen ohne Adhärenzfläche, erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini RNA-Isolation Kits (siehe 2.1.4.). Zum Zellaufschluss und zur Inaktivierung aller Proteine, vor allem der RNA abbauenden Enzyme, wurden 350-600 µl denaturierender Puffer (RLT-Puffer + β-ME (10 µl/ml)) auf die Zellen pipettiert, diese durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und entsprechend mit 350-600 µl EtOH (70%) vermischt. Dieses Homogenat wurde auf Säulen mit einem RNA-Moleküle bindenden Filtereinsatz gegeben, mehrmals zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zwischen zwei Waschschritten wurde die in der Filtermembran gebundene RNA zusätzlich mit 10 µl Dnase I (aufgelöst in Dnase-Puffer (70 µl RDD-Puffer)) 15 min bei RT inkubiert. Letztendlich wurde die RNA in 30-50 µl Rnase-freiem H₂O eluiert. Die Konzentration der präparierten RNA wurde am Nanophotometer gemessen. Die Konzentration und zugleich Reinheit der präparierten RNA wurde am Agilent 2100 BioAnalyzer überprüft.

2.3.7. Zellkultur-Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Vor Benutzung wurde sie ebenso wie alle Gegenstände, die von außerhalb in die Sterilwerkbank eingeführt und dort benutzt wurden, mit 70-prozentigem EtOH abgesprüht. Die verwendeten Zellkulturschalen waren speziell für die Gewebekultur sterilisiert. Gestopfte Einmalpipetten sowie gestopfte Pipettenspitzen wurden für Pipettierarbeiten benutzt, Pasteurpipetten aus Glas wurden autoklaviert und vor Benutzung abgeflammt. Alle Lösungen und Medien für die Gewebekultur wurden sterilfiltriert oder autoklaviert und vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Zellen wurden in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert.

2.3.8. Kulturbedingungen

2.3.8.1. Auftauen und Aussäen von Zellen

P19 EC Zellen/F1G4 ES Zellen wurden in Einfriermedium in 2 ml Gefrierplastikröhrchen für längere Zeit in flüssigem Stickstoff oder für wenige Tage bei -80°C gelagert. Die Zellen mussten zügig für 2-3 min im 37°C-Wasserbad aufgetaut werden, um sie anschließend steril in ein 15 ml Plastikröhrchen in 3-5 ml auf 37°C vorgewärmtes P19- oder ES Medium zu überführen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rcf, 5 min, RT), das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 3-10 ml P19- oder ES Medium aufgenommen und als Zellsuspension

auf die Zellkulturschale gegeben. F1G4 ES Zellen mußten im Gegensatz zu P19 EC Zellen auf gelatinierten Zellkulturschalen oder auf einer Fibroblastenzellschicht, sog. "Feederzellen" ausplattiert werden.

2.3.8.2. Splitten und Passagieren von Zellen

Von einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt und der Boden vorsichtig zweimal mit DPBS gewaschen. Ein den Boden bedeckender dünner Film aus Trypsin-EDTA wurde auf die Zellkulturschale pipettiert und diese bei 37°C 5-10 min inkubiert. Nach Ablösen der Zellschicht vom Zellkulturschalenboden wurde die Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Nach Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren wurden diese in einem 15 ml Plastikröhrchen abzentrifugiert (5 min, 1000 rcf, RT). Das überstehende Medium wurde abgesaugt und je nach Bedarf das Zellpellet in 5-12 ml Medium oder PBS aufgenommen und mit der gewünschten Verdünnung wieder ausplattiert. In der Regel ist es als eine Passage zu werten, wenn die Zellen auf einer fünffach größeren Fläche ausplattiert, somit 1:5, gesplittet wurden.

2.3.8.3. Einfrieren von Zellen

Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale wurden nach Absaugen des Mediums zweimal mit DPBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA bedeckt und 5-10 min bei 37°C inkubiert. Nach Lösen der Zellschicht vom Boden wurden diese durch Auf- und Abpipettieren in frischem Medium vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Plastikröhrchen aufgenommen und abzentrifugiert (1000 rcf, 5 min, RT). Das überstehende Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde ein Tropfen auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und jeweils vier große Quadrate der Kammer ausgezählt und daraus der Mittelwert errechnet. Nach Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10^4 erhielt man die Zellzahl/ml in der Suspension. Die Zellen wurden mit einem bestimmten Volumen an Medium auf die gewünschte Zellzahl/ml gebracht, je 1 ml in ein Gefrierplastikröhrchen pipettiert und mit einem weiteren ml einer 20-prozentigen DMSO/Kulturmedium- Lösung vermischt, so dass die Endkonzentration an DMSO im Medium 10% entsprach. Das Einfrieren erfolgte in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierbehälter bei -80°C . Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen nach mindestens 24 h bei -80°C zur Lagerung in flüssigem Stickstoff umgesetzt.

2.3.8.4. Gelatinieren von Zellkulturschalen

Zum Gelatinieren der Zellkulturschalen wurde der Boden mit einer auf 4°C gekühlten, 0,1-prozentigen Gelatinelösung (in H_2O gelöst) bedeckt. Die Zellkulturschalen wurden 45 min auf der Sterilwerkbank inkubiert, danach die Lösung wieder abgesaugt und bis zum

vollständigen Abtrocknen des Schalenbodens mit offenem Deckel bei RT gelagert. Gelatinierte Zellkulturschalen konnten im Zellkulturbrutschrank aufbewahrt werden.

2.4. Methoden, speziell

2.4.1. Immunhistochemie (IHC) von P19 EC Zellen mit den Antikörpern (AK) Cdh1, Vim und Oct4

P19 EC Zellen wurden zu je 8×10^4 Zellen/Kammer ($1,7 \text{ cm}^2$) auf Objektträgern mit einem 4-Kammer-Aufsatz („CultureSlides“) in P19 Medium ausgesät. Nach 7-tägigem Wachstum und Absaugen des P19 Mediums wurden die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und sofort in 4-prozentiger PFA/DPBS-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach Absaugen der Fixierungslösung wurden die Zellen erneut 2x mit DPBS gewaschen und weitere 5 min bei RT in 0,2-prozentiger Triton X-100/DPBS-Lösung inkubiert, um die Zellkerne der Anfärbung zugänglich zu machen. Nach Absaugen der Lösung wurden die Zellen 2x mit DPBS gewaschen und mindestens 45 min bei RT in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss mit dem primären AK Cdh1, Vim oder Oct4 in der Konzentration 1:1000 (in DPBS gelöst) inkubiert. Daraufhin wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen wiederum 3x mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die mit Cdh1 und Vim markierten P19 EC Zellen mit dem sekundären AK AF488 (grün leuchtend, Konzentration 1:1000, in DPBS gelöst) und die mit Oct4 markierten P19 EC Zellen mit dem sekundären AK Cy5 (pink leuchtend, Konzentration 1:1000, in DPBS gelöst) für mindestens 45 min bei RT in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang mit DPBS wurden die Zellen mit DAPI (Zellkernmarkierung, blau leuchtend, Konzentration 1:1000, in DPBS gelöst) für 10 min bei RT inkubiert und nach einem letzten Waschschrift mit DPBS und nach Abnehmen des 4-Kammer-Aufsatzes mit einem Deckgläschen auf dem Objektträger mit Immumount (Thermo Electron Cooperation) fixiert. Als Negativkontrollen wurden die sekundären AK AF488 sowie Cy5 ohne primären AK auf den P19 EC Zellen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Vim auf Feederzellen inkubiert (siehe Abb.3.2.). Die angefärbten Zellen konnten nun unter dem Mikroskop betrachtet werden oder in einer trockenen Kammer unter Lichtausschluss bei RT zur späteren Untersuchung aufbewahrt werden.

Verwendete Immunreagenzien/Antikörper siehe 2.1.5.

2.4.2. Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion (sqPCR)

Die sqPCR ist eine Standard PCR, die geeignet ist, unterschiedliche mRNA-Spiegel zu verschiedenen Zyklen nachzuweisen. Hierfür wird die PCR-Reaktion nach einer festgelegten Anzahl an Zyklen gestoppt. Die in den P19 EC Zellen verwendeten Oligonukleotide waren AS140.1/141.1 (Cdh1) und AS138/139 (GAPDH) (siehe 2.1.13.). GAPDH diente als Positivkontrolle, während dH₂O statt cDNA zusammen mit den Oligonukleotiden für Cdh1 als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die Reaktionsbedingungen der sqPCR entsprechen einer Standard PCR (siehe 2.3.5.7.) und sind im Folgenden aufgelistet:

PCR-Komponenten	20 µl Ansatz
10x Taq-DNA-Polymerasepuffer	2 µl
dNTPS (10 mM)	0,4 µl
Oligonukleotid 1 (10 µM)	0,5 µl
Oligonukleotid 2 (10 µM)	0,5 µl
Taq-DNA-Polmerase (1 U/µl)	0,2 µl
cDNA (50 ng/µl)	1 µl
dH ₂ O	15,4 µl

Nach Vervielfältigung der cDNA über 25, 30, 35 und 40 Zyklen (Schritte 2-4, siehe 2.3.5.7) wurde diese in einem 1-prozentigen Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Banden analysiert und fotografiert (siehe Abb.3.4.).

2.4.3. Luziferase-Assay mit der Zugabe von Wnt3a oder SB216763 (Gsk3 β -Inhibitor)

Das Prinzip des „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ beruht auf der Verwendung von zwei biolumineszenten Substraten, der Firefly (*Photinus pyralis*) und der Renilla (*Renilla reniformis*) Luziferase. Diese Luziferasen besitzen unterschiedliche Enzymstrukturen, setzen somit verschiedene Substrate um und können getrennt voneinander in ihren biolumineszenten Aktivitäten erfasst werden. Die Transfektionseffizienz wird mittels der Renilla Luziferase, die als Standard dient, gemessen.

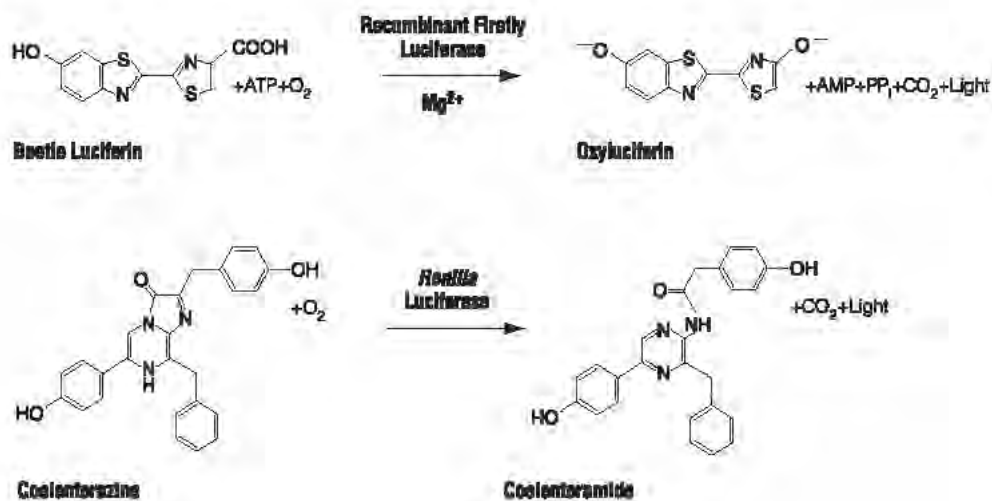


Abb. 2.1.: Lichtreaktionen von Firefly- und Renilla-Luziferase mit ihren jeweiligen Substraten Beetle Luciferin und Coelenterazine. Abbildung aus dem „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“-Handbuch von Promega entnommen.

P19 EC Zellen wurden mit dem TOP-Flash-Vektor (Positivkontrolle, Promoter mit 6 TCF-Bindestellen, nuklearer Transkriptionsfaktor interagierend mit β -Catenin, siehe 1.4., von Prof. Hans Clever, Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Niederlande) und mit dem FOP-Flash-Vektor (Negativkontrolle, Promoter mit mehreren mutierten TCF-Bindestellen, von Prof. Hans Clever, Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Niederlande) transfiziert. Der TOP-Flash Vektor aktiviert bei Wnt-Aktivität die Expression des Luziferasegens. Die Aktivität der Enzyme Luziferase und Renilla wurde jeweils in Triplikatanalysen im Vergleich zueinander gemessen. Die Luziferase zeigt die Stärke der Illumineszens des jeweiligen Plasmids an. Von den gemessenen Luziferase-Werten wurden der Durchschnitt und die Standardabweichung ermittelt und die Resultate mit Microsoft Excel in einem Balkendiagramm zusammengefasst (statistische Analyse Dr. Hannes Luz, Bioinformatiker des MPI für molekulare Genetik, Berlin). Als Referenzwert für

die Berechnungen diene der Firefly-Durchschnittswert der Nullprobe, welcher 1 gesetzt wurde. Die Werte der Nullprobe ergaben sich aus der Transfektion des Reporterplasmids mit dem pRL-CMV-pGL3-Vektor (Promega), der als interner Standard dient. Der Lef/ β -Vektor (Prof. Jörg Huelsken, Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Lausanne, Schweiz) wurde als zusätzliches Plasmid zu den P19 EC TOP/FOP-Flash Zellen transfiziert, da es ein Überexpressionskonstrukt mit einer Fusion zwischen dem c-terminalen Teil von β -Catenin und Lef darstellt, das die dominant aktive Form dieses Transkriptionsfaktors darstellt. Da es unabhängig von der Wnt-Signalkaskade den TOP-Flash Vektor im Zellkern aktiviert, dient es als Positivkontrolle des TOP-Flash Vektors. Das parakrine Signalmolekül Wnt3a, ein externer Aktivator der Wnt-Signalkaskade, sowie SB216763 als Inhibitor des Enzyms Gsk3 β , das durch den Abbau von β -Catenin den Wnt-Signalweg intrazellulär inhibiert, wurden in den Konzentrationen 10/30/90 ng für Wnt3a sowie 3,5/35/350 nM für SB216763 mit dem P19 EC TOP/FOP-Flash Zellen dem P19 Medium zugegeben.

Die transfizierten P19 EC Zellen wurden nach Angaben des Herstellers behandelt: Nach einmaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen in einer 48-Titer Zellkulturschale durch Zugabe von 65 μ l/Vertiefung 1x PLB (Passive Lysis Buffer) lysiert und durch 20 minütiges Schütteln auf einem Orbitalschüttler vereinzelt. Je 25 μ l der Zelllysate wurden in die Vertiefungen einer 96-Titer Zellkulturschale pipettiert und mit einem Luminometer nach folgendem Ablauf gemessen:

Autoinjektion von 25 μ l Luciferase Assay Reagenz II (LAR II)

Erste Messung („Firefly“ Luciferase)

Autoinjektion von 25 μ l Stop&Glo® Reagenz

Zweite Messung (Renilla Luciferase)

Berechnung des Verhältnisses aus beiden Lumineszenzmessungen

2.4.4. Differenzierung von P19 EC Zellen mit DMSO nach McBurney et al., (1982)

Die Zellen wurden gründlich vereinzelt und mit einer Dichte von mind. 1×10^6 Zellen in 10 ml P19 Medium mit 1% (v/v) DMSO in eine 100 mm-Plastikpetrischale (bacterial grade) ausplattiert. Nach 48 h wurde das Medium mit den Zellaggregaten in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt. Nach Absetzen der Aggregate konnte das überstehende Medium abgesaugt werden. Die Aggregate wurden in 10 ml frisches P19 Medium mit 1% DMSO aufgenommen und in 100 mm-Plastikpetrischalen überführt. Nach weiteren 48 h wurden die Aggregate erneut aus dem Medium genommen. 100–200 Aggregate wurden in frischem P19 Medium ohne DMSO in einer 100 mm-Zellkulturschale ausplattiert, auf deren Boden sich die

Zellaggregate anheften konnten. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach insgesamt weiteren fünf bis sechs Tagen traten vereinzelte sich rhythmisch kontrahierende Muskelzellen auf.

2.4.5. Klonierung des DNA-Konstrukts sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA

Das DNA-Konstrukt *sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA* besteht aus dem *sp70_PGK_hyg-Vektor* (Grundlage *sp70_PGK-Vektor* von Hein te Riele, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam; Hygromycin-Resistenz von Dr. Heinrich Schrewe eingefügt, MPI für molekulare Genetik (Berlin)). Ein ubiquitär vorkommender *Phosphoglyzerolkinase* (PGK)-Promoter zur Transkription einer Hygromycin-Resistenz dient der Selektion positiv transfizierter Zellen. Der ubiquitär vorkommende *Cytomegalie Virus* (CMV)-Promoter dient der Transkription des Faktors Tbx6. Die Poly-Adenylierungssignale (pA) von Hygromycin sowie von Tbx6 dienen der Stabilisierung und Optimierung der Translationseffizienz. Das DNA-Konstrukt wurde wie folgt kloniert: Der DNA-Vektor *sp70_PGK_hyg_pA* wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und PvuII verdaut; der DNA-Vektor *pcDNA3_CMV_Tbx6_pA* (Grundlage *pcDNA3_CMV-Vektor* von Invitrogen, Tbx6 eingefügt von Dr. Michael Hoffmann, MPI für Immunbiologie, Freiburg) wurde mit Sall und NaeI verdaut. Die Ligation beider Vektoren führte zum DNA-Konstrukt *sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA*. Dieses wurde vor der Transfektion in P19 EC Zellen mit den Enzymen MfeI und SapI verdaut, um eine stabile Integration des Konstruktes in das Wirtsgenom zu gewährleisten.

2.4.6. Transfektion des DNA-Konstrukts sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA mit Lipofektamin™ 2000

Das Prinzip des verwendeten Transfektionsreagens Lipofektamin™ 2000 beruht auf der Lipofektion (Felgner, P. L. et al., 1987). Aufgrund der positiven Ladung der Lipide bilden diese sehr effektiv Komplexe mit negativ geladener DNA. Diese Komplexe fusionieren mit der Zelloberfläche und schleusen somit die DNA in das Zellinnere, so dass die eingeschleusten Reporterplasmide in den Zellen exprimiert werden.

24 h vor der Transfektion wurden P19 EC Zellen in einer Zellkulturschale mit 6x 35 mm Zellkulturschalen in P19 Medium ohne Antibiotika in einer Dichte von 4×10^5 Zellen/35 mm-Zellkulturschale verteilt, die eine Konfluenz der Zellen von 60-70% am Versuchstag gewährleistete.

Am Versuchstag wurden 4 µg Plasmid-DNA der zu untersuchenden Probe (DNA-Konstrukt *sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA*) und 4 µg Kontrollplasmid-DNA *CMV_eGFP_pA* (Dr.

Lars Wittler, MPI für molekulare Genetik, Berlin) mit eGFP als Transfektionskontrolle pro 35 mm-Zellkulturschale jeweils in 250 µl Opti-MEM I-Medium mit reduziertem Serumanteil (2-4% FCS) gelöst. Parallel wurden 10 µl Lipofektamin™ 2000 pro 35 mm-Kulturschale in jeweils 250 µl Opti-MEM I-Medium mit reduziertem Serumanteil gelöst. Diese Reaktionsansätze wurden 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden Plasmid-DNA- und Lipofektaminansätze zusammenpipettiert und vorsichtig vermischt, so dass das Endvolumen 500 µl entsprach. Diese Ansätze wurden 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die P19 EC Zellen pipettiert. Durch vorsichtiges Vor- und Zurückschwenken der Zellkulturschale wurde ein gleichmäßiges Verteilen der Transfektionsproben im Zellkulturmedium gewährleistet. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 7,5% CO₂ in einem Zellkulturbrutschrank. Das Medium wurde nach 6 h gewechselt.

Nach 15 Tagen Selektion in Hygromycinhaltigem P19 EC Medium (200 µg/µl) wurden mit dem Tbx6-Konstrukt transgene Zellklone vereinzelt und expandiert. Die P19 EC Zellklone #11 und #15 wurden im Vergleich zu Wildtyp P19 EC Zellen durch einen qRT-PCR (siehe 2.4.8.4.) mit Oligonukleotiden für transgenes sowie endogenes Tbx6 (siehe 2.1.13.) als transgen bestätigt (siehe Abb. 3.7.).

2.4.7. Microarray-Chip Analyse, „Illumina® TotalPrep™ Amplifikation Kit“

Alle Teilschritte der Microarray-Chip Analyse wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und können unter „Illumina® TotalPrep™ Amplifikation Kit“ von Ambion (Applied Biosystems) nachgelesen werden.

Die bioinformatische Analyse sowie Normalisierung der Hybridisierungsdaten wurde durchgeführt mit Unterstützung von Dr. Martin Werber, Bioinformatiker des MPI für molekulare Genetik, Berlin. Der dargestellte „fold change“ errechnet sich aus der Änderung des Expressionsniveaus des Transkripts einer experimentell veränderten Zellprobe im Vergleich zu Kontrollzellen. Diese Veränderung wird als log₂ Quotient dargestellt. Eine log₂ Quotient von 1 entspricht einem „fold change“ von 2.

Zur Charakterisierung einzelner Gene der Microarray-Chip Analyse wurden die Internetseiten www.informatics.jax.org, www.ncbi.nlm.nih.gov und <http://mamep.molgen.mpg.de> herangezogen.

2.4.7.1. cDNA Erststrang-Synthese

50-500 ng Gesamt-RNA (siehe 2.3.6.) wurden auf ein Maximalvolumen von 11 µl DEPC-H₂O eingestellt. Zu dem Reaktionsansatz wurden 9 µl der Reversen-Transkriptions-Master-Mischung bei RT hinzupipettiert und anschließend bei 42°C 2 h inkubiert.

2.4.7.2. cDNA Zweitstrang-Synthese

Dem 20 µl Reaktionsansatz der cDNA Erststrang-Synthese wurden nach 2 h Inkubation bei 42°C 80 µl der Zweitstrang-Master-Mischung auf Eis hinzugefügt und anschließend bei 16°C 2 h inkubiert.

2.4.7.3. Aufreinigung von cDNA

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA im 100 µl Reaktionsansatz erfolgte über cDNA-Säulen des „Illumina® TotalPrep™ Amplifikation Kits“. Mit Hilfe eines Bindepuffers wurde die cDNA in der Membran des Filtereinsatzes gebunden, gewaschen und mit 19 µl auf 50-55°C erwärmten Nuklease-freiem H₂O eluiert.

2.4.7.4. cRNA-Synthese

19 µl Reaktionsansatz (siehe 2.4.7.3.) der aufgereinigten dsDNA wurden bei RT die IVT-Mastermischung hinzugefügt und bei 37°C 4-14 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Nuklease-freiem H₂O auf 100 µl Endvolumen gestoppt.

2.4.7.5. cRNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der cRNA im 100 µl Reaktionsansatz erfolgte über cRNA-Säulen. Mit Hilfe eines Bindepuffers und hinzugefügtem EtOH (100%) wurde die cRNA in der Membran des Filtereinsatzes gebunden, danach gewaschen und mit 100 µl auf 50-55°C erwärmten Nuklease-freiem H₂O eluiert. Die cRNA-Proben wurden bei –20°C für weitere Versuche bereitgehalten oder bei –80°C zur längerfristigen Aufbewahrung eingefroren.

2.4.7.6. cRNA-Chip-Hybridisierung

Im Rahmen einer „Illumina 8-Sample Bead Chip Hybridisierung“ wurden 850 ng cRNA ün mittels Formamid auf einem Chip hybridisiert und danach mehrmals gewaschen. Die zuvor mit Biotin-16-UTP markierte cRNA wurde vor dem letzten Waschschrift nochmals mittels Streptavidin-Cy3 sichtbar gemacht, bevor der Chip eingescannt wurde.

2.4.8. Mixl1,- Nrarp- und Tnfrsf19- shRNA-mir-knockdown-Konstrukte

2.4.8.1. Erhalt der Mixl1,- Nrarp- und Tnfrsf19- shRNA-mir-knockdown-Konstrukte

Für die Herunterregulierung der Zielgene Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19 wurden kommerziell erhältliche *Maus-retrovirale-shRNA-mir-knockdown-Konstrukte* von der Firma Open

Biosystems, #RMM1766 verwendet. Folgende Codes sind den individuellen shRNA-mir-Klonen zugeordnet.

Mixl1	RMM1766-97043766/ 96746049/ 9106110 V2MM_68498/ 68932/ 74274
Nrarp	RMM1766-97044897/ 98467243 V2MM_10700/ 7277
Tnfrsf19	RMM1766-9335856/ 96743757/ 9336010 V2MM_66699/ 75097/ 66143

2.4.8.2. Restriktionsverdau der einzelnen shRNA-mir-knockdown-Konstrukte vor der Transfektion

Diese Konstrukte wurden entweder linearisiert mit BamHI (Nrarp, Tnfrsf19) oder verdaut mit BamHI und ClaI (Mixl1). Die resultierenden 3,5kb-Fragmente wurden vor der Transfektion geextrahiert und aufgereinigt (siehe 2.3.2.3. und 2.3.2.4.).

Als Negativkontrolle („mock“) in F1G4 ES Zellen wurde das Konstrukt *TRE2_CMVfl_mir30/lacZ-puro* (von Dr. Markus Morkel, MPI für molekulare Genetik, Berlin) nach Linearisierung mit dem Enzym XhoI verwendet.

2.4.8.3. Transfektion der Mixl1,- Nrarp- und Tnfrsf19-shRNA-mir-knockdown-Konstrukte mit Lipofektamin™ 2000

Die einzelnen shRNA-mir-knockdown-Konstrukte wurden mittels der Lipofektamin-Methode (siehe 2.4.6.) in P19 EC- und F1G4 ES Zellen transfiziert.

4µg Plasmid-DNA der zu untersuchenden Probe (Maus-retrovirale-shRNA-mir-knockdown-Konstrukte für die Zielgene Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19, siehe 2.4.8.1.) sowie als Negativkontrollplasmid in den F1G4 ES Zellen wurde das DNA-Konstrukt *TRE2_CMVfl_mir30/lacZ-puro* (von Dr. Markus Morkel, MPI für molekulare Genetik, Berlin) transfiziert. Nach 15 Tagen Selektion in Puromycinhaltigem (1 µg/ml) P19- bzw. ES-Medium wurden mit dem knockdown-Konstrukt (für Mixl1, Nrarp, Tnfrsf19) sowie dem Negativkontrollplasmid transgene P19 EC/F1G4 ES Zellen vereinzelt und expandiert. Nach Expansion einzelner Zellklone wurde aus diesen Gesamt-RNA extrahiert (siehe 2.3.6.). Die Effektivität der knockdown-Konstrukte in den P19 EC/F1G4 ES Zellklonen für Mixl1 (Mixl III #1- #3), Nrarp (Nrarp II #1- #5, sowie #2- #4) und Tnfrsf19 (Tnfrsf I #1, #2, #4, #6, #7, sowie #1- #6) wurden per qRT-PCR analysiert (siehe 2.4.8.4. und Abb. 3.11.-3.15.).

2.4.8.4. Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von mRNA-Mengen im Ausgangsmaterial, also eine quantitative Genexpressionsanalyse. Dazu wird mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend bezüglich der ermittelten DNA-Menge die ursprüngliche mRNA-Menge bestimmt. Diese Messung basiert auf der Erkennung fluoreszierender Reporteroleküle (Power Sybr®Green Mix, siehe 2.1.5.), welche sich mit der neu gebildeten DNA verbinden. Die beobachtete Fluoreszenz zeigt die Menge gebildeter cDNA zu jedem Zeitpunkt der PCR an (Echtzeit-PCR). Als internen Standard zur Normalisierung der Werte wird ein Referenzgen (z.B. GAPDH, HRPT, siehe 2.1.13.) gewählt, von dem man annimmt, dass es in allen zu untersuchenden Ansätzen in einer konstanten Menge exprimiert wird. Relativ dazu kann die Menge an spezifischem Produkt errechnet werden. Vor der qRT-PCR-Reaktion ist es notwendig, eine Verdünnungsreihe vom DNA-Template herzustellen, um später eine Standardkurve zu ermitteln. Die qRT-PCR-Reaktion wird also parallel mit unterschiedlichen Mengen desselben DNA-Templates durchgeführt. Es wurden qRT-PCRs aus cDNA mit dem Tbx6-DNA-Konstrukt (siehe 2.4.5.) transfizierter P19 EC Zellen sowie Mixl1,- Nrarp- und Tnfrsf19-shRNA-mir-knockdown-Konstrukten transfizierter P19 EC Zellen sowie F1G4 ES Zellen (siehe 2.4.8.3.) mit den entsprechenden Oligonukleotiden (siehe 2.1.13.) nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

PCR-Komponenten	20 µl-Ansatz
2x Power Sybr®Green Mix	10 µl
Oligonukleotid 1 (10 µM)	0,25 µl
Oligonukleotid 2 (10 µM)	0,25 µl
cDNA (50 ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	7,5 µl

Diese qRT-PCRs wurden auf einer 96-Titer-Zellkulturschale in einer Abi7900HT Fast Real Time PCR Maschine durchgeführt. Für die Amplifikation (Schritte 2 und 3) wurden 40 Zyklen gefahren. Folgende Reaktionsbedingungen wurden eingehalten:

	Schritt	Temperatur	Dauer
Power Sybr®GreenMix	1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
	2. Denaturierung	95°C	15 sek
	3. Annealing	60°C	30 sek
	4. Elongation	95°C	15 sek

		60°C	15 sek
		95°C	15 sek

2.4.8.5. cDNA Erststrang-Synthese für die qRT-PCR (2.4.8.4.)

Die reverse Transkription, das Umschreiben von RNA in DNA, wurde mit dem “Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (siehe 2.1.4.) durchgeführt. Dazu wurden miteinander vermischt:

- 1 µg Gesamt-RNA
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl)/

oder 1 µl Random-Hexamer Primer (50 ng/µl)

mit DEPC- H₂O auf 10 µl aufgefüllt

Inkubation 5 min, 65°C

Abkühlen auf Eis mind. 1 min

Je nach Verwendung von Oligo(dT)- oder Random-Hexamer-Primern wurde Folgendes hinzupipettiert:

	Oligo(dT)- Primer- Reaktion	Temperatur	Dauer	Random- Hexamer- Primer- Reaktion	Temperatur	Dauer
Reaktions-Mix	9 µl	42°C	2 min	9 µl	25°C	2 min
SuperScript™ II-RT	1 µl	1. 42°C 2. 70°C	50 min 15 min	1 µl	1. 25°C 2. 42°C 3. 70°C	10 min 50 min 15 min
auf Eis kühlen	unbestimmte Dauer					
Rnase H	1 µl	37°C	20 min	1 µl	37°C	20 min

Teile des Reaktionsansatzes wurden direkt in der qRT-PCR eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

2.4.8.6. Statistische Analyse der qRT-PCR (2.4.8.4.)

Durch einen direkten linearen Zusammenhang zwischen Produktmenge und der gemessenen Fluoreszenz nach jedem Zyklus, ist es möglich aus der Fluoreszenz nach einer Zyklenzahl C auf die Ausgangsmenge zu schließen. Bei Vergleich mehrerer Proben wird ein für das Fluoreszenzniveau konstanter Schwellenwert T definiert. Die Zyklenzahl, die diesen Schwellenwert erreicht, bezeichnet man als CT-Wert (threshold cycle). Trägt man die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl auf, erhält man eine Amplifikationskurve im

logarithmischen Maßstab. Durch parallele Amplifikation bekannter Mengen eines Referenzgens (GAPDH, HPRT) erhält man eine Referenzkurve. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes kann über die sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode erfolgen. Dabei wird für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des Zielgens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT-Zielgen} - \text{CT-Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCT -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT -Wert der Kontrolle abgezogen. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen, ergibt sich dann aus der arithmetischen Formel $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ und stellt den fold change (fc) dar.

2.4.8.7. Kontrolle statistischer Angaben

Statistische Angaben wurden kontrolliert durch die Bioinformatiker Dr. Martin Werber (Microarray-Daten) und Dr. Hannes Luz (Luziferase-Assay, qRT-PCR) des MPI für molekulare Genetik, Berlin.

2.4.8.8. Genotypisierungs-PCR mit den Oligonukleotiden SM 30/31 sowie YC 43/44

Zur Genotypisierung von Embryonen des *Tnfrsf19*-knockdown-Versuchs (siehe 3.6.) wurde eine Standard PCR (siehe 2.3.5.7.) mit den Oligonukleotiden SM 30/31 und 1 μl der lysierten genomischen DNA (verdünnt 1:1000), gewonnen aus dem Kopf des Embryos (siehe 2.2.6.), durchgeführt. Zur Genotypisierung von Embryonen mit dem DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 „G1“ oder „H3“ (siehe 3.7.) wurde eine Standard PCR (siehe 2.3.5.7.) mit den Oligonukleotiden YC 43/44 und der lysierten genomischen DNA (verdünnt 1:500), gewonnen aus den extraembryonalen Hüllmembranen des Embryos (siehe 2.2.6.), durchgeführt.

2.4.9. Klonierung und pronukleare Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 mit *Tnfrsf19* in voller Länge sowie als dominant negativer Rezeptor

2.4.9.1. Das DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350

Das DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 *pDonor_loxP_TRE_T/attR_attR/HA-tag_IRES_eGFP_pA-PGK-pro-loxP** basiert auf dem *pDonor-loxP*-Vektor von Dr. Markus Morkel (MPI für molekulare Genetik, Berlin). Im Falle einer Transfektion in transgene ES Zellen (verändert durch einen im Genom integrierten ROSA26-Vektors mit Puromycinresistenz) dient der PGK-Promoter der Transkription der Puromycin-Resistenz und demnach einer Selektion positiv transfizierter Zellen. Die loxP-Erkennungssequenzen dienen der Rekombination in den transgenen ES-Zellen, d.h. ohne diese

Erkennungssequenzen wäre eine Rekombination des DNA-Konstruktes in den im Genom der ES Zellen integrierten ROSA26-Vektor nicht möglich. Der Hämagglutinin-Anhang (HA-tag) ermöglicht durch seine Aminosäuresequenz die Detektion durch spezifische Antikörper, das Tet-Responsive Element (TRE) ist im Falle einer Transfektion in ES-Zellen induzierbar mit Doxycyclin. Das Poly-Adenylierungssignal (pA) dient der Stabilisierung und Regulation der Translation.

Im Zuge der pronuklearen Injektion sind folgende Bestandteile des DNA-Konstruktes LW #350 ausschließlich von Bedeutung: Die attR-Sequenzen dienen der Klonierung mittels des LR Clonase-Enzyms. Der T-Promoter ist ein gewebsspezifischer Promoter (Schwanzknospe/Präsomitisches Mesoderm), während IRES (Internal Ribosomal Entry Site) als eine interne ribosomale Eingangserkennungssequenz die zusätzliche interne Translation des vorgeschalteten Markers eGFP ermöglicht.

2.4.9.2. Gateway Klonierung der DNA-Überexpressionskonstrukte LW #350 mit Tnfrsf19 in voller Länge sowie als dominant negativer Rezeptor

DNA-Konstrukte mit Tnfrsf19 als dominant negativer Rezeptor (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) und Tnfrsf19 in voller Länge (DNA-Buch, Riken Genomic Sciences Center (GSC), Japan) dienten als Grundlage. Nach dem Protokoll der PrimeSTAR® HS DNA-Polymerase (siehe 2.1.6.) wurden die jeweiligen ORFs von Tnfrsf19 mit den Primern LW299/301 (dom.neg.Rez.) und LW299/303 (volle Länge) vervielfältigt.

Für den 1. Klonierungsschritt wurden folgende Bestandteile miteinander vermischt:

2 µl PCR-Produkt- aufgereinigt nach Angaben des Herstellers (MinElute-Säulen, siehe 2.1.4.)

1 µl pDonor221 (150 ng/µl, Invitrogen)

5 µl TE (1x)

2 µl BP-Clonase

Inkubation (1 h, RT)

1 µl ProteinaseK (10 µg/µl)

Inkubation (10 min, 37°C)

Elektroporation in DH5α-Zellen (siehe 2.3.5.5.). Die DNA-Isolation erfolgte nach einer Vermehrung der Zellen (üN, 37°C) auf Kanamycin-Agarplatten. Nach positivem Test-RD mit den Enzymen PvuII (PCR LW299/301) oder NheI (PCR LW299/303) und bestätigter Sequenz nach der Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13 for/rev (siehe 2.1.13.)

erfolgte die Klonierung in den von Dr.Lars Wittler (MPI für molekulare Genetik, Berlin) zur Verfügung gestellten Vektor LW #350.

Für den 2. Klonierungsschritt wurden folgende Bestandteile miteinander vermischt:

2 µl PCR-Produkt im pDonor221

1 µl LW #350 (150 ng/µl)

5 µl TE (1x)

2 µl LR-Clonase

Inkubation (1h, RT)

1 µl ProteinaseK (10 µg/µl)

Inkubation (10 min, 37°C)

Elektroporation in Dh5α-Zellen (siehe 2.3.5.5.). Die DNA-Isolation erfolgte nach einer Vermehrung der Zellen (üN, 37°C) auf Ampicillin-Agarplatten. Nach positivem Test-RD mit BglII (Tnfrsf19 als dom.neg.Rez.) und XbaI (Tnfrsf19 in voller Länge) und bestätigter Sequenz nach der Sequenzierung mit den Oligonukleotiden LW281/298 (siehe 2.1.14.) erfolgte die pronukleare Injektion.

2.4.9.3. Präparation von DNA vor einer pronuklearen Mikroinjektion

5 µg des DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 „H3“ sowie LW #350 „G1“ (siehe 2.4.9.) wurden mit dem Enzymen SacII und SpeI bei 37°C verdaut und das 5 kb-Fragment geextrahiert (siehe 2.3.2.3.) und über Qiaquick-Säulen nach Angaben des Herstellers (siehe 2.1.4.) aufgereinigt. Die DNA wurde mit 50 µl Injektionspuffer je Säule eluiert und mit 1/10 Vol. 3 M NaAc und 2,5x Vol. eiskaltem EtOH bei -20°C für 2-3 h (16100 rcf) gefällt, danach mit 70-prozentigem EtOH gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in Injektionspuffer resuspendiert, die Konzentration photometrisch bestimmt und auf 50-100 ng/µl eingestellt.

2.4.10. Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit Uncx4.1 und eGFP

Das Prinzip der in situ-Hybridisierungstechnik nach Wilkinson (1992) besteht aus der spezifischen Bildung von Doppelsträngen zwischen einer markierten Nukleinsäuresonde und der komplementären Nukleinsäure im fixierten Gewebe, gefolgt von der Visualisierung der markierten Nukleinsäure im Gewebe. Mit Hilfe dieser Technik wird die Lokalisation von RNA-Molekülen einer bestimmten Sequenz im präparierten Gewebe bzw. im gesamten Embryo untersucht.

2.4.10.1. Bearbeitung von Embryonen vor einer Ganzpräparat in situ-Hybridisierung

Die Rehydratisierungs- und Fixierungsschritte wurden im 4°C Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen (siehe 2.1.12.) auf dem Roller Mixer durchgeführt. Die verschiedenen Teilschritte werden im Folgenden aufgeführt:

Lösungen	Inkubationszeiten
75% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
50% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
25% MetOH-DEPC-H ₂ O-PBST	10 min
DEPC-H ₂ O-PBST	2x 10 min
6% H ₂ O ₂ / DEPC-H ₂ O-PBST	20 min (E9,5)/30 min (E10,5)
DEPC-H ₂ O-PBST	3x 10 min
ProteinK/ DEPC-H ₂ O-PBST (10 µg/ml)	10 min (E9,5)/13 min (E10,5)
Glycin/ DEPC-H ₂ O-PBST (2 mg/ml)	10 min
DEPC-H ₂ O-PBST	2x 10 min

Weitere Fixierungsschritte wurden bei RT auf einem Roller Mixer durchgeführt.

0,2% Glut./4% PFA/DEPC-H ₂ O-PBST-Lösung	30 min
DEPC-H ₂ O-PBST	2x 10 min
DEPC-H ₂ O-Hyb	15 min

Eine Prähybridisierung wurde durchgeführt, um unspezifische Hintergrundfärbung im Embryo zu minimieren. Diese erfolgte bei 68°C für 2 h. Die prähybridisierten Embryonen konnten nun entsprechend der WISH weiterbearbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

2.4.10.2. Präparation von Proben für die Ganzpräparat in situ-Hybridisierung

Die in situ Probe für den verwendeten Marker (Uncx.4.1, eGFP) wurden in einer PCR mit den Oligonukleotiden U5/L2 für Uncx4.1 (von pSV-Sport1-Vektor, Invitrogen, Karlsruhe) sowie YC43/44 (von pcDNA3-eGFP-Vektor, Dr.Heinrich Schrewe, MPI für molekulare Genetik, Berlin) mit folgendem Programm vervielfältigt, wobei Schritt 2-4 30x wiederholt wurden:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min 15 sek
2. Denaturierung	95°C	45 sek
3. Annealing	65°C	45 sek
4. Elongation	72°C	4 min
5. abschl. Elongation	72°C	4 min

Folgender Ansatz wurde bei RT in der angegebenen Reihenfolge miteinander vermischt und anschließend für 2,5 h bei 37°C inkubiert.

In vitro-Transkriptionsansatz:

3 µl Transkriptionspuffer	(10x TRB)
3 µl ACG Nukleotide	(4 mM),
0,75 µl dig UTP-Mix	(4 mM),
1,5 µl DTT	(200 mM),
0,6 µl T7-RNA-Polymerase	(50 U/µl)
12,15 µl DEPC-H ₂ O	
9 µl PCR-Produkt	

Weitere Zugabe von: 3 µl Rnase-freie DnaseI (10 U/µl)

Inkubation weitere 15 min bei 37°C

Zugabe von:

1,2 µl Glycogen und	
12 µl Ammonium Acetat	(10 M)
150 µl eiskaltem 100%EtOH	

Zentrifugation 30 min (16100 rcf, 4°C)

nach Verwerfen des Überstandes

Zugabe zu Pellet von: 150 µl eiskaltem 70-prozentigem EtOH

Zentrifugation 10 min (16100 rcf, 4°C)

Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet unter dem Abzug luftgetrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.10.3. Ganzpräparat in situ-Hybridisierung von Zeitreihen mit Mausembryonen (E8,5 - E11,5)

Prähybridisierte Embryonen wurden in mit 2 ml DEPC-H₂O-Hyb gefüllte Vertiefungen einer 12-Titer-Zellkulturschale auf zuvor eingelegte Netzeinsätze („Netwells“) gegeben und 30 min auf 68°C vorgewärmt. Als Hybridisierungslösung wurden 2 ml DEPC-H₂O-Hyb mit 200-300 ng/ml hydrolysiertes Probe vermischt, diese Lösung 10 min bei 80°C denaturiert, die vorgewärmten Embryonen in diese überführt und wippend üN (mind. 16 h) bei 68°C in Plastikboxen mit feuchten Papiertüchern in 12-Titer-Zellkulturschalen hybridisiert. Folgende Waschschrte wurden am nächsten Tag durchgeführt:

2. Material, Tiere und Methoden

Lösung	Dauer	Temperatur
DEPC-H ₂ O-Hyb	30 min	68°C
Sol1-Lösung	2x 30 min	68°C
Sol3T-Lösung	2x 30min/2x 60 min	68°C
TBST	3x 15 min	RT
10% Lammserum/TBST	2-3 h	RT

6 ml TBST und eine kleine Löffelspitze Embryopulver (siehe 2.2.4.) wurden vermischt und bei 70°C 30 min inaktiviert. Nach Inaktivierung wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und 60 µl Lammserum sowie 12,5 µl α-Dig-AP hinzugegeben und diese 1 h im Dunkeln bei 4°C rollend inkubiert. Das Embryopulver wurde daraufhin abzentrifugiert (4°C, 894 rcf) und die Antikörperlösung (mit Uncx4.1 oder eGFP, Verdünnung je 1:2000) in 19 ml 1% Lammserum/TBST gegeben und gut gemischt.

Die Embryonen wurden in die Antikörperlösung überführt und üN (mind.10 h) wippend bei 4°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurden wie folgt gewaschen:

Lösung	Dauer	Temperatur
TBST	2x 15 min	RT
TBST	2x 30 min	RT
TBST	6x 1 h	RT
TBST	üN	4°C

Zur Färbung wurden die Embryonen 4x 15 min mit NTMT bei RT gewaschen, dazu wurde 25 ml auf Eis gekühltes NTMT mit 112,5 µl NBT und 87,5 µl BCIP gemischt und durch einen 0,45 µm Spritzenfilter sterilfiltriert. Die Embryonen wurden in je 2 ml dieser Färbelösung überführt und 15 min bei RT im Dunkeln wippend inkubiert, danach regelmäßig unter einem Stereomikroskop auf die Färbestärke hin kontrolliert und letztendlich die Färbung durch einmaliges Waschen mit NTT (NTMT-MgCl₂) und mehrfaches Waschen mit PBST abgebrochen; zum Verhindern einer Nachfärbung wurden die Embryonen üN in 4% PFA/PBS fixiert und konnten dann in dieser Lösung (4°C, dunkel) aufbewahrt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von P19 EC Zellen

P19 Embryonic Carcinoma Zellen (P19 EC Zellen) sind pluripotente Stammzellen, die aus murinen Teratokarzinomen gewonnen wurden (McBurney, M. W., 1976, McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E.M.V., Edwards, M. and Anderson, P., 1982, Rossant, J. et al., 1982, Stevens, L. C., 1970) (siehe Abschnitt 1.8.). Sie werden auf ungelatinierten Zellkulturschalen ohne Feederzellen in serumhaltigem P19 Medium (+10% FCS) passagiert. Sie heften sich schnell als flache einzellige Schicht am Schalenboden an. Diese von Martin sowie Rudnicki und McBurney etablierten Haltungsbedingungen (Martin, G. R. et al., 1975, Rudnicki, M. A., McBurney, M.W., 1987) erlauben eine optimale Kultivierbarkeit der P19 EC Zellen. Eine immunzytologische Analyse des im Zellkern lokalisierten Markers *POU domain, class 5, transcription factor 1* (Pou5f1, Syn. Oct4) und Markern des Zytoskeletts wie *Cadherin1* (Cdh1) und *Vimentin* (Vim) (siehe 2.1.5.) sollten der Charakterisierung dieser Zellen dienen und wurde unter den erwähnten Bedingungen durchgeführt.

Cdh1 ist ein Marker der Zelladhäsionsmoleküle in den Zellmembranen epithelialer Zellen. Eine immunzytologische Analyse für Cdh1 wies das Vorhandensein von Cdh1 in P19 EC Zellen nach (siehe Abb. 3.1.). Zudem wurde Cdh1 in einer semiquantitativen PCR (sq PCR, siehe 2.4.2.) in den P19 EC Zellen im Zyklus 40 detektiert (siehe Abb. 3.4.).

Vim ist ein Marker von Intermediärfilamenten mesenchymaler Zellen. In einer weiteren immunzytologischen Analyse mit Vim wurden die P19 EC Zellen negativ für eine Vim-Expression charakterisiert (siehe Abb. 3.2.).

Oct4 ist ein Marker für Stammzellen. Die Expression von Oct4 in den P19 EC Zellen wurde in einer weiteren immunzytologischen Analyse detektiert (siehe Abb. 3.3.).

In der folgenden Tabelle 3.1. sind die Ergebnisse der immunzytologischen Analysen und der semiquantitativen PCR (sqPCR) zusammengefasst:

P19 EC Zellen in	immunzytologische Analyse von Cdh1	immunzytologische Analyse von Vim	immunzytologische Analyse von Oct4	sqPCR mit Cdh1
P19 Medium	+	-	+	+

Tab. 3.1.: P19 EC Zellen wurden nach 7 Tagen Wachstum in serumhaltigem P19 Medium (+10% FCS) mittels einer immunzytologischen Analyse auf die Expression der Marker Cdh1, Vim und Oct4 getestet. Sie reagierten positiv auf Cdh1 und Oct4 und negativ auf Vim. In einer semiquantitativen PCR (sqPCR) wurde Cdh1 in den P19 EC Zellen detektiert.

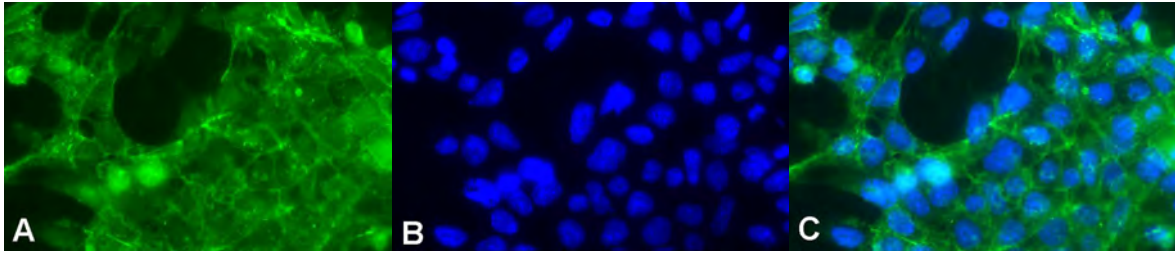


Abb. 3.1.: Doppelfärbung von Cdh1 (grün) und DAPI (blau) von P19 EC Zellen in P19 Medium; 40-fache Vergrößerung **A:** Alleinige Darstellung der Cdh1-Detektion; eine Cdh1-Expression in P19 EC Zellen konnte mittels einer immunzytologischen Analyse mit einem anti-Cdh1-Antikörper detektiert werden **B:** Alleinige Darstellung der DAPI-Detektion in den Zellkernen **C:** Gemeinsame Darstellung der Cdh1- und DAPI-Detektion aus A und B

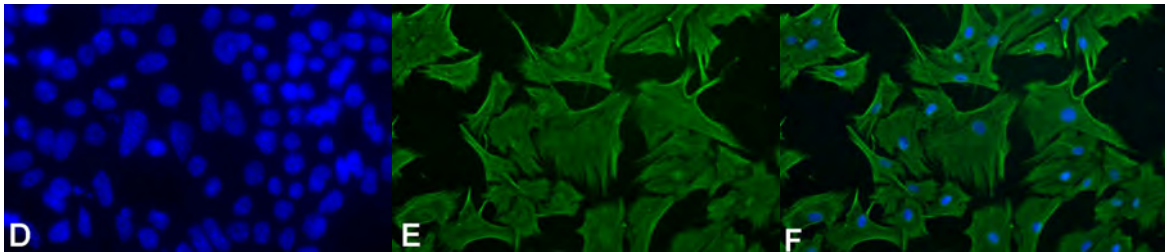


Abb. 3.2.: Doppelfärbung mit Vim (grün) und DAPI (blau) in P19 EC Zellen in P19 Medium, (**D**) sowie von murinen Fibroblastenzellen in P19 Medium (**E,F**); 40-fache Vergrößerung **D:** Gemeinsame Darstellung der Vim- und DAPI-Detektion; eine Vim-Expression in P19 EC Zellen konnte mittels einer immunzytologischen Analyse mit einem anti-Vim-Antikörper nicht detektiert werden, es sind nur die mit DAPI angefärbten Zellkerne darstellbar **E:** Alleinige Darstellung der Vim-Detektion in murinen Fibroblastenzellen; Positivkontrolle des anti-Vim-Antikörpers auf murinen Fibroblastenzellen **F:** Gemeinsame Darstellung der Vim- und DAPI-Detektion auf murinen Fibroblastenzellen

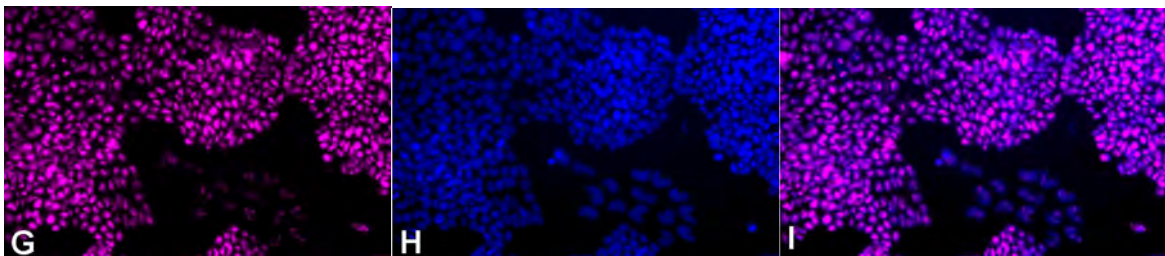


Abb. 3.3.: Doppelfärbung mit Oct4 (pink) und DAPI (blau) in P19 EC Zellen in P19 Medium, 20-fache Vergrößerung **G:** Alleinige Darstellung der Oct4-Detektion; eine Oct4-Expression konnte in P19 EC Zellen mittels einer immunzytologischen Analyse mit einem anti-Oct4-Antikörper detektiert werden **H:** Alleinige Darstellung der DAPI-Detektion in den Zellkernen **I:** Gemeinsame Darstellung der Oct4- und DAPI-Detektion aus G und H

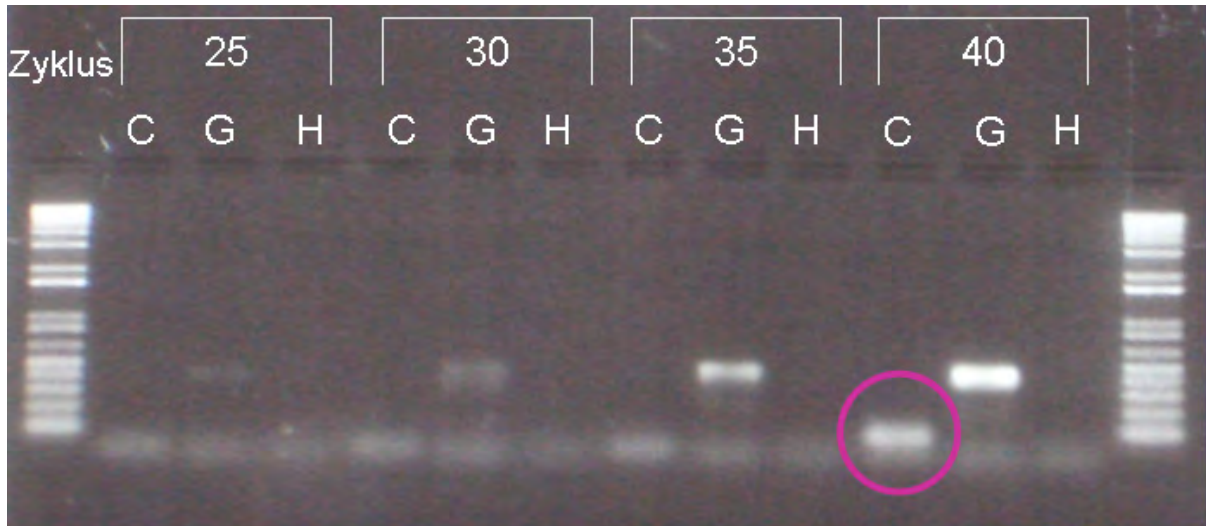


Abb. 3.4.: Semiquantitative PCR über 25/30/35/40 Zyklen (siehe 2.4.2.); Darstellung auf einem 1-prozentigen Agarosegel

Cdh1 (133bp groß) wird in den P19 EC Zellen in Zyklus 40 detektiert (violetter Kreis); GAPDH wird in den P19 EC Zellen in allen Zyklen detektiert; nicht in das PCR-Produkt inkorporierte Primer-Dimere sind am unteren Bildrand zu erkennen (C=Cdh1; G=GAPDH; H=H₂O) (GAPDH= Positivkontrolle H₂O= Negativkontrolle)

3.2. Analyse der Aktivierbarkeit der Wnt-Signalkaskade in P19 EC Zellen

Die kanonische Wnt-Signalkaskade induziert die epitheliale mesenchymale Transition (EMT). Über die Zugabe von Wnt3a oder SB216763 in das P19 Medium sollte eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in adhärenenten, nicht aggregierten P19 EC Zellen untersucht werden. Das parakrine Signalmolekül Wnt3a dient dabei als externer Aktivator der Wnt-Signalkaskade. SB216763 (abgekürzt SB) als Inhibitor des Enzyms Gsk3 β , das durch den Abbau von β -Cat den Wnt-Signalweg inhibiert (siehe Abschnitt 1.4.), greift dagegen intrazellulär in die Signalkaskade ein.

Als Positivkontrolle diente ein TOP-Flash-Vektor, als Negativkontrolle wurde ein FOP-Flash-Vektor benutzt. Lef/ β aktiviert unabhängig von der Wnt-Signalkaskade den TOP-Flash-Vektor im Zellkern und dient somit als Positivkontrolle des TOP-Flash-Vektors (siehe 2.4.3.). Lef/ β alleine ruft eine Aktivierung einer 4,1-fachen Expression des TOP-Flash-Vektors hervor, während der FOP-Flash-Vektor nicht aktivierbar ist. Die Zugabe von Wnt3a führt zu einer maximal 1,9-fachen Expression des TOP-Flash-Vektors, während SB zu einer maximalen Expression des TOP-Flash-Vektors von 3,3 führt, wobei der FOP-Flash-Vektor parallel eine Aktivierung von maximaler 2,2-fachen Expression zeigt. Die einzelnen Resultate sind in einem Balkendiagramm in Abb. 3.5. zusammengefasst dargestellt.

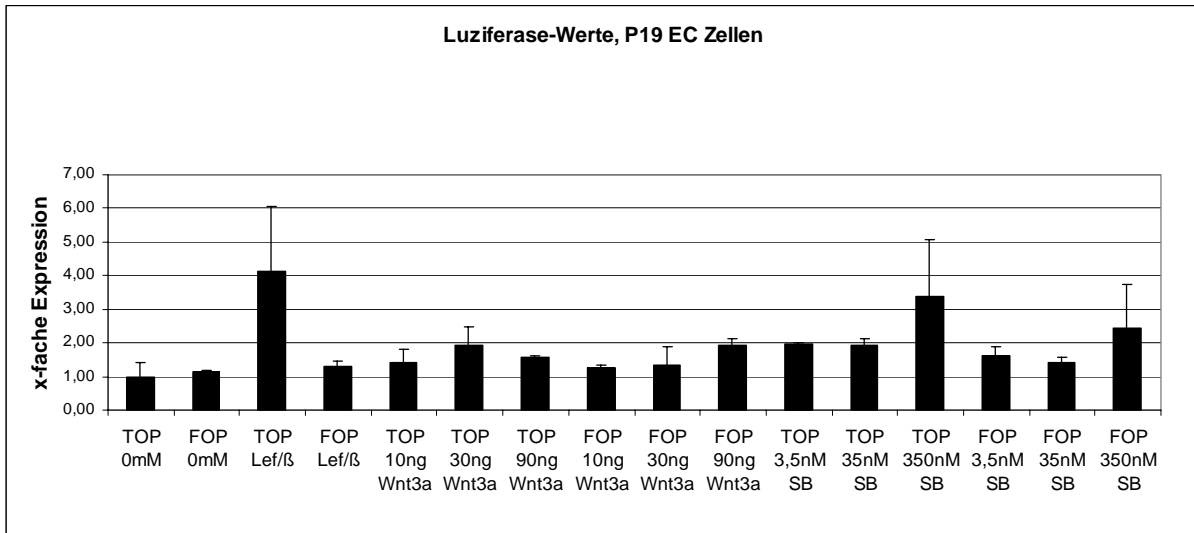


Abb. 3.5.: Die Vektoren TOP-Flash (Positivkontrolle) und FOP-Flash (Negativkontrolle) zeigen in den P19 EC Zellen den erwarteten Standardwert von 1. Bei Zugabe von Lef/β wird bei dem TOP-Flash-Vektor im Gegensatz zum FOP-Flash Vektor eine erwartete Aktivierung einer 4,1-fachen Expression gemessen. Die untersuchten Konzentrationen an Wnt3a (10/30/90 ng) zeigen eine Aktivierung von maximal 1,9-facher Expression bei den mit dem TOP- oder FOP-Flash-Vektor transfizierten P19 EC Zellen. Die untersuchten Konzentrationen (3,5/35/350 nM) des Gsk3β-Inhibitors (=SB für SB216763) zeigen eine Aktivierung bis maximal 3,4-fachen Expression in den TOP-Flash transfizierten P19 EC Zellen, jedoch auch eine Aktivierung einer 2,4-fachen Expression des FOP-Flash-Vektors.

3.3. Induktion der Differenzierung von P19 EC Zellen mithilfe von DMSO

Eine gezielte Induktion der Wnt-Signalkaskade in den verwendeten Konzentrationen war in den adhären wachsenden P19 EC Zellen nicht erkennbar (siehe 3.2.). Um dennoch ein mesodermales Entwicklungsprogramm in den P19 EC Zellen zu aktivieren, wurde nach McBurney et al. (1982) mithilfe von DMSO eine Differenzierung zu Kardiomyozyten ähnlichen Zellen induziert (siehe 2.4.4., Tab. 3.2. Versuch #1). In eigenen Untersuchungen wurden die P19 EC Zellen 4 Tage als schwimmende Zellaggregate in DMSO-haltigem (1%) P19 Medium gehalten. Eine in P19 Medium folgende 5-tägige Haltung der Zellen, die adhärirt am Zellkulturschalenboden wuchsen, ermöglichte die spontane Differenzierung zu Kardiomyozyten ähnlichen Zellen. Nach diesem 5-tägigen Wachstum zeigten die P19 EC Zellen makroskopisch sichtbare regelmäßige Kontraktionen. Diese mesodermal induzierten P19 EC Zellen wurden für die folgenden Expressionsanalysen verwendet.

In weiteren eigenen Untersuchungen wurde versucht, durch abgeänderte Kultivierungsbedingungen (siehe Tab. 3.2., Versuche #2- #6) eine Differenzierung zu erreichen. Jegliche Abweichungen der beschriebenen Kultivierungsmethode unterbanden die Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (siehe Tab. 3.2., Versuche #2- #6).

Versuch #	P19 Medium	Zellen, als Zellaggregate schwimmend	Zellen, adhärirt am Zellkulturschalenboden	Wachstum 4 Tage	Wachstum 5 Tage	sichtbare Kontraktionen
1	+DMSO	+		+		ja
	-DMSO		+		+	
2	-DMSO	+		+		nein
	-DMSO		+		+	
3	+DMSO		+	+		nein
	-DMSO	+			+	
4	+DMSO		+	+		nein
	-DMSO		+		+	
5	+DMSO	+		+		nein
	-DMSO	+			+	
6	-DMSO	+		+		nein
	-DMSO	+			+	

Tab. 3.2.: Die Differenzierung von P19 EC Zellen in Richtung Kardiomyozyten ähnlicher Zellen, die makroskopisch sichtbar regelmäßig kontrahieren, wurde in eigenen Untersuchungen nach den bereits etablierten Bedingungen von McBurney et al. (1982) bestätigt. Die Zellen wurden 4 Tage als schwimmende Zellaggregate mit DMSO (1%) im P19 Medium induziert und zeigten nach weiteren 5 Tagen adhärirt am Zellkulturschalenboden ohne DMSO Zugabe im P19 Medium sichtbare Kontraktionen (**Versuch #1**). Veränderte Haltungs- und/oder Behandlungsbedingungen (**Versuche #2 - #6**) blieben erfolglos und zeigten keine sichtbaren Kontraktionen der Zellen.

3.3.1. Identifizierung von entwicklungspezifischen Genen bei Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO

P19 EC Zellen wurden mit DMSO nach im Abschnitt 3.3. (siehe auch Tab. 3.2., Versuch #1). beschriebener Kultivierungsmethode in die mesodermale Differenzierungsrichtung induziert. Um ein globale Analyse der Veränderung des Expressionsprofils während der Differenzierung durchführen zu können, wurden mRNA-Präparationen induzierter P19 EC Zellen (3 Tage mit DMSO induziert) im Vergleich zu P19 EC Kontrollzellen (1 Tag gewachsen, unbehandelt) als Matrize für eine Biotin-markierte cRNA eingesetzt, die auf Illumina Bead Microarrays hybridisiert wurde (siehe 2.4.7.). Es wurden Gene identifiziert, die während der DMSO induzierten Differenzierung in ihrem Expressionsniveau verändert wurden und spezifisch für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sind. Aus diesen Genen wurden 35 Gene nach ihrer entwicklungspezifischen Expression ausgewählt (siehe

3. Ergebnisse

4.3.1.). Die Veränderung des Expressionsniveaus dieser Gene deutet darauf hin, dass eine EMT durch die Induktion der P19 EC Zellen mit DMSO stattgefunden hat.

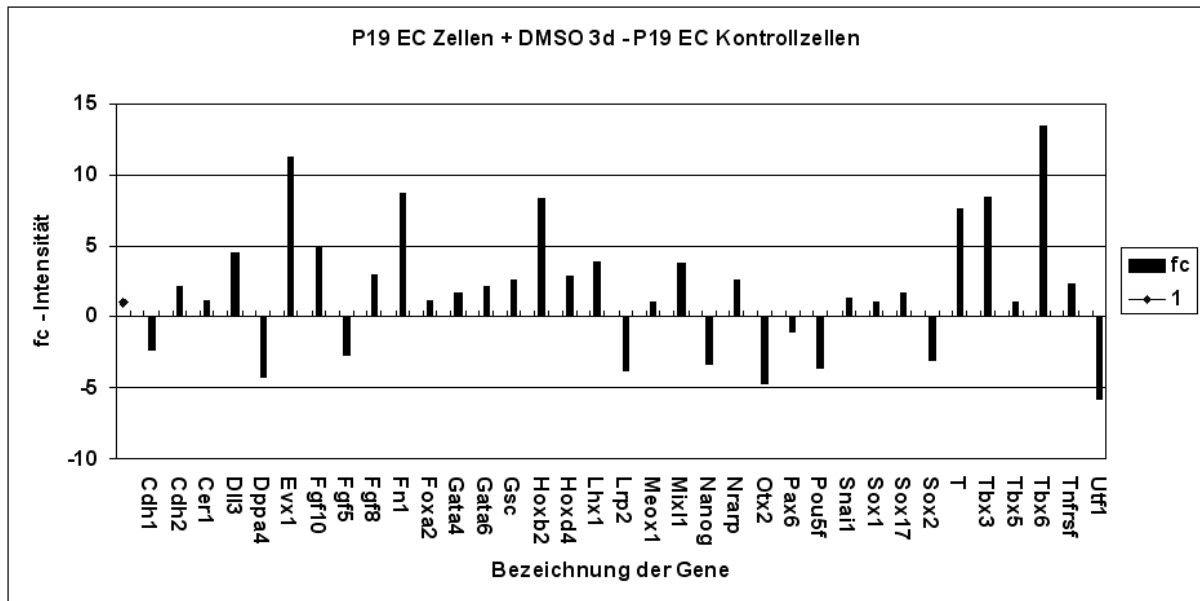


Abb. 3.6.: Darstellung des fold change (fc) einer Auswahl von 35 Genen, die entwicklungspezifisch wichtig sind. Die x-fache Veränderung des Expressionsniveaus einzelner Gene 3 Tage mit DMSO induzierter P19 EC Zellen im Vergleich zu P19 EC Kontrollzellen wird als Intensität des fc dargestellt (siehe 2.4.7.). Die Bedeutung dieser ausgewählten Gene siehe in Tabelle 4.1. Tabellarische Auflistung aller signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderter Gene siehe Anhang 8.1.

3.4. Gezielte Überexpression mit Tbx6 in P19 EC Zellen

Tbx6 ist das essentielle Regulatorgen bei der Entwicklung von PSM. Der im Primitivstreifen und PSM exprimierte Transkriptionsfaktor Tbx6 wurde mittels des Überexpressionskonstruktes *sp70_PGK_hyg_pA_CMV_Tbx6_pA* in P19 EC Zellen stabil transfiziert (siehe 2.4.5. und 2.4.6.). Hierdurch sollte die mesodermale Differenzierungsrichtung der durch DMSO induzierten P19 EC Zellen weiter in die Richtung des PSM forciert werden. Die erfolgreiche Transfektion ist durch den Nachweis von transgenem Tbx6 in den P19 EC Zellklonen #11 und #15 (siehe 2.4.6.) mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR dargestellt (siehe Abb. 3.7.).

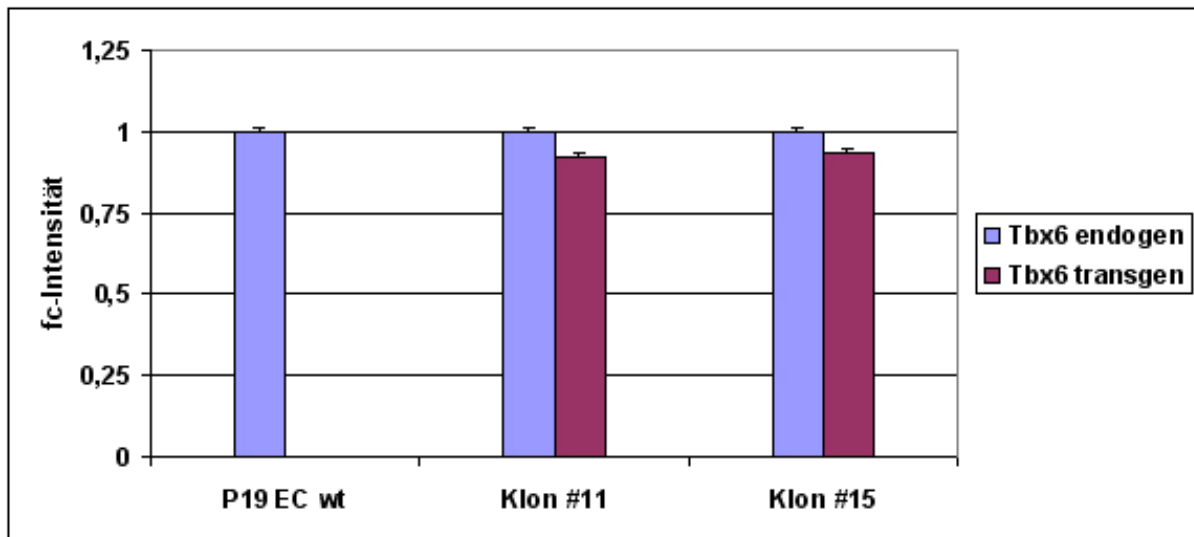


Abb. 3.7.: Tbx6-Transgennachweis von P19 EC Zellen. Darstellung der Änderung der fold change (fc) Intensität in einem Balkendiagramm.

Die x-fache Veränderung des Expressionsniveaus mit Tbx6 transgener P19 EC Zellklone #11 und #15 im Vergleich zu den auf den Wert 1 normalisierten endogenen Tbx6-Werten der Wildtyp P19 EC Zellen (=Kontrollzellen) wird als Intensität des fc dargestellt (siehe 2.4.7.). Durch eine qRT-PCR (siehe 2.4.8.4.) wurde mit Oligonukleotiden für endogenes und transgenes Tbx6 (siehe 2.1.13.) nachgewiesen, dass die P19 EC Zellklone #11 und #15 im Gegensatz zu den Wildtyp (wt) P19 EC Zellen transgen sind (siehe 2.4.6.).

3.4.1. Identifizierung von entwicklungsspezifischen Genen bei Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO und Überexpression von Tbx6

Zur Analyse des Expressionsprofils Tbx6-überexprimierender P19 EC Zellen wurden diese 3 Tage mit DMSO induziert und die Veränderung der Expressionsniveaus gegenüber Kontrollzellen (1 Tag gewachsen, unbehandelt) analysiert. Die durch die Induktion mit DMSO vorgegebene Differenzierungsrichtung sollte dabei durch die stabile Überexpression von Tbx6 in Richtung PSM spezifiziert werden. mRNA Präparationen der DMSO induzierten, sowie der Kontrollzellen wurden als Matrize für eine Biotin-markierte cRNA benutzt und auf Illumina Bead Microarrays hybridisiert.

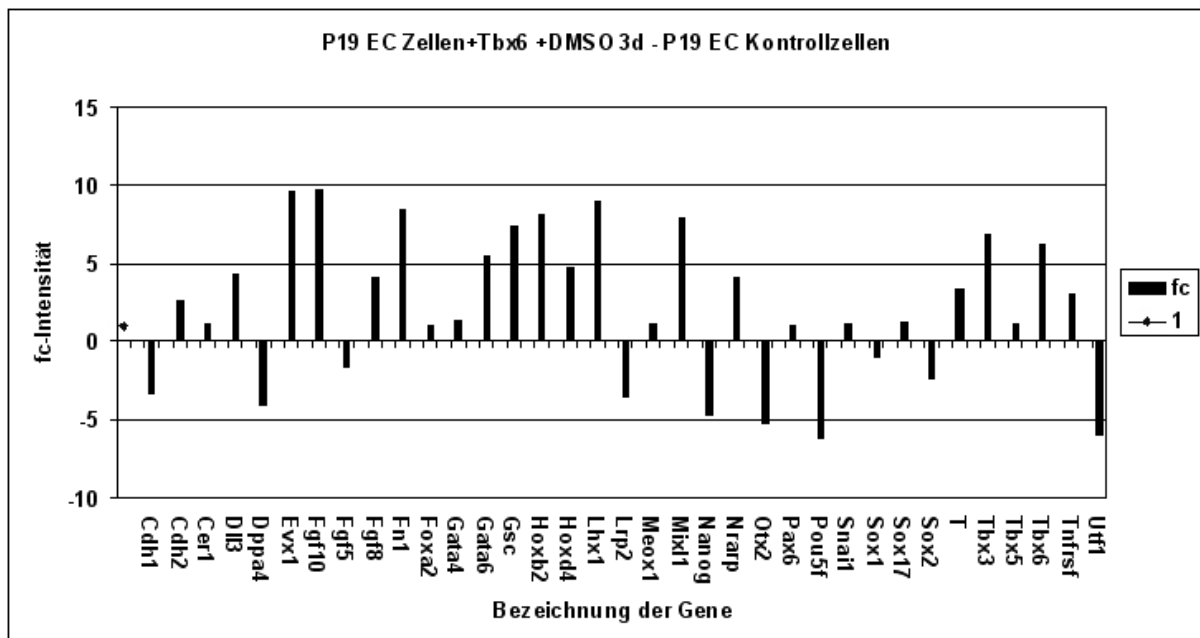


Abb. 3.8.: Darstellung des fold change (fc) einer Auswahl von 35 Genen, die entwicklungsspezifisch wichtig sind. Die x-fache Veränderung des Expressionsniveaus einzelner Gene 3 Tage mit DMSO induzierter sowie Tbx6 transgener P19 EC Zellen im Vergleich zu P19 EC Kontrollzellen wird als Intensität des fc dargestellt (siehe 2.4.7.). Die Bedeutung dieser ausgewählten Gene siehe in Tabelle 4.1. Tabellarische Auflistung aller signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderter Gene siehe Anhang 8.2.

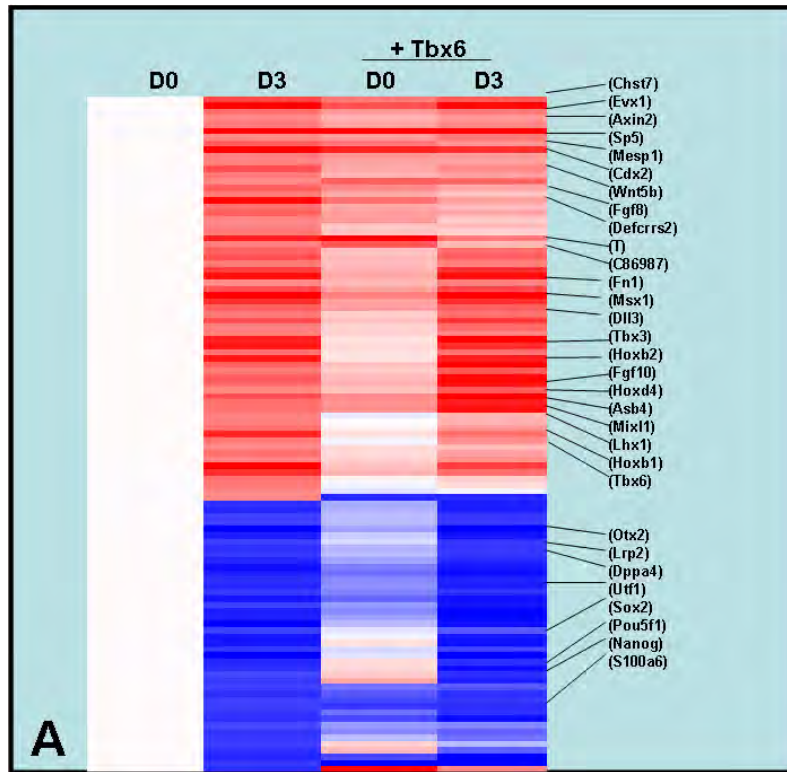
3.4.2. Vergleichende Analyse von Tbx6-überexprimierenden Zellen zu Kontrollzellen

Basierend auf dem Vergleich 3 Tage mit DMSO induzierter P19 EC Zellen (D3) zu unbehandelten P19 EC Kontrollzellen (D0) zeigen unbehandelte Tbx6-überexprimierende P19 EC Zellen (+Tbx6 D0) sowie 3 Tage mit DMSO induzierter Tbx6-überexprimierende P19 EC Zellen (+Tbx6 D3) eine bis zu 10-fache Hoch- oder Herunterregulierung der Expressionsniveaus entwicklungspezifischer Gene im Vergleich zu unbehandelten P19 EC Kontrollzellen (D0, weiss dargestellt, da normalisiert) (siehe Abb. 3.9. A).

Basierend auf dem Vergleich Tbx6-überexprimierender P19 EC Zellen (+Tbx6 D0) zu unbehandelten P19 EC Kontrollzellen (D0) zeigen unbehandelte Tbx6-überexprimierende P19 EC Zellen (+Tbx6 D0) sowie 3 Tage mit DMSO induzierter Tbx6-überexprimierende P19 EC Zellen (+Tbx6 D3) eine bis zu 10-fache Hoch- oder Herunterregulierung der Expressionsniveaus entwicklungspezifischer Gene im Vergleich zu unbehandelten P19 EC Kontrollzellen (D0, weiss dargestellt, da normalisiert) (siehe Abb. 3.9. B).

Im Vergleich von Genen, welche durch eine 3-tägige Differenzierung von P19 EC Zellen mit DMSO (siehe 3.3.1., Abb. 3.6.) sowie durch eine Tbx6-Überexpression in uninduzierten P19 EC Zellen signifikant in ihrem Expressionsniveau verändert erscheinen, ergibt sich eine Schnittmenge von 12 Genen. Diese 12 Gene werden in ihrem Expressionsniveau durch eine DMSO-Induktion der P19 EC Zellen, aber auch durch eine Tbx6-Überexpression der P19 EC Zellen beeinflusst (siehe Abb. 3.9. C).

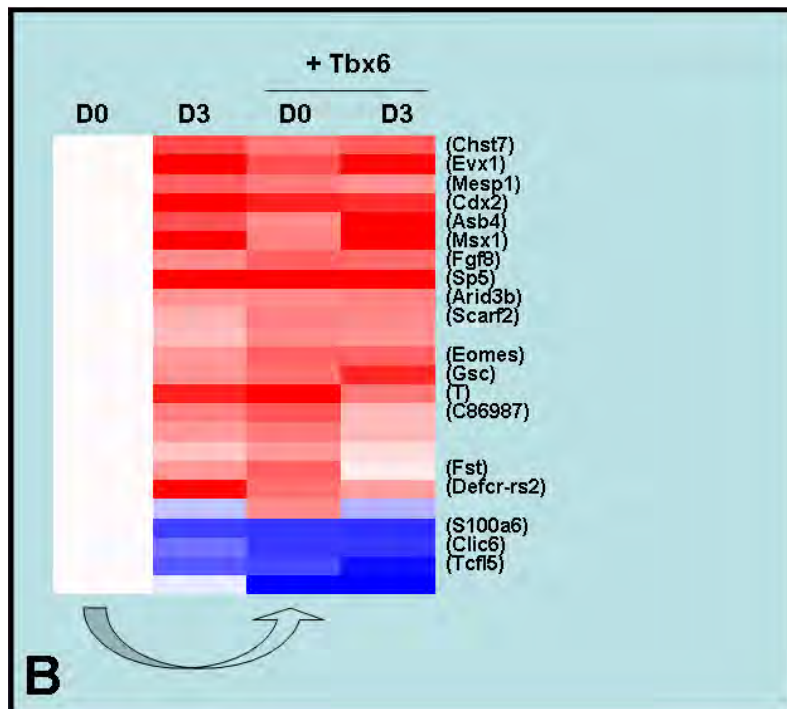
3. Ergebnisse



10-fach hochreguliert



10-fach herunterreguliert



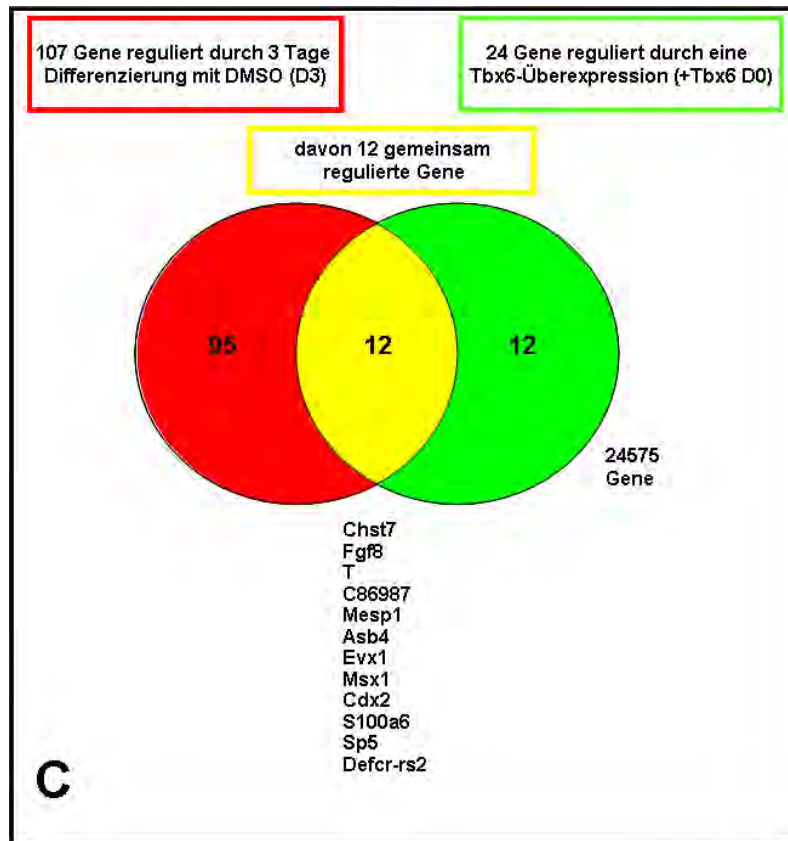


Abb. 3.9. A, B, C: Auswertung der Microarray-Daten und vergleichende Darstellung der Expressionsniveaus hoch- und herunterregulierter Gene in unterschiedlichen Farbstärken („heat map“)

A: Darstellung von **107** signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Genen, basierend auf dem Vergleich 3 Tage mit DMSO-induzierter (**D3**) P19 EC Zellen zu P19 EC Kontrollzellen (**D0**); zusätzliche Darstellung der Änderung des Expressionsniveau dieser 107 Gene in uninduzierten sowie 3 Tage mit DMSO induzierten Tbx6-überexprimierenden Zellen (**+Tbx6 D0**; **+Tbx6 D3**) vergleichend zu P19 EC Kontrollzellen (**D0**); (namentliche Auflistung von ausgewählten Genen; zur Auflistung aller 107 Gene siehe Anhang 8.1.)

B: Darstellung von **24** signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Genen, basierend auf dem Vergleich Tbx6-überexprimierender P19 EC Zellen (**+Tbx6 D0**) zu P19 EC Kontrollzellen (**D0**); zusätzliche Darstellung der Änderung des Expressionsniveau dieser 24 Gene in 3 Tage mit DMSO induzierten P19 EC Zellen ohne/mit Tbx6-Überexpression (**+Tbx6 D0**; **+Tbx6 D3**) vergleichend zu P19 EC Kontrollzellen (**D0**); (namentliche Auflistung von ausgewählten Genen; zur Auflistung aller 24 Gene siehe Anhang 8.3.)

C: Von insgesamt **24575** Genen werden **107** Gene durch eine 3-tägige DMSO-Induktion in ihrem Expressionsniveau sowie **24** Gene durch eine Tbx6-Überexpression beeinflusst; Auflistung der **12** Gene, die gemeinsam durch Tbx6 sowie eine DMSO-Induktion reguliert werden, Darstellung als Schnittmengendiagramm.

(**D0**= P19 EC Kontrollzellen; **D3**= P19 EC Zellen 3 Tage mit DMSO induziert; **+Tbx6 D0**= P19 EC Tbx6-überexprimierende Kontrollzellen; **+Tbx6 D3**= P19 EC Tbx6-überexprimierende Zellen 3 Tage mit DMSO induziert)

3.4.3. Vergleichende Analyse von DMSO induzierten P19 EC Zellen und DMSO-induzierten Tbx6-überexprimierenden P19 EC Zellen

Bei einer weiteren Analyse wurden DMSO-induzierte P19 EC Zellen mit DMSO-induzierten P19 EC Zellen, die zusätzlich noch Tbx6 überexprimieren, verglichen (Abb. 3.10.). Einzelne Gene werden durch die zusätzliche Tbx6-Überexpression stärker in ihrem Expressionsniveau beeinflusst als mit alleiniger DMSO-Induktion. Beispiele hierfür sind Cdh1, Cdh2, Fgf10, Fgf8, Fn1, Gata6, Gsc, Hoxd4, Lhx1, Mixl1, Nanog, Nrarp, Otx2, Pou5f1 und Tnfrsf19 (siehe Abb. 3.10.).

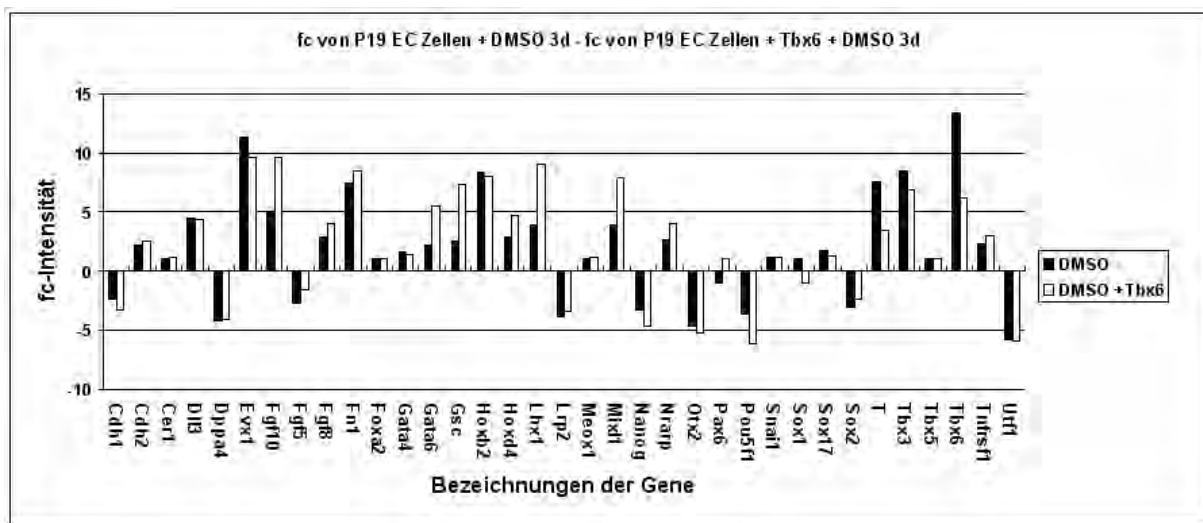


Abb. 3.10.: Darstellung des fold change (fc) einer Auswahl von 35 Genen (siehe 3.3.1., Tabelle 4.1.), die entwicklungspezifisch wichtig sind. Die x-fache Veränderung des Expressionsniveaus einzelner Gene 3 Tage mit DMSO induzierter P19 EC Zellen im Vergleich zu 3 Tage mit DMSO induzierter Tbx6-überexprimierender P19 EC Zellen wird als Intensität des fc dargestellt (siehe 2.4.7.).

3.5. Expressionsanalyse nach Herunterregulierung (knockdown) in vitro von Mixl1/Nrarp/Tnfrsf19

Basierend auf den Analysen der Expressionsprofile 3 Tage mit DMSO induzierter P19 EC Zellen und 3 Tage mit DMSO-induzierter, zusätzlich Tbx6-überexprimierender P19 EC Zellen (3.4.3.) wurden die Gene Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19 als Regulorgene für eine funktionelle Analyse ausgewählt. Für eine Funktionsverlustanalyse wurde mittels RNA-Interferenz die jeweilige Genexpression der drei Regulorgene herunterreguliert. Dafür wurden kommerziell hergestellte DNA-Konstrukte (siehe 2.4.8.1.) stabil in P19 EC Zellen sowie F1G4 ES Zellen transfiziert (siehe 2.4.8.3.). Mittels qRT-PCR wurde die Effektivität der jeweiligen Konstrukte getestet (siehe 2.4.8.4.). Nur die Transfektion des DNA-Konstruktes von Tnfrsf19 zeigte in

P19 EC Zellen und F1G4 ES Zellen eine signifikante Herunterregulierung der Tnfrsf19-Expression. Die Ergebnisse sind in den folgenden Darstellungen als x-fache Veränderung der Expressionsstärke (fc, fold change) dargestellt. Die x-fache Veränderung des Expressionsniveaus einzelner Gene durch die Transfektion mit den DNA-Konstrukten für Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19 im Vergleich zur unbeeinflussten Expression von Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19 in den P19 EC Zellen sowie in den F1G4 ES Zellen, die als 100% (fc-Intensität 1) gesetzt wird, wird als Intensität des fc dargestellt (siehe 2.4.7.)

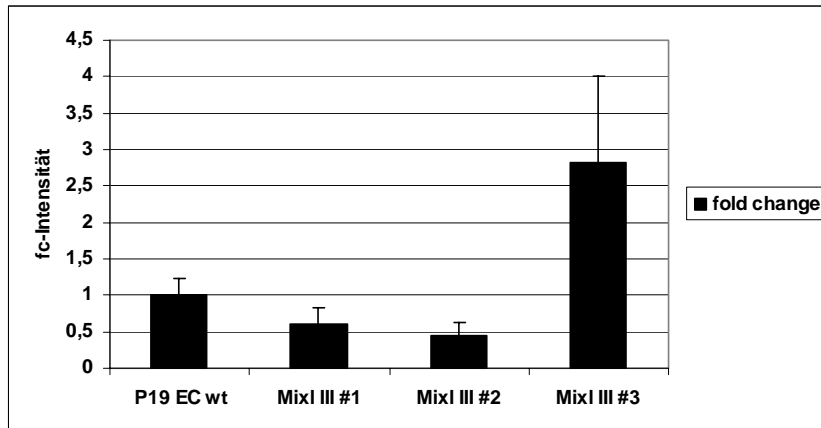


Abb. 3.11.: Analyse der Effektivität des knockdown-Konstruktes für Mixl1 in P19 EC Zellen (wt=Wildtyp). Auswertung mittels qRT-PCR, Darstellung der x-fachen Veränderung der Expressionsstärke von Mixl1 („fold change“). Wenige P19 EC Zellklone transfiziert mit einem knockdown-Konstrukt für Mixl1 überlebten und konnten ausgewertet werden. Die Zellklone #1 und #2 zeigten eine Abschwächung der Expression von Mixl1 um bis zu 55%, Zellklon #3 zeigte dagegen eine Verstärkung der Expression auf 281%.

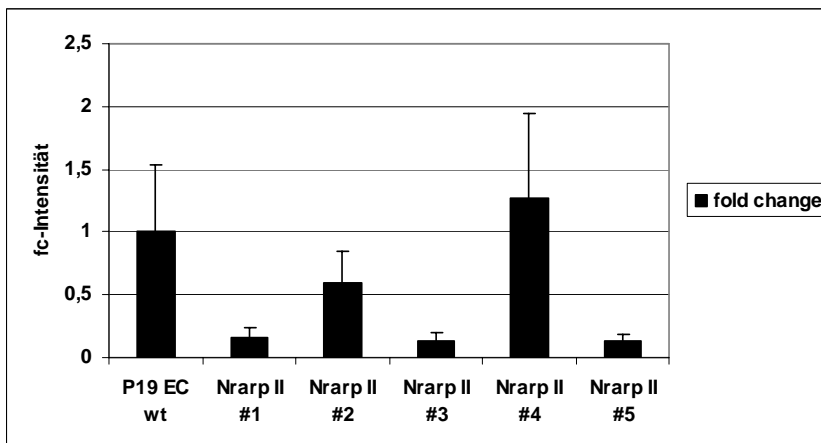


Abb. 3.12.: Analyse der Effektivität des knockdown-Konstruktes für Nrarp in P19 EC Zellen (wt=Wildtyp). Auswertung mittels qRT-PCR, Darstellung der x-fachen Veränderung der Expressionsstärke von Nrarp („fold change“). Die Zellklone #1, #2, #3 und #5 zeigten eine Abschwächung der Expression von Nrarp um bis zu 87%, Zellklon #4 zeigte dagegen eine Verstärkung der Expression auf 127%.

3. Ergebnisse

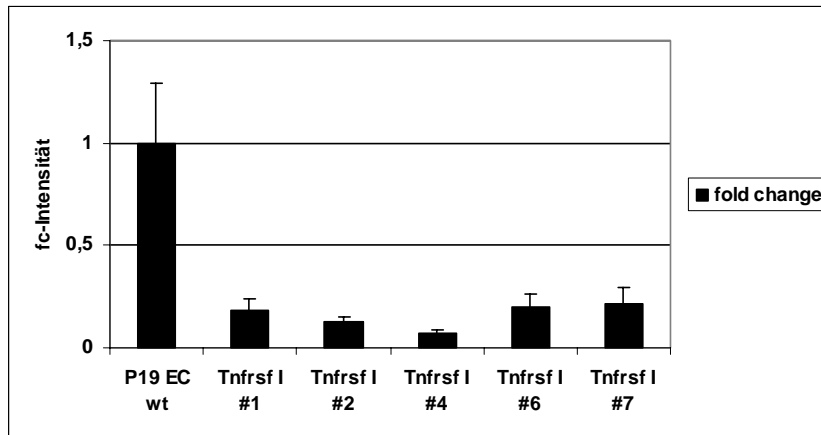


Abb. 3.13.: Analyse der Effektivität des knockdown-Konstruktes für Tnfrsf19 in P19 EC Zellen (wt=Wildtyp). Auswertung mittels qRT-PCR, Darstellung der x-fachen Veränderung der Expressionsstärke von Tnfrsf19 („fold change“). Die Zellklone #1, #2, #4, #6 und #7 zeigten eine Abschwächung der Expression von Tnfrsf19 um bis zu 93%.

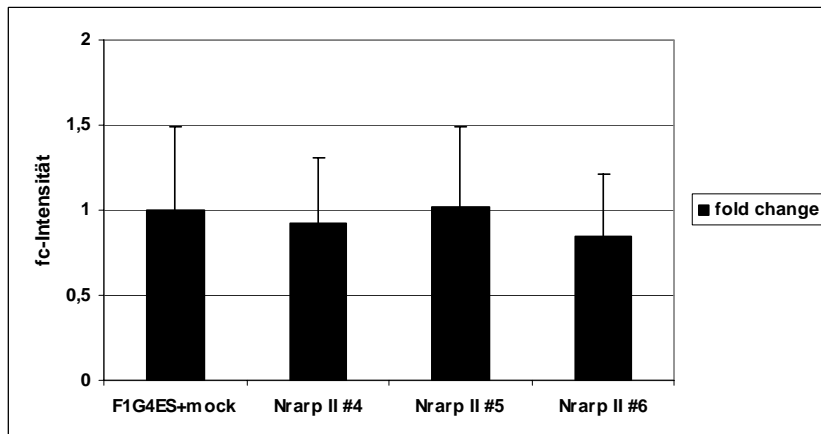


Abb. 3.14.: Analyse der Effektivität des knockdown-Konstruktes für Nrarp in F1G4 ES Zellen, transfiziert mit einem DNA-Konstrukt (TRE2_CMVfl_mir30/lacZ_puro) als Negativkontrolle („mock“, siehe 2.4.8.2.). Auswertung mittels qRT-PCR, Darstellung der x-fachen Veränderung der Expressionsstärke von Nrarp („fold change“). Wenige F1G4 ES Zellklone mit einem knockdown-Konstrukt für Nrarp überlebten und konnten ausgewertet werden. Die Zellklone #4 und #6 zeigten eine Abschwächung der Expression von bis zu 15%, Zellklon #5 zeigte dagegen eine Verstärkung der Expression auf 102%.

3. Ergebnisse

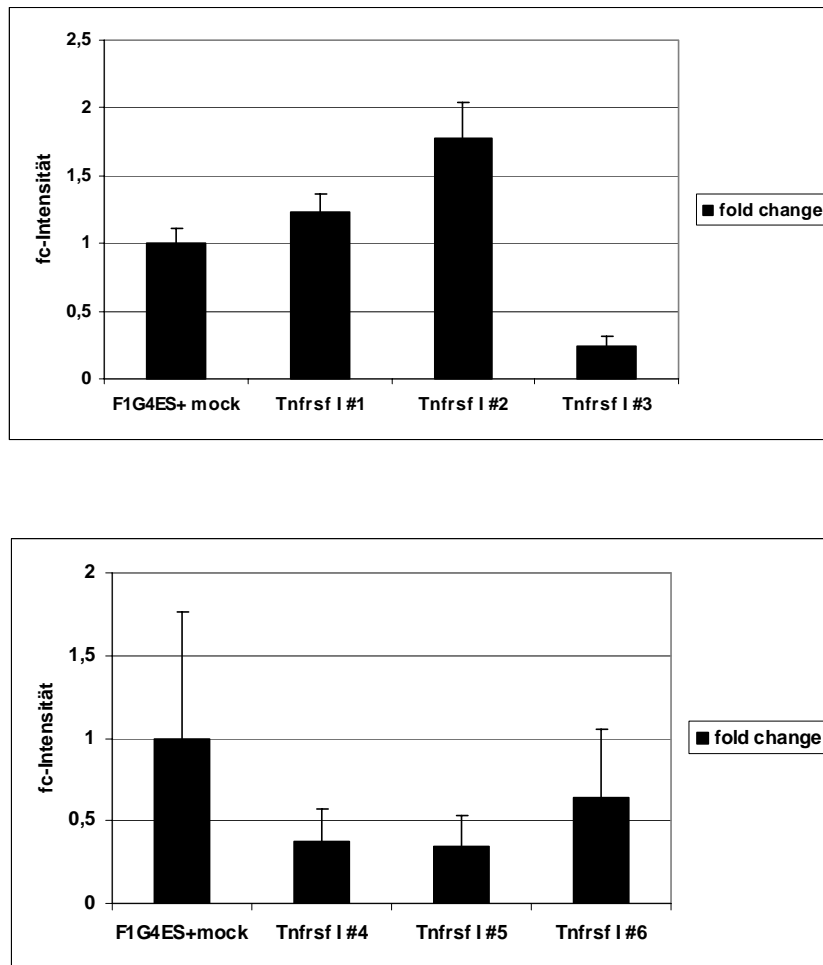


Abb. 3.15: Analyse der Effektivität des knockdown-Konstruktes für Tnfrsf19 in F1G4 ES Zellen, transfiziert mit einem DNA-Konstrukt (TRE2_CMVfl_mir30/lacZ_puro) als Negativkontrolle („mock“, siehe 2.4.8.2.). Auswertung mittels qRT-PCR, Darstellung der x-fachen Veränderung der Expressionsstärke von Tnfrsf19 („fold change“). Die Zellklone #3 - #6 zeigten eine Abschwächung der Expression von Tnfrsf19 um bis zu 76%, die Zellklone #1 und #2 zeigten dagegen eine Verstärkung der Expression um bis zu 178%.

3.6. Funktionelle Analyse von Tnfrsf19 in vivo durch Herunterregulierung der Expression (knockdown) und Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit dem Marker Uncx4.1

Die Zellklone von Tnfrsf19, transfiziert als knockdown-DNA-Konstrukt in P19 EC- und F1G4 ES Zellen (siehe 2.4.8.3.), zeigen eine Herunterregulierung der Genexpression (bis zu 93%, siehe Abb. 3.13. und Abb. 3.15.). Eine erste in vivo-Charakterisierung von Tnfrsf19 erfolgte über die Herunterregulierung der Tnfrsf19-Expression in transgenen Embryonen durch das nach Lasertechnik sowie Tetraploidaggregation injizierte knockdown-DNA-Konstrukt in dem F1G4 ES Zellklon #3 (Abb.3.15., siehe 2.2.3.). Die Injektion per Tetraploidaggregation war nicht auswertbar, da sich in der Ammenmaus keine Embryonen entwickelt hatten. Die Laserinjektion des F1G4 ES Zellklons #3 erbrachte 8 Embryonen von einer Maus. Von diesen Embryonen wurden 4 als transgen genotypisiert.

Embryonen (E10,5)	Laserinjektion	Tetraploidaggregation
Wildtyp	4	-
transgen	4	-

Tab. 3.3.: Anzahl der Embryonen von insgesamt 2 Mäusen (Wildtyp/transgen, Nachweis per Genotypisierungs-PCR, siehe 2.4.8.8.) nach ES Zelinjektion per Lasertechnik und per Tetraploidaggregation. Aus der mittels Laserinjektion injizierten Maus wurden 8 Embryonen präpariert, während die mittels Tetraploidaggregation manipulierte Maus keine Embryonen entwickelt hatte.

Durch eine Ganzpräparat in situ-Hybridisierung wurden die transgenen Embryonen mit Uncx4.1, einem Markergen für den kaudalen Teil der Somiten, angefärbt (siehe 2.4.10.). Eine makroskopische Veränderung der Somiten, hervorgerufen durch die Herunterregulierung der Expression des Gens Tnfrsf19, konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.16.).

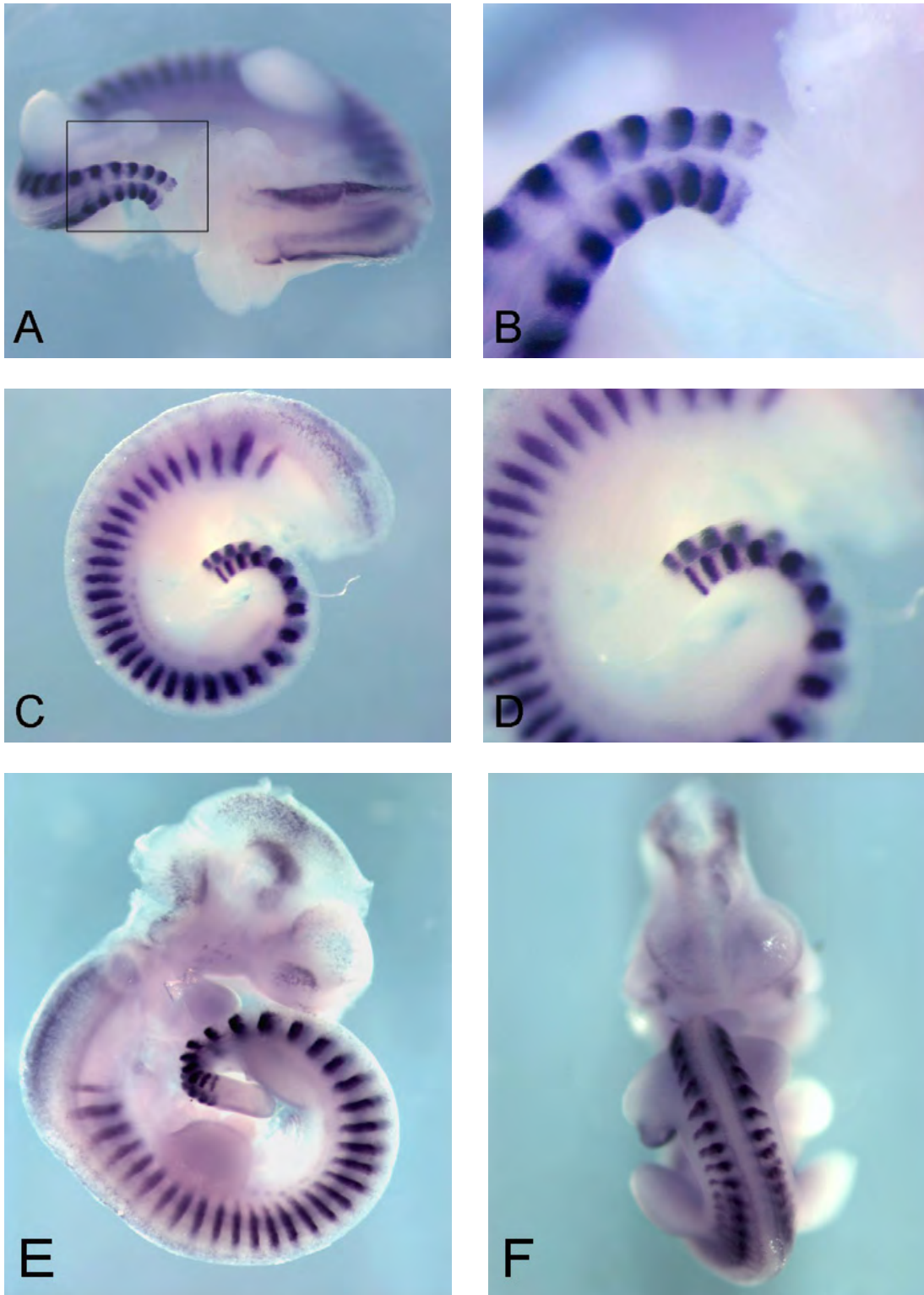


Abb. 3.16.: Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit *Uncx4.1*; Embryonen im Alter von E10,5, knockdown von *Tnfrsf19* **A-D:** transgene Embryonen, *Tnfrsf19* knockdown **E, F:** Negativkontrolle **A:** Das Kaudalende des Embryos ist in dorsaler Ansicht erkennbar, der Kopf wurde entfernt. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, eine morphologische Veränderung der Somitenpaare nicht erkennbar. **B:** Dorsale Ansicht des Kaudalendes, vergrößerter Ausschnitt aus A. **C:** Das Kaudalende des Embryos ist in der Lateralansicht nach rechts orientiert, der Kopf wurde entfernt. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, eine morphologische Veränderung der Somitenpaare nicht erkennbar. **D:** Lateralansicht des Kaudalendes des Embryos, vergrößerter Abschnitt aus C. **E:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach rechts orientiert. **F:** Dorsalansicht des Embryos aus E.

3.7. Funktionelle Analyse von Tnfrsf19 in vivo durch Überexpressionsversuche und Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit dem Marker Uncx4.1 sowie eGFP

DNA-Überexpressionskonstrukte mit Tnfrsf19 in zwei verschiedenen Isoformen wurden durch das DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 (*pDonor_loxP_T-pro_TNFRSF19_IRES-eGFP_pA_loxP*) pronuklear mikroinjiziert (siehe 2.4.9.). Tnfrsf19 (DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 „G1“) fehlte die intrazelluläre Domäne und könnte daher als vermutlich dominant negativer Rezeptor eingesetzt werden. Die Embryonen wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden YC 43/44 (siehe 2.4.8.8.) genotypisiert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 3.4. ersichtlich:

Maus #	Embryo (E9,5) #	Wildtyp	transgen
10	1	+	
	2		+
	3	+	
	4	+	
	5	+	
11	1		+
	2	+	
	3		+
	4	+	
	5		+
	6	+	
	7	+	
	8	+	

Tab. 3.4.: Anzahl der Embryonen (E9,5) (Wildtyp/transgen, bestimmt durch Genotypisierungs-PCR) von den NMRI-Mäusen #10 und #11 nach pronuklearer Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 „G1“ (Tnfrsf19 als dominant negativer Rezeptor)

3. Ergebnisse

Parallel wurde das Überexpressionskonstrukt LW #350 „H3“ mit Tnfrsf19 in voller Länge pronuklear mikroinjiziert (siehe 2.4.9.). Die Embryonen wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden YC 43/44 (siehe 2.4.8.8.) genotypisiert Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 3.5. ersichtlich:

Maus #	Embryo (E9,5) #	Wildtyp	transgen	
4	1	+		
	2	+		
	3	+		
	4	+		
	5		+	
	6		+	
	7	+		
	8		+	
	9	+		
	10	+		
	11	+		
	12	+		
	13	+		
	14			+
	15	+		
	16	+		
	17	+		

Tab. 3.5.: Anzahl der Embryonen (E9,5) (Wildtyp/transgen, bestimmt durch Genotypisierungs-PCR) von NMRI-Maus #4 nach pronuklearer Mikroinjektion des DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 „H3“ (Tnfrsf19 in voller Länge).

Durch Überexpression von Tnfrsf19 in voller Länge sowie als vermutlich dominant negativer Rezeptor (DNA-Überexpressionskonstrukt LW #350 „H3“ sowie „G1“) in F1G4 ES Zellen wurde der Einfluss von Tnfrsf19 auf die Segmentierung untersucht. Nach pronuklearer Injektion der Überexpressionskonstrukte wurde die Expression in vivo durch eine Ganzpräparat in situ-Hybridisierung untersucht. Die Embryonen (E9,5) wurden mit den Markern eGFP und Uncx4.1 angefärbt (siehe 2.4.10. – 2.4.10.3.). Zur Expressionskontrolle des Transgens diente eGFP. Diesem Marker war ein T-Promoter vorgeschaltet, der somit in der Schwanzspitze des Embryos (tailbud) zu einer Farbreaktion im Falle einer Transgenität führt. Eine solche positive Reaktion zeigten die Embryonen #1+ #3 der Maus #11 mit dem pronuklear mikroinjizierten DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 „G1“ ebenso Embryo #6 der Maus #4 mit dem pronuklear mikroinjizierten DNA-Überexpressionskonstrukts LW #350 „H3“. Weitere in der PCR als ebenfalls positiv genotypisierten Embryonen zeigten in der Ganzpräparat in situ-Hybridisierung keine Anfärbung im Bereich der embryonalen Schwanzspitze. Die Hybridisierung mit dem Marker Uncx4.1, exprimiert im kaudalen Abschnitt der Somitenpaare, diente der speziellen Anfärbung der Somiten. Es wurden keine makroskopische Veränderung im Bereich der Somiten bei den transgenen Embryonen festgestellt (siehe Abb. 3.17./3.18.).

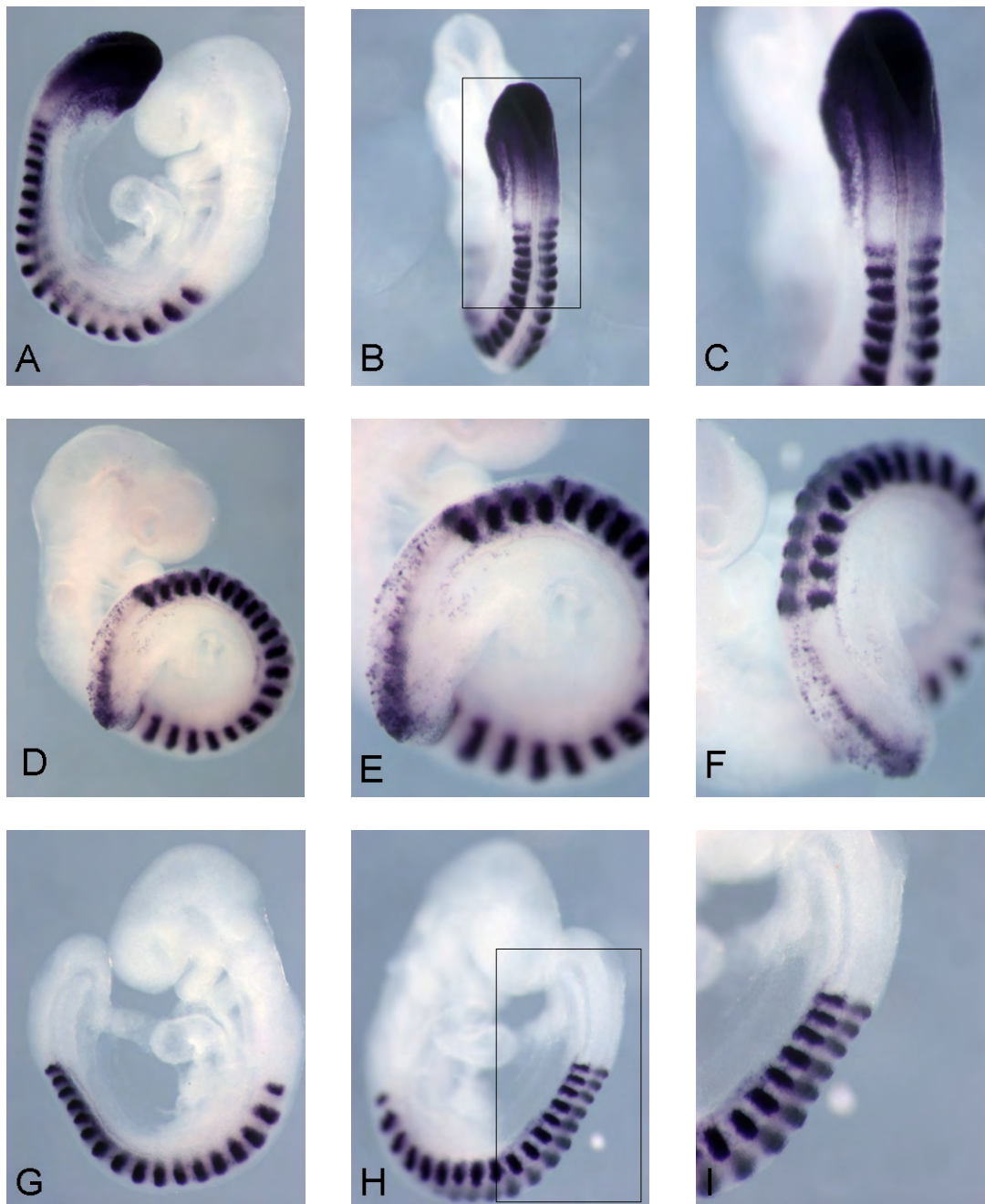


Abb. 3.17.: Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit eGFP und Uncx4.1; Embryonen im Alter von E9,5, Tnfrsf19 als dominant negativer Rezeptor (G1) **A-C:** Transgener Embryo (#1) **D-F:** Transgener Embryo (#3) **G-I:** Wildtyp Embryo **A:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach links orientiert. Das Kaudalende zeigt eine deutliche Anfärbung, eGFP dient als Nachweis der Expression des Transgens. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, als Somitenmarker dient Uncx4.1, eine morphologische Veränderung der Somitenpaare ist nicht erkennbar. **B:** Dorsalansicht auf das Kaudalende des Embryos **C:** Dorsalansicht auf das Kaudalende des Embryos, vergrößerter Ausschnitt aus B. **D:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach rechts orientiert. Das Kaudalende zeigt eine punktförmige Anfärbung, eGFP dient als Nachweis der Expression des Transgens. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, als Somitenmarker dient Uncx4.1, eine morphologische Veränderung der Somitenpaare ist nicht erkennbar. **E:** Vergrößerter Darstellung des Kaudalendes des Embryos aus D. **F:** Laterodorsale Ansicht des Kaudalendes des Embryos. **G:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach links orientiert, der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, das Kaudalende nicht. **H:** Laterodorsale Ansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach rechts orientiert **I:** Laterodorsale Ansicht des Embryos, vergrößerter Ausschnitt aus H.

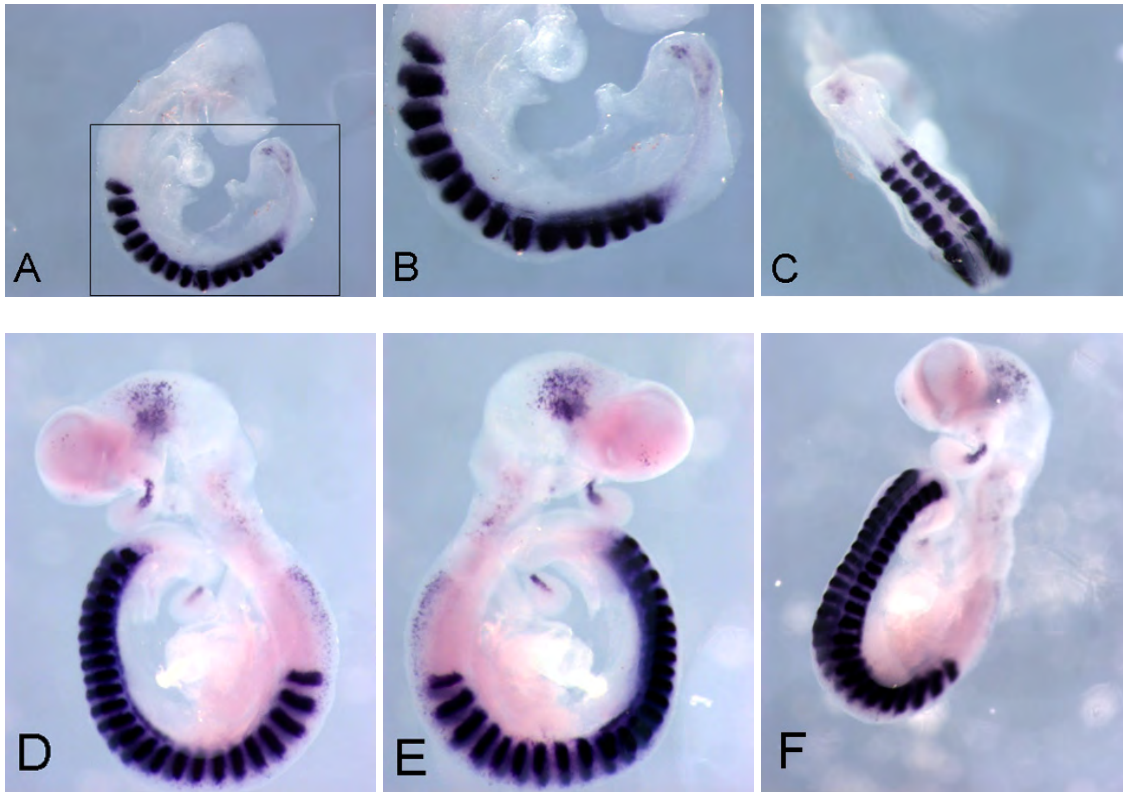


Abb. 3.18.: Ganzpräparat in situ-Hybridisierung mit eGFP und Uncx4.1; Embryonen im Alter von E9,5, Tnfrsf19 in voller Länge (H3) **A-C:** Transgener Embryo (#6) **D-F:** Wildtyp Embryo **A:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach rechts orientiert und zeigt eine punktuelle Anfärbung, eGFP dient als Nachweis der Expression des Transgens. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, als Somitenmarker dient Uncx4.1, eine morphologische Veränderung der Somitenpaare ist nicht erkennbar. **B:** Lateralansicht des Kaudalendes des Embryos, vergrößerter Ausschnitt aus A. **C:** Dorsalansicht auf das Kaudalende des Embryos. **D:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach links orientiert. Der kaudale Anteil der Somiten ist angefärbt, das Kaudalende nicht. **E:** Lateralansicht des Embryos, das Kaudalende ist nach rechts orientiert. **F:** Laterodorsale Ansicht des Embryos.

4. Diskussion

Die Etablierung der Rumpfanlage im Wirbeltierembryo wird durch komplexe regulatorische Netzwerke gesteuert, die einem streng kontrollierten Ablauf folgen. Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) steht dabei am Anfang und ist Grundvoraussetzung für die morphoregulatorischen Prozesse, die zur Bildung des Rumpfes führen. Ein Teil der durch EMT gebildeten Mesenchymzellen differenziert zu präsomitischem Mesoderm (PSM), aus dem sich u.a. Wirbelsäule, Skelett- und Extremitätenmuskulatur entwickeln. P19 EC Zellen dienen als Zellkulturmodell und wurden charakterisiert, sie exprimierten Cdh1 und Oct4. Die Wnt-Signalkaskade, ein bedeutender EMT-induzierender Signalweg, war in den P19 EC Zellen nicht induzierbar. Eine gezielte Induktion der Differenzierung der P19 EC Zellen zu Mesodermzellen des Rumpfes fand nicht statt. Alternativ wurden in aggregierten P19 EC Zellen durch DMSO-Zugabe ein mesodermales Entwicklungsprogramm aktiviert. Durch die Überexpression von Tbx6, einem essentiellen Regulator bei der Bildung des PSM, wurde die Expression von Genen, die an der Bildung von PSM beteiligt sind, forciert. Dies weist darauf hin, dass die Bildung von PSM durch die Tbx6-Expression begünstigt wurde. Durch Microarray-Analysen dieser manipulierten P19 EC Zellen wurden entwicklungspezifische Gene identifiziert, deren Expressionsniveaus eine Differenzierung in Richtung Mesoderm sowie PSM erkennen lassen. Darunter befanden sich die Kontrollgene Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19, die weiter charakterisiert wurden. Ein Schwerpunkt dieser Charakterisierung lag hierbei auf dem Kandidatengen Tnfrsf19, dessen potentielle Rolle in der Bildung des PSM und in der Somitogenese durch Genfunktionsverlustexperimente durch RNA-Interferenz und Genfunktionsgewinnexperimente durch DNA-Überexpressionskonstrukte in vivo analysiert werden sollte.

4.1. P19 EC Zellen exprimieren Cdh1 und Oct4

P19 EC Zellen sind pluripotente Stammzellen, die aus murinen Teratokarzinomen gewonnen wurden (McBurney, M. W., 1993, McBurney, M. W. et al., 1982, van der Heyden, M. A. et al., 2003). Sie gleichen ES Zellen in Bezug auf ihre Entwicklung und dem Potential zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen, sie sind aber im Gegensatz zu ES Zellen nicht in der Lage, sich zu einem kompletten Embryo zu entwickeln. Im Vergleich zu ES Zellen sind P19 EC Zellen ein leichter zu handhabendes Zellkulturmodell. Sie sind als alternatives Zellkultursystem bei Untersuchungen früher Embryonalentwicklung in vitro von Bedeutung. Eine Charakterisierung der P19 EC Zellen sollte Aufschluss über die Einsetzbarkeit von P19 EC Zellen bei Untersuchungen von EMT und Somitogenese geben. Eine Charakterisierung

der P19 EC Zellen in Bezug auf ihre Zelltypspezifität in den von Martin und Evans sowie Rudnicki beschriebenen optimalen Kultivierungsbedingungen (Martin, G. R. et al., 1975, Rudnicki, M. A., McBurney, M.W., 1987) erfolgte durch immunzytologische Analysen mit spezifischen Antikörpern.

Die Zellen exprimierten das Zelladhäsionsmolekül Cdh1 sowie den Stammzellmarker Oct4 (Syn. Pou5f1) (siehe Abb. 3.1. und 3.3.). Die Expression des Stammzellmarkergens Oct4 bestätigt die bereits beschriebene Stammzellidentität der P19 EC Zellen (McBurney, M. W., 1993, McBurney, M. W. et al., 1982, van der Heyden, M. A. et al., 2003). Eine Cdh1-positive semiquantitative PCR (siehe Abb. 3.4.) bestätigte weiter die Hypothese, dass P19 EC Zellen unter standardisierten Haltungsbedingungen epitheliale Zellcharakteristika besitzen. Die Expression von Vim als Marker mesenchymaler Zellen, die sich aus dem epithelialen Zellverband gelöst haben, also eine EMT durchlaufen haben (siehe 1.5.), wurde nicht detektiert (siehe Abb. 3.2.). Dies deutet darauf hin, dass noch keine EMT bei den P19 EC Zellen stattgefunden hat. Die Expression eines epithelialen Markergens sowie eines Stammzellmarkergens weist auf einen epithelialen Zelltyp mit Stammzeleigenschaften hin. P19 EC Zellen bieten somit für eine Analyse von EMT in vitro ein zu nutzendes Zellkultursystem.

4.2. Die Wnt-Signalkaskade ist durch die Zugabe von Wnt3a oder Gsk3 β -Inhibitor in P19 EC Zellen nicht induzierbar

Die Wnt-Signalkaskade steuert die Bildung des Primitivstreifens und die Gastrulation. Wnt3a reguliert die Entwicklung des PSM im anterioren Primitivstreifen unter anderem durch die direkte Aktivierung der Transkription von T, einem essentiellen Regulator der Mesodermbildung (Huelsken, J. et al., 2000, Lindsley, R. C. et al., 2006, Liu, P. et al., 1999, Logan, C. Y. et al., 2004, Yamaguchi, T. P. et al., 1999).

Gsk3 β ist ein Enzym, das durch Phosphorylierung von β -Cat eine Akkumulation desselben im Zellkern verhindert und dessen Degradation auslöst. Weiterhin hemmt Gsk3 β Snai1, den Repressor von Cdh1, das Zelladhäsionsmolekül epithelialer Zellen (Thiery, J. P. et al., 2006, Liu, C. et al., 2002, Behrens, J. et al., 1998). Durch Zugabe eines Inhibitors von Gsk3 β sollte die Degradation von β -Cat und die Inhibition von Snai1 verhindert und eine Induktion der Wnt-Signalkaskade intrazellulär in den P19 EC Zellen forciert werden.

P19 EC Zellen liessen sich durch Beeinflussung der Wnt-Signalkaskade nicht gezielt in Mesodermzellen des Rumpfes differenzieren. Die Zugabe von Wnt3a oder SB216763, einem Inhibitor des Enzyms Gsk3 β , erbrachte keine Induktion der Wnt-Signalkaskade bei P19 EC Zellen (siehe 3.2., Abb. 3.5., 2.4.3.). Die über 3-fache Aktivierung des TOP-Flash-Vektors bei der Zugabe von 350nM SB216763 ist nicht signifikant, da der FOP-Flash-Vektor als

Negativkontrolle ebenso aktiviert und auch im Vergleich zu den anderen Messungen eine deutlich erhöhte Standardabweichung gemessen wurde.

Die Möglichkeit einer Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch Zugabe von Wnt3a oder SB216763 als spezifischen Gsk3 β -Inhibitor wurde bereits in Zellkulturexperimenten durch Messung der Luziferase Reporteraktivität in Reporterkonstrukten mit Wnt-abhängigen Promotoren bestätigt (Inoue, T. et al., 2007, Wittler, L. et al., 2007, Nakagiri, S. et al., 2005, Qiu, W. et al., 2007). Bei den Zelltypen, in denen durch die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade Reporteraktivität induzierbar war, handelte es sich allerdings nicht um P19 EC Zellen sondern u.a. um Affennieren-Epithelzellen (COS-7 Zellen), humane embryonale Nierenzellen (HEK293-T), humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Mausfibroblastenzellen (MEF). Es konnte gezeigt werden, dass der TOP-Flash-Vektor nach der Transfektion durch den aktiven Transkriptionsfaktor Lef/ β in den P19 EC Zellen aktiviert werden konnte, während der FOP-Flash-Vektor nicht aktivierbar war (siehe Abb. 3.5.). Die Kontrolle hat funktioniert, jedoch ist die 4-fache Aktivierung als relativ gering einzustufen, da bereits eine 50-fache Aktivierung des dominant aktiven Transkriptionsfaktors Lef/ β gemessen wurde (Wittler, L. et al., 2007). Trotz positiver Kontrollreaktion war keine Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch Induktion mit Wnt3a oder SB216763 in den P19 EC Zellen messbar. Die verwendeten Konzentrationen von Wnt3a und SB216763 könnten zu gering für eine Induktion der EMT gewesen sein. Zudem könnten die Kultivierungsbedingungen (Rudnicki, M. A., McBurney, M.W., 1987) nicht optimal für eine Induktion der Wnt-Signalkaskade mit den verwendeten Faktoren sein, da P19 EC Zellen in serumhaltigem Medium (+10% FCS) kultiviert wurden. Serum besteht aus vielen nicht definierten Faktoren, die in Zellen verschiedenste Signalkaskaden bereits aktiviert haben könnten und somit eine Zugabe von Wnt3a-Protein keinen weiteren Effekt hervorrufen würde (Arnold Schröder, Doktorand, MPI für molekulare Genetik, Berlin, persönliche Mitteilung). Wnt3a hat einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation von HEK293-Zellen, die in 0,5prozentigem Serum kultiviert wurden, was ohne Wnt3a-Zugabe eine Apoptose der Zellen hervorgerufen hat (Jia, L. et al., 2008). Somit wäre ein Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration im Medium und einem Effekt von Wnt3a nachvollziehbar.

P19 EC Zellen exprimieren Oct4 (siehe 4.1. und Abb. 3.3.). Oct4 ist ein wichtiges Kontrollgen für die Erhaltung der Stammzellidentität und Pluripotenz. Wie gezeigt wurde, kann Oct4 Komponenten des Wnt-Signalwegs in humanen Stammzellen sowie weitere Gene, die bei Differenzierungsprozessen von Bedeutung sind, inhibieren (Babaie, Y. et al., 2007, Boyer, L. A. et al., 2005). Die Oct4-Expression in P19 EC Zellen könnte demnach ein weitere Erklärung dafür sein, dass keine Induktion der Wnt-Signalkaskade durch Wnt3a und SB216763 in den P19 EC Zellen stattgefunden hat.

Die einzelnen Kultivierungskonditionen schienen nicht optimal geeignet, um die P19 EC Zellen aus ihrer Stammzellidentität zu lösen und zu einer Differenzierung zu forcieren.

4.3. Identifizierung entwicklungspezifischer Gene nach Manipulation von P19 EC Zellen mit DMSO und/oder Überexpression von Tbx6

Eine signifikante Beeinflussung durch die Wnt-Signalkaskade, P19 EC Zellen gezielt in Mesodermzellen des Rumpfes zu differenzieren, fand nicht statt (siehe 4.2.). Alternativ wurde in aggregierten P19 EC Zellen durch die Zugabe von DMSO ein mesodermales Entwicklungsprogramm aktiviert (McBurney, M. W. et al., 1982). Eine gleichzeitige Überexpression von Tbx6 als essentielles Regulatorgen bei der Bildung PSM diene der weiteren Forcierung der Differenzierungsrichtung in Richtung PSM. Durch Analyse einer Vielzahl in ihrem Expressionsniveau veränderter Gene war ein Gesamtüberblick über die Differenzierung der Zellen möglich. 35 Gene (siehe Tab. 4.1.) wurden nach ihrer entwicklungspezifischen Expression ausgewählt (Babaie, Y. et al., 2007, Chapman, D. L. et al., 1996, Chapman, D. L. et al., 2003, Ciruna, B. G. et al., 1997, De Langhe, S. P. et al., 2005, Dubrulle, J. et al., 2001, Faiella, A. et al., 1991, Filosa, S. et al., 1997, Garcia-Castro, M. I. et al., 2000, Herrmann, B. G. et al., 1990, Hu, S. et al., 1999, Hukriede, N. A. et al., 2003, Itoh, N. et al., 2008, Kan, L. et al., 2004, King, C. C. et al., 2008, Kitajima, S. et al., 2000, Li, Y. X. et al., 2000, Mitiku, N. et al., 2007, Miyatani, S. et al., 1992, Okuda, A. et al., 1998, Pearce, J. J. et al., 1999, Pirot, P. et al., 2004, Pispá, J. et al., 2003, Tam, P. P. et al., 1994, Wasteson, P. et al., 2008, Willnow, T. E. et al., 1996, Xin, M. et al., 2006, Yook, J. I. et al., 2005).

Bezeichnung der Gene	Bedeutung als/Expression in
Cdh1, Dppa4, Nanog, Pou5f1, Sox2, Utf1	Stammzellmarker
Cer1, Foxa2, Gata4, Gata6, Sox17	Entoderm
Cdh2, Foxa2, Lhx1, Lrp2, Pax6, Sox1	Ektoderm
Fn1, Tbx3, Tbx5, Gata6, T	Mesoderm (lateral)
Cdh2, Evx1, Fgf10, Fgf5, Fgf8, Fn1, Gsc, Hoxb2, Hoxd4, Meox1, Mixl1, Nrarp, Snai1, T, Tbx3, Tbx6, Tnfrsf19	Mesoderm (paraxial)

Tab. 4.1.: Zuordnung einer Auswahl von 35 Genen nach Expressionsgewebe (siehe 3.3.1.). Darstellung von 35 Genen, die in den Microarray-Analysen bei 3 Tage mit DMSO induzierten P19 EC Zellen im Vergleich zu P19 EC Kontrollzellen durch eine Änderung ihres Expressionsniveaus auffielen.

Die Analyse entwicklungsspezifischer Gene wurde mithilfe von Daten aus einem Microarray erstellt. Als Matrize für eine Biotin-markierte cRNA dienten mRNA Präparationen manipulierter P19 EC Zellen, die auf Illumina Bead Microarrays hybridisiert wurden. Es konnten entwicklungsspezifische Gene identifiziert werden. Diese Microarraydaten stehen in keiner Beziehung zum Phänotyp. Da ein spezifischer Marker für das präsomitische Mesoderm zum Zeitpunkt der Analyse nicht zur Verfügung stand, entfiel ein phänotypischer Assay. Die Analyse mittels eines Microarray wurde zudem einer qRT-PCR vorgezogen, da so die Möglichkeit der Analyse tausender Gene, im Gegensatz zu einzelnen Genen, bestand.

4.3.1. Durch Zugabe von DMSO (1%) differenzieren P19 EC Zellen in Richtung Mesoderm

Wnt3a ist der wichtigste Kontrollfaktor im Embryo bei der Entwicklung des Mesoderms und des PSM im anterioren Primitivstreifens (Huelsken, J. et al., 2000, Lindsley, R. C. et al., 2006, Liu, P. et al., 1999, Logan, C. Y. et al., 2004, Yamaguchi, T. P. et al., 1999). Der Versuch, die Wnt-Signalkaskade in adhärennten P19 EC Zellen in einem kontrollierbaren Zustand mittels Wnt3a zu aktivieren, um so eine Differenzierung in Richtung Mesoderm zu induzieren, war unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich (siehe Abschnitt 4.2. und Abb. 3.5.). Die Differenzierung in Kardiomyozyten ähnliche Zellen sowie in weitere verschiedene Mesodermtypen durch die Zugabe von DMSO (1%) (McBurney, M. W., 1993, McBurney, M. W. et al., 1982, Rudnicki, M. A. et al., 1990, van der Heyden, M. A. et al., 2003) wurde in eigenen Untersuchungen bestätigt. Die Haltung von P19 EC Zellen als Zellaggregate ist eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der Differenzierung mit DMSO (McBurney, M. W. et al., 1982, Armour, C. et al., 1999, Andrews, P. W., 2002). Der Zustand der P19 EC Zellen als Zellaggregate ist dabei wenig kontrollierbar. Zusätzlich ist die Differenzierung der Zellen abhängig von der Konzentration an DMSO im Medium (Edwards, M. K. et al., 1983). Jegliche Abweichung der Haltungs- und/oder Behandlungsbedingungen (siehe Tab. 3.2. Versuch #2- #6) verhinderte die Differenzierung Richtung Kardiomyozyten ähnlicher Zellen mit makroskopisch sichtbaren Kontraktionen.

P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden, zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen bei Microarray-Analysen (D3-D0, siehe Abb. 3.9. A) 107 in ihrem Expressionsniveau signifikant (>2) veränderte Gene (siehe Anhang 8.1.).

Unter den in ihrem Expressionsniveau veränderten Genen befinden sich essentielle Kontrollgene der Bildung von Mesoderm und PSM. Diese Kontrollgene *T*, *Fibroblast growth factor 8* (Fgf8) und *Tbx6* (Chapman, D. L. et al., 1996, Chapman, D. L. et al., 2003, Crossley,

P. H. et al., 1995, Dubrulle, J. et al., 2001, Herrmann, B. G. et al., 1990, Kispert, A. et al., 1993) wurden in ihrem Expressionsniveau bis zu 10-fach hochreguliert, was auf eine Differenzierung in Richtung Mesoderm hindeutet. Weitere signifikant veränderte Gene sind Pou5f1 und Nanog (Chambers, I., 2004, Chambers, I. et al., 2003, Herr, W. et al., 1995, Mitsui, K. et al., 2003, Okamoto, K. et al., 1990, Pesce, M. et al., 2001), die im Vergleich zu den Kontrollzellen in ihrem Expressionsniveau bis zu 10-fach herunterreguliert waren. Da Pou5f1 und Nanog für die Haltung von Zellen in undifferenziertem Zustand essentiell sind, weist dies auf einen Verlust von Stammzeleigenschaften und auf eine erfolgte Differenzierung in Richtung Mesoderm hin.

4.3.2. Eine Tbx6-Überexpression begünstigt die Differenzierung von P19 EC Zellen in Richtung präsomitisches Mesoderm

Tbx6 ist im Primitivstreifen und PSM der Maus exprimiert (Chapman, D. L. et al., 1996, Hofmann, M. et al., 2004). Die Genaktivität von Tbx6 im PSM ist für die Spezifikation und Segmentierung des PSM und damit für die Bildung der Somiten notwendig. Reduzierte Tbx6-Aktivität führt zu Defekten im PSM und somit zu einem Verlust der Somitenbildung (Chapman, D. L. et al., 1998, Chapman, D. L. et al., 2003).

Beim Vergleich von Tbx6-überexprimierenden P19 EC Zellen zu Kontrollzellen konnten bei Microarray-Analysen (siehe Abb. 3.9. B) 24 in ihrem Expressionsniveau signifikant (>2) veränderte Gene identifiziert werden (siehe Anhang 8.3.). Die Hochregulierung des Expressionsniveaus essentieller Kontrollgene bei der Mesodermbildung deutet dabei auf einen direkten Einfluss von Tbx6 auf diese Gene hin. Gene wie T, Fgf8, *mesoderm posterior 1* (Mesp1) und *caudaltype homeobox transcription factor 2* (Cdx2) werden, wie auch Tbx6, im Primitivstreifen, in der Schwanzknospe und im PSM exprimiert.

Die Verbindung der Expression von T und Tbx6 ist unumstritten, da Tbx6 ein Zielgen von T ist. In den Introns 1 und 5 von Tbx6 sind T-Bindestellen, ebenso erfährt Tbx6 eine deutliche Herunterregulierung der Expression in Embryonen ohne T-Expression (Chapman, D. L. et al., 1996, Chapman, D. L. et al., 2003, Hofmann, M. et al., 2004). In der vorliegenden Microarray-Analyse fällt dagegen der Einfluss von Tbx6 auf die T-Expression auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass Tbx6 wiederum rückwärts gerichtet als sog. "positiver feedback" einen deutlichen Einfluss auf die Expression von T hat.

Es wurde gezeigt, dass in Wnt3a-Nullmutanten eine Herunterregulierung der Expression von Fgf8 stattfindet (Aulehla, A. et al., 2003, Dunty, W. C., Jr. et al., 2008) und dass in Fgf8-Nullmutanten keine Tbx6-Expression detektiert wird (Sun, X. et al., 1999). Fgf8 könnte ein direktes oder indirektes Zielgen von T sein, worauf die Herunterregulierung der Expression von Fgf8 in Microarrayanalysen von T-Nullmutanten hinweist (persönliche Mitteilung Dr.

Markus Morkel, MPI für molekulare Genetik, Berlin). Fgf8 induziert zudem die Expression von T im PSM (Dubrulle, J. et al., 2001). Die durch die Überexpression von Tbx6 erhöhte T-Expression scheint somit regulierend auf das Expressionsniveau von Fgf8 zu wirken.

Denkbar ist eine Regulierung der Expression von Mesp1 über den Notch-Signalweg durch Tbx6, da ein Einfluss von Tbx6 über den Notch-Signalweg auf Mesp2 nachgewiesen wurde (Yasuhiko, Y. et al., 2006). Mesp2 und Mesp1 sind benachbart („head to head“) auf Chromosom 7 lokalisiert. Sie teilen sich einige individuelle Sequenzabschnitte und werden von derselben Region aus transkribiert (Saga, Y. et al., 1996, Whittock, N. V. et al., 2004). Zudem sind Mesp1 und Mesp2 durch ein teilweise überlappendes Expressionsmuster während der Gastrulation und Somitogenese im anterioren PSM charakterisiert (Kitajima, S. et al., 2000). Tbx6 scheint nicht nur einen Einfluss auf Mesp2 auszuüben (Yasuhiko et al., 2006), sondern ebenso auf die Expression von Mesp1 (siehe Abb. 3.9.).

Cdx2 spielt eine bedeutende Rolle bei der Verlängerung der Körperachse während der Gastrulation; Cdx2-Nullmutanten sind phänotypisch auffällig durch eine abnorme Verkürzung des Rumpfbereichs (Chawengsaksophak, K. et al., 2004). Die Tbx6-Expression ist in homozygoten Cdx2-Mutanten deutlich reduziert (Chawengsaksophak, K. et al., 2004). Die vorliegenden Microarray-Daten wiederum zeigen einen Einfluss von Tbx6 auf Cdx2 auf. Dies deutet auf eine gegenseitige Abhängigkeit der Expression von Tbx6 und Cdx2 und damit auf eine positive Rückkopplung dieser beiden Gene hin.

Tbx6 ist für die Spezifikation und Segmentierung des PSM und damit für die Bildung der Somiten notwendig. Über die direkte Aktivierung von Dll1 nimmt Tbx6 Einfluss auf die Segmentierung des PSM (Hofmann, M. et al., 2004).

4.3.3. Regulation der Expression von 12 Genen durch 3-tägige Differenzierung mit DMSO oder Überexpression mit Tbx6

Durch Analyse der Microarray-Daten konnten 12 Gene charakterisiert werden, die ihr Expressionsniveau sowohl durch 3-tägige Induktion der Differenzierung mit DMSO als auch durch die Überexpression mit Tbx6 veränderten, also gemeinsam durch Tbx6 und DMSO-Induktion reguliert werden (siehe Abb. 3.9. C). Zu diesen 12 Genen zählen Markergene der frühen Embryogenese wie Chst7, Fgf8, T, Mesp1, Evx1, Msx1, Cdx2 und Sp5, sowie 4 weitere Gene C86987, Asb4, S100a6, Defcr-rs2, die bei Gastrulation und Somitogenese nicht klar einzuordnen sind.

Carbohydrate sulfotransferase 7 (Chst7), *Even skipped homeobox 1* (Evx1) und *Muscle segment homeobox 1* (Msx1) spielen eine Rolle bei der Bildung von Chondroitinsulfatstrukturen (Kitagawa, H. et al., 2000), bei der Bildung der anterior-posterioren Körperachse (Faiella, A. et al., 1991) und bei der Regulation der Differenzierung

von Skelettmuskulatur (Lee, H. et al., 2004). Der *trans-acting Transcription Factor Sp5* (Sp5) ist ein Zielgen von Wnt und wird während der Gastrulation im Primitivstreifen, in der Schwanzknospe und in den sich entwickelnden Somiten exprimiert (Dequeant, M. L. et al., 2006, Harrison, S. M. et al., 2000).

Der Transkriptionsfaktor Tbx6 sowie DMSO haben einen Einfluss auf die Expressionsniveaus der erwähnten Gene. DMSO forciert die Differenzierung zu Herzmesoderm bzw. zu Kardiomyozyten ähnlichen Zellen (McBurney, M. W., 1993, McBurney, M. W. et al., 1982, Rudnicki, M. A. et al., 1990, van der Heyden, M. A. et al., 2003). Tbx6 ist ein essentieller Regulator bei der Bildung von PSM (Chapman, D. L. et al., 1996, Hofmann, M. et al., 2004). Dennoch konnten in beiden Ansätzen 12 Gene nachgewiesen werden, die durch DMSO oder Tbx6 beeinflusst sind. Diese Gene spielen bei der Bildung von Mesoderm an sich eine Rolle, was den Zusammenhang einer gemeinsamen Beeinflussbarkeit durch DMSO oder Tbx6-Überexpression erklären würde.

Tbx6 ist ein direktes Zielgen von T, einem essentiellen Regulatorgen der Mesodermbildung (Chapman, D. L. et al., 2003, Hofmann, M. et al., 2004). Da T zu den 12 Kontrollgenen gehört, ist der direkte Einfluss von DMSO auf die T-Expression bei der Differenzierung zu Mesoderm möglich. Tbx6 scheint zudem einen rückwärtsgerichteten Einfluss auf die Expression von T auszuüben, da durch alleinige Tbx6-Überexpression die T-Expression erhöht ist (siehe Abschnitt 4.3.2. und Abb. 3.9.B,C).

Weitere Kontrollgene wie Fgf8, Evx1 und Sp5 stehen über die Wnt-Signalkaskade in engen Zusammenhang mit T und Tbx6 (Chapman, D. L. et al., 1996, Chapman, D. L. et al., 2003, Hofmann, M. et al., 2004, Aulehla, A. et al., 2003, Dequeant, M. L. et al., 2006, Harrison, S. M. et al., 2000) und könnten über diesen Weg in ihrer Expression reguliert worden sein.

Chst7 und Msx1 spielen eine Rolle bei der Differenzierung mesodermaler Strukturen wie Knorpelgewebe und Skelettmuskulatur (Kitagawa, H. et al., 2000, Lee, H. et al., 2004). Tbx6 ist essentiell für die Spezifikation und Segmentierung des PSM und damit für die Bildung der Somiten als Vorläuferstrukturen von Wirbelkörpern, Knorpel, Rumpf- und Skelettmuskulatur notwendig. Die Tbx6-Überexpression scheint Einfluss auf Kontrollgene späterer Strukturen, wie Knorpelgewebe und Skelettmuskulatur, zu nehmen. Da im Gegensatz zur Entwicklung im Embryo bei in vitro-Analysen in Zellen Entwicklungsprozesse unkontrollierter sind, ist die Expression von Markergenen späterer Strukturen möglich.

.

4.3.4. Verstärkter Einfluss auf die Differenzierung von P19 EC Zellen durch eine zusätzliche Tbx6-Überexpression bei gleichzeitiger DMSO-Induktion

P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden und Tbx6 überexprimierten, zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen bei Microarray-Analysen 143 in ihrem Expressionsniveau signifikant (>2) veränderte Gene (siehe Anhang 8.2.).

Eine vergleichende Analyse 35 ausgesuchter Gene in P19 EC Zellen, die 3 Tage entweder mit DMSO induziert wurden oder zusätzlich noch Tbx6 überexprimierten, ist in Abb.3.10. dargestellt.

Kontrollgene wie *Fibroblast Growth Factor 10* (Fgf10), *Gata binding protein 6* (Gata6), *Goosecoid homeobox* (Gsc) und *Lim homeobox gene 1* (Lhx1), die eine Bedeutung bei der Entwicklung mesodermaler Strukturen haben, werden dabei durch die zusätzliche Tbx6-Expression stärker positiv beeinflusst als mit alleiniger DMSO-Induktion (siehe Abb. 3.10.).

Tbx6 scheint einen regulatorischen Einfluss auf die Kontrollgene Fgf10, Gata6, Gsc und Lhx1 zu haben. Hier ist ein Zusammenhang mit der Entwicklung mesodermaler Strukturen denkbar, da einzelne Expressionsmuster der Kontrollgene teilweise mit Tbx6-Expressionsmustern überlappen.

Vorder- und Hinterextremitäten entwickeln sich aus dem lateralen Mesoderm. Fgf10-Nullmutanten werden ohne Hinter- und Vorderextremitäten geboren und sterben kurz nach der Geburt durch Fehlentwicklungen oder völligem Fehlen verschiedener innerer Organe, wie z.B. der Lunge (Min, H. et al., 1998, Ohuchi, H. et al., 2000, Sekine, K. et al., 1999).

Gata6 ist ein Transkriptionsfaktor, der in vielen vom lateralen Mesoderm abstammenden Zelllinien exprimiert wird (Morrisey, E. E. et al., 1996). Zusätzliche Expressionsdomänen von Gata6 sind unter anderem im Rumpfbereich und in der Schwanzknospe (siehe <http://mamep.molgen.mpg.de>), dem Bereich des PSM.

Gsc sowie Lhx1 werden ebenso wie Tbx6 im Primitivstreifen exprimiert und sind bedeutend bei der Gastrulation (Yamada, G. et al., 1997, Filosa, S. et al., 1997, Blum, M. et al., 1992, Hukriede, N. A. et al., 2003). Die Microarray-Daten deuten auf einen direkten oder indirekten Einfluss von Tbx6 auf die Kontrollgene hin. Gsc sowie Lhx1 stimmen in einzelnen Expressionsdomänen mit Tbx6 überein und scheinen direkte Zielgene von Tbx6 zu sein. Dagegen scheint Tbx6 auch Einfluss auf Faktoren zu nehmen, die unter anderem auch im lateralen Mesoderm exprimiert sind wie Fgf10 und Gata6. Dennoch könnten diese indirekten Zielgene von Tbx6 sein, die unter diesen Kulturbedingungen mit DMSO und der zusätzlichen Tbx6-Überexpression reguliert werden.

Im Gegensatz dazu werden Kontrollgene für Stammzellen wie Pou5f1 und Nanog durch die zusätzliche Überexpression von Tbx6 stärker negativ beeinflusst als durch alleinige Induktion

mit DMSO (siehe Abb. 3.10.). Tbx6 als essentielles Regulatorgen der Entwicklung PSM (Chapman, D. L. et al., 1998, Chapman, D. L. et al., 2003) forciert die Zelldifferenzierung in Richtung Mesoderm. Dazu beeinflusst es mögliche Zielgene in der Differenzierung zu Mesoderm positiv, während es gleichzeitig Kontrollgene, die für die Aufrechterhaltung der Stammzellidentität wichtig sind, herunterreguliert. Dieser Antagonismus von Stammzellidentität versus Differenzierung ist ein bereits beobachteter Mechanismus in der embryonalen Entwicklung, der im Hinblick auf die Erhaltung der Stammzellidentität durch die Expression von Pou5f1 und Nanog in humanen und murinen ES Zellen bereits näher untersucht wurde (Babaie, Y. et al., 2007, Boyer, L. A. et al., 2005).

Es ist auffallend, dass die Gene Tbx6 und T durch eine alleinige DMSO-Induktion deutlich stärker ihr relatives Expressionsniveau verändern als mit zusätzlicher Tbx6-Überexpression. Diese dargestellte Erhöhung des Expressionsniveaus könnte durch den Expressionswert dieser Gene in den Tbx6-überexprimierenden Zellen verursacht werden, der von Anfang an höher ist als in den Kontrollzellen. Durch die zusätzliche Induktion mit DMSO ist die Erhöhung des Expressionsniveaus der Tbx6-überexprimierenden Zellen deswegen relativ geringer ausgeprägt als im Vergleich zu den Kontrollzellen.

4.4. Die Tbx6-Überexpression hat einen positiven Einfluss auf die Kontrollgene Mixl1 und Nrarp

Die Kontrollgene *Mixl homeobox-like 1* (Mixl1) und *Notch-regulated ankyrin repeat protein* (Nrarp) sind durch eine zusätzliche Überexpression mit Tbx6 stärker positiv beeinflusst als mit alleiniger DMSO-Induktion (siehe Abb. 3.10.).

Mixl1 ist in der Schwanzknospe exprimiert und Nrarp besitzt mit Tbx6 überlappende Expressionsdomänen im PSM (siehe <http://mamep.molgen.mpg.de>). Beide Gene spielen eine Rolle bei Entwicklung von Mesoderm bzw. PSM. Die Daten der Microarray-Analyse weisen zudem auf eine Abhängigkeit der Expression von Tbx6 hin.

Mixl1 ist verwandt mit der Mix/Bix homeobox Genfamilie im Krallenfrosch und dem CMIX Gen im Hühnchen. Es wird abhängig vom Entwicklungsstadium (E5,5 bis E9,5) nacheinander im viszeralem Entoderm, im Primitivstreifen und in der Schwanzknospe exprimiert (Pearce, J. J. et al., 1999). Das Bix-Gen (*Brachyury induced homeobox*), ein vermutliches Ortholog von Mixl1, ist ein direktes Zielgen von T im Krallenfrosch (Tada, M. et al., 1998). Diese direkte Regulierung durch T über das Zielgen Tbx6 scheint in den P19 EC Zellen ebenso der Fall zu sein, da die Microarray-Daten einen entsprechend positiven Einfluss auf die Mixl1-Expression durch die zusätzliche Tbx6-Überexpression zeigen.

Nrarp wird im sich entwickelnden Nervensystem während der ersten und zweiten Neurogenese, im PSM und während der Segmentierung der Somiten exprimiert (Pirrot, P. et

al., 2004). Es ist ein direktes Zielgen der Notch-Signalkaskade und wirkt auf diese negativ regulierend ein (Kawai, J. et al., 2001). Gene der Notch-Signalkaskade sind mit ihrem zyklischen Expressionsmuster bei der regelmäßigen Somitenbildung beteiligt und stehen in Verbindung mit dem bei der Somitogenese beteiligten Wnt-Signalweg (Aulehla, A. et al., 2003). Tbx6 wirkt regulierend über Dll1 auf den Notch-Signalweg ein (Hofmann, M. et al., 2004). Die Überexpression von Tbx6 führt zu einer Erhöhung der Dll1-Expression, die wiederum zur stärkeren Expression von Zielgenen der Notch-Signalkaskade führt, unter ihnen auch Nrarp.

4.5. Versuch der Funktionsanalyse von Mixl1 und Nrarp mittels RNA-Interferenz durch eingesetzte shRNA-mir-Konstrukte

Die Technik der RNA-Interferenz ermöglicht die Herunterregulierung einer spezifischen Genexpression („knockdown“) (Fire, A. et al., 1998). Diese bereits etablierte Technik wird zur gezielten Erforschung von Genen und ihrer entwicklungs-genetischen Bedeutung eingesetzt (McManus, M. T. et al., 2002, Tang, F. C. et al., 2004, Fewell, G. D. et al., 2006).

Einer Funktionsanalyse von Mixl1 und Nrarp mittels RNA-Interferenz (siehe 1.9., 2.4.8.) gingen Analysen der Effektivität der eingesetzten shRNA-mir-Konstrukte in P19 EC- sowie ES Zellen voraus.

Die vorliegende Analyse der Mixl1-Expression durch eine gezielte Herunterregulierung in P19 EC Zellen zeigte in den 3 Zellklonen keinen auswertbaren Effekt, da keine signifikante Herunterregulierung der Expression stattfand (siehe Abb. 3.11.).

Die Herunterregulierung der Nrarp-Expression in P19 EC Zellen konnte ausgewertet werden, da 3 von 5 Zellklonen eine signifikante Herunterregulierung der Expression zeigten (siehe Abb. 3.12.). In F1G4 ES Zellen konnten nur 3 Zellklone ohne auswertbare Effekte dargestellt werden (siehe Abb. 3.14.).

Der verwendete Vektor (pSM2c) war bei allen Konstrukten gleich. Die RNA-Interferenz basierte auf einer „small hairpin RNA-microRNA“ (shRNA-mir)-Struktur mit vorgeschalteter DNA-Sequenz eines U6-Promoters. Der U6-Promoter ist ein Polymerase-III-Promoter, der ubiquitär exprimiert wird. Er ist bei vorangegangenen Untersuchungen in murinen Stammzellen bereits erfolgreich eingesetzt worden (Tang, F. C. et al., 2004). Die verwendeten „knockdown“-Konstrukte unterschieden sich nur in der sequenzspezifischen shRNA-mir-Struktur. Die Auswahl der Hairpin-Sequenzen könnte nicht optimal gewesen sein. Einzelne transfizierte Zellklone reagierten mit einer Hochregulierung der Genexpression (siehe Abb. 3.11. - 3.15.). Dies könnte als Artefakt zu deuten sein.

Im Gegensatz dazu funktionierte bei weiteren Analysen mit sequenzspezifischer shRNA-Struktur für das Gen Tnfrsf19 der „knockdown“ sehr gut mit dem eingesetzten Konstrukt. Die

Herunterregulierung der Genexpression war in den P19 EC Zellen (siehe Abb. 3.13.) sowie in den F1G4 ES Zellen (siehe Abb. 3.15.) bei 5-6 auswertbaren Zellklonen signifikant.

4.6. Funktionsanalyse von Tnfrsf19

4.6.1. Die TNF-Genfamilie und die Bedeutung von Tnfrsf19

Die Tumor Nekrose Faktoren (TNF) sind multifunktionelle Zytokine, die über ihre Rezeptoren Signale anregen, die für die normale Entwicklung und Funktion des Immunsystems, bei Zellproliferation, Apoptose sowie Zellantworten auf Stressfaktoren notwendig sind. Sie werden in aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle während einer T-Zell Immunantwort (Arch, R. H. et al., 1998, Baker, S. J. et al., 1998, Bazzoni, F. et al., 1996, Chaudhary, P. M. et al., 1997). Die TNFs wurden 1975 bei Studien über hämorrhagische Nekrosen bei Tumoren entdeckt, da sie als Produkte von Lymphozyten und Makrophagen des Wirtes in der Lage sind, besonders Tumorzellen zu bekämpfen und zu lysieren (Carswell, E. A. et al., 1975). Tnfrsf19 wurde als Transmembranprotein des Typs 1 als Mitglied 19 der Tumor Nekrose Rezeptor Superfamilie charakterisiert (Hu, S. et al., 1999). Troy als Transkriptvariante von Tnfrsf19 unterscheidet sich von diesem durch einen um 68 Aminosäuren längeren C-Terminus im Zytoplasma (Kojima, T. et al., 2000).

Tnfrsf19 wird unter anderem im PSM exprimiert (Prof. Bernhard Herrmann, MPI für molekulare Genetik, Berlin; persönliche Mitteilung). Die Expression von Tnfrsf19 wurde bereits im posterioren Teil des PSM detektiert, scheint aber während der Bildung der Somiten auf das Dermomyotom begrenzt zu bleiben (Buttitta, L. et al., 2003). Weitere Charakterisierungen deuten auf eine Beteiligung am molekularen Oszillator bei der regelmäßigen Somitenbildung hin und auf eine Steuerung über die Wnt-Signalkaskade (Dequeueant, M. L. et al., 2006). In der vorliegenden Microarray-Analyse (siehe Abb. 3.10.) wurde bei einem Vergleich 3 Tage mit DMSO induzierter P19 EC Zellen zu 3 Tage mit DMSO induzierter und zusätzlich Tbx6 überexprimierender P19 EC Zellen eine stärkere Beeinflussung des Expressionsniveaus von Tnfrsf19 durch die zusätzliche Tbx6-Überexpression festgestellt. Diese Daten weisen auf einen Zusammenhang der Tbx6-Expression und der Expression von Tnfrsf19 hin, was eine Bedeutung bei der Differenzierung von PSM und der Segmentierung der Somiten bestätigen würde.

4.6.2. Die Bedeutung des NFκB-Signalwegs im Bezug zu Tnfrsf19 und Somitogenese

Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor κB (NFκB) kommt in allen Zelltypen und Geweben vor (Sen, R. et al., 1986, Sen, R. et al., 1986). Seine Aktivierung ist kritisch bei der Entstehung von Entzündungen. Er ist wichtig bei der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose (Baldwin, A. S., Jr., 1996). Über den Transkriptionsfaktor p65 des NFκB-Signalwegs wird Snail (Gensymbol Snai1), ein Repressor von Cdh1 (Cano, A. et al., 2000), in humanen Colon Adenokarzinomzellen (SW480) aktiviert (Barbera, M. J. et al., 2004). Im Embryo der Fruchtfliege agiert Snail zusammen mit Twist als Hauptregulatorprotein bei der Bildung von Mesoderm (Boulay, J. L. et al., 1987, Thisse, B. et al., 1987). Dabei aktivieren die Faktoren Twist und Dorsal zusammen die Expression von Snail (Simpson, P., 1983, Ip, Y. T. et al., 1992). Durch Phosphorylierung von Cactus, dem Inhibitor von Dorsal, wird Cactus degradiert und Dorsal kann im Nukleus die Transkription spezifischer Gene in der Fruchtfliege regulieren. Dadurch werden die mesodermalen Faktoren Twist und Snail exprimiert.

Der Faktor Dorsal entspricht NFκB im Säugerembryo, während Cactus IκB entspricht. In Säugerlymphozyten werden durch Phosphorylierung und somit Degradierung des NFκB-Inhibitors IκB NFκB und IκB aus ihrem im Zytoplasma bestehenden Komplex voneinander gelöst. NFκB kann daraufhin im Nukleus die Transkription entsprechender Zielgene wie Snail aktivieren. Die auffällige Homologie dieser beiden Signalwege (Cao, Z. et al., 1996, Gonzalez-Crespo, S. et al., 1994, Gilbert, S. F., 2006) lässt eine Rolle von NFκB bei der Bildung des Mesoderms im Säugerembryo über den Faktor Snail vermuten. In Zellanalysen humaner Colon Adenokarzinomzellen (SW480) wurde bereits eine Stimulation von Snail über p65 des NFκB-Signalwegs bestätigt (Barbera, M. J. et al., 2004). Zudem zeigen Nullmutanten von IKK1, eine bei der Aktivierung des NFκB-Signalwegs beteiligten IκBα-Kinase, einen skeletalen Phänotyp mit verkürzten, unterentwickelten Hinterextremitäten und Schwanz sowie kraniofazialen Missbildungen (Li, Q. et al., 1999). Dies deutet auf eine Beteiligung des NFκB-Signalwegs bei der Somitogenese hin.

In 293Human Embryonic Kidney-EBNA-Zellen (HEK-EBNA) sowie bei Überexpressionsversuchen in HEK 293T-Zellen konnte eine Aktivierung des NFκB-Signalwegs durch Tnfrsf19 (Syn.TAJ) festgestellt werden (Eby, M. T. et al., 2000, Kojima, T. et al., 2000). Die Aktivierung von NFκB wurde parallel durch die dominant negativen Formen der Tnfrsf19 Rezeptor assoziierten Faktoren 2, 5 und 6 (TRAF2, 5 und 6) gehemmt (Kojima, T. et al., 2000). TRAF5 wurde zudem als beteiligtes Gen des molekularen Oszillators in der regelmäßigen Somitenbildung charakterisiert (Dequeant, M. L. et al., 2006). Der Cdh1-Repressor Snail wird über Wnt reguliert (Yook, J. I. et al., 2005) und Tnfrsf19 ist ein Zielgen

von Wnt im PSM (Dequeant, M. L. et al., 2006). NFκB wird über Tnfrsf19 sowie dessen Rezeptor assoziierten Faktoren 2,5 und 6 reguliert (Eby, M. T. et al., 2000, Kojima, T. et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass Tnfrsf19 möglicherweise über den NFκB-Signalweg Snail reguliert und somit negativ auf die Epithelialisierung und PSM-Segmentierung einwirkt. Die vorliegenden Microarray-Analysedaten (siehe Abb. 3.10. und 4.6.1.) weisen ausserdem auf einen Einfluss von Tbx6 auf Tnfrsf19 hin. Folgende Schemazeichnung soll den Versuch einer Einordnung von Tnfrsf19 in der Somitogenese verdeutlichen (siehe Abb. 4.1.):

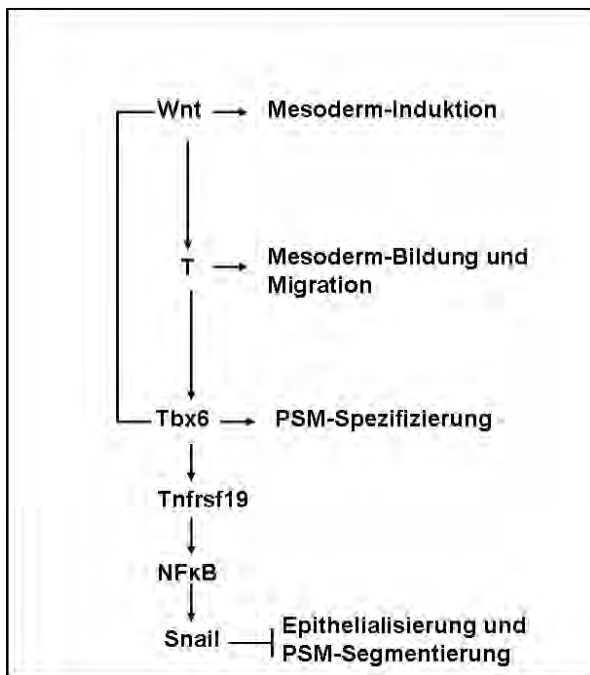


Abb. 4.1.: Versuch der Intergration von Tnfrsf19 in den Prozess der Epithelialisierung und Segmentierung präsomitischen Mesoderms (PSM)

Das Signalmolekül Wnt sowie der Transkriptionsfaktor T spielen eine Rolle bei der Induktion sowie Bildung und Migration von Mesoderm. Der Transkriptionsfaktor Tbx6, essentiell für die Spezifizierung von PSM, wird über Wnt beeinflusst. Tnfrsf19 als Zielgen von Wnt und Tbx6 könnte über NfκB den Faktor Snail aktivieren, der inhibitorisch auf die Epithelialisierung und PSM-Segmentierung wirkt.

4.6.3. In vivo Genfunktionsverlust- und Genfunktionsgewinnexperimente mit Tnfrsf19

Eine Genfunktionsverlustanalyse durch „knockdown“ von Tnfrsf19, das Herunterregulieren der Genexpression durch RNA-Interferenz, zeigte bei den untersuchten Mausembryonen (E10,5) keinen Phänotyp (siehe Abb. 3.16.). Der Befund könnte darin begründet sein, dass Tnfrsf19 keine essentielle Funktion ausübt. Andere Rezeptoren wie Aktivin-, Serinkinase- oder Thyrosinkinase-rezeptoren könnten den Verlust der verminderten Expression von Tnfrsf19 komplementiert haben.

Um ausgleichende Einflüsse weiterer aktiver Signalfaktoren zu unterdrücken, wurde Tnfrsf19 in vermutlich dominant negativer Form eingesetzt. Aufgrund der Proteinstruktur wurde ein dominant negativer Effekt postuliert. Die fehlende intrazelluläre Domäne des Rezeptors sollte

durch Unterbrechung der Signalweiterleitung aller Signalfaktoren der TNF-Familie einen dominant negativen Einfluss auf diesen Signalweg ausüben. Demnach hätte die nachfolgende Inhibierung des NfκB-Signalwegs zu einer verminderten oder unterbrochenen Segmentierung der Somiten führen sollen. Ein erfolgreicher Einsatz dominant negativer Rezeptoren in Krallenfrosch, Fruchtfliege und in verschiedenen Zelllinien (293T, Cos7) wurde bereits dokumentiert (Lin, G. et al., 2008, Amaya, E. et al., 1991, Wouda, R. R. et al., 2008, Song, J. et al., 2008).

Vergleichend wurde Tnfrsf19 als Isoform in voller Länge eingesetzt, um durch eine Überproduktion an Protein eine mögliche Veränderung der Segmentierung der Somiten hervorzurufen.

Beide Genfunktionsgewinnexperimente mit Tnfrsf19 als Isoform in voller Länge (siehe Abb. 3.18.) sowie als vermutlich dominant negativer Rezeptor (siehe Abb. 3.17.) zeigten bei den untersuchten Mausembryonen (E9,5) keinen Phänotyp.

Die injizierten Konstrukte schienen funktionstüchtig. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) markierte die Zellen, die das Konstrukt exprimieren. Dies wurde durch die in situ-Hybridisierung sichtbar. Eine pronukleare Injektion führt zu wenigen transgenen Embryonen bei einer großen Menge an behandelten Embryonen (siehe 2.2.3.). Die verwendete Technik der pronuklearen Injektion gewährt eine Integration des Konstruktes in alle Zellen, wobei die Expression des Konstruktes abhängig vom Promoter ist. Dennoch könnte eine Abhängigkeit vom Integrationsort zu Unterschieden in der Expression des Konstruktes führen. Dies könnte ein Grund für die unterschiedlich starke Expression des Konstruktes sein, da im Gegensatz zum transgenen Embryo #1 (siehe Abb. 3.17. A-C) Embryo #3 nur eine punktförmige Expression aufweist (siehe Abb. 3.17. D-F). Möglicherweise war die Expression insgesamt nicht dominant genug, um einen Phänotyp zu produzieren.

Da kein Phänotyp durch die Injektion verschiedener Isoformen zu detektieren war, könnte das eingesetzte Konstrukt nicht voll funktionstüchtig gewesen sein. Dies ist aber unwahrscheinlich, da das Konstrukt zu Beginn auf seine Funktion hin kontrolliert wurde.

Zudem ist eine falsche Hypothese zu Beginn des Experimentes möglich. Das Fehlen der intrazellulären Domäne von Tnfrsf19 könnte nicht dominant negativ wirken, da die Funktion des TNF-Signalwegs in anderer Weise als zuvor angenommen ausgeprägt ist.

Die Verbindung der verschiedenen Rezeptortypen untereinander ist eine wichtige Voraussetzung eines dominant negativen Effekts. Da noch nicht geklärt ist, ob Tnfrsf19 allein oder als Dimer mit anderen Rezeptoren der Signalweiterleitung dient, könnte dies auch ein Grund für die nicht erfolgte phänotypische Auswirkung des dominant negativen Rezeptors gewesen sein.

Troy, eine Transkriptvariante von Tnfrsf19, unterscheidet sich von diesem durch einen um 68 Aminosäuren längeren C-Terminus im Zytoplasma (Kojima, T. et al., 2000). Auch der Troy

knockout ließ keinen Phänotyp erkennen. Nullmutanten von Troy zeigten keine physischen Auffälligkeiten oder Veränderungen bei Verhalten, Fortbewegung und Fortpflanzung (Shao, Z. et al., 2005).

Eine Einordnung der spezifischen Rolle von Tnfrsf19 in der Somitogenese bleibt offen und ist weiterhin zu klären.

5. Zusammenfassung

Die Embryogenese beruht auf einer Vielzahl von räumlich und zeitlich kontrollierten Prozessen, die aufeinander aufbauen. Ein wesentlicher Prozess bei der Bildung der Körperanlage und bei der Organogenese ist die Mesodermbildung. Sie beginnt mit der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT), bei der epitheliale Zellen in mesenchymale Zellen umgestaltet werden, die dann in verschiedene Richtungen weiter differenzieren können. Darunter befindet sich das sogenannte präsomitische Mesoderm (PSM), aus dem die Somiten hervorgehen. Somiten sind u.a. die Vorläufer der Wirbelkörper und der Skelettmuskulatur.

Embryonale Prozesse wie die Mesodermbildung werden durch noch nicht vollkommen aufgeklärte Netzwerke von Regulatorgenen gesteuert. Eine Charakterisierung des Zusammenspiels aller beteiligten Regulatorgene ist daher elementar für die Aufklärung von Vorgängen in der frühen Embryogenese, wie EMT und Mesodermbildung und würde zudem zum Verständnis von Vorgängen in der Tumorprogression und Metastasierung beitragen, da die EMT auch hierbei einen zentralen Vorgang darstellt.

P19 Embryonale Carcinoma (P19 EC) Zellen dienen als Zellkulturmodell pluripotenter Stammzellen *in vitro*. Sie können *in vitro* zur Mesodermbildung induziert werden und damit zur Identifizierung von Regulatorgenen der Mesodermbildung verwendet werden.

Die Charakterisierung der P19 EC Zellen mittels einer Antikörpermarkierung wies auf einen epithelialen Zelltyp mit Stammzeleigenschaften hin. Sie exprimierten die Markergene *Cdh1* und *Oct4*, die epitheliale Zellcharakteristik und Pluripotenz anzeigen; eine Expression des mesenchymalen Markers *Vim* wurde im Gegensatz dazu nicht detektiert.

Mittels Aktivierung der Wnt-Signalkaskade, die ein bei der EMT wichtiges Regelnetzwerk darstellt, sollte eine gezielte Induktion der P19 EC Zellen in Richtung Mesoderm ermöglicht werden. Alternativ sollte eine Differenzierung der P19 EC Zellen zu Mesoderm bzw. PSM mittels der Zugabe von DMSO oder einer *Tbx6*-Überexpression in den P19 EC Zellen untersucht werden. Mithilfe einer Microarray-Analyse sollte ein Gesamtüberblick über die sich dabei in ihrem Expressionsniveau verändernden Gene möglich werden. Durch Funktionsanalysen einzelner sich darin signifikant verändernder Gene wäre eine Eingliederung dieser Gene mit ihrer Funktion bei EMT und Somitogenese sowie im Embryo möglich.

Eine gezielte Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch die Induktion mit Wnt3a oder SB216763, als Inhibitor von Gsk3 β , einem wichtigen Enzym in der Wnt-Signalkaskade, war nicht möglich. P19 EC Zellen ließen sich demnach nicht mittels der Wnt-Signalkaskade zu einer Differenzierung en bloc in Richtung Rumpfmesoderm induzieren.

Eine unspezifische Mesoderm-Induktion der P19 EC Zellen mit DMSO war dagegen möglich. Mittels Expressionsprofilierung auf einem Microarray konnten Mesoderm-spezifische Gene identifiziert werden. Der gleiche Effekt konnte allein durch Überexpression von Tbx6, einem essentiellen Regulator im PSM, erzielt werden. 24 Gene wurden bereits durch die alleinige Tbx6-Überexpression in den P19 EC Zellen beeinflusst. Aus diesen Genen wurden 12 auch durch die DMSO-Induktion allein reguliert. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Tbx6 in Kombination mit DMSO-Induktion begünstigte die Differenzierung der P19 EC Zellen in Richtung PSM.

Tbx6 führte unter anderem zur Aktivierung der Regulatorgene Mixl1, Nrarp und Tnfrsf19, die für die weitere Funktionsanalyse mittels RNA-Interferenz ausgewählt wurden. Ein „knockdown“ der Expression in P19 EC- und in ES Zellen war aber mit den dafür hergestellten Konstrukten nur mit Tnfrsf19 erzielbar. In vivo im Embryo erzielte jedoch auch dieses knockdown-Konstrukt keinen Phänotyp. Weitere Funktionsanalysen mittels Überexpression von Tnfrsf19 und einer vermutlichen dominant negativen Variante dieses Gens in vivo zeigten ebenfalls keinen Phänotyp.

Tnfrsf19 wurde sowohl als Zielgen des Wnt-Signalwegs als auch, in den eigenen Analysen aufgrund der Microarray-Daten, als Zielgen von Tbx6 identifiziert und scheint somit eine Rolle bei der Bildung von PSM zu spielen. Die vorliegende Arbeit erbrachte einen Hinweis auf eine Rolle von Tnfrsf19 bei der Bildung von PSM sowie der Somitogenese und identifizierte weitere Kontrollgene der EMT und Mesodermbildung im Mausembryo.

6. Summary

Functional characterization of genes involved in the regulation of EMT and somitogenesis in the mouse embryo

Embryogenesis is based on many locally and temporally controlled processes which are coordinated to each other. The formation of mesoderm is an essential process while forming the anlage of the bodyplan and during organogenesis. It starts with the epithelial mesenchymal transition (EMT) in which epithelial cells are transfigured to mesenchymal cells which are, then, able to differentiate into distinct directions. Among these mesenchymal cells the so called presomitic mesoderm (PSM) is situated, from which the somites emerge. Somites are the precursors of the vertebrae and the skeletal muscles.

Embryonic processes such as mesoderm formation are controlled by signalling cascades of regulatory genes, which are yet not fully analyzed. The characterization of the interaction of all regulatory genes is therefore fundamental for the understanding of processes of early embryogenesis such as EMT and mesoderm formation. It also would help to understand processes during tumor progression and metastasis as EMT is also a pivotal event during these processes.

P19 Embryonic Carcinoma (P19 EC) cells served as a cell culture model for pluripotent stem cells in vitro. They can be induced to formate mesoderm in vitro. They are, therefore, predestined to identify regulatory genes in mesoderm formation. The characterization of P19 EC cells using antibody staining furthermore indicates an epithelial cell type with stem cell features. The cells expressed the genes Cdh1 and Oct4 which are essential to identify epithelial cell characteristics and pluripotency. In contrast the cells didn't express Vim, which is an essential gene to identify mesenchymal characteristics.

Directed induction of P19 EC cells to differentiate to mesoderm should be possible by activation of the Wnt signalling cascade, which is an essential regulatory network of EMT. Alternatively differentiation of P19 EC cells to mesoderm or presomitic mesoderm should be analyzed while using DMSO or overexpression of Tbx6 in P19 EC cells. An overview of all genes changing their expression level should be analyzed via expression profiling on microarrays. Functional characterization of individual genes, which are significantly modified in their expression level, could help to integrate these genes and their function in EMT, somitogenesis as well as in the embryo.

It was not impossible to induce directly the Wnt signalling cascade in P19 EC cells using Wnt3a or SB216763, an inhibitor of Gsk3 β , an important enzyme of the Wnt signalling

cascade. According to that there was no measured induction of the Wnt signalling cascade in P19 EC cells to differentiate en bloc into trunk mesoderm.

It was possible to induce a non-specific mesoderm induction of P19 EC cells with DMSO. Mesoderm-specific genes were identified via expression profiling on microarrays. The same effect could be attained with exclusive overexpression of Tbx6, an essential regulatory gene within the PSM. 24 genes were influenced by the exclusive Tbx6-overexpression in P19 EC cells. 12 of those 24 genes were also regulated exclusively by DMSO-induction. Overexpressing the transcription factor Tbx6 in combination with DMSO was promoting the differentiation of P19 EC cells towards PSM.

Among other things Tbx6 were activating the regulatory genes Mixl1, Nrarp and Tnfrsf19, whose functions were to be analyzed via RNA-interference. The only significant “knockdown” of the expression in P19 EC and ES cells with the established constructs was attained with Tnfrsf19. However, in vivo no embryonic phenotype was observed using this construct. Further functional analysis of overexpressing Tnfrsf19 and a probably dominant-negative isoform of this gene did likewise not show any phenotype.

Tnfrsf19 as target gene of the Wnt-signaling cascade was also identified as target gene of Tbx6 in our analysis of the microarray data. Thus it seems to be relevant in the formation of PSM. The present thesis supplied indication on Tnfrsf19 being relevant in the formation of PSM and in somitogenesis and identified controlling genes of EMT and mesoderm formation in the mouse embryo.

7. Literaturverzeichnis

- AMAYA, E. , MUSCI, T. J.KIRSCHNER, M. W., 1991: *Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in Xenopus embryos*. Cell, 66, 257-70.
- ANDREWS, P. W., 2002: *From teratocarcinomas to embryonic stem cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 357, 405-17.
- ARCH, R. H. , GEDRICH, R. W.THOMPSON, C. B., 1998: *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death*. Genes Dev, 12, 2821-30.
- ARMOUR, C. , GARSON, K.MCBURNEY, M. W., 1999: *Cell-cell interaction modulates myoD-induced skeletal myogenesis of pluripotent P19 cells in vitro*. Exp Cell Res, 251, 79-91.
- ARNOLD, S. J. , STAPPERT, J. , BAUER, A., et al., 2000: *Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Mech Dev, 91, 249-58.
- AULEHLA, A.JOHNSON, R. L., 1999: *Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation*. Dev Biol, 207, 49-61.
- AULEHLA, A. , WEHRLE, C. , BRAND-SABERI, B., et al., 2003: *Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis*. Dev Cell, 4, 395-406.
- BABAIE, Y. , HERWIG, R. , GREBER, B., et al., 2007: *Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 25, 500-10.
- BAKER, S. J.REDDY, E. P., 1998: *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. Oncogene, 17, 3261-70.
- BALDWIN, A. S., JR., 1996: *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 14, 649-83.
- BARBERA, M. J. , PUIG, I. , DOMINGUEZ, D., et al., 2004: *Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells*. Oncogene, 23, 7345-54.
- BAZZONI, F.BEUTLER, B., 1996: *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med, 334, 1717-25.
- BEDDINGTON, R. S.ROBERTSON, E. J., 1998: *Anterior patterning in mouse*. Trends Genet, 14, 277-84.

- BEHRENS, J. , JERCHOW, B. A. , WURTELE, M., et al., 1998: *Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta*. Science, 280, 596-9.
- BESHO, Y. , MIYOSHI, G. , SAKATA, R., et al., 2001: *Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm*. Genes Cells, 6, 175-85.
- BLUM, M. , GAUNT, S. J. , CHO, K. W., et al., 1992: *Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene goosecoid*. Cell, 69, 1097-106.
- BOULAY, J. L. , DENNEFELD, C. ALBERGA, A., 1987: *The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers*. Nature, 330, 395-8.
- BOYER, L. A. , LEE, T. I. , COLE, M. F., et al., 2005: *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 122, 947-56.
- BRADLEY, A. , EVANS, M. , KAUFMAN, M. H., et al., 1984: *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 309, 255-6.
- BUTTITTA, L. , TANAKA, T. S. , CHEN, A. E., et al., 2003: *Microarray analysis of somitogenesis reveals novel targets of different WNT signaling pathways in the somitic mesoderm*. Dev Biol, 258, 91-104.
- CANO, A. , PEREZ-MORENO, M. A. , RODRIGO, I., et al., 2000: *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2, 76-83.
- CAO, Z. , HENZEL, W. J. GAO, X., 1996: *IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor*. Science, 271, 1128-31.
- CARSWELL, E. A. , OLD, L. J. , KASSEL, R. L., et al., 1975: *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 72, 3666-70.
- CHAMBERS, I., 2004: *The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells*. Cloning Stem Cells, 6, 386-91.
- CHAMBERS, I. , COLBY, D. , ROBERTSON, M., et al., 2003: *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 113, 643-55.
- CHAPMAN, D. L. , AGULNIK, I. , HANCOCK, S., et al., 1996: *Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation*. Dev Biol, 180, 534-42.
- CHAPMAN, D. L. , COOPER-MORGAN, A. , HARRELSON, Z., et al., 2003: *Critical role for Tbx6 in mesoderm specification in the mouse embryo*. Mech Dev, 120, 837-47.
- CHAPMAN, D. L. PAPAIOANNOU, V. E., 1998: *Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6*. Nature, 391, 695-7.
- CHAUDHARY, P. M. , EBY, M. , JASMIN, A., et al., 1997: *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. Immunity, 7, 821-30.

- CHAWENGSAKSOPHAK, K. , DE GRAAFF, W. , ROSSANT, J., et al., 2004: *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 7641-5.
- CIRUNA, B. G. , SCHWARTZ, L. , HARPAL, K., et al., 1997: *Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak*. Development, 124, 2829-41.
- CONLON, F. L. , LYONS, K. M. , TAKAESU, N., et al., 1994: *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development, 120, 1919-28.
- CONLON, R. A. , REAUME, A. G.ROSSANT, J., 1995: *Notch1 is Required for the Coordinate Segmentation of Somites*. Development, 121, 1533-1545.
- CROSSLEY, P. H.MARTIN, G. R., 1995: *The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo*. Development, 121, 439-51.
- DE LANGHE, S. P. , SALA, F. G. , DEL MORAL, P. M., et al., 2005: *Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung*. Dev Biol, 277, 316-31.
- DEQUEANT, M. L. , GLYNN, E. , GAUDENZ, K., et al., 2006: *A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock*. Science, 314, 1595-8.
- DOENCH, J. G. , PETERSEN, C. P.SHARP, P. A., 2003: *siRNAs can function as miRNAs*. Genes Dev, 17, 438-42.
- DUBRULLE, J. , MCGREW, M. J.POURQUIE, O., 2001: *FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation*. Cell, 106, 219-32.
- DUNTY, W. C., JR. , BIRIS, K. K. , CHALAMALASETTY, R. B., et al., 2008: *Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation*. Development, 135, 85-94.
- EBY, M. T. , JASMIN, A. , KUMAR, A., et al., 2000: *TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death*. J Biol Chem, 275, 15336-42.
- EDWARDS, M. K. , HARRIS, J. F.MCBURNEY, M. W., 1983: *Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line*. Mol Cell Biol, 3, 2280-6.
- ELBASHIR, S. M. , HARBORTH, J. , LENDECKEL, W., et al., 2001: *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 411, 494-8.
- EVANS, M. J.KAUFMAN, M. H., 1981: *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 292, 154-6.

- EVRRARD, Y. A. , LUN, Y. , AULEHLA, A., et al., 1998: *lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning*. Nature, 394, 377-81.
- FAIELLA, A. , D'ESPOSITO, M. , RAMBALDI, M., et al., 1991: *Isolation and mapping of EVX1, a human homeobox gene homologous to even-skipped, localized at the 5' end of HOX1 locus on chromosome 7*. Nucleic Acids Res, 19, 6541-5.
- FELGNER, P. L. , GADEK, T. R. , HOLM, M., et al., 1987: *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 7413-7.
- FEWELL, G. D.SCHMITT, K., 2006: *Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens*. Drug Discov Today, 11, 975-82.
- FILOSA, S. , RIVERA-PEREZ, J. A. , GOMEZ, A. P., et al., 1997: *Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis*. Development, 124, 2843-54.
- FIRE, A. , XU, S. , MONTGOMERY, M. K., et al., 1998: *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 391, 806-11.
- FORSBERG, H. , CROZET, F.BROWN, N. A., 1998: *Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation*. Curr Biol, 8, 1027-30.
- GARCIA-CASTRO, M. I. , VIELMETTER, E.BRONNER-FRASER, M., 2000: *N-Cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry*. Science, 288, 1047-51.
- GEARING, D. P. , GOUGH, N. M. , KING, J. A., et al., 1987: *Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)*. EMBO J, 6, 3995-4002.
- GEORGE, S. H. , GERTSENSTEIN, M. , VINTERSTEN, K., et al., 2007: *Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 4455-60.
- GILBERT, S. F., 2006: *Developmental Biology, 8th edition*. 8th edn.
- GONZALEZ-CRESPO, S.LEVINE, M., 1994: *Related target enhancers for dorsal and NF-kappa B signaling pathways*. Science, 264, 255-8.
- GREENBURG, G.HAY, E. D., 1982: *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 95, 333-9.
- GUO, S.KEMPHUES, K. J., 1995: *par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed*. Cell, 81, 611-20.
- HAMILTON, A. J.BAULCOMBE, D. C., 1999: *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 286, 950-2.

- HAMMOND, S. M., CAUDY, A.A., HANNON, G.J., 2001: *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA*. Nature Reviews Genetics, 2, 110-119.
- HARRISON, S. M. , HOUZELSTEIN, D. , DUNWOODIE, S. L., et al., 2000: *Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury*. Dev Biol, 227, 358-72.
- HERR, W.CLEARY, M. A., 1995: *The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain*. Genes Dev, 9, 1679-93.
- HERRMANN, B. G. , LABEIT, S. , POUSTKA, A., et al., 1990: *Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse*. Nature, 343, 617-22.
- HOFMANN, M. , SCHUSTER-GOSSLER, K. , WATABE-RUDOLPH, M., et al., 2004: *WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos*. Genes Dev, 18, 2712-7.
- HOGAN, B. L., 1996: *Bone morphogenetic proteins in development*. Curr Opin Genet Dev, 6, 432-8.
- HRABE DE ANGELIS, M. , MCINTYRE II, J.GOSSLER, A., 1997: *Maintenance of Somite Borders in Mice Requires the Delta Homologue Dll1*. Nature, 386, 717-721.
- HU, S. , TAMADA, K. , NI, J., et al., 1999: *Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. Genomics, 62, 103-7.
- HUELSKEN, J. , VOGEL, R. , BRINKMANN, V., et al., 2000: *Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice*. J Cell Biol, 148, 567-78.
- HUKRIEDE, N. A. , TSANG, T. E. , HABAS, R., et al., 2003: *Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation*. Dev Cell, 4, 83-94.
- INOUE, T. , KAWAJI, T. , INOUE-MOCHITA, M., et al., 2007: *Media conditioned by retinal pigment epithelial cells suppress the canonical Wnt pathway*. Neurosci Lett, 424, 190-3.
- IP, Y. T. , PARK, R. E. , KOSMAN, D., et al., 1992: *dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo*. Genes Dev, 6, 1518-30.
- ITOH, N.ORNITZ, D. M., 2008: *Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family*. Dev Dyn, 237, 18-27.
- JIA, L. , MIAO, C. , CAO, Y., et al., 2008: *Effects of Wnt proteins on cell proliferation and apoptosis in HEK293 cells*. Cell Biol Int, 32, 807-13.
- JONES-VILLENEUVE, E. M. , MCBURNEY, M. W. , ROGERS, K. A., et al., 1982: *Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells*. J Cell Biol, 94, 253-62.

- JOUVE, C. , PALMEIRIM, I. , HENRIQUE, D., et al., 2000: *Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm.* Development, 127, 1421-9.
- KAN, L. , ISRASENA, N. , ZHANG, Z., et al., 2004: *Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis.* Dev Biol, 269, 580-94.
- KAWAI, J. , SHINAGAWA, A. , SHIBATA, K., et al., 2001: *Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection.* Nature, 409, 685-90.
- KING, C. C. , BEATTIE, G. M. , LOPEZ, A. D., et al., 2008: *Generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells cultured in feeder layer-free conditions.* Regen Med, 3, 175-80.
- KISPERT, A.HERRMANN, B. G., 1993: *The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein.* EMBO J, 12, 3211-20.
- KITAGAWA, H. , FUJITA, M. , ITO, N., et al., 2000: *Molecular cloning and expression of a novel chondroitin 6-O-sulfotransferase.* J Biol Chem, 275, 21075-80.
- KITAJIMA, S. , TAKAGI, A. , INOUE, T., et al., 2000: *MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm.* Development, 127, 3215-26.
- KOJIMA, T. , MORIKAWA, Y. , COPELAND, N. G., et al., 2000: *TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles.* J Biol Chem, 275, 20742-7.
- LEE, H. , HABAS, R.ABATE-SHEN, C., 2004: *MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis.* Science, 304, 1675-8.
- LI, Q. , LU, Q. , HWANG, J. Y., et al., 1999: *IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton.* Genes Dev, 13, 1322-8.
- LI, Y. X. , FARRELL, M. J. , LIU, R., et al., 2000: *Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish.* Dev Biol, 217, 394-405.
- LIN, G.SLACK, J. M., 2008: *Requirement for Wnt and FGF signaling in Xenopus tadpole tail regeneration.* Dev Biol, 316, 323-35.
- LINDSLEY, R. C. , GILL, J. G. , KYBA, M., et al., 2006: *Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm.* Development.
- LIU, C. , LI, Y. , SEMENOV, M., et al., 2002: *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism.* Cell, 108, 837-47.
- LIU, P. , WAKAMIYA, M. , SHEA, M. J., et al., 1999: *Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation.* Nat Genet, 22, 361-5.
- LOGAN, C. Y.NUSSE, R., 2004: *The Wnt signaling pathway in development and disease.* Annu Rev Cell Dev Biol, 20, 781-810.

- MANSOURI, A. , VOSS, A. K. , THOMAS, T., et al., 2000: *Uncx4.1 is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of Pax9*. Development, 127, 2251-8.
- MANSOURI, A. , YOKOTA, Y. , WEHR, R., et al., 1997: *Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system*. Dev Dyn, 210, 53-65.
- MARTIN, G. R., 1981: *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78, 7634-8.
- MARTIN, G. R. EVANS, M. J., 1975: *Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 72, 1441-5.
- MASSAGUE, J., 2000: *How cells read TGF-beta signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 1, 169-78.
- MASSAGUE, J. CHEN, Y. G., 2000: *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 14, 627-44.
- MCBURNEY, M. W., 1976: *Clonal lines of teratocarcinoma cells in vitro: differentiation and cytogenetic characteristics*. J Cell Physiol, 89, 441-55.
- MCBURNEY, M. W., 1993: *P19 embryonal carcinoma cells*. Int J Dev Biol, 37, 135-40.
- MCBURNEY, M. W. , JONES-VILLENEUVE, E. M. , EDWARDS, M. K., et al., 1982: *Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line*. Nature, 299, 165-7.
- MCBURNEY, M. W., JONES-VILLENEUVE, E.M.V., EDWARDS, M. AND ANDERSON, P., 1982: *Controlled differentiation of teratocarcinoma cells in culture*. Nature, 299, 165-167.
- MCBURNEY, M. W. ROGERS, B. J., 1982: *Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns*. Dev Biol, 89, 503-8.
- MCGREW, M. J. , DALE, J. K. , FRABOULET, S., et al., 1998: *The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos*. Curr Biol, 8, 979-82.
- MCMANUS, M. T. SHARP, P. A., 2002: *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 3, 737-47.
- MIN, H. , DANILENKO, D. M. , SCULLY, S. A., et al., 1998: *Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless*. Genes Dev, 12, 3156-61.
- MITIKU, N. BAKER, J. C., 2007: *Genomic analysis of gastrulation and organogenesis in the mouse*. Dev Cell, 13, 897-907.
- MITSUI, K. , TOKUZAWA, Y. , ITOH, H., et al., 2003: *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell, 113, 631-42.

- MIYATANI, S. , COPELAND, N. G. , GILBERT, D. J., et al., 1992: *Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse N-cadherin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 8443-7.
- MORRISEY, E. E. , IP, H. S. , LU, M. M., et al., 1996: *GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm*. Dev Biol, 177, 309-22.
- NAGY, A. , GERTSENSTEIN, M. , VINTERSTEN, K., et al., 2003: *Manipulating the Mouse Embryo*
A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: John Inglis.
- NAKAGIRI, S. , MURAKAMI, A. , TAKADA, S., et al., 2005: *Viral FLIP enhances Wnt signaling downstream of stabilized beta-catenin, leading to control of cell growth*. Mol Cell Biol, 25, 9249-58.
- NICOLAS, J. F. , AVNER, P. , GAILLARD, J., et al., 1976: *Cell lines derived from teratocarcinomas*. Cancer Res, 36, 4224-31.
- NUSSE, R.VARMUS, H. E., 1992: *Wnt genes*. Cell, 69, 1073-87.
- OHUCHI, H. , HORI, Y. , YAMASAKI, M., et al., 2000: *FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development*. Biochem Biophys Res Commun, 277, 643-9.
- OKAMOTO, K. , OKAZAWA, H. , OKUDA, A., et al., 1990: *A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells*. Cell, 60, 461-72.
- OKUDA, A. , FUKUSHIMA, A. , NISHIMOTO, M., et al., 1998: *UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells*. EMBO J, 17, 2019-32.
- PADDISON, P. J., CAUDY, A.A., BERNSTEIN,E., HANNON,G.J.,CONKLIN, D.S., 2002: *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes And Development, 16, 948-958.
- PEARCE, J. J.EVANS, M. J., 1999: *Mml, a mouse Mix-like gene expressed in the primitive streak*. Mech Dev, 87, 189-92.
- PESCE, M.SCHOLER, H. R., 2001: *Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development*. Stem Cells, 19, 271-8.
- PIROT, P. , VAN GRUNSVEN, L. A. , MARINE, J. C., et al., 2004: *Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 322, 526-34.
- PISPA, J. , MIKKOLA, M. L. , MUSTONEN, T., et al., 2003: *Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis*. Gene Expr Patterns, 3, 675-9.

- POURQUIE, O., 2001: *Vertebrate somitogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 311-50.
- POURQUIE, O., 2003: *Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation?* *Int J Dev Biol*, 47, 597-603.
- QIU, W. , ANDERSEN, T. E. , BOLLERSLEV, J., et al., 2007: *Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells*. *J Bone Miner Res*, 22, 1720-31.
- ROBERTSON, E. , BRADLEY, A. , KUEHN, M., et al., 1986: *Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector*. *Nature*, 323, 445-8.
- ROSSANT, J.MCBURNEY, M. W., 1982: *The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection*. *J Embryol Exp Morphol*, 70, 99-112.
- RUDNICKI, M. A. , JACKOWSKI, G. , SAGGIN, L., et al., 1990: *Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells*. *Dev Biol*, 138, 348-58.
- RUDNICKI, M. A., MCBURNEY, M.W., 1987: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* Washington, DC: E.J. Robertson, Ed.
- SAGA, Y. , HATA, N. , KOBAYASHI, S., et al., 1996: *MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation*. *Development*, 122, 2769-78.
- SAIKI, R. K. , GELFAND, D. H. , STOFFEL, S., et al., 1988: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 239, 487-91.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. , FRITSCH, E.F., 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Sambrook Fritsch edn.
- SCHIER, A. F., 2003: *Nodal signaling in vertebrate development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 589-621.
- SCHOLER, H. R. , DRESSLER, G. R. , BALLING, R., et al., 1990: *Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex*. *EMBO J*, 9, 2185-95.
- SEKINE, K. , OHUCHI, H. , FUJIWARA, M., et al., 1999: *Fgf10 is essential for limb and lung formation*. *Nat Genet*, 21, 138-41.
- SEN, R.BALTIMORE, D., 1986: *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. *Cell*, 47, 921-8.
- SEN, R.BALTIMORE, D., 1986: *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. *Cell*, 46, 705-16.
- SHAO, Z. , BROWNING, J. L. , LEE, X., et al., 2005: *TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration*. *Neuron*, 45, 353-9.

- SHIMOMURA, O. , JOHNSON, F. H.SAIGA, Y., 1962: *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 59, 223-39.
- SIMPSON, P., 1983: *Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in Drosophila Embryos*. Genetics, 105, 615-632.
- SIMPSON, R. J. , HILTON, D. J. , NICE, E. C., et al., 1988: *Structural characterization of a murine myeloid leukaemia inhibitory factor*. Eur J Biochem, 175, 541-7.
- SONG, J. , PARK, S. , KIM, M., et al., 2008: *Down-regulation of Notch-dependent transcription by Akt in vitro*. FEBS Lett, 582, 1693-9.
- STEVENS, L. C., 1970: *The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos*. Dev Biol, 21, 364-82.
- STEWART, C. L. , KASPAR, P. , BRUNET, L. J., et al., 1992: *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 359, 76-9.
- SUN, X. , MEYERS, E. N. , LEWANDOSKI, M., et al., 1999: *Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo*. Genes Dev, 13, 1834-46.
- TADA, M. , CASEY, E. S. , FAIRCLOUGH, L., et al., 1998: *Bix1, a direct target of Xenopus T-box genes, causes formation of ventral mesoderm and endoderm*. Development, 125, 3997-4006.
- TAM, P. P.BEHRINGER, R. R., 1997: *Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan*. Mech Dev, 68, 3-25.
- TAM, P. P.TRAINOR, P. A., 1994: *Specification and segmentation of the paraxial mesoderm*. Anat Embryol (Berl), 189, 275-305.
- TANG, F. C. , MENG, G. L. , YANG, H. B., et al., 2004: *Stable suppression of gene expression in murine embryonic stem cells by RNAi directed from DNA vector-based short hairpin RNA*. Stem Cells, 22, 93-9.
- THIERY, J. P., 2002: *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2, 442-54.
- THIERY, J. P., 2003: *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. Curr Opin Cell Biol, 15, 740-6.
- THIERY, J. P.SLEEMAN, J. P., 2006: *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 7, 131-42.
- THISSE, B. , EL MESSAL, M.PERRIN-SCHMITT, F., 1987: *The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern*. Nucleic Acids Res, 15, 3439-53.

- VAN DER HEYDEN, M. A., DEFIZE, L. H., 2003: *Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation.* Cardiovasc Res, 58, 292-302.
- VARLET, I. , COLLIGNON, J., ROBERTSON, E. J., 1997: *nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation.* Development, 124, 1033-44.
- WASTESON, P. , JOHANSSON, B. R. , JUKKOLA, T., et al., 2008: *Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice.* Development, 135, 1823-32.
- WHITTOCK, N. V. , SPARROW, D. B. , WOUTERS, M. A., et al., 2004: *Mutated MESP2 causes spondylocostal dysostosis in humans.* Am J Hum Genet, 74, 1249-54.
- WILLIAMS, R. L. , HILTON, D. J. , PEASE, S., et al., 1988: *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.* Nature, 336, 684-7.
- WILLNOW, T. E. , HILPERT, J. , ARMSTRONG, S. A., et al., 1996: *Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalyn.* Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 8460-4.
- WITTLER, L. , SHIN, E. H. , GROTE, P., et al., 2007: *Expression of Msgn1 in the presomitic mesoderm is controlled by synergism of WNT signalling and Tbx6.* EMBO Rep, 8, 784-9.
- WODARZ, A., NUSSE, R., 1998: *Mechanisms of Wnt signaling in development.* Annu Rev Cell Dev Biol, 14, 59-88.
- WOLPERT, L., BEDDINGTON, R., JESSELL, T., LAWRENCE, P., MEYEROWITZ, E. UND SMITH, J., 2000: *Principles of Development.*
- WOUDA, R. R. , BANSRAJ, M. R. , DE JONG, A. W., et al., 2008: *Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the Drosophila embryonic central nervous system.* Development, 135, 2277-87.
- XIN, M. , DAVIS, C. A. , MOLKENTIN, J. D., et al., 2006: *A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 11189-94.
- YAMADA, G. , UENO, K. , NAKAMURA, S., et al., 1997: *Nasal and pharyngeal abnormalities caused by the mouse gooseoid gene mutation.* Biochem Biophys Res Commun, 233, 161-5.
- YAMAGUCHI, T. P. , TAKADA, S. , YOSHIKAWA, Y., et al., 1999: *T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification.* Genes Dev, 13, 3185-90.
- YASUHIKO, Y. , HARAGUCHI, S. , KITAJIMA, S., et al., 2006: *Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 3651-6.

- YOOK, J. I. , LI, X. Y. , OTA, I., et al., 2005: *Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail*. J Biol Chem, 280, 11740-8.
- YOSHIKAWA, Y. , FUJIMORI, T. , MCMAHON, A. P., et al., 1997: *Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse*. Dev Biol, 183, 234-42.
- ZAMORE, P. D. , TUSCHL, T. , SHARP, P. A., et al., 2000: *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 101, 25-33.
- ZENG, Y. , YI, R., CULLEN, B. R., 2003: *MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 9779-84.
- ZHANG, N., GRIDLEY, T., 1998: *Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice*. Nature, 394, 374-7.
- ZHOU, X. , SASAKI, H. , LOWE, L., et al., 1993: *Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation*. Nature, 361, 543-7.

8. Anhang

8.1. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden gegenüber P19 EC Kontrollzellen

Genname	P19 EC Zellen 3 Tage +DMSO	P19 EC Kontrollzellen	fold change
1110012O05Rik	13,26502677	11,56245237	3,254812417
1600023A02Rik	8,31781965	10,2301641	-3,764203052
2210411K11Rik	7,704923389	9,479919777	-3,422371535
2310015N21Rik	9,518243901	7,665861664	3,610959494
2610009E16Rik	10,63601472	8,885100589	3,365717602
4933424A10Rik	8,128893813	10,43166704	-4,934053046
A230098A12Rik	9,843193989	8,058110629	3,446383768
Agtrl1	9,597340018	7,655856263	3,841004769
Arid3a	10,10378178	8,373852698	3,317115128
Asb4	10,13740269	7,728302953	5,311427818
Atp1b1	8,53121419	10,55993835	-4,080438384
Axin2	9,048088233	7,507117037	2,909903269
B3bp	10,58481306	8,788617452	3,473031779
B430218L07Rik	10,8775171	9,361887066	2,859236647
Bhlhb2	9,535941122	7,669798756	3,645564851
Bmp4	9,336502194	7,71374548	3,079629325
Bscl2	9,464704606	11,04835082	-2,997264101
Bst2	8,236266036	10,55869076	-5,001721488
C86987	9,625476411	7,955807835	3,181414999
Cbx7	8,500649183	10,75583273	-4,773950286
Cdx2	11,35084962	7,708824452	12,48414547
Chst7	10,32131236	7,809648438	5,702774249
Col18a1	8,94197711	10,57399792	-3,099468428
Crip2	8,514588132	10,15117433	-3,109292197
Cxcl12	7,973988063	9,828105722	-3,615305743

8. Anhang

D11Ert759e	10,9734709	8,593318798	5,205916251
Ddah2	10,63800427	8,898831994	3,338435752
Defcr-rs10	9,149379083	7,173914758	3,932547863
Defcr-rs2	10,90292046	7,629771177	9,667543039
Defcr-rs7	9,170122819	7,401017007	3,408426355
Dll3	10,32672569	8,179077448	4,43104887
Dnmt3b	12,03743819	13,77276249	-3,329543307
Dnmt3b	8,015723264	9,877777324	-3,635248682
Dnmt3l	7,256537655	9,06026964	-3,491221726
Dppa4	8,392403176	10,4772776	-4,24238168
Efhd1	7,786430975	9,365637876	-2,988055409
Enc1	7,840158104	9,377485709	-2,902563451
Eno2	9,476943127	7,876815577	3,031701157
Enpp2	7,840486019	10,34545303	-5,67636363
Epha8	7,514188274	9,13330366	-3,071866217
Eras	7,519259828	9,438693405	-3,782745136
Evx1	11,22553574	7,730551987	11,27443906
Fabp3	8,323095786	10,34300922	-4,055594559
Fgf10	10,0046517	7,703129738	4,929775537
Fgf8	9,138090521	7,585700946	2,933025422
Fn1	10,9148173	7,79600836	8,686704349
Fn1	10,72687198	7,8167009	7,517073365
Gap43	7,621797264	9,380200397	-3,383234396
Gbx2	10,86074314	8,057590722	6,979639015
Gclm	8,156243208	9,908150577	-3,368035556
Gdf3	7,824764378	11,32663745	-11,32840678
Gpc3	12,07867249	9,871055869	4,619115511
Greb1	10,76017664	8,436130867	5,007344708
Grsf1	10,47782106	8,882121454	3,022410466
H1fx	9,608977844	7,983548592	3,085339511
H2afy	10,06885419	8,494611611	2,977791173
Hoxb1	9,225589508	7,29561993	3,810471639
Hoxb2	10,84387584	7,777503684	8,376642819
Hoxd4	8,985739198	7,462137817	2,875078567
Hoxd8	9,380561855	7,326895442	4,151597019

8. Anhang

Hoxd9	10,21603018	7,403255305	7,026347221
Hspb1	7,956719835	9,597124732	-3,11753314
Igf2	12,73333738	9,719046875	8,07963715
Lgals3	9,805837402	7,642652104	4,479026797
Lhx1	9,465219082	7,495529343	3,916838759
Lor	9,68646065	7,783379547	3,740111104
Lrp2	7,447345664	9,396563008	-3,861649817
Mesp1	9,573057207	7,366809482	4,614734748
Mixl1	9,375214022	7,432188711	3,845111172
Mrg1	9,570927403	7,713121262	3,624560676
Msx1	11,88102123	8,097643967	13,76924224
Nanog	8,850180721	10,58047139	-3,317946605
Ndg2	10,09593568	13,48726593	-10,49281773
Npy	8,092133712	9,621453843	-2,88649781
Nrp	9,998868016	7,646382406	5,107033811
Nrp	9,384334201	7,675294053	3,269432296
Nup210	9,471861478	11,16229415	-3,227534845
Otx2	8,604351673	10,83043971	-4,678636139
Pdgfra	10,12912656	7,726324322	5,288293464
Pdim4	10,65405926	8,550270923	4,298366021
Pfkfb3	10,72365748	8,968683038	3,375203383
Phlda2	12,47803291	10,27152409	4,615569983
Pim2	8,676847226	10,95342288	-4,845265277
Plcg2	8,021935743	9,961537386	-3,835997136
Pmp22	10,03456933	8,267039631	3,404704751
Pou5f1	8,693820062	10,53700139	-3,588003569
Rasgrp3	9,028784227	7,313980287	3,282520315
Rbms1	10,3896068	8,852896137	2,901322488
Rbp1	10,28581963	8,545546456	3,340984238
Rbpms2	8,979985302	11,0658811	-4,245386191
Reln	9,769131185	8,130810965	3,113031597
S100a6	8,142973559	9,797805127	-3,148864262
Sall2	7,976845122	9,603314472	-3,087564659
Sct	9,249654152	7,710484352	2,906272138
Slc35d3	7,395412842	9,348149966	-3,871082686

Slc7a3	8,669488964	11,90972527	-9,449488939
Sox2	8,03483979	9,636691706	-3,035326932
Sp5	11,31082326	7,912749038	10,54198196
Spp1	7,374650525	9,95320217	-5,973397149
T	11,51791459	8,589118621	7,614746286
Tbx3	10,84881505	7,775930864	8,414538742
Tbx6	11,32292818	7,575396634	13,43134188
Tnnt1	7,607926507	9,284897387	-3,19755878
Trh	11,94272171	13,91365079	-3,920204961
Utf1	7,347127293	9,878126112	-5,779716861
Wnt5b	9,597703407	7,868263407	3,315990791
Zfpm1	10,83863639	8,239164252	6,060648339

8.2. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die 3 Tage mit DMSO induziert wurden und zusätzlich Tbx6 überexprimieren zu P19 EC Kontrollzellen

Genname	P19 EC Zellen 3 Tage +DMSO +Tbx6	P19 EC Kontrollzellen	fold change
1600023A02Rik	7,624055577	10,2301641	-6,088591516
2210411K11Rik	7,845697224	9,479919777	-3,104202241
2310015N21Rik	9,315121381	7,665861664	3,136726445
2900093B09Rik	10,99275975	8,394740337	6,054548647
3732412D22Rik	9,310170922	7,351051823	3,888244926
4933424A10Rik	7,835258482	10,43166704	-6,047792146
6330403K07Rik	9,727454822	7,66228011	4,184846519
6720469N11Rik	9,977482908	8,026191559	3,86720528
A830059I20Rik	9,251500554	7,334062869	3,777515525
Aass	7,739251056	9,361078406	-3,077646109
Amph	10,10666185	8,600025055	2,841468635
Arid3b	10,95010757	9,257480039	3,232448826
Asb4	11,11185633	7,728302953	10,4364082

8. Anhang

Asb4	8,860319672	7,298027609	2,953226611
Atp1b1	8,658887335	10,55993835	-3,734851839
B3bp	10,3226223	8,788617452	2,895886081
BC046404	9,954956664	8,098468275	3,62125153
Bscl2	8,685601206	11,04835082	-5,143497168
Bst2	8,072199878	10,55869076	-5,604131792
Cacna2d2	9,721358068	7,668176906	4,150200862
Cbx7	7,850335127	10,75583273	-7,492761857
Cdh1	7,693593655	9,436241256	-3,346487442
Cdx2	10,54105907	7,708824452	7,121763921
Chst7	10,06173511	7,809648438	4,763713584
Ckb	9,419556095	11,25279644	-3,563365201
Cldn6	8,271163096	10,9517461	-6,411149293
Clic6	7,779379547	9,583552284	-3,492288477
Col4a1	10,36368101	8,185623121	4,525439432
Col4a2	11,37015926	8,655576155	6,564035799
Crip2	8,418468306	10,15117433	-3,323506159
Crym	7,38729818	9,071152328	-3,212851163
Ctsc	10,97848855	9,23829957	3,340789271
Cxxc6	8,659534269	10,31040962	-3,140241147
Ddah2	10,85319257	8,898831994	3,875441242
Dlg5	12,08300209	10,29604711	3,450857692
Dll3	10,29220953	8,179077448	4,326295122
Dnmt3b	7,832865944	9,877777324	-4,126479233
Dnmt3b	11,37484762	13,77276249	-5,270408816
Dnmt3l	7,177354068	9,06026964	-3,688196629
Dppa4	8,426112361	10,4772776	-4,144405705
Efhd1	7,65688183	9,365637876	-3,268788526
Emid2	9,177786232	7,44238075	3,329730657
Enpp2	7,602538696	10,34545303	-6,694212435
Eomes	10,95090743	8,744046474	4,616696701
Epha8	7,419875216	9,13330366	-3,279392183
Eras	7,269565838	9,438693405	-4,497513362
Ets2	10,14381048	8,636589581	2,842619309
Evx1	10,9988418	7,730551987	9,635034339

8. Anhang

Fabp3	8,149701432	10,34300922	-4,573528957
Fgf10	10,981733	7,703129738	9,704159511
Fgf15	7,486211409	9,021846541	-2,899160353
Fgf8	9,616027338	7,585700946	4,084972573
Fn1	10,90789802	7,8167009	8,522029919
Gata3	8,996976174	7,387298181	3,051837176
Gata6	10,31989065	7,86997865	5,463827736
Gbx2	10,02433326	8,057590722	3,908845443
Gclm	8,23244681	9,908150577	-3,194751612
Gdf3	8,027859948	11,32663745	-9,840812951
Gpc3	11,91293026	9,871055869	4,117801798
Grb7	8,088968452	9,78220658	-3,233817196
Greb1	10,92328443	8,436130867	5,606706565
Gsc	10,58235547	7,698523764	7,381078846
H2afy	10,19505822	8,494611611	3,250015522
Hey1	10,00973657	8,025039263	3,957796155
Hmgcs1	13,66491301	12,09294793	2,973094003
Hoxa5	9,508438148	7,314151608	4,576632788
Hoxb2	10,79392969	7,777503684	8,091605616
Hoxb4	9,218415182	7,582137045	3,10862833
Hoxc6	9,649847182	7,343636139	4,945824484
Hoxc9	8,964186343	7,153997228	3,506882554
Hoxd4	9,706322291	7,462137817	4,737692205
Hoxd8	10,46078201	7,326895442	8,777965307
Hoxd9	10,2163247	7,403255305	7,027781764
Hspb1	7,883522321	9,597124732	-3,27978765
Igf2	13,40785262	9,719046875	12,8955888
Kit	9,96331837	8,222635087	3,341934095
Klhl6	9,703384103	7,786879929	3,775072036
Laptm4b	9,651456795	7,891812075	3,386147271
Ldb2	7,530174604	9,047820899	-2,863235418
Lgals3	11,53586146	7,642652104	14,85842565
Lhx1	10,67333379	7,495529343	9,049289049
Lmo2	9,958270402	7,479866763	5,572804872
Lor	9,659580093	7,783379547	3,671069803

8. Anhang

Lrp2	7,611694953	9,396563008	-3,445869474
Ly6e	8,284913767	10,03258435	-3,35815911
Man1c1	9,112782327	7,403096908	3,270894933
Mixl1	10,42742882	7,432188711	7,973649049
Mrg1	9,499144355	7,713121262	3,44862938
Msx1	11,84343767	8,097643967	13,41517252
Mt1	9,585877684	12,10108832	-5,716811144
Nanog	8,341916166	10,58047139	-4,71924223
Ndg2	9,647862818	13,48726593	-14,31447755
Npy	7,711907272	9,621453843	-3,756910039
Nrarp	9,953192824	7,923659981	4,082726267
Nrp	10,37533267	7,646382406	6,62973066
Nrp	9,740837894	7,675294053	4,185917391
Otx1	9,509343984	7,348785409	4,470879228
Otx2	8,430380015	10,83043971	-5,278250026
Phc1	11,42277386	13,08969547	-3,175363163
Phc2	10,58028286	9,026341846	2,936181224
Phlda1	10,55891913	8,785765998	3,418001744
Pim2	7,98309761	10,95342288	-7,837129144
Plcg2	7,759770131	9,961537386	-4,600425345
Pml	8,6711495	10,36267959	-3,229990882
Pmp22	10,57573902	8,267039631	4,954362368
Pou5f1	7,903748303	10,53700139	-6,204233932
Pou5f1	8,444250929	11,86021662	-10,67353156
Ppp1r1a	7,944209135	9,790774246	-3,59642897
Prkcb	7,84926004	9,70731714	-3,625191229
Prnp	11,16399298	9,137532289	4,074041539
Prps1	9,632172966	11,43205258	-3,481911689
Rab8b	10,46671634	8,951215012	2,858981581
Rbms1	10,59666489	8,852896137	3,349089098
Rbpms2	8,753512206	11,0658811	-4,966979849
Reln	9,828066179	8,130810965	3,24283409
S100a6	7,872296642	9,797805127	-3,798707122
Scarf2	9,230085465	7,705352851	2,877333831
Sdccag33	9,292865309	7,535575442	3,380624708

Sgk	9,338170312	11,4765487	-4,402669002
Slc35d3	7,538733132	9,348149966	-3,505005806
Slc7a3	9,256397556	11,90972527	-6,291167236
Smad1	10,27197117	8,583207712	3,223802706
Snrpn	7,881353929	9,620245888	-3,337787156
Snrpn	11,6663502	13,6639626	-3,993385643
Sp5	11,41878978	7,912749038	11,36117971
Spp1	7,43729031	9,95320217	-5,719590502
Stard8	10,21648138	8,129443898	4,248747115
Sult4a1	7,963952727	9,774624124	-3,508055074
Tax1bp3	10,18730701	8,605886136	2,992644433
Tax1bp3	10,31129552	8,743197909	2,965134626
Tbx3	10,56456406	7,775930864	6,909748496
Tbx6	10,19782523	7,575396634	6,157858005
Tcf15	7,667529449	10,2606339	-6,033957133
Tnfrsf19	10,06391271	8,447334613	3,06646842
Tnnt1	7,350110246	9,284897387	-3,823217141
Trh	9,054967178	13,91365079	-29,01412699
Ttc3	10,14341503	8,483041396	3,16098379
Ttc3	11,27035208	9,630735102	3,115830992
Utf1	7,306363914	9,878126112	-5,945351874
Vil2	8,650219861	10,21469116	-2,957690924
Vldlr	10,51806687	8,237439884	4,858890719
Wnt5a	9,223334147	7,688173967	2,898206074
Zfpm1	11,03792871	8,239164252	6,958442661

8.3. Tabellarische Zusammenstellung der signifikant in ihrem Expressionsniveau veränderten Gene; Vergleich von P19 EC Zellen, die Tbx6 überexprimieren zu P19 EC Kontrollzellen

Genname	P19 EC Zellen +Tbx6	P19 EC Kontrollzellen	fold change
0610041G09Rik	11,22676116	9,720823513	2,840091959
8430415E04Rik	9,219772545	7,600796414	3,071569722

8. Anhang

A930010I20Rik	9,466841707	7,690529672	3,425493944
Arid3b	10,78724529	9,257480039	2,887388534
Asb4	9,326745509	7,728302953	3,028162354
C86987	10,22117901	7,955807835	4,807780981
Cdx2	10,65524091	7,708824452	7,708319939
Chst7	9,632545515	7,809648438	3,537909336
Clic6	7,88597877	9,583552284	-3,24354963
Defcr-rs2	9,490990163	7,629771177	3,633145101
Eomes	10,85424385	8,744046474	4,317503581
Evx1	10,08436801	7,730551987	5,111745541
Fgf8	9,726618257	7,585700946	4,410423859
Fst	10,66573429	8,483937951	4,537181388
Gsc	9,583171985	7,698523764	3,692628742
Mesp1	9,210168856	7,366809482	3,588446407
Msx1	9,771200168	8,097643967	3,189999505
S100a10	11,07382213	9,546877966	2,881747965
S100a6	8,009570035	9,797805127	-3,453921018
Scarf2	9,413741441	7,705352851	3,267956071
Sp5	11,27932025	7,912749038	10,31427998
T	11,90671813	8,589118621	9,970041469
Tcf15	8,730037831	10,2606339	-2,889051787
Zcchc3	9,14006991	10,72104719	-2,991724392

9. Liste von vorab veröffentlichten Ergebnissen

Müller, S.; Herrmann, B.G.; Plendl, J.:

Funktionelle Charakterisierung regulatorischer Gene bei der Bildung der Wirbelsäule der Maus .

2. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
Berlin, 08.06.2007

Postersession, Abstract, S. 62

10. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Herrmann, der mir diese Doktorarbeit am MPI für molekulare Genetik ermöglichte und so einen intensiven Einblick in die Grundlagenforschung im Bereich der Embryologie eröffnete. Ohne seine Betreuung, seine Hilfestellungen und Ratschläge wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit, ihre Bereitschaft, mir jederzeit als Ansprechpartner mit unterstützenden und motivierenden Worten zur Seite zu stehen, danken.

Frau Prof. Dr. Heike Tönhardt möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Arnold Schröder, der mich von Beginn an mit allen Techniken im Labor vertraut gemacht hat und mich bereitwillig an seiner Arbeit teilnehmen ließ, der niemals die Geduld verlor, mir - seinem Beiboot- etwas zu erklären oder zu helfen im Labor und vor allem bei für mich unverständlichen Computerproblemen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Dr. Lars Wittler, der mich bereitwillig und spontan unter seine Fittiche nahm und mir mit Rat und Tat, hilfreichen Ideen, anregenden Diskussionen zur Seite stand und mich eloquent, mit positiver Kritik beim Zusammenschreiben der Arbeit permanent unterstützt hat.

All denen, die ebenfalls am Gelingen der Arbeit beteiligt waren, danke ich ebenso herzlich: Dr. Martin Werber für die aufwendige Auswertung der Microarray-Daten, Dr Hannes Luz für die Durchsicht meiner Auswertungen von qRT-PCRs und Luziferase Assay, Dr. Markus Morkel für die Bereitstellung einiger DNA-Konstrukte, der grafischen Darstellung der Microarray-Ergebnisse und immer bereitwilliger Erklärung molekularbiologischer Zusammenhänge, sowie Dr. Phillip Grote für die praktische und umgängliche Unterstützung beim Umgang mit Microarrays und der kompetenten Auswertung qRT-PCRs und Dr. Heinrich Schrewe für die Bereitstellung von DNA-Konstrukten, Andrea für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten und Nachkontrollieren von Umrechnungen jeglicher Art.

Karol und Antje möchte ich für ihre allseitige und immer freundliche Unterstützung in Zellkulturangelegenheiten danken sowie Karol und Ingo für die Durchführung der Mikroinjektionen in Mäuse.

Also many thanks to Dr. Yves Charron for his help while working with knockdown constructs, his always friendly motivating smile and the very nice and funny evenings with playing badminton and drinking a "Warsteiner" afterwards.

Jürgen möchte ich ebenso herzlich danken für seine Unterstützung im Labor, die netten und z.T. unvergesslichen Abende beim Badminton oder bei Konzerten aller Art, dem intensivem Austausch von guter Musik und einem Stückchen Schokolade, wann immer es nötig war.

Ein herzliches Dankeschön auch dem Rest der Abteilung Herrmann für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung- Bene, Hermann, Joana, Lorenz, Marc, Marta, Nathalie, Sabrina, Pedro, Ralf, Silvia und Uta.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Manuela, Mia und Shini, die mir immer bei labortechnischen Fragen zur Seite standen: in-situ-Hybridisierungen nachts nur begleitet von Robbie Williams, Helfen beim Herstellen jeglicher Lösungen oder Ausborgen von diesen, immer wieder geduldiges Erklären von Southern-Waschungen, die ich dann leider doch nicht brauchte, Korrekturlesen der Arbeit und und und...es ist gar nicht alles aufzuzählen; vor allem möchte ich euch aber für eure Unterstützung und motivierenden Worte danken im Kreise von Kaffeepausen, Spaziergängen oder schönen Abenden, hätte ich euch nicht gehabt.....

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinen Freunden: Benni- dem besten Mitbewohner überhaupt- für Deine stete Hilfe in Computerangelegenheiten, Deine loyale Unterstützung und die bezaubernden Opern- und Konzertabende, Nancy, Sascha und Raika für ihre spontane Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit.

Kathrin, meiner Freundin vom ersten Tag des Studiums an, möchte ich auch von Herzen danken, da zu zweit alles doch viel leichter ist als alleine, da nur mit Dir zusammen das Studium und die Doktorarbeit zu schaffen war- danke.

Ein inniges Dankeschön an Dirk Hochstatter, der immer für mich da war, mir zuhörte und mich motivierte, alle Höhen und Tiefen zusammen mit mir durchgestanden hat und mir mit seiner Liebe die Kraft geschenkt hat, die ich brauchte.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie danken, die mich immer in allem unterstützt hat und mir so das Studium meines Traumberufes sowie die Doktorarbeit ermöglicht hat. Ohne euren Glauben an mich und die geballte familiäre Kraft im Hintergrund wäre das alles nicht möglich gewesen- danke, danke, danke.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angaben der Quellen als Entlehnungen kenntlich gemacht worden sind.

Die Arbeit wurde vom Mai 2005 bis Juli 2008 im Labor von Prof. Dr. Bernhard Herrmann am Max Planck Institut für Molekulare Genetik in Berlin angefertigt.

Berlin, den 23.09.2008

Solveig Müller