

Somitogenese im Zebrafisch:

Die Interaktion zwischen Wnt und Delta/Notch Signalweg

und

die *ripple* vermittelte Termination der „clock“

- Eine Untersuchung mittels der *her1* und *her7* Mutanten

Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Suma Choorapoikayil

aus Köln

Köln, 2008

Berichtersteller:

PD Dr. Martin Gajewski

Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der mündlichen Prüfung:

23.Juni.2008

für meine Schwester

für Martin Gajewski:

*„Jedem tiefen Naturforscher muß eine Art religiösen Gefühls naheliegen,
weil er sich nicht vorzustellen vermag,
daß die ungemein feinen Zusammenhänge,
die er erschaut, von ihm zum erstenmal gedacht werden.“*

Albert Einstein

„Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von (Name des anleitenden Dozenten) betreut worden.“

Köln, April 2008

Suma Choorapoikayil

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1.1	präsomitisches Mesoderm (PSM)
Abb. 1.2	Delta/Notch Signalweg
Abb. 1.3	Heterodimerisierung zwischen zwei Her Proteinen
Abb. 1.4	Wnt/ β -Catenin Signalweg
Abb. 2.1	<i>her1</i> Promotor
Abb. 2.2	<i>her1</i> Promotor
Abb. 4.1	<i>her1</i> Chromatogramm
Abb. 4.2	<i>her1</i> KO Phänotyp
Abb. 4.3	a-p Polarität im <i>her1</i> KO
Abb. 4.4	zyklische Genexpression von <i>deltaC</i> , <i>her1</i> und <i>her7</i> im <i>her1</i> KO
Abb. 4.5	<i>deltaC</i> und <i>deltaD</i> Expression im WT und <i>her1</i> KO
Abb. 4.6	Analyse der <i>her1</i> Expression im <i>her1</i> KO bzw. nach <i>her1</i> MO Injektion
Abb. 4.7	<i>her7</i> Expression im <i>her1</i> KO
Abb. 4.8	Festlegung und Aufrechterhaltung der a-p Polarität
Abb. 4.9	<i>mesp</i> Expression im Wildtyp und <i>her1</i> KO
Abb. 4.10	<i>her7</i> Chromatogramm
Abb. 4.11	<i>her7</i> KO Phänotyp
Abb. 4.12	Analyse der defekten Somitengrenzen im <i>her7</i> KO
Abb. 4.13	a-p Polarität im <i>her7</i> KO
Abb. 4.14	<i>deltaC</i> , <i>deltaD</i> , <i>her1</i> und <i>her7</i> Expression im WT und <i>her7</i> KO
Abb. 4.15	zyklische Genexpression von <i>deltaC</i> , <i>her1</i> und <i>her7</i>
Abb. 4.16	<i>mesp</i> Expression im <i>her7</i> KO
Abb. 4.17	<i>her13.2</i> MO im <i>her7</i> KO
Abb. 4.18	Analyse der defekten Somitengrenzen im <i>her7</i> KO nach <i>her13.2</i> MO Injektion
Abb. 4.19	Skelettstruktur in WT und <i>her7</i> KO
Abb. 4.20	Phänotyp <i>bea/her1</i> und <i>bea/her7</i>
Abb. 4.21	A-P Polarität in <i>bea</i> , <i>bea/her1</i> und <i>bea/her7</i>
Abb. 4.22	<i>deltaC</i> , <i>her1</i> und <i>her7</i> Expression im WT, <i>bea</i> , <i>her1</i> KO, <i>her7</i> KO, <i>bea/her1</i> und <i>bea/her7</i>
Abb. 4.23	<i>her1</i> Promotor
Abb. 4.24	BamHI-Injektion und transgener Embryo
Abb. 4.25	456-Konstrukt
Abb. 4.26	456-Konstrukt Injektion und transgene Linie
Abb. 4.27	2in3 Konstrukt
Abb. 4.28	Embryonen nach 2in3-Konstrukt Injektion
Abb. 4.29	Terminationsuntersuchung in der frühen Entwicklung durch <i>rippy</i> in <i>her1</i> KO

- Abb. 4.30 *ripply* Expression im *her1KO*
- Abb. 4.31 *ripply* Expression im *her7KO*
- Abb. 4.32 *Irp6.1* Morpholino injizierte Embryonen
- Abb. 4.33 Segmentgrenzedefekt im *Irp6.2MO* injizierten Embryo
- Abb. 4.34 kombinatorisches Ausschalten des Wnt Signalweges mit unterschiedlichen Komponenten des Delta-Notch Signalweges
- Abb. 4.35 Segmentgrenzedefekt und a-p-Polarität im *Irp6.1MO* injizierten *her7KO*
- Abb. 4.36 *deltaC* Expression nach *Irp* Injektion
- Abb. 4.37 *deltaC*, *her1* und *her7* Expression nach *Irp* MO Injektion in WT und *her1KO*
- Abb. 4.38 *deltaC*, *her1* und *her7* Expression nach *Irp* Injektion in *bea* und *her7KO*
- Abb. 4.39 *her13.2MO* und *Irp6.2MO* Injektion
- Abb. 4.40 Inhibierung von Wnt und Delta-Notch
-
- Abb. 5.1 zyklische Genexpression im *her1KO*
- Abb. 5.2 zyklische Genexpression im *her1KO* und *her1MO*
- Abb. 5.3 *her1* Promotor
- Abb. 5.4 *her1* Promotor
- Abb. 5.5 Hypothese der redundanten Funktion von *her1* und *her7* während der Somitogenese
- Abb. 5.6 zyklische Genexpression nach *Irp6.1MO* Injektion
- Abb. 5.7 *IrpMO* Injektion in WT, *bea*, *her1KO* und *her7KO*
- Abb. 5.8 zyklische Genexpression nach *Irp6.1MO* Injektion

Tabellenverzeichnis:

Tab. 2.1	Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von Sonden
Tab. 2.2	Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung von Mutantenlinien
Tab. 2.3	Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung von möglichen transgenen Linien
Tab. 2.4	Verwendete <i>antisense</i> Morpholino modifizierten Oligonukleotide
Tab. 2.5	Verwendete Oligonukleotide für Generierung der einzelnen Fragmente zur Klonierung
Tab. 2.6	Verwendete Kits
Tab. 2.7	Verwendete Bakterienstämme
Tab. 2.8	Verwendete Plasmide
Tab. 2.9	Verwendete Fisch- und Mutantenlinien
Tab. 3.1	PCR Profil <i>her1</i>
Tab. 3.2	PCR Profil <i>her7</i>
Tab. 3.3	PCR Profil <i>deltaC</i>
Tab. 3.4	PCR Profil <i>deltaD</i>
Tab. 3.5	PCR Profil <i>notch1a</i>
Tab. 3.6	<i>in situ</i> Hybridisierungsprotokoll
Tab. 3.7	Protokoll zur Generierung von digoxigenin markierten RNA Sonden
Tab. 3.8	Parameter für Injektionsnadeln
Tab. 3.9	PCR-Profil für DNA-Sequenzierung
Tab. 3.10	PCR-transgenen-Reaktionsansatz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Der Prozess der Somitogenese in Vertebraten	- 1 -
1.1.1	„clock and wavefront“ Modell.....	- 2 -
1.2	Somitogenese.....	- 3 -
1.2.1	Der Delta-Notch Signalweg	- 4 -
1.2.2	“hairy and Enhancer of split related” (<i>her</i>) Gene.....	- 5 -
1.2.3	Die Rolle von <i>her1</i> und <i>her7</i> im Zebrafisch.....	- 6 -
1.2.4	Gradientenexpression im posterioren PSM	- 7 -
1.2.5	Termination im anterioren PSM.....	- 7 -
1.2.6	Der Wnt Signalweg	- 8 -
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	- 10 -
2	Materialien.....	11
2.1	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	11
2.2	Verwendete Oligonukleotide	12
2.3	<i>antisense</i> Morpholino modifizierte Oligonukleotide.....	13
2.4	Generierung der Konstrukte für <i>her1</i> transgene Linien.....	14
2.5	Verwendete Kits.....	15
2.6	Bakterienstämme und Plasmide.....	15
3	Methoden	17
3.1	Fischhaltung und Gewinnung von Embryonen	17
3.1.1	Haltung	17
3.1.2	Fixierung und Dechorionisierung von Embryonen	17
3.2	Genotypisierung.....	17
3.2.1	<i>her1</i> -Genotypisierung.....	18
3.2.2	<i>her7</i> -Genotypisierung.....	18
3.2.3	<i>bea/deltaC</i> -Genotypisierung.....	19
3.2.4	<i>aei/deltaD</i> -Genotypisierung.....	19
3.2.5	<i>des/notch1a</i> -Genotypisierung.....	19
3.3	Klonierung.....	20
3.4	<i>in situ</i> Hybridisierung.....	20
3.4.1	Protokoll.....	21
3.5	<i>in vitro</i> Transkription.....	22
3.6	Injektion	22
3.6.1	Herstellung der Kapillaren	22
3.6.2	Injektionslösung	23
3.6.3	Injektion	23

3.7	Knochenfärbung.....	23
3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
3.9	DNA-Konzentrierung.....	23
3.10	DNA Sequenzierung	24
3.11	Reinigung von DNA	24
3.12	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
3.13	Isolierung von Plasmid DNA.....	25
3.14	Isolierung von RNA.....	25
3.15	cDNA Synthese.....	25
3.16	PCR zur Analyse von transgenen Gründerfischen	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Charakterisierung der Mutante <i>her1</i> ^{-/-}	26
4.2	Charakterisierung der Mutante <i>her7</i> ^{-/-}	35
4.3	Doppelmutante <i>bea/her7</i> und <i>bea/her1</i>	44
4.4	<i>her1</i> Promotoranalyse durch Generierung von transgenen Linien.....	48
4.4.1	Eingrenzung des posterioren Elements.....	48
4.4.2	Kontrolle der anterioren Expression über <i>sps</i> -site?	50
4.4.3	Posteriore und anteriore Expression abhängig voneinander?	52
4.5	Die Kontrolle der Terminationsgene <i>rippy</i>	53
4.6	Wnt und Delta-Notch Signalweg agieren kooperativ während der anterioren Somitogenese.....	56
5	Diskussion.....	65
5.1	Die essentielle Rolle von <i>her1</i> in der frühen Somitogenese	65
5.2	Die essentielle Rolle von <i>her7</i> in der späten Somitogenese.....	73
5.3	Der Wnt und Delta-Notch Signalweg.....	76
6	Zusammenfassung.....	81
7	Abstract.....	83
8	Danksagung.....	84
9	Literaturverzeichnis	85

1 Einleitung

Die Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Vertebraten während ihrer Embryonalentwicklung wurden erstmalig von Karl Ernst von Baer bereits früh im 19. Jahrhundert festgestellt. Dabei werden transiente Strukturen gebildet - die sogenannten Somiten -, die den Wirbeltierembryo in metamere Einheiten unterteilen. Dieser Vorgang wird unter dem Begriff der Somitogenese zusammengefasst und beschreibt im Allgemeinen den Prozess der Somitenbildung. Somiten sind mesodermale Zellblöcke, die periodisch am posterioren Ende des Embryos gebildet werden und Vorläufer für die Bildung von Sklerotom und Dermomyotom sind. Dabei handelt es sich um Zellpopulationen, die, im Falle des Sklerotoms, Zellen für die Wirbelkörper und das Dermomyotom, die Rumpfmuskulatur der Wirbel und Teile der Rückenhaut bilden.

1.1 Der Prozess der Somitogenese in Vertebraten

Abnormalitäten, die während der Somitogenese auftreten, führen von leichten bis zu schweren Fehlbildungen und unter Umständen auch zum Tod. So sind Krankheiten im Menschen bekannt wie das Spondylocostal Dysostosis/Jarcho-Levin Syndrom, Klippel-Feil Syndrom, Goldenhar Syndrom oder das Alagille Syndrom (Goldenhar 1952; Pourquié O 2001; Harper JA 2003), die alle auf eine Fehlsteuerung in der Somitogenese zurück zu führen sind. Mit dem Begriff Spondylocostal Dysostosis (SCD) wird ein Krankheitsverlauf beschrieben, dem eine anormale Wirbelkörper-Segmentierung zu Grunde liegt. Es konnte festgestellt werden, dass eine Mutation im Gen Delta-like3 (DLL3) (Bulman et al. 2000), MESP2 (Whitlock et al. 2004) bzw. Lunatic Fringe (LFNG) (Sparrow et al. 2006) zu dieser Deformation führt. Die genannten Gene sind Komponenten eines der wichtigsten Signaltransduktionswege während der Somitogenese, dem Delta-Notch Signalweg.

Die Aufklärung bzw. Charakterisierung des Prozesses der Somitogenese wird in diversen Modell-Organismen wie Hühnchen, Maus und auch Fisch untersucht. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass der zu Grunde liegende Mechanismus zwar konserviert ist, aber in einigen Punkten Unterschiede zwischen den Arten zeigt. So benötigt der Zebrafisch für die Bildung eines Somiten 30 Minuten, wohingegen das Huhn 90 und die Maus 120 Minuten benötigen.

Der Vorgang der Somitenbildung beginnt schon in der frühen Entwicklung des Zebrafischembryos. Sobald die Gastrulation abgeschlossen ist und der Embryo beginnt, sich durch die posteriore Elongation zu strecken, werden erste Anzeichen einer Segmentierung sichtbar.

Die Komplexität dieses Mechanismus wird klar, wenn versucht wird, Modelle zu entwickeln, die den Prozess der Somitogenese beschreiben. Bislang konnte noch kein eindeutiges Modell aufgestellt werden, das alle bisher gewonnen Erkenntnisse in Einklang bringt. Bereits in den frühen siebziger Jahren wurde versucht, einen theoretischen Mechanismus zu entwickeln. So wurde von Flint eine Hypothese aufgestellt, die den Vorgang als „wave gradient model“ beschreibt (Flint et al. 1978). Es folgten weitere Modelle, wie das „reaction-diffusion type model“ nach Meinhardt (Meinhardt 1982; Meinhardt 1986), das Zell-Zyklus Modell von Primmitt (Primmitt 1988), Polezhaev fasste den Prozess unter den Begriffen „wave cell polarisation model“ zusammen (Polezhaev 1992) und Schnell und Maini führten im Jahre 2000 das „clock and induction model“ ein (Schnell and Maini 2000). Trotz der weiteren Entwicklung in diesem Feld ist das von Cooke und Zeeman im Jahre 1976 aufgestellte Modell „clock and wavefront“ (Cooke and Zeeman 1976) das bis dato am ehesten zutreffendeste und wird im folgenden kurz näher beschrieben.

1.1.1 „clock and wavefront“ Modell

Das „clock and wavefront“ Modell von Cooke und Zeeman fasst die Prozesse der Somitogenese zusammen und bringt sie mit den empirisch gewonnenen Daten in Einklang. Das Modell beschreibt einen Oszillatormechanismus, der mit einer „wavefront“ zusammen agiert. Dabei handelt es sich bei ersteren um einen molekularen Oszillator, der für eine spatio temporale gerichtete Genexpression sorgt. So deuten Ergebnisse darauf hin, dass der Delta-Notch Signalweg einen Teil dieser molekularen Segmentierungsuhr darstellt und die alternierende Zielgenexpression kontrolliert. Dies verursacht eine zyklische Genexpression, die sich optisch in Wellen von posterior nach anterior erstreckt. In Abhängigkeit ihrer Zyklusphase exprimieren einzelne Zellverbände das Gen oder sind in ihrer Genaktivität inhibiert. Die Aktivierung der Gene unterliegt der Koordination einer intrazellulären Uhr „clock“, die bewirkt, dass bestimmte Zellen im präsomitischen Mesoderm (PSM) zum gleichen Zeitpunkt die gleichen Gene exprimieren.

Erste Belege dafür, dass ein Oszillatormechanismus eine Rolle spielt, wurden 1997 von Palmeirim veröffentlicht. Sie konnte zeigen, dass das *c-hairy* Gen zyklisch im PSM exprimiert wird (Palmeirim et al. 1997). Es wurden im Laufe der Zeit weitere zyklisch exprimierte Gene in weiteren Organismen gefunden. So wurden die homologen Gene in Maus (*hes1*, *hes5* und *hes7*) (Jouve et al. 2000; Bessho et al. 2001; Bessho and Kageyama 2003), in *Xenopus* (*ers9* und *ers10*) (Li et al. 2006) und in Zebrafisch (*her1* und *her7*) (Holley et al. 2000; Oates and Ho 2002) beschrieben.

Der Oszillator agiert zusammen mit einem Morphogengradienten („wavefront“) entlang der antero-posterioren Achse. Eine solche „wavefront“ bildet beispielsweise *fgf8*, wobei sich die höchste Expressionsrate im posterioren Teil des PSM befindet und zunehmend Richtung anterior abnimmt (Dubrulle et al. 2001; Saga and Takeda 2001; Sawada et al. 2001; Aulehla and Herrmann 2004; Dubrulle and Pourquie 2004). Die Determinierung der Zellen erfolgt unter anderem durch diesen Gradienten. Über einem bestimmten Schwellenwert werden die Zellen in einem undeterminierten Zustand gehalten, wie sie im posterioren PSM anzutreffen sind. Zellen, die sich weiter anterior befinden, fallen unter den Schwellenwert und werden determiniert Somiten zu bilden.

Die frühe Entwicklung des Embryos basiert auf einer exakten zeitlichen und räumlichen Koordination von Signalkaskaden (Delta-Notch-, FGF-, Retinsäure- und Wnt-Signalweg), die im Folgenden (Kapitel 1.2.2 – 1.2.5) näher beschrieben werden.

1.2 Somitogenese

Die frühe Entwicklung umfasst viele Zellbewegungen, die in drei Prozesse unterteilt werden können. Das PSM liegt als dreidimensionale, unsegmentierte Struktur um das Notochord und bildet in periodischen Intervallen die segmentartigen Somiten. Der erste Schritt der Somitogenese ist eine Vormusterung der mesenchymalen Zellen, welches auch als „prepatterning“ bezeichnet wird. Dabei werden die sich im lockeren Zellverband befindlichen Zellen im posterioren PSM auf ihr Somitenschicksal festgelegt. Im anterioren PSM wird in diesen Blöcken eine anteriore posteriore Polarität etabliert. Und schließlich folgt als dritter Schritt die Bildung von Somitengrenzen, wobei die Somitenblöcke von einem Epithelgewebe umgeben werden (Abb. 1.1) (Stern and Keynes 1987; Aoyama and Asamoto 1988). Diese gebildeten Segmente weisen morphologisch keine Unterschiede auf, bilden aber dennoch später in der Entwicklung unterschiedliche Strukturen entsprechend ihrer axialen Lage (Tam and Trainor 1994).

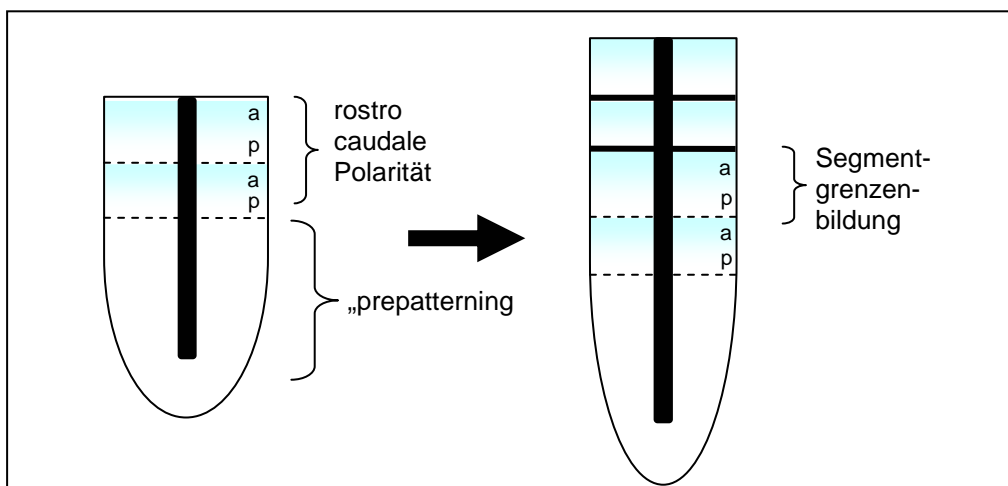


Abbildung 1.1: präsomitisches Mesoderm (PSM): Die drei Prozesse der Somitogenese, „prepatterning“, rostro-caudale Polaritätsetablierung und Bildung der Somitengrenzen sind dargestellt. a=anterior, p=posterior

1.2.1 Der Delta-Notch Signalweg

Der Delta-Notch Signalweg ist einer der am stärksten konservierten und weit verbreiteten Signaltransduktionswege. Dieser ist an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt und reguliert u.a. eine Vielzahl von Gewebestrukturierungen wie z.B. die Somitogenese während der Embryonalentwicklung. Diverse *knockdown* und *knockout* Untersuchungen in Fröschen, Zebrafischen, Hühnchen und Mäusen haben gezeigt, dass der Delta-Notch Signalweg essentiell während der frühen embryonalen Entwicklung ist (Maroto and Pourquie 2001; Saga and Takeda 2001; Rida et al. 2004). Mutationen im Delta-Notch Signalweg führen zu einer fehlgesteuerten Segmentierung, die zu morphologischen Deformationen im Körperbauplan führen. Ausfall einzelner Gene führt in Abhängigkeit ihrer Funktion während der Somitogenese zu einem gestörten „prepatterning“, Fehletablierung der rostro-caudalen Polarität oder zu defekten Somitengrenzen, welche sowohl in Maus, Huhn und Zebrafisch beobachtet worden sind (Pourquie 2001).

Zebrafische mit Mutationen in den *Delta-Notch* Genen bilden in Abhängigkeit davon, welches Gen mutiert ist, die ersten drei (*bea/deltaC*), sieben (*des/notch1a*) oder acht Somiten (*aei/deltaD*) (van Eeden et al. 1998; Jiang et al. 2000; Oates and Ho 2002).

Der Delta-Notch Signalweg bildet mit seinen Zielgenen, den „*hairy and Enhancer of split related*“ (*her*) Genen, einen Kreislauf und sorgt so für eine zyklische Aktivierung bzw. Inhibierung der beteiligten Gene.

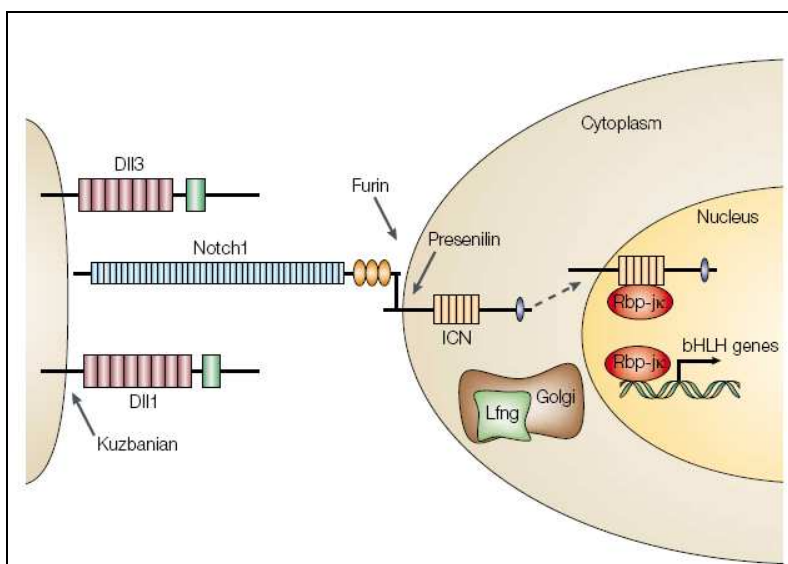


Abbildung 1.2:
Delta-Notch Signalweg:
Nach Bindung des Liganden Delta an den Notchrezeptor wird die intrazelluläre Domäne (ICN) abgespalten und in den Nucleus translokalisiert und aktiviert dort Zielgene (Saga and Takeda 2001).

Ein Zyklus beginnt damit, dass Delta/Serrate/Jagged als Ligand an den transmembranen Rezeptor Notch bindet (Abb. 1.2). Daraufhin folgt eine Spaltung der intrazellulären Domäne von Notch, welche in den Nucleus translokalisiert wird (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Struhl and Greenwald 2001). Dort interagiert die Domäne mit Proteinen der CSL-Familie

(CBF1, Suppressor of hairless, Lag-1) (Oka et al. 1995; Barrantes et al. 1999; Sieger et al. 2003) und aktiviert daraufhin weitere Zielgene wie im Zebrafisch die *her* Gen. Diese sind in der Lage, sowohl ihre eigene Expression, als auch die der *delta* Gene zu reprimieren (Rida et al. 2004).

1.2.2 "hairy and Enhancer of split related" (*her*) Gene

Das Charakteristische an den *her* Genen ist, dass sie hochkonservierte Domänen in ihrer Sequenz aufweisen (Abb. 1.3). Die Funktion eines Transkriptionsfaktors wird durch die basische Domäne, die für eine Bindung mit der DNA verantwortlich ist, ausgeübt. Des Weiteren fungieren die Proteine der *her* Familie im zellulären Kontext als Hetero- bzw. Homodimer. Für diese Art der Dimerisierung ist eine Helix-Loop-Helix-Domäne verantwortlich (HLH) (Murre et al. 1994). Außerdem besitzen Her Proteine eine Orange-Domäne für eine spezifische Dimerisierung und ein WRPW-Motif am C-Terminus (Dawson et al. 1995) für die Bindung mit dem Co-Repressor Groucho (Fisher et al. 1996; Davis and Turner 2001).

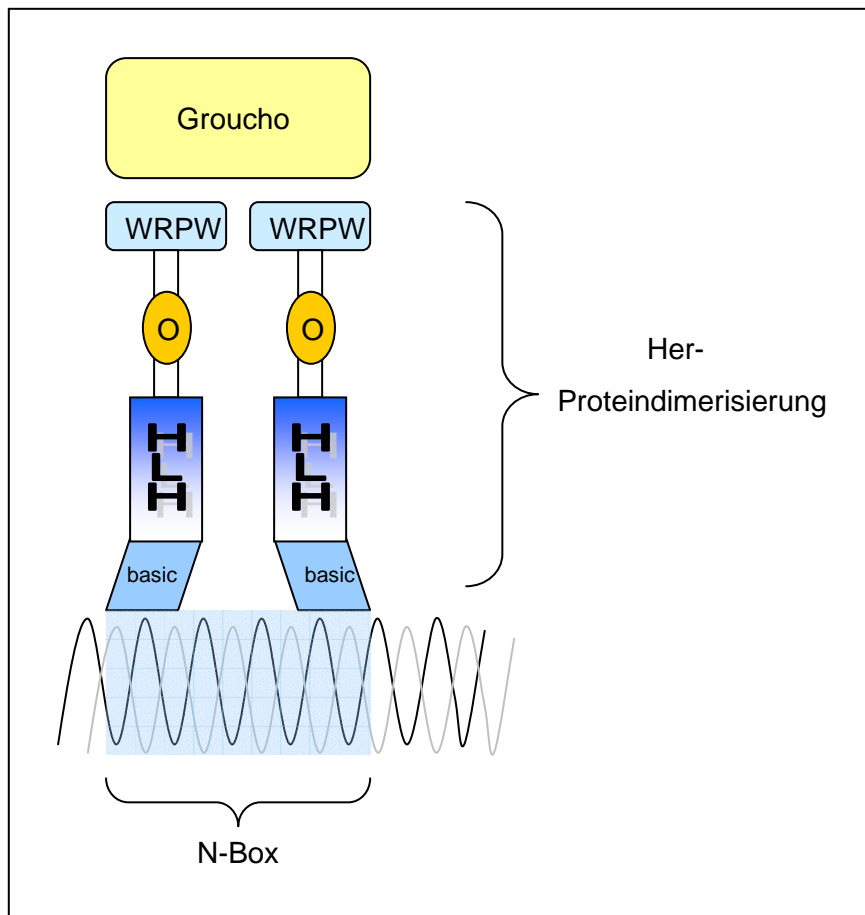


Abbildung 1.3:
Heterodimerisierung zwischen zwei Her Proteinen:
Zwei Helix-Loop-Helix Domänen führen zu einer Dimerisierung, wobei die Orange-(O)-Domäne für die Spezifität verantwortlich ist. Die WRPW-Motive dienen zur Bindung des Co-Repressors Groucho. Die „basic“-Domäne wird für die Bindung an eine N-Box Sequenz auf der DNA benötigt. Nach Bindung erfolgt je nach Funktion eine Repression oder Aktivierung. O=Orange Domäne

Bislang wurden 23 *her* Gene im Zebrafisch annotiert (Sieger et al. 2004), wobei in der vorliegenden Arbeit im Speziellen zwei Proteine der *her*-Genfamilie detaillierter analysiert und beschrieben werden. Her1 (Takke and Campos-Ortega 1999) und Her7 (Leve et al. 2001) sind Transkriptionsfaktoren mit reprimierender Wirkung und werden zyklisch im PSM exprimiert (Holley et al. 2000; Oates and Ho 2002).

Beide Gene sind weitgehend ko-exprimiert, wobei *her7* im anterioren PSM eine etwas schwächere Transkription aufweist (Holley et al. 2000; Oates and Ho 2002; Gajewski et al. 2003). Die bislang erbrachten Ergebnisse deuten daraufhin, dass *her1* und *her7* im Delta-Notch Signalweg einen regulatorischen Kreislauf bilden, welcher als Ausgangspunkt und für die Aufrechterhaltung der Somitogenese unerlässlich ist.

1.2.3 Die Rolle von *her1* und *her7* im Zebrafisch

Die Analyse von *her1* und *her7* Morpholino injizierten Embryonen weist auf eine Funktion dieser beiden Proteine während des „pre-patterning“ Mechanismus hin. Untersuchungen deuten daraufhin, dass *her1* temporär für die Bildung der ersten drei Somiten (Henry et al. 2002) und *her7* ab Somit neun (Oates and Ho 2002) essentiell sind. Des Weiteren konnte anhand der b567 Zebrafischmutante gezeigt werden, dass ein Fehlen beider Proteine, Her1 und Her7, zu einem Segmentgrenzedefekt ab Somit eins führt (Henry et al. 2002). Die durch Morpholino Injektion gewonnene Analyse zeigt ferner, dass Her1 und Her7 als Repressoren in der Lage sind, sowohl ihre eigene Transkription zu inhibieren, als auch einen Einfluss auf die Aktivierung von *deltaC* und *deltaD* auszuüben (Gajewski et al. 2003). Darüber hinaus wurde in einer Studie beobachtet, dass Her1 benötigt wird für die Initiierung seiner eigenen Expression und der von *her7* im anterioren PSM, während Her7 für die Aktivierung der zyklischen Expression von *her7* im posterioren PSM verantwortlich ist. Obwohl *her1* und *her7* Repressor-Domänen aufweisen, scheinen diese möglicherweise auch eine aktivatorische Funktionalität zu besitzen (Gajewski et al. 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass der *her1* Promotor zwei Elemente beinhaltet, die die räumliche Expression von *her1* im PSM kontrollieren. So kann zwischen einem „clock“ Element für die Expression im anterioren und einem für die Expression im posterioren PSM unterschieden werden (Gajewski et al. 2003).

Die bisher erhobenen Daten resultieren aus Morpholino injizierten Embryonen, die zwar eine hohe Penetranz besitzen (Nasevicius and Ekker 2000), aber dennoch zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. So zeigen Oates und Ho (2002) nach Injektion von *her1* Morpholino Defekte in einzelnen Somiten entlang der Körperachse, die in Henry et al. (2002) nach *her1* Morpholino Injektion nicht beobachtet worden sind. Ferner wird für *her7* postuliert, an der

Segmentgrenzenbildung ab Somit neun bis zum letzten gebildeten Somiten essentiell beteiligt zu sein, die aber nach eigenen Beobachtungen so nicht bestätigt werden konnte (Oates et al. 2005).

1.2.4 Gradientenexpression im posterioren PSM

Der molekulare Oszillator agiert zusammen mit einer „wavefront“, welche die Zellen zu Somiten determiniert. Sawada et al. (2001) konnte in Zebrafisch zeigen, dass *fgf8* einen Gradienten bildet, der posterior sein Maximum besitzt und zum anterioren Teil des Embryos an Expressionsstärke abnimmt. Eine Manipulation dieses Gradienten führt z.B. im Falle einer Inhibierung zu vergrößerten Somiten (Sawada et al. 2001).

her13.2, welches ebenfalls an der Somitogenese beteiligt ist, wird im Gegensatz zu *her1* und *her7* nicht zyklisch sondern ebenfalls als Gradient im PSM exprimiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Protein ein Verknüpfungselement zwischen dem Delta-Notch Signalweg und dem FGF Gradienten darstellt (Kawamura et al. 2005; Sieger et al. 2006). Eine alleinige Translationsinhibition von *her13.2* mit einem hypomorph wirkenden Morpholino führt zu einer gestörten zyklischen Expression von *her1* und *her7*, ohne Somitengrenzdefekt. Wohingegen die *knockdown* Kombination von *her1* und *her13.2* zu einem Embryo ohne Segmentgrenzen führt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die *her1* Genaktivität zusammen mit dem FGF8 Zielgen *her13.2* sowohl für die anteriore als auch posteriore Somitenbildung benötigt wird.

Der Gegenspieler zum FGF Signalweg ist der Retinsäure Gradient, der die Positionierung der Determinationsfront bestimmt (Diez del Corral et al. 2003; Moreno and Kintner 2004; Kawakami et al. 2005). Studien in der Maus haben gezeigt, dass eine Störung des Retinsäure Gradienten zu einer Störung von zyklischer Genexpression im PSM führt und es darüber hinaus zu einer Fehlbildung in der links-rechts Asymmetrie kommt (Verrot and Pourquie 2005).

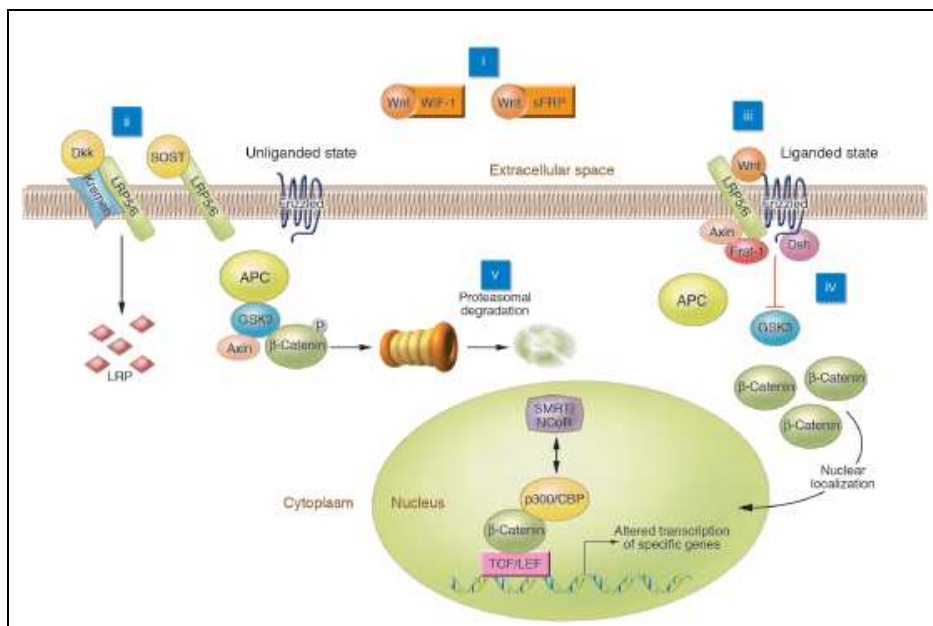
1.2.5 Termination im anterioren PSM

Im anterioren PSM, wo Zellen durch FGF determiniert werden Somiten zu bilden, spielen die Gene der *rippy*-Familie bei der Termination der Segmentierungsuhr eine entscheidende Rolle. Eine Inhibition ihrer Genfunktion führt zu einem kompletten Verlust der Segmentgrenzen. Insbesondere für *rippy1* (Kawamura et al. 2005) konnte gezeigt werden, dass die Expression außerdem für die Aufrechterhaltung der rostro-caudalen Halbsegmentalität innerhalb eines Somiten essentiell ist. Ein *rippy1* Genverlust führt zu einer

ektopen Expression von Genen beispielsweise von *her1* oder *mespb* in Bereichen vom Embryo, speziell in den Somiten, in der normalerweise keine natürliche Transkription vorhanden ist (Kawamura et al. 2005). Studien in Maus konnten zeigen, dass die *rippy2* Expression in *Wnt3a* Mutanten drastisch herunterreguliert worden ist. Möglicherweise positioniert der Wnt Signalweg die Segmentgrenzenbildung im anterioren PSM der Maus durch die Regulation von *rippy2*. In *Hes7* Mutanten konnte hingegen keine gestörte *rippy2* Expression beobachtet werden. Diese Expressionsanalysen deuten auf eine nicht regulierende Rolle von *Hes7* auf die *rippy2* Transkription hin. Für die *Hes7* Zebrafisch homologen Gene *her1* und *her7* wurden bislang im Zusammenhang der einzelnen Mutanten noch keine genaueren Analysen durchgeführt.

1.2.6 Der Wnt Signalweg

Für die räumliche und zeitliche Koordination der Entwicklungsprozesse im Embryo ist neben dem Delta-Notch Signalweg ein weiterer Signaltransduktionsweg, in dem Wnt involviert ist von großer Bedeutung. Eine zentrale Komponente hierbei ist β -Catenin, welches mit seinen verschiedenen Funktionen (Cadigan and Nusse 1997) unterschiedliche Aufgaben wahrnimmt, die von grundlegender Bedeutung in der Entwicklung von Organismen sind (Wodarz and Nusse 1998). Zum einen ist es an der direkten Zell-Zell-Kommunikation (Pinto and Clevers 2005) durch die Funktion als Adhäsionsmolekül beteiligt, zum anderen besitzt β -Catenin eine Kontrollfunktion in der Achsenelongation (Aulehla et al. 2003).



Legende zur Abb. 1.4: Wnt/ β -Catenin Signalweg auf folgender Seite

Abbildung 1.4:

Wnt/ β -Catenin Signalweg:

Die Bindung von Wnt an den Frizzled Rezeptor führt zur Bildung eines Komplexes aus Lrp, Axin, Frat-1 und Disheveled (Dsh) (iii), welcher zur Inhibierung der GSK3 Aktivität führt (iv). Daraufhin akkumuliert β -Catenin im Zytosol und kann in den Nukleus transferiert werden. Dort interagiert es mit TCF/LEF und aktiviert weitere Zielgene. Eine aktive GSK3 führt zu einer Phosphorylierung von β -Catenin und somit durch die Ubiquitinierung zu einer Degradation (v). Eine Bindung von WIF („Wnt inhibitory factor-1“) und sFRP („secreted Frizzled related protein“) an den Wnt Liganden führt zu einer Inhibition von Letzterem (i). Die Komplexbildung von Dkk und SOST/sclerostin an Lrp führt ebenfalls zu einer Inhibition (ii). (Krishnan et al. 2006)

Zytoplasmatisches β -Catenin unterliegt einem permanenten Degradationsprozess. In der Zelle liegt ein Proteinkomplex aus den Molekülen Glykogensynthasekinase3 β (GSK3 β), dem Tumorsuppressorgen Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Axin vor, welcher an das freie β -Catenin bindet (McCrea 1991; Huber et al. 1997). Dies bewirkt eine Phosphorylierung von aminoterminalen Serinen und Threoninen (S/T), die zu einem anschließenden Abbau im Ubiquitin-Proteosom-Weg führt (Aberle et al. 1997) (Abb.1.4: v). Das sekretierte lipidmodifizierte Wnt-Molekül (Abb.1.4: iii) bindet an den transmembranen Rezeptor *frizzled* (Vinson et al. 1989) und dem Ko-Rezeptor Lrp (*low-density lipoprotein (LDL) receptor-related Protein*), wodurch ein tenärer Komplex gebildet (Pinson et al. 2000; Zorn 2001; He et al. 2004; Tamai et al. 2004) und Dishevelled aktiviert wird. Die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges verhindert letztlich die Degradation von β -Catenin durch die Bindung von Dishevelled (Klingensmith et al. 1994) an Axin, welche zu einer Destabilisierung des Proteinkomplexes in der Zelle führt (Abb.1.4: iii). Als Folge reichert sich β -Catenin im Zytoplasma an (Abb.1.4: iv), gelangt in den Nukleus und kann mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/LEF-Familie interagieren (Wodarz and Nusse 1998).

Studien in der Maus haben gezeigt, dass der Wnt Signalweg über der Segmentierungsuhr steht. Des Weiteren reguliert dieser die *fgf8* Expression und somit auch den FGF Gradienten (Aulehla et al. 2003). Bislang konnte für den Zebrafisch noch nicht geklärt werden, inwieweit die einzelnen Signaltransduktionswege in Verbindung zum Wnt Signalweg stehen und welcher Art die Verknüpfung hierbei ist. Für die Maus wird postuliert, dass der Delta-Notch Signalweg durch das Wnt Zielgen NKD1 miteinander verknüpft ist (Ishikawa et al. 2004). Eine Mutation im Lrp Rezeptor führt zu den Mausmutanten „ringelschwanz“ und „crooked tail“, die Wirbelkörperdeformationen und einen verkürzten Körper aufweisen (Kokubu C 2004). In der „ringelschwanz“ Mutante konnte eine Verbindung mit dem Delta-Notch Signalweg dadurch belegt werden, dass einige Segmentierungsgene, wie *mesp2* und *Infg* in ihrer Expressionsrate reduziert sind. Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von *wnt3a* und *wnt8* zu einem ähnlichen Phänotyp der *Lrp* Mausmutante führt (Shimizu et al. 2005). Im Gegensatz zu Maus zeigen alle bisher bekannten Wnt Signalgene keine zyklische Expression im Zebrafisch (Kelly et al. 1995; Dorsky et al. 1999; Tsai et al. 2000; Aulehla et al. 2003; Shimizu et al. 2005; Dequeant et al. 2006).

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Komponenten des Delta-Notch mit den Zielgenen *her1* und *her7* und der Wnt Signalweg spielen eine bedeutende Rolle während der Somitogenese. Die Analyse der *her1* und *her7* Zebrafischmutanten und der Vergleich mit den bislang erbrachten *knockdown* Daten sollten zu einem besseren Verständnis der bisher kontrovers diskutierten Rolle von *her1* und *her7* führen. Eine weitergeführte *her1*-Promotor-Studie sollte die regulatorische Funktion der *her1* Expression detaillierter untersuchen und insbesondere einen Hinweis darauf geben, ob das posteriore „clock“ Element von dem anterioren „clock“ Element abhängig ist oder nicht. Die Rolle von *her1* und *her7* auf die Termination der Segmentierungsuhr sollte an hand der Expressionsanalyse von *rippy* näher untersucht werden. Eine mögliche synergistische Rolle in der Entwicklung des Zebrafisches zwischen dem Delta-Notch und dem Wnt Signalweg sollte schließlich durch die Inhibition einzelner Komponenten des Delta-Notch Signalweges und dem Co-Rezeptor Lrp des Wnt Signalweges aufgedeckt werden.

2 Materialien

2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Alle nachfolgenden wässrigen Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser hergestellt und anschließend, wenn nicht anders aufgeführt, autoklaviert. Die Zusammensetzung von Puffern und Lösungen, die Bestandteile von Fertig-Kits sind, wird nicht angegeben. Sofern Herstellerangaben bezüglich der Inhaltsstoffe vorhanden sind, wird an entsprechender Stelle auf das Herstellerhandbuch verwiesen. Des Weiteren erfolgte die Lagerung der Medien und Puffer, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur oder nach Herstellerangaben. Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen entsprachen mindestens der Reinheitsstufe „pro analysis“. Puffer und Lösungen, die nicht weiter aufgeführt werden, wurden nach Sambrook et al (1989) hergestellt.

DNA-Extraktionspuffer

10 mM Tris pH 8.2
10 mM EDTA
200 mM NaCl
10 µl ProteinaseK
0.5 % SDS

ProteinaseK

19.45 mg/ml in 10 mM TrisHCl
pH7.5, 4 °C lagern

Morpholino-Injektion-Lösung

X mM Morpholino
0.1 M KCl
0.2 % Phenolrot
4 °C lagern

20 x PBS

2.76 M NaCl
50 mM KCl
160 mM Na₂HPO₄
50 mM KH₂PO₄

4% PFA

4 g Paraformaldehyd
in 100 ml 1 x PBS
-20 °C lagern

2 x SSCT

2 x SSC
0.1 % Tween-20

Tricaine

(3-amino-benzoesäure-ethylester)
400 mg Tricaine
97.9 ml Wasser
2.1 ml Tris pH 9
pH 7, -20 °C lagern

Low-TE-Puffer

10 mM Tris pH 8
0.1 mM EDTA

DNA-Injektion-Lösung

80 ng DNA
0.1 M KCl
0.2 % Phenolrot
4 °C lagern

1 x PBST

1 x PBS
0.1 % Tween-20

20 x SSC

3 M NaCl
0.3 M NaCitrat
pH 4.7

Blocking-Lösungen

Block I: 0.2 % BSA (Bovine Serum Albumine) in PBST
Block II: 0.2 % BSA / 5 % Schafserum (hitzeinaktiviert)
in PBST

Alkalische Phosphatase-Puffer

100 mM Tris pH 9,5
 50 mM MgCl₂
 100 mM NaCl
 0.1 % Tween-20
 5 mM Levamisol

TEA/AA

0.1 M Triethanolamin pH 8
 0.25 % Essigsäureanhydrid
 4 °C lagern

Hybmix (Hybridisierungspuffer)

50 % Formamid
 5 × SSC
 1 % Boehringer Block (Roche)
 1 mg/ml Yeast RNA (Roche)
 100 µg/ml Heparin
 1 × Denhards
 0.1 % Tween-20
 0.1 % Chaps
 5 mM EDTA
 -20 °C lagern

2.2 Verwendete Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Arbeitskonzentration 20µM) wurden von der Firma Metabion bezogen.

Für die Generierung von Sonden wurden die im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotide verwendet (Tab. 2.1).

Sonde	Sequenz
<i>her1 exon</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG TGT ATC GTC TTC TT-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCT CCA CAA AGG CT-rev
<i>her1 intron</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG TGT ATA ATT AAT G-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CTG AAT TTA AAC A-rev
<i>her7</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG TGG AAT GTA CTG AT -fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TGG AAT GTA CTG AT-rev
<i>deltaC</i>	CAATGAGTGTGACAGCAACC-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CAG TAG CAA ACA CAC GTT GT-rev
<i>deltaD</i>	GCC ATG GGA CGA CTA ATG ATA-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CGT TGC TGT CGG TTT ACT TCA-rev
<i>myoD</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG GTC GGA TAT CCC CTT-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG GTT TCC AGC AGT GGA-rev
<i>rippy1</i>	ATG AAT TCT GTG TGC TTT GCC A-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCA GTT GAA AGC TG-rev
<i>rippy2</i>	ATG GAG AAC ATC ACT TTC ACG A-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCA TCT GAG CTC TT-rev
<i>mespa</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG TGC TGT ATC AGA TGC-fw TAATACGACTCACTATAGGG TCA CCT TGA ACT GGA-rev
<i>mespb</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG ACG CTA GTG AGA AGG-fw TAATACGACTCACTATAGGG GCC CAC ACT GTT GAC-rev
<i>gfp</i>	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG CGA GGA GCT GTT CAC-fw TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CGG ACT GGG TGC TCA-rev
<i>eplin</i>	Plasmid von A. Oates, <i>BamHI</i> linearisiert, T7 Polymerase für Amplifikation

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von Sonden. T3: (AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG) und T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) sind kursiv dargestellt. fw=forward, rev=reverse

Für die Genotypisierung und auch Sequenzierung des Amplikons wurden folgende Oligonukleotide verwendet (Tab. 2.2):

Gen	Name	Oligonukleotide	Bemerkung
<i>her1</i>	Her1mutfor	GAGAAGAAACGGAGAGACCGG-fw	für Sequenzierung verwendet
	Her1mutrev	CTTTACATACGTGTAGACAGG-rev	
<i>her7</i>	her7-orf-for	GAT GAA AAT CCT GGC ACAGACT-fw	für Sequenzierung verwendet
	Her7rv627-608	TCT GAA TGC AGC TCT GCT CG-rev	
<i>bea</i>	bea_forw	GGGTCCACAGGCTCACGTTG-fw	für Sequenzierung verwendet
	bea_rev	GGACACCTTAAATGGGCCACC-rev	
<i>des</i>	des_forw	CAAGCGAGAGTTTCCCACCG-fw	für Sequenzierung verwendet
	des_rev	CTGTGCAACAAGTGACGCTCA-rev	
<i>aei</i>	aei_forw	CCTCAGGGGTTTTGTTTCAGGGG-fw	für Sequenzierung verwendet
	aei_rev	CTGGCCATGTGAACCCAAACGC-rev	

Tabelle 2.2: verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung von Mutantenlinien

Um stille oder seltene DNA-GFP Integrationen erfassen zu können, wurde nach Isolierung der genomischen DNA des interessierenden Fisches eine PCR durchgeführt und folgende Oligonukleotide verwendet (Tab. 2.3):

Gen	Name	Oligonukleotide
<i>wnt5a</i>	Wnt5a-sense	CAG TTC TCA CGT CTG CTA CTT GCA
	Wnt5a-sense	ACT TCC GGC GTG TTG GAG AAT TC
<i>gfp</i>	GFPfor3	CGG CAA CTA CAA GAC CCG CG
	GFPprev3	GTC CTC GAT GTT GTG GCG GA

Tabelle 2.3: verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung von möglichen transgenen Linien

2.3 antisense Morpholino modifizierte Oligonukleotide

Die verwendeten *antisense* Morpholino-modifizierten Oligonukleotide (Nasevicius and Ekker 2000) wurden von der Firma Gene Tools hergestellt und werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 2.4).

Gen	Sequenz	Konz.	paper
<i>her1</i> MO	5'-AGT ATT GTA TTC CCG CTG ATC TGT C-3'	0.75 mM	Gajewski M. et al., 2003
<i>her7</i> MO	5'-ATG CAG GTG GAG GTC TTT CAT CGA G-3'	0.6 mM	Gajewski M. et al., 2003
<i>Su(H)</i> MO	5'-CGC CAT CTT CAC CAA CTC TCT CTA A-3'	0.5 mM	Sieger D. et al., 2003
<i>her13.2</i> MO	5'-CAT ATT GCT GCA AGT TCA GGA CGC TT-3'	1 mM	Sieger D. et al., 2006
<i>lrp6.1</i> MO	5'-CTG TGA TTC GGG TTG TTC GCG TTG A-3	0.6 mM	nicht publiziert
<i>lrp6.2</i> MO	5'-TTC TCC GCT GCA GTT TTT CAT CGA T-3'	0.75 mM	nicht publiziert

Tabelle 2.4: verwendete *antisense* Morpholino modifizierten Oligonukleotide

2.4 Generierung der Konstrukte für *her1* transgene Linien

Für die vorliegende Arbeit wurden, ausgehend vom bereits publizierten *her1*-Promotor-Konstrukt (Gajewski et al. 2003), drei Konstrukte generiert, die im Folgenden dargestellt werden (Abb. 2.1).

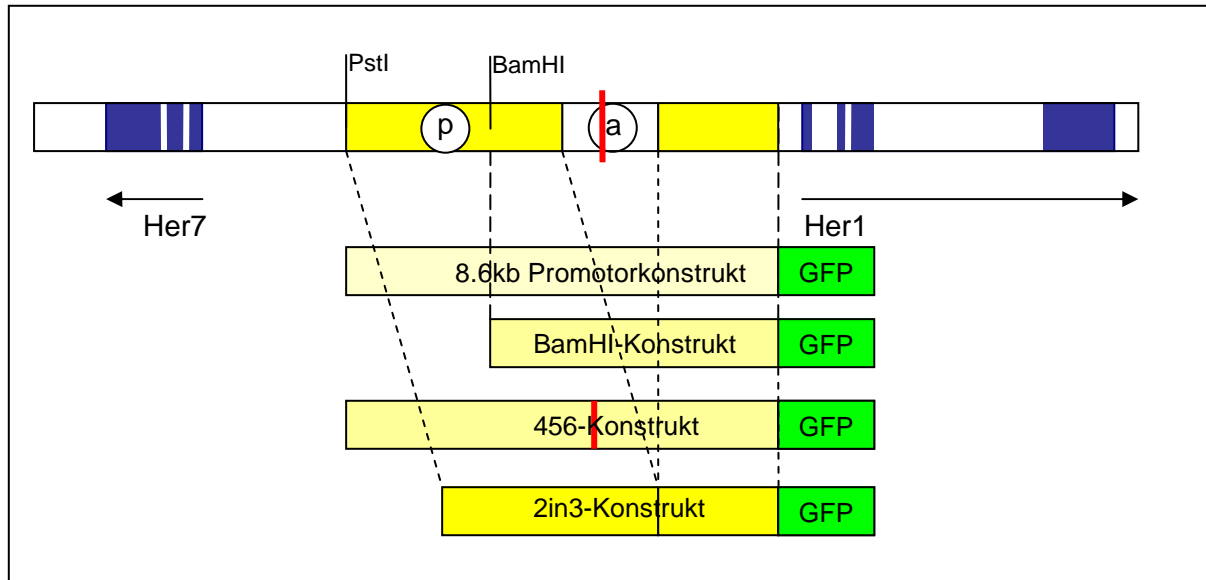


Abbildung 2.1:

her1 Promotor:

Modifiziert nach Gajewski et al., (2003). Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Das BamHI-Konstrukt besitzt eine Länge von 6668 bp, das 2in3-Konstrukt eine Länge von 8192 bp und das 456-Konstrukt eine Länge von 8564 bp. Der rote Balken deutet die fehlende *sps*-Sequenz an.

Für die Generierung vom BamHI-Konstrukt wurde der Promotor mit *PstI* und *BamHI* geschnitten. Die generierten Überhänge wurden durch Nukleotide mit Hilfe von *Klenow-fill* aufgefüllt. Die DNA-Enden wurden nach Herstellerangaben durch Polynukleotid Kinase phosphoryliert und religiert. Um die Konstrukte „456“ und „2in3“ zu generieren, wurden zunächst die einzelnen Fragmente mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotide in Tabelle 2.5 zusammengefasst) und dann miteinander ligiert.

Konstrukt		Name	Oligonukleotid
456	Fragment1	F-II-fw-her1P-BamHI	TTA AGG ATC CTC TGA TAG GAT AAT TAG TC
456	Fragment1	neu856-NcoI-rev-F-II	CCA TGG GGA CCA TTA CGA AAC
456	Fragment2	525/526-NcoI-rv-F-I	GGC CCA TGG CTG AAA ATC GGA AG
456	Fragment2	her1P-ohne-sps-NcoI-fw-F-I	GGC CCA TGG CCA TTT TAA ATT GCT G
2in3	Fragment3	F-II-fw-her1P-BamHI	TTA AGG ATC CTC TGA TAG GAT AAT TAG TC
2in3	Fragment3	neu856-NcoI-rev-F-II	CCA TGG GGA CCA TTA CGA AAC
2in3	Fragment4	525/526-NcoI-rv-F-I	GGC CCA TGG CTG AAA ATC GGA AG
2in3	Fragment4	526-NcoI-fw-F-I	GGC CCA TGG AAA GCC ACA TCA AAG

Tabelle 2.5: verwendete Oligonukleotide für Generierung der einzelnen Fragmente zur Klonierung

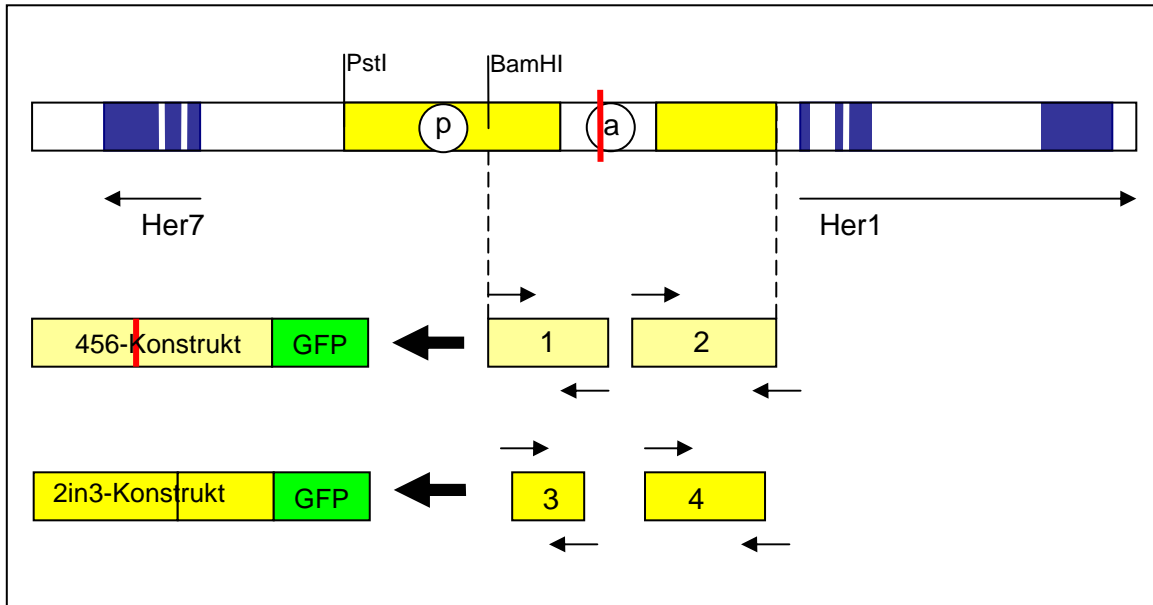


Abbildung 2.2:

her1 Promotor:

Modifiziert nach Gajewski et al., (2003). Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Zur Generierung der Konstrukte „456“ und „2in3“ wurden zunächst einzelne Fragmente (1-4) mittels PCR amplifiziert.

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen und Polymerasen mit den jeweils zugehörigen Puffern wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von der Firma NEB bezogen und bei -20°C gelagert.

2.5 Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Mini Kit-Wizard Plus, SV Mini-Preps	zur Aufreinigung von Plasmid-DNA	Promega
TOPO-Kit zur Klonierung von PCR-Produkten Invitrogen	zur Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
Gelextraktionskit	zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Marligen/Qiagen
PCR-Purification	zur Aufreinigung von PCR-Produkten	Marligen
cDNA-Synthese	zur Erststrang-Synthese	Invitrogen

Tabelle 2.6: verwendete Kits

2.6 Bakterienstämme und Plasmide

Die Bakterienstämme und Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind mit ihren wichtigsten genetischen Eigenschaften und unter Angabe ihrer Herkunft in den Tabellen 2.7 und 2.8 zusammengefasst.

Die zur Generierung von Plasmidkonstrukten nötigen Klonierungen wurden mit *E.coli* DH5alpha oder XL1Blue durchgeführt.

Alle gentechnischen Arbeiten wurden nach S1-Richtlinien durchgeführt.

E.coli	Marker/Genotyp	Referenz
DH5alpha	F-thi-1 endA1 hsdR17(r,m-) supE44 DlacU169(80lacZDM15) recA1 gyrA96 relA1	(Hanahan 1983)
XL1Blue	recA1 end A1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F- proAB lac1q ZDM15 Tn10 (Tetr)]	(Bullock et al. 1987)

Tabelle 2.7: verwendete Bakterienstämme

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Plasmid	Marker/Genotyp	Referenz
pCR2.1-TOPO	MCS, LacZa-peptide, T7 RNA polymerase promotor, SP6 RNA polymerase promotor, Amp, Kn, pUC origin	Invitrogen
pHsREM	MCS, LacZa-peptide, T7 RNA polymerase promotor, SP6 RNA polymerase promotor, Amp, Kn, pUC origin	(Karch et al. 1981; Shopland and Lis 1996)
mPBS	MCS, LacZa-peptide, T7 RNA polymerase promotor, SP6 RNA polymerase promotor, Amp, Kn, pUC origin	(Thermes et al. 2002)

Tabelle 2.8: verwendete Plasmide

Die verwendeten und generierten Fischlinien werden in folgender Tabelle aufgeführt:

Fischmutante	betroffenes Gen	Mutantenallel	Referenz
bea	<i>deltaC</i>	tm98	(Julich et al. 2005)
des	<i>notch1a</i>	tg37	(Holley et al. 2002)
aei	<i>deltaD</i>	tg249	(Holley et al. 2000)
K54-transgene Linie	<i>her1</i> -Promotor		(Gajewski et al. 2003)
525-transgene Linie	<i>her1</i> -Promotor		(Gajewski et al. 2003)
<i>her1</i> KO	<i>her1</i>	hu2124	Hubrecht-Tilling-Labor
<i>her7</i> KO	<i>her7</i>	hu2526	Hubrecht-Tilling-Labor
bea/ <i>her1</i>	<i>deltaC/her1</i>	tm98/hu212	eigene Kreuzungen
bea/ <i>her7</i>	<i>deltaC/her7</i>	tm98/hu2526	eigene Kreuzungen
K54- <i>her1</i> KO	<i>her1</i> -Promotor <i>her1</i> KO		eigene Kreuzungen
525- <i>her1</i> KO	<i>her1</i> -Promotor <i>her1</i> KO		eigene Kreuzungen

Tabelle 2.9: verwendete Fisch- und Mutantenlinien

3 Methoden

3.1 Fischhaltung und Gewinnung von Embryonen

Für die vorliegende Arbeit wurde die kommerziell erworbenen Zebrafische (*Danio rerio*) verwendet.

3.1.1 Haltung

Adulte Fische wurden in einer Aquarienanlage (AquaSchwarz), bestehend aus seriell angeordneten Wasserbecken, bei einer Wassertemperatur zwischen 26 und 28°C gehalten. Embryonen wurden nach natürlichem Laichen abgesammelt und nach Kimmel et al. (1995) und Iwamatsu (2004) aufgezogen.

3.1.2 Fixierung und Dechorionisierung von Embryonen

Embryonen im gewünschten Stadium wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über mehrere Tage bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Für die weitere Verwendung wurde das Chorion mechanisch mit Hilfe von Pinzetten entfernt.

3.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung juveniler bzw. adulter Fische wurde genomische DNA aus der Schwanzflosse isoliert. Nach Betäubung des Fisches mit „Tricaine“ wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells ein Stück Schwanzflosse entnommen und in 100µl DNA-Extraktionspuffer überführt. Nach dreistündiger Inkubation bei 55°C wurde die DNA-Lösung mit 1.5 Vol 100% igem EtOH gefällt und anschließend pelletiert (2min bei 14.000rpm). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500µl 75% igem EtOH gewaschen (2min bei 14.000 rpm). Die DNA wurde dann bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und in 100µl Low-TE-Puffer resuspendiert. Im Anschluss daran wurde mittels PCR der interessierende Bereich im Genom amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Die PCR-Aufreinigung im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe von AcroPrep™96 Platten (PALL). Dabei wurde nach durchgeführter PCR 50µl Wasser zum PCR-Ansatz hinzugegeben und jeweils in ein *well* der Platte überführt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 150µl Wasser wurde die Membran mit 50µl Wasser für 10 Minuten inkubiert und anschließend die gelöste DNA in Reaktionsgefäße überführt.

3.2.1 *her1*-Genotypisierung

PCR Profil:

Amplikongröße *her1*: 300 bp

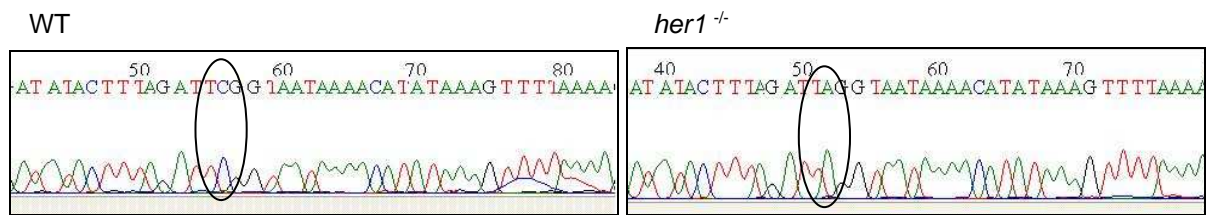
acc. no. X97329

verwendete Primer: Her1mutfor
Her1mutrev

1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	15 sec	x 34
3)	55 °C	15 sec	
4)	72 °C	30 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.1: PCR Profil *her1*

Punktmutation: c > a bp 185



3.2.2 *her7*-Genotypisierung

PCR Profil:

Amplikongröße *her7*: 700 bp

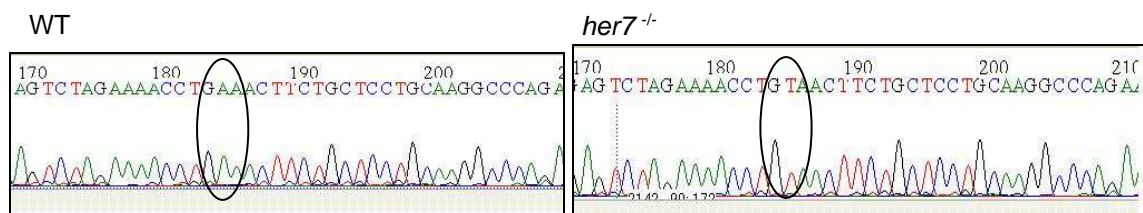
acc. no. AF240772

verwendete Primer: her7-orf-for
Her7rev627-608

1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	15 sec	x 34
3)	55 °C	15 sec	
4)	72 °C	45 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.2: PCR Profil *her7*

Punktmutation: a > t bp 208



3.2.3 *bea/deltaC*-Genotypisierung

PCR Profil:

Amplikongröße *deltaC*: 500 bp
 acc. no. NW_633612.1, *bea*^{tm98}
 verwendete Primer: *bea_forw*
 bea_rev


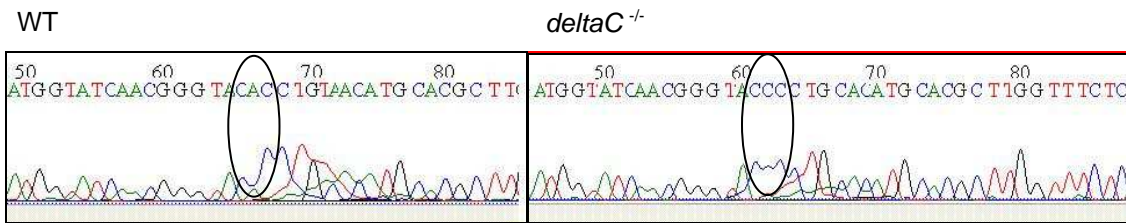
1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	30 sec	
3)	53 °C	30 sec	
4)	72 °C	30 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.3: PCR Profil *deltaC*

Punktmutation: a > c bp 1580



3.2.4 *aei/deltaD*-Genotypisierung

PCR Profil:

Amplikongröße *deltaD*: 300 bp
 acc. no. NW_648814.1, *aei*^{tg249/AG49}
 verwendete Primer: *aei_forw*
 aei_rev


1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	30 sec	
3)	60 °C	30 sec	
4)	72 °C	30 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.4: PCR Profil *deltaD*

Punktmutation: a > t bp 190

3.2.5 *des/notch1a*-Genotypisierung

PCR Profil:

Amplikongröße *notch1a*: 400 bp
 acc. no. NW_001512207, *des*^{P37A}
 verwendete Primer: *des_forw*
 des_rev


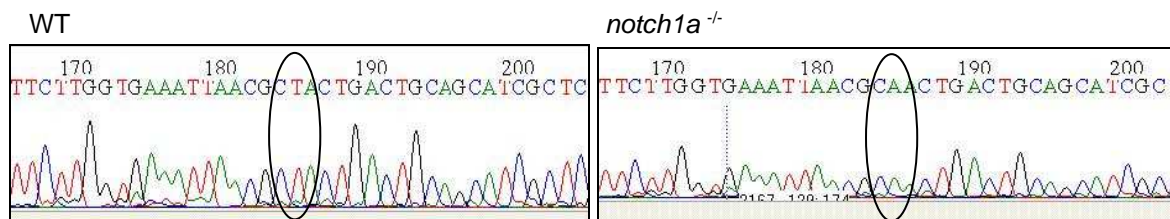
1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	30 sec	
3)	58 °C	30 sec	
4)	72 °C	30 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.5: PCR Profil *notch1a*

Punktmutation: t > a bp 186



3.3 Klonierung

Restriktion und Ligation von DNA erfolgten im Allgemeinen nach Sambrook & Russel (1989). Für die Charakterisierung von Plasmid-DNA wurde diese durch Typ-II Restriktionsendonukleasen in spezifische Fragmente gespalten. Restriktionsenzyme dieser Art erkennen spezifische, kurze DNA-Sequenzen (Tetra- bis Hexanukleotide) und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz. Dabei können glatte (*blunt ends*) oder überstehende (*sticky ends*) Enden entstehen (Winnacker 1985). Die Inkubationszeit betrug, in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge und Leistungsfähigkeit des Enzyms, zwischen einer und drei Stunden. Für einen analytischen Nachweis wurde ein Ansatz von 20µl mit maximal 10 U Enzym und 0.5µg DNA gewählt. Sowohl die Enzym-Menge als auch die DNA Konzentration wurden bei einem präparativen Restriktionsansatz erhöht. So wurden bei einer DNA-Menge von 1µg 15 U Enzym eingesetzt.

Für die kovalente Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten muss an den zu ligierenden Enden das Zuckerphosphatgerüst mit Phosphodiester-Bindungen verbunden werden. Die DNA-Ligationen wurden mit der ATP-abhängigen T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (NEB bzw. Invitrogen) durchgeführt. Hierbei wurde ein molares Verhältnis Insert:Vektor von 3:1 angestrebt. Die Länge der Inkubation und die optimale Ligationstemperatur ergaben sich bei *sticky ends* über folgende Regel: Pro überstehende Base ist eine Temperatureinheit von 4°C zu wählen, d. h. bei einem Nukleotidüberhang von drei Basen beträgt die optimale Inkubationstemperatur für die Ligation 12°C (Tipler 2004). Eine Ligation mit *blunt ends* erfolgte über Nacht bei 4°C mit anschließender einständiger Inkubation bei Raumtemperatur.

3.4 *in situ* Hybridisierung

Für die räumlich-zeitliche Detektion von mRNA wurde die Technik der *in situ Hybridisierung* angewandt. Das Prinzip beruht auf der Paarung von komplementären Basen, wobei die künstlich hergestellte Sonde markiert ist und durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden kann. Die fixierten Embryonen wurden mit Digoxigenin markierten *anti sense* RNA Sonden inkubiert (Tautz and Pfeifle 1989). Die hybridisierten Moleküle wurden

immunochemisch mit Hilfe der alkalischen Phosphatase detektiert und mittels Farbsubstrat sichtbar gemacht, wobei durch die enzymatische Umsetzung spezifischer Substrate farbige Präzipitate erzeugt wurden.

Die automatisierte *in situ* Hybridisierung für *Danio rerio* erfolgte nach Leve (Leve et al. 2001) wobei der *InsituPro* Automat (*Abimed*) verwendet wurde (Plickert et al. 1997). Für die *in situ*-Hybridisierungen mit *Oryzias latipes* wurde das in einigen Punkten modifizierte Protokoll von Quiring (Quiring et al. 2004) angewandt. So wurde die ProteinaseK-Behandlung nach dem Fixierungsschritt durch eine Hitzebehandlung der Embryonen ersetzt (siehe (Leve et al. 2001)).

3.4.1 Protokoll

1)	dechorionisierte Embryonen in PBST überführen
	<i>heat treatment</i>
2)	10 min aufkochen, gelegentlich invertieren
3)	5 min auf Eis inkubieren
4)	2 mal 5 min mit PBST waschen
	<i>treatment with acetanhydrid</i>
5)	10 min in TEA/AA inkubieren
6)	5 min mit PBST waschen
	<i>prehybridisation</i>
7)	5 min in Hybmix inkubieren
8)	weitere Schritte bei 65°C
9)	1 h in Hybmix inkubieren
	<i>Hybridisierung</i>
10)	16 h Inkubation mit Sonde
11)	30 min Hybmix inkubieren
12)	2 mal 30 min mit Hybmix/2xSSCT waschen
13)	2 mal 30 min mit 0,2 x SSCT waschen
14)	ab jetzt bei Raumtemperatur
	<i>Antibody Incubation</i>
15)	2 mal 10 min mit PBST waschen
16)	10 min in BlockI inkubieren
17)	60 min in BlockII inkubieren
18)	4 h Antikörper Inkubation (1:2000 in BlockII)
19)	8 mal 15 min mit PBST waschen
20)	2 mal 30 min mit PBST waschen
	<i>staining reaction</i>
21)	10 min AP-Puffer inkubieren
22)	Fäberekation (BM Purple)
23)	abstoppen mit PBST bzw. PFA

Tabelle 3.6: *in situ* Hybridisierungsprotokoll

3.5 *in vitro* Transkription

Für die Herstellung einer markierten Ribonukleinsäure (RNA) Sonde wurde zunächst das gewünschte Fragment mittels PCR amplifiziert, wobei Oligonukleotide mit T7- bzw. T3-Promotorsequenz verwendet wurden. Darauf folgte die Generierung der digoxigenin markierten Sonde nach folgendem Protokoll:

200 ng	PCR-Produkt bzw. 1µg linearisierter Plasmid-DNA
2 µl	RNA Labeling Mix von Roche
2 µl	10 x Transkriptionspuffer
1 µl	RNaseInhibitor
2 µl	Polymerase
total 20 µl	Wasser
	3-4 Stunden bei 37°C inkubieren
	1 µl DNase(RNasefrei) hinzugeben, 15min bei 37°C inkubieren
	zum Stoppen der Reaktion: 1µl 0.2 M EDTA hinzugeben
	Ethanol-fällung:
	2.5 x Volumen 100% Ethanol
	1/10 Volumen 4 M LiCl
	mindestens zwei Stunden bei -20°C fällen
	Zentrifugation:
	20min bei 4°C
	Überstand verwerfen
	50 µl 70% Ethanol hinzugeben
	5min bei 4°C
	Pellet trocken, in 20µl aufnehmen
	1µl RNaseInhibitor hinzugeben bei 37°C 15min inkubieren
	zur dauerhaften Lagerung 20µl Formamid hinzugeben

Tabelle 3.7: Protokoll zur Generierung von digoxigenin markierten RNA Sonden

3.6 Injektion

3.6.1 Herstellung der Kapillaren

Die Injektion von *antisense* Morpholino modifizierten Oligonukleotiden (Morpholino) bzw. linearisierter Plasmid-DNA wurde im Einzell-Stadium mit Hilfe des FemtoJet® und einem Micromanipulator von Eppendorf durchgeführt. Die verwendeten Injektionskapillaren (von Hildenberg) wurden mittels des *Sutter P9 Micropipette Puller* hergestellt. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet.

	Puller	Heat	Velocity	Pull	Time
Zebrafish	Horizontal	537	100	100	150

Tabelle 3.8: Parameter für Injektionsnadeln

3.6.2 Injektionslösung

Die verwendeten Morpholinos wurden in einer Konzentration zwischen 0.5-0.9mM mit 0.1M KCL und 0.2 %igem Phenolrot versetzt und injiziert.

3.6.3 Injektion

Die Injektion sowohl der DNA, als auch der Morpholinos wurde jeweils im Einzell-Stadium durchgeführt (Kimmel et al. 1995).

3.7 Knochenfärbung

Für die Visualisierung des Zebrafisch Knochenskelettes wurde die Methode von Du (Du et al. 2001) angewandt. Dabei wurde das Protokoll soweit modifiziert, dass der 9-11mm große Juvenilfisch (21 Tage alt) über Nacht in einer 0,2%igen Calcein-Lösung inkubiert wurde. Nach zehnstündigem Auswaschen mit frischen Aquarienwasser wurde der Fisch mit Hilfe des UV-Stereomikroskops (MZFLHIII; Leica) und einem GFP3-Filter analysiert und fotografiert (Leica DFC480).

3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*PolymeraseChainReaction*, PCR) dient der gezielten, enzymatisch katalysierten Amplifikation von DNA-Molekülen *in vitro* (Mullis 1990). Zur Generierung von *in situ* Proben wurde die Taq-Polymerase von Amplicon bzw. die hauseigene Taq-Polymerase von Michael Kröiher verwendet. Bei einer Amplifikation von Fragmenten, die keine Fehler in der Abfolge der Nukleotidsequenz aufweisen durften, wurden Polymerasen mit „proof reading“ Funktion, wie zum Beispiel *Vent* (NEB) oder die *Expand High Fidelity* (Roche), verwendet.

3.9 DNA-Konzentrierung

Zur Konzentrierung von DNA und zum Entfernen von Salzen wurde eine Fällung mit 2.5fachem Volumen 100%igem Ethanol und 1/10 Volumen an 3M Natriumacetat-Lösung (bei Plasmid-DNA) bzw. 5M Natriumchlorid-Lösung (bei genomischer DNA) durchgeführt. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 14000 Umdrehungen pro Minute wurde anschließend das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die DNA wurde luftgetrocknet und danach in H₂O_{bidest} mit gewünschtem Endvolumen und Endkonzentration gelöst. Die Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte nach Standardmethode.

3.10 DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger (Sanger et al. 1977) im Institut für Genetik Köln. Dafür wurden folgende Konzentrationen und Komponenten verwendet:

Komponente	Konzentration/Volumen
BigDye	0.5 µl
Puffer	1.75 µl
Oligonukleotid (10µM)	0.5 µl
DNA/Plasmid	10ng/100ng

und folgendes PCR-Profil verwendet:


1)	94 °C	1 min	
2)	94 °C	10 sec	
3)	55 °C	15 sec	
4)	60 °C	4 min	
5)	hold 12 °C		

Tabelle 3.9: PCR-Profil für DNA-Sequenzierung

3.11 Reinigung von DNA

Die Abtrennung von Puffer, Enzymen und kurzen DNA-Fragmenten von PCR- sowie Restriktions- und Ligationsansätzen erfolgte entweder unter Verwendung des PCR Purification- bzw. Gelextraktions-Kit von Marligen oder Qiagen. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die Methode auf Freisetzung der DNA durch Aufschmelzen der Agarose und nachfolgender selektiver Bindung der DNA an eine Silikatmatrix beruht. Des Weiteren wurde zur Aufreinigung von DNA die Methode der Phenol-Chloroform Extraktion angewendet.

3.12 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen mit gesteigerter Kompetenz zur Aufnahme von DNA durch einen Hitzeschock wurden nach der Methode von Inoue (Inoue H. 1990) für „Ultra-kompetente-Zellen“ hergestellt.

Die Transformation mittels Hitzeschock wurde nach Hanahan (Hanahan 1983) durchgeführt.

3.13 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab (5ml) erfolgte durch das Mini Kit von Promega nach Herstellerangaben.

3.14 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Gewebe erfolgte mit TRIzol von Invitrogen nach Herstellerangaben.

3.15 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese bzw. Erststrangsynthese erfolgte mit Hilfe des SuperScriptIII-Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben.

3.16 PCR zur Analyse von transgenen Gründerfischen

Nach Aufzucht der mit DNA injizierten Embryonen wurden diese gegeneinander ausgekreuzt. Bei einer erfolgreichen Integration des Konstruktes mit GFP sollten einige der Nachkommen im frühen Stadium GFP-Protein translatieren, welches durch das Anregen mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Um eine stille oder seltene Integration quantifizieren zu können, wurde die genomische DNA des gesamten Geleges isoliert. Anschließend daran wurde eine PCR durchgeführt, welche Oligonukleotide enthielt, die bei gegebener Integration ein entsprechendes GFP-Produkt amplifizieren.

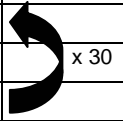
1)	95 °C	2 min	
2)	95 °C	15 sec	
3)	55 °C	15 sec	
4)	72 °C	30 sec	
5)	72 °C	5 min	
6)	hold 12 °C		

Tabelle 3.10: PCR-transgenen-Reaktionsansatz

Als interne Kontrolle diente Wnt5 (400bp) (siehe Tabelle 2.3).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Mutante *her1*^{-/-}

Die Aktivierung des Delta-Notch Signalweges führt zu einer Expression der *her* Gene. Bislang wurden 23 *her* Gene im Zebrafisch gefunden (Sieger et al. 2004), von denen allerdings nicht alle an der Somitogenese beteiligt sind. Das *her1* Gen wurde erstmals 1996 von Müller beschrieben (Müller et al. 1996) und im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass *her1* ein zyklisches Expressionsmuster im präsomitischen Mesoderm (PSM) aufweist (Holley et al. 2000). Erste *knockdown* Versuche von *her1* führten zu unterschiedlichen Phänotypen. So zeigten Henry et al. (2002), dass *her1* für die Bildung der ersten drei Somitengrenzen essentiell ist, während weitere stärkere Phänotypen, wie z. B. einen Zusammenbruch der Segmentgrenzen verteilt über den gesamten Embryo, von anderen Autoren beobachtet werden konnten (Holley et al. 2000; Oates and Ho 2002). Es stellt sich die Frage, welche Rolle *her1* im Detail während der embryonalen Entwicklung besitzt. Die verwendete *her1* Mutante wurde in einem Tilling Projekt im Hubrecht-Labor auf Anfrage generiert und für eine Analyse zur Verfügung gestellt.

Die *her* Gene besitzen eine „basic“ Helix-Loop-Helix Domäne (bHLH), die zur Dimerisierung mit Proteinen benötigt wird. Die hier analysierte Mutante besitzt eine Punktmutation in der *loop* Region, welche in ihrer Basenabfolge von einem „tcg“ zu einem „tag“ führt. Dadurch wird anstelle eines Serin ein Stopp codiert, welche zu einer Nonsense-Mutation führt (Abb. 4.1).

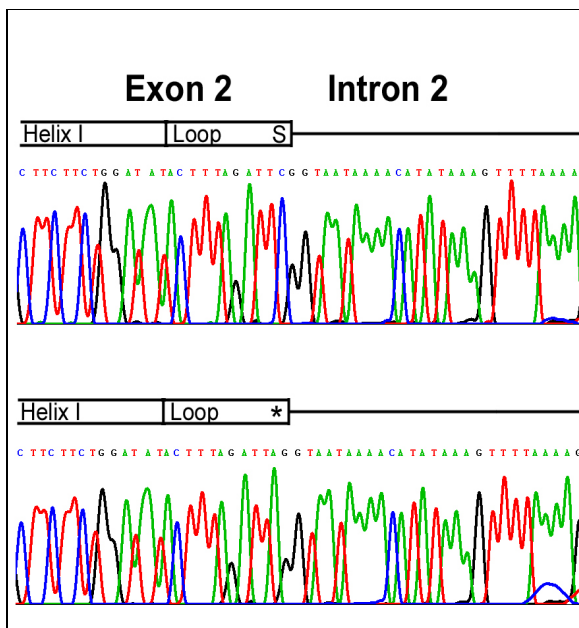


Abbildung 4.1:
her1 Chromatogramm:
Die TCG-(Serin) wird zu TAG (Stop)-Sequenz.
obere Reihe WT, untere Reihe *her1*KO, Loop-
und Helix-Region in Exon 2, sowie Intron 2
schematisch angedeutet.

Die morphologische Charakterisierung der *her1* Mutante zeigt Somitengrenzendefekte in den ersten drei Somiten (+/-1) und stimmt mit den auf Morpholino Injektion basierenden veröffentlichten *knockdown* Daten von Henry et al. (2002) überein (Abb. 4.2).

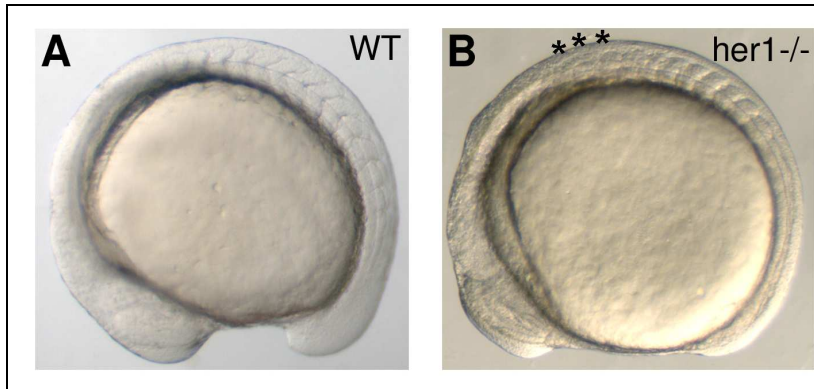


Abbildung 4.2:
her1KO Phänotyp:
Im Vergleich zum Wildtyp (A) zeigt der *her1*KO (B) einen Defekt in den ersten drei Somitengrenzen (Sternchen).
(A) WT, (B) *her1*KO, 10-12 SS, laterale Ansicht, anterior links

Während der Somitenbildung im anterioren PSM erhält jedes Segment eine anteriore und posteriore Polarität, die zu einer rostralen und caudalen Somitenhälfte führt. Diese Kompartimentisierung kann durch *myoD*, welches nur in jedem posterioren Halbsegment exprimiert wird, nachgewiesen werden (Weinberg et al. 1996) (Abb. 4.3: A). Eine Störung in diesem Muster deutet auf eine Störung in der Halbsegmentalität hin (vergleiche Abb. 4.3: A mit B).

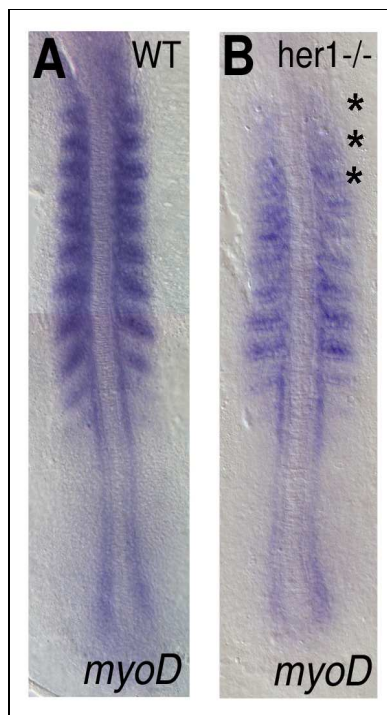


Abbildung 4.3:
a-p Polarität im *her1*KO:
myoD Expression ist halbsegmental im WT (A). Im *her1*KO (B) (n=15) scheint die *myoD* Expression diffus in der Region der ersten drei (+/-1) Somiten (Sternchen) zu sein.
(A) WT, (B) *her1*KO im 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Mit Hilfe von *myoD* kann gezeigt werden, dass die rostro-caudale Polarität in den ersten drei Segmenten (+/-1) verloren gegangen ist, diese aber ab etwa dem vierten Somiten wieder

hergestellt wird (Abb. 4.3: B). Es kann festgehalten werden, dass der *her1*KO sowohl morphologische Defekte in den ersten drei Somitengrenzen, als auch eine Störung der rostro-caudalen Polarität in diesem Bereich aufweist. Daher ist anzunehmen, dass Her1 essentiell für die Segmentierung in dieser Region zu sein scheint.

Die ersten drei Somitengrenzen werden in der frühen Entwicklung des Embryos angelegt. Möglicherweise führt eine Störung der Segmentierungsuhr zu diesem Phänotyp und kann daher durch die Analyse der zyklisch exprimierenden Gene (*deltaC*, *her1* und *her7*) näher untersucht werden (Abb. 4.4).

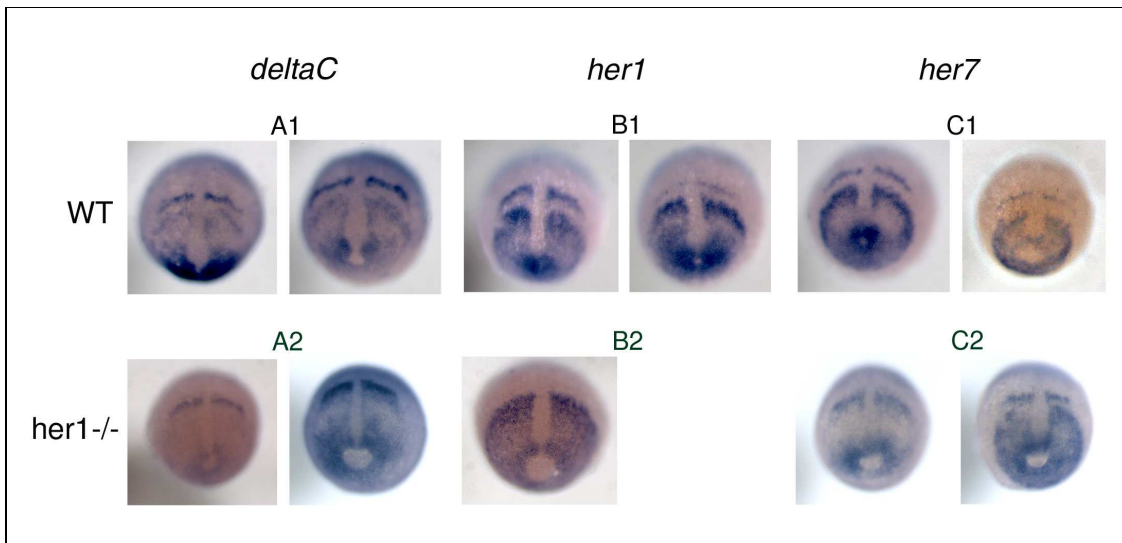


Abbildung 4.4:

zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7* im *her1*KO:

deltaC, *her1* und *her7* sind im Wildtyp zyklisch exprimiert, jeweils dargestellt in zwei Phasen (A1, B1, C1). Dahingegen ist der Expressionsstreifen im anterioren PSM für *deltaC* in der Mutante eingefroren, und die Expression bleibt posterior weiter zyklisch (schmale Expression n=36, breitere Expression n=12) (A2). *her1* ist in der *her1* Mutante komplett zusammengebrochen (n=15/15) (B2). *her7* zeigt in der *her1* Mutante eine zyklische Expression (schmale Expression posterior n=13, breitere Expression posterior n=20) (C2).

Obere Reihe Wildtyp, untere *her1*KO Reihe, dorsale Ansicht, 90 % Epibolie bis *bud stage*

Mittels *in situ* Hybridisierung wurde untersucht, ob eine Expressionsstörung im *her1*KO in den Genen *deltaC*, *her1* und *her7* vorhanden ist und damit die Segmentierungsuhr und das „pre-patterning“ betroffen sind (Abb. 4.4). *deltaC* zeigt im Wildtyp eine zyklische Expression, die dadurch gekennzeichnet ist, dass entweder ein oder zwei Streifen im anterioren PSM exprimiert werden (Abb. 4.4: A1). In Abhängigkeit davon ist die Expressionsdomäne im posterioren PSM länger oder kürzer (Jiang et al. 2000). Im *her1*KO hingegen ist nur noch ein *deltaC* Expressionsstreifen im anterioren PSM detektierbar, der zumeist breiter erscheint. Aber dennoch zeigt sich eine zyklische Expression im posterioren PSM, die erkennbar an der unterschiedlich breiten posterioren Expressionsdomäne um den Epibolie-Rand ist (Abb. 4.4: A2).

Die *her1* Expression ist hingegen komplett im Her1KO zusammengebrochen (Abb. 4.4: B1, B2), während *her7* weiter zu oszillieren scheint (Abb. 4.4: C1, C2).

Somit könnte der Somitendefekt in den ersten drei (+/-1) Somiten im *her1*KO auf eine Störung (der anterioren *deltaC* und *her1* Expression) der Segmentierungsuhr während der Frühentwicklung zurückzuführen sein.

Da offensichtlich die Somiten posterior von etwa Somite vier wieder wildtypisches Erscheinungsbild zeigen, stellt sich die Frage, ob und in welcher Weise die Segmentierungsuhr wieder zu „ticken“ beginnt. Hierzu wurden die Expressionsmuster der zyklisch exprimierenden Gene *deltaC*, *her1* und *her7* im *her1*KO im 10-12 Somitenstadium analysiert. Im Wildtyp wird *deltaC* sowohl im PSM als auch segmental in den Somiten exprimiert. Die Expression variiert im posterioren PSM von einer kleineren zu einer größeren Expressionsdomäne. In Abhängigkeit davon sind zwei oder ein Expressionsstreifen im anterioren PSM erkennbar (Abb. 4.5: A, B). In der *her1* Mutante wird *deltaC* nur als breiter Streifen im anterioren PSM exprimiert, wohingegen im Wildtyp zwei Streifen vorhanden sind. Des Weiteren sind zwei unterschiedliche Expressionsmuster von *deltaC* im posterioren PSM der *her1* Mutante nachweisbar (Abb. 4.5: C, D). Dies deutet darauf hin, dass auch in späteren Stadien *deltaC* Expression im posterioren PSM oszilliert und somit unabhängig von Her1 ist. *deltaD* wird im Gegensatz zu *deltaC* nicht zyklisch exprimiert (Holley and Takeda 2002). Es können im Wildtyp zwei Streifen im anterioren PSM unterschieden werden, welche in der Mutante nur noch als eine breite Domäne sichtbar sind. Es scheint also, dass Her1 auch auf die anteriore Expression von *deltaD* einen Einfluss ausübt.

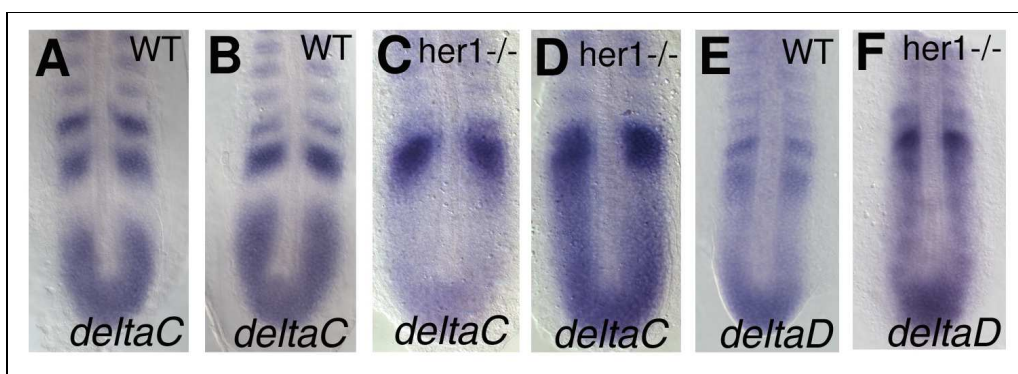


Abbildung 4.5:

deltaC und *deltaD* Expression im WT und *her1*KO:

deltaC wird zyklisch exprimiert, die zwei Phasen sind deutlich im anterioren PSM zu sehen, zwei (A) (n=12) oder ein (B) (n=4) starker Expressionsstreifen. Diese Expression ist in der *her1* Mutante zusammengebrochen, wohingegen die zyklische Expression (Schwanzknospe (n=28) oder gesamtes PSM (n=21)) im posterioren PSM aufrechterhalten bleibt. *deltaD* wird nicht zyklisch im WT (E) (n=5) exprimiert, es können aber zwei Expressionsdomänen im anterioren PSM beobachtet werden, die im *her1*KO (F) (n=5) verloren gegangen sind.

(A, B, D) WT, (C, F) *her1*KO, 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Die bisher beobachteten Ergebnisse im 10-12 Somitenstadium bestätigen die durch die *her1* Morpholino Injektion ermittelten Daten. Allerdings konnte zum ersten Mal dokumentiert werden, dass *deltaC* in der *her1* Genverlust-Situation posterior weiter zyklisch exprimiert wird.

Im Wildtyp wird *her1* zyklisch im PSM exprimiert (Abb. 4.6: A, B), dabei können zwei Phasen unterschieden werden. In Abhängigkeit der Expressionslänge im posterioren PSM können zwei bzw. drei Transkriptionsstreifen im anterioren PSM nachgewiesen werden.

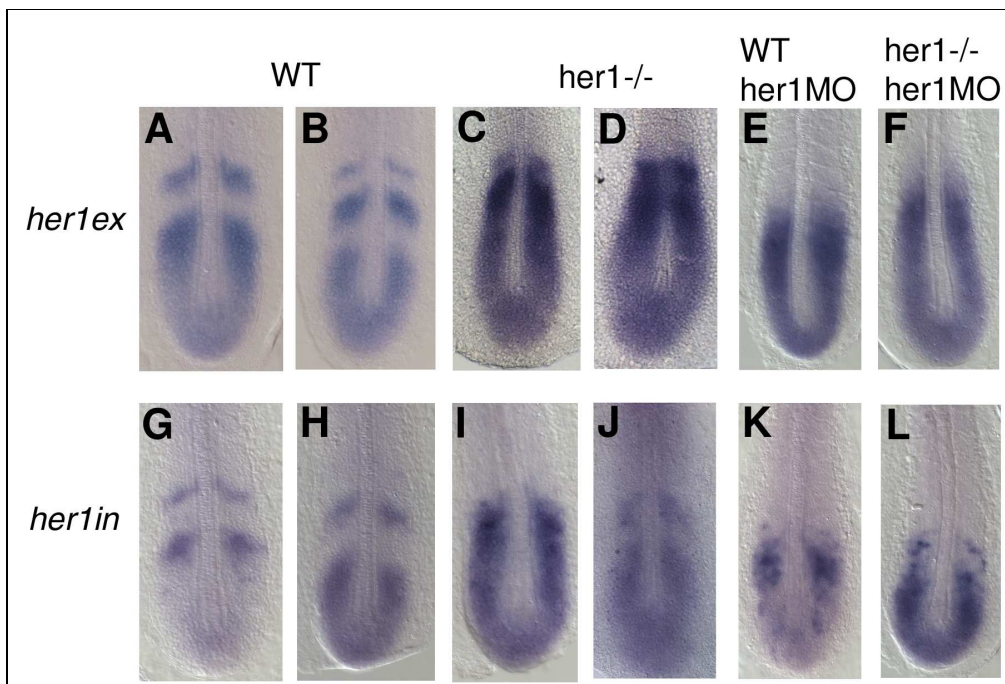


Abbildung 4.6:

Analyse der *her1* Expression im *her1*KO bzw. nach *her1*MO Injektion:

Im *her1*KO kann eine restzyklische Aktivität von *her1* sowohl auf Exon- als auch Intronebene beobachtet werden (C, D, I, J). Die Injektion von *her1*MO im *her1*KO zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster (L) wie nach *her1*MO Injektion im WT (K), welches sich vom KO Muster (I,J) unterscheidet.

her1 Exon Expression im WT (A (n=30), B (n=31)), *her1*KO (C (n=27),D (n=39)), *her1* Morpholino injiziertem Embryo (E (n=12)) und *her1*KO nach *her1* Morpholino Injektion (F (n=16))

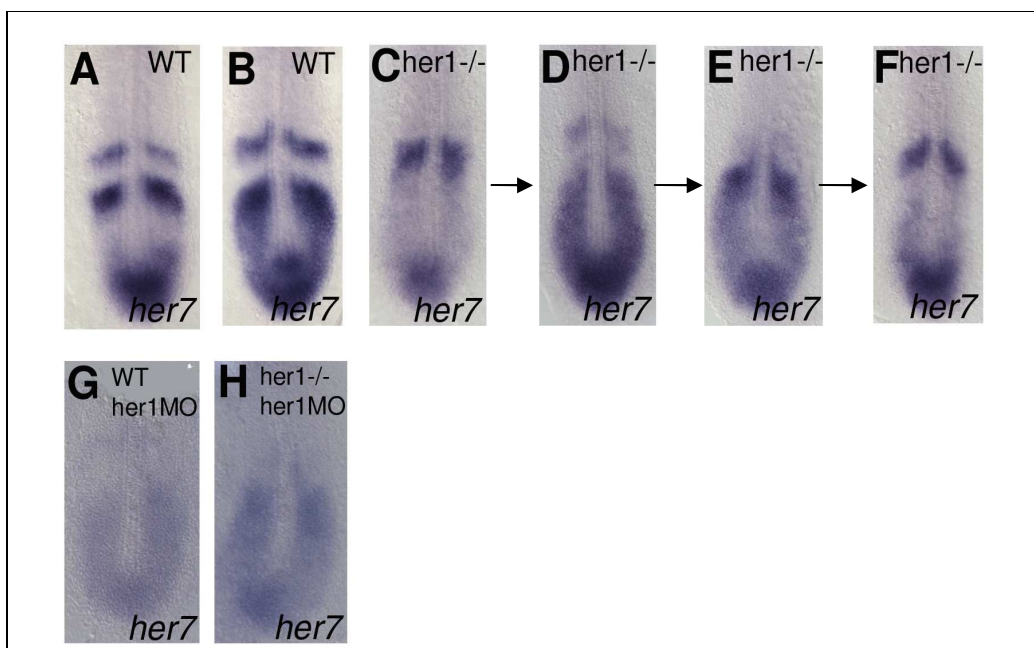
her1 Intron Expression im WT (G, H), *her1*KO (I, J), *her1* Morpholino injizierten Embryonen (K) und *her1*KO nach *her1* Morpholino Injektion (L)
10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Überraschenderweise verändert sich das Expressionsmuster von *her1* im *her1*KO während der Entwicklung. Wie bereits dargestellt (Abb. 4.4: B2) ist die *her1* Expression im frühen Embryo komplett zusammengebrochen. Es können keine Unterschiede in Expressionsstärken beobachtet werden, wie es in älteren Embryonen (10-12 SS) der Fall ist. Die Expressionsanalyse des *her1*KOs mit einer *her1* Exon-Sonde brachte erstaunliche

Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression über den posterioren Teil des PSM hinausgeht und dass zwei Oszillationsphasen, wenn auch nicht wildtypisch, erkennbar sind (Abb 4.6: C, D). Es kann zwischen einer Expression, die verstärkt im anterioren PSM vorhanden ist und die dann weiter zum caudalen Bereich des Embryos hin an Intensität abnimmt, und zwei verstärkt angefärbten Domänen unterschieden werden. Somit konnten die von Martin Gajewski (persönliche Mitteilung) aus einer heterozygoten *her1* Mutanten Kreuzung erhobenen Daten bestätigt werden.

Es scheint, dass *her1* im Laufe der Somitogenese wieder anfängt, zyklisch exprimiert zu werden und zwar in einer Her1 unabhängigen Art und Weise. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass unterschiedliche Mechanismen für die Entwicklung verantwortlich sind, die in frühe (Zeitpunkt, in der die Anlagen der ersten Somiten gebildet werden; 90-95% Epibolie) und späte Somitogenese (ab 10ten Somitenstadium) unterteilt werden kann. Es ist auch möglich, dass zu einem späteren Zeitpunkt weitere Gene aktiv werden, die früh keine regulatorische Rolle auf *her1* ausüben.

her7 wird ähnlich wie *her1* zyklisch im PSM exprimiert (Abb. 4.7:A, B), allerdings mit einer schwächeren Expression im anteriorsten PSM (Gajewski et al. 2003). Im frühen Embryonalstadium zeigt der *her1*KO zyklische Genexpression von *her7*, die zwar auch im 10-12 Somitenstadium sichtbar ist, allerdings dort in Form einer lang gestreckten Oszillationsphase (Abb. 4.7: C-F).



Legende zur Abb. 4.7: *her7* Expression im *her1*KO auf folgender Seite

Abbildung 4.7:

her7 Expression im her1KO:

her7 wird zyklisch im WT (A, B) exprimiert, schmaler Expressionspunkt und zwei Streifen oder große Expressionsdomäne und ein Streifen, wohingegen im *her1KO* diverse Expressionsmuster detektiert werden können (C-F). Die *her7* Expression in *her1* Morpholino injizierten Embryonen (G) (n=4) unterscheidet sich von der Expression des *her1KO*s (C-F). Um eine mögliche Restfunktionalität von *her1* auf *her7* zu analysieren, wurde die *her7* Expression im *her1KO* nach *her1MO* Injektion analysiert (H) (n=6). Es zeigt sich ein vergleichbares Muster wie in *her1* Morpholino injizierten Embryonen.

(A, B) WT, (C-F) *her1KO*, (G) *her1MO* und (H) *her1KO* mit *her1MO*, 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Die fehlende Funktion von Her1 scheint dennoch keinen starken Einfluss auf die zyklische Genexpression von *her7* auszuüben.

Der Vergleich der hier erhobenen Daten mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen zeigt Unterschiede auf der Genexpressionsebene. So wurde beschrieben, dass *deltaC*, *her1* und *her7* im frühen Embryo nach *her1* Morpholino Injektion weiterhin ein zyklisches Muster besitzen (Sieger et al. 2006), wohingegen der *her1KO* eine gestörte Expression von *her1* aufweist (Abb. 4.2: B2). Es scheint in der frühen Entwicklung einen Unterschied zwischen einem *knockdown* und einem *knockout* Embryo zu geben.

Die Translationsinhibition von Her1 durch Morpholino Injektion führt zu einer gestörten *her1* Expression, die sich auf das posteriore PSM des Embryos beschränkt, aber als zyklisch zu bezeichnen ist (Gajewski et al. 2003). Die *her1* mRNA Expression in *her1* Morpholino injizierten Embryonen betrifft die Transkription im posterioren Teil des PSMs (Gajewski et al. 2003) (Abb. 4.6: E, K). Auch die Verwendung einer *her1* Intron-Sonde, welche die pre-mRNA markiert, zeigt, dass zwischen den Morpholino injizierten Embryonen und dem KO zwei unterschiedliche Expressionsmuster zu finden sind. Während sich in Morpholino injizierten Embryonen die Expression gänzlich auf das posteriore PSM beschränkt (Abb. 4.6: K), zeigt der KO eine etwas verlängerte Expression, die bis in das anteriore PSM hineinzureichen scheint (Abb. 4.6: I, J) und weiterhin zyklisch exprimiert wird. Um eine mögliche restfunktionale Aktivität von *her1* zu untersuchen, wurden in den *her1KO* *her1MO* injiziert. Im Falle, dass es sich bei dem KO um einen vollen KO, d.h. ohne Restfunktion, handelt, dürfte sich das Expressionsmuster von *her1* nach einer *her1* Morpholino Injektion nicht verändern. Der Vergleich zeigt, dass nach Morpholino Injektion in den KO eine *her1* Expression auftritt, die einen deutlichen Unterschied zum KO zeigt und die absolut vergleichbar mit einem *her1* Morpholino injizierten Embryo ist (Abb. 4.6: I-L).

Die Ergebnisse legen nahe, dass die *her1KO* mRNA noch in irgendeiner Weise eine Funktion ausüben kann.

Die Festlegung der Polarität von Zellen in caudal und rostral innerhalb eines Somiten wird im anterioren PSM unter anderem von *mesp* (Sawada et al. 2000) gesteuert. Um eine mögliche Fehlsteuerung der Polarität zu überprüfen wurden *her1*KO Embryonen sowohl während der frühen Musterbildung als auch im 10-12 Somitenstadium auf eine *mesp* Expression untersucht. *mespb* wird im Wildtyp in zwei bzw. drei (Abb. 4.8) und *mespa* in zwei Streifen im anterioren PSM exprimiert.

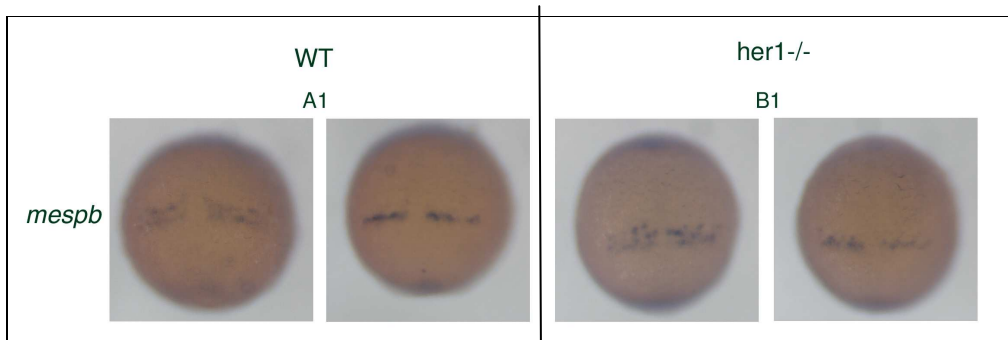


Abbildung 4.8:
Festlegung und Aufrechterhaltung der a-p Polarität:
 Im WT (A1) wird *mespb* in zwei Phasen exprimiert, auch im *her1*KO (B1) sind diese sichtbar, allerdings ist ein „salt and pepper“ Muster erkennbar.
 dorsale Ansicht, 90 % Epibolie bis *bud* stage

Die Analyse der frühen Entwicklungsstadien zeigt, dass die streifenartige Expression von *mespb* (Abb.4.8: A1) im *her1*KO in Form eines „salt and pepper“ Expressionsmusters gestört ist.

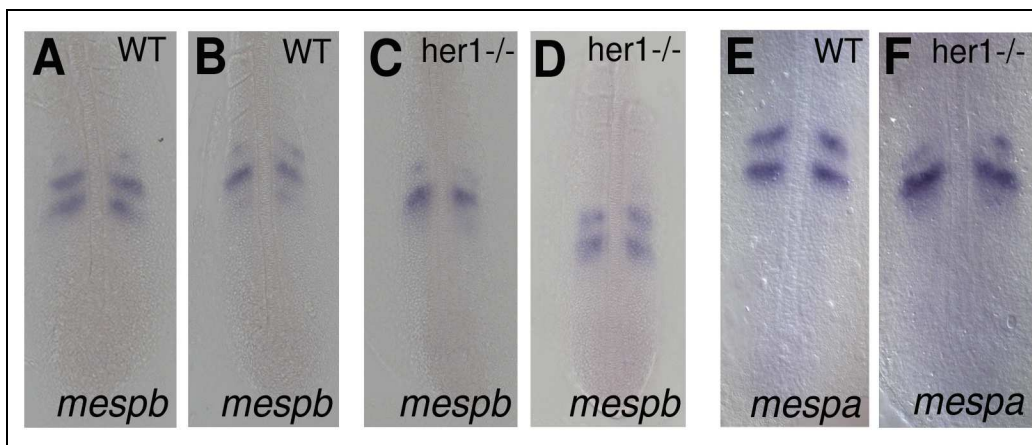


Abbildung 4.9:
mesp Expression im Wildtyp und her1KO:
mespb wird in zwei oder drei Streifen im anterioren PSM des WTs (A (n=15), B (n=4)) exprimiert. Auch im *her1*KO (C (n=11), D (n=18)) sind zwei verschiedene Expressionsstadien detektierbar, allerdings weichen diese minimal von der wildtypischen ab. *mespa* wird im WT in zwei Streifen (E) exprimiert, welche auch mit leichten Abweichungen im *her1*KO zu beobachten ist.
mespb im (A, B) WT und (C, D) *her1*KO, *mespa* im WT (E) und *her1*KO (F), 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Im 10-12 Somitenstadium können auch in der *her1* Mutante für die *mesp* Gene zwei Expressionsmuster wie im Wildtyp nachgewiesen werden, die allerdings eine „Expressionsunschärfe“ zeigen (Abb. 4.9). Die Polarität von anterior und posterior innerhalb eines Somiten ist in der *her1* Mutante in diesem Stadium nicht dramatisch gestört; sowohl *mespa* als auch *mespb* zeigen ein wildtypisches Expressionsmuster, welches auch im Einklang mit der wildtypischen Somitenbildung steht (vergleiche Abb. 4.9: A und B mit C und D).

Das hier beschriebene Untersuchungsergebnis scheint somit ein weiterer Beleg für eine frühe differentielle Rolle des Her1 Proteins zu sein.

4.2 Charakterisierung der Mutante *her7*^{-/-}

her7 ist ein im PSM zyklisch exprimiertes Gen (Oates and Ho 2002) und besitzt als Her7 Protein eine „basic“ Helix-Loop-Helix Domäne (bHLH), welche für die Dimerisierung mit Proteinpartnern benötigt wird (Henry et al. 2002; Oates and Ho 2002; Gajewski et al. 2003). Aus *knockdown* Versuchen geht hervor, dass *her1* und *her7* sich gegenseitig regulieren und beide Gene für die zyklische Expression von *deltaC* und auch *deltaD* benötigt werden. Ein durch Morpholino Injektion verursachter Funktionsverlust von *her7* führt zu einer gestörten Expression von *her1*, *deltaC* und *deltaD* (Henry et al. 2002; Holley and Takeda 2002; Oates and Ho 2002; Gajewski et al. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *her7* Morpholino injizierte Embryonen einen „anterior limit of defect (ALD)“ ab Somit zehn besitzen, d.h. dass ab diesem Segment keine Somitengrenzen mehr gebildet werden (Oates et al. 2005). Ähnlich zu den Ergebnissen im *her1*KO stellt sich hier ebenso die Frage, ob eine Penetranz des *her7* Morpholinos für einen völligen Funktionsverlust ausreicht. Die hier verwendete Mutante wurde nach Anfrage im Hubrecht-Labor aus einem Tilling Projekt generiert. Die *her7* Mutante weist eine Punktmutation in der ersten Helix-Region auf, welche von einer Basenabfolge „aaa“ zu „taa“, und damit von einem Lysin zu einem Stoppcodon führt (Abb. 4.10).

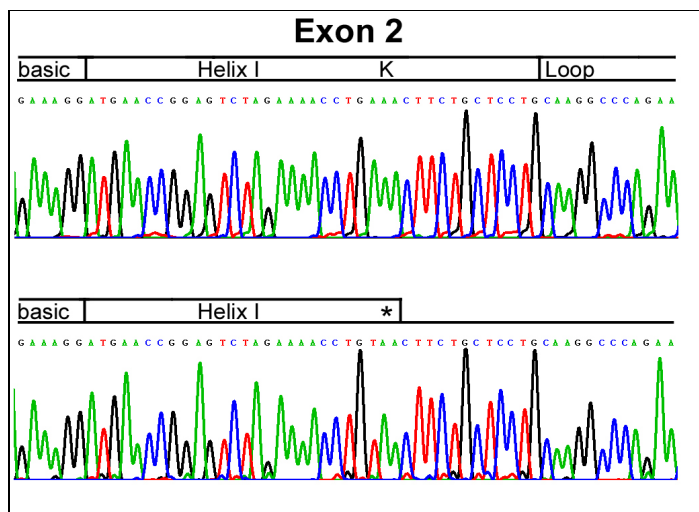


Abbildung 4.10:
her7 Chromatogramm:
Die AAA-(Lysin) wird zu TAA (Stop)-Sequenz.
obere Reihe WT, untere Reihe *her7*KO, loop und Helix Regionen in Exon 2, sowie Intron 2 schematisch angedeutet.

Zunächst wurde die morphologische Auswirkung des Her7 Protein Verlustes untersucht. Dazu wurde neben einer lichtmikroskopischen Analyse (Abb. 4.10) auch eine Analyse der Segmentgrenzen mit einem Somitenmarker (*epin*) (Maul et al. 2001) durchgeführt (Abb. 4.11).

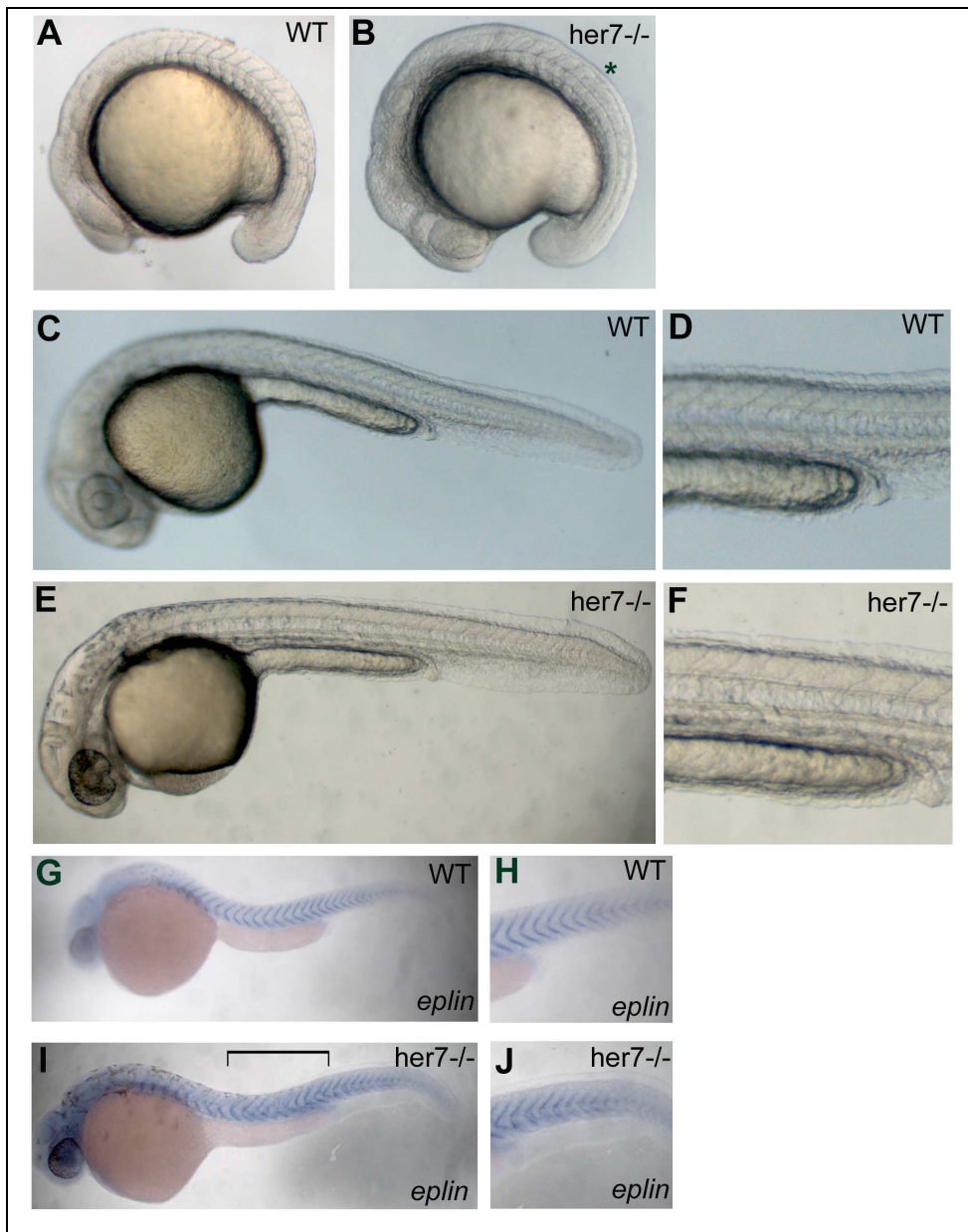


Abbildung 4.11:
*her7*KO Phänotyp:

Im *her7*KO (B) ist im Vergleich zum WT (A) ein Somitengrenzdefekt ab Somit neun zu erkennen (Sternchen), dieser kann auch bis in 42h alten Embryonen beobachtet werden (C-F) (n=56), Segmentgrenzen wurden durch *eplin* angefärbt (G, H). Der dargestellte Ausschnitt (J) des *her7*KO zeigt eine wildtypische *eplin* Expression zum posterioren Ende. (A) WT, (B) *her7*KO im 16 SS, (C) WT, (E) *her7*KO, Ausschnitt über Dottersack (D, J) WT und (F, J) *her7*KO, WT (G) und *her7*KO (I) mit *eplin* angefärbt, 16 *prim stage* alte Embryonen, laterale Ansicht, Kopf links, Klammer markiert Bereich mit defekten Somitengrenzen.

Die morphologische Analyse zeigte einen bisher noch nicht beschriebenen Phänotyp. Der *her7*KO besitzt einen örtlich begrenzten Somitengrenzdefekt etwa in der Region über dem Dottersack (Abb. 4.11: H, J). Um die Grenzen des im *her7*KO beobachteten Defekts näher zu charakterisieren, wurden *eplin* gefärbte Präparate angefertigt und ausgewertet (Abb. 4.12).

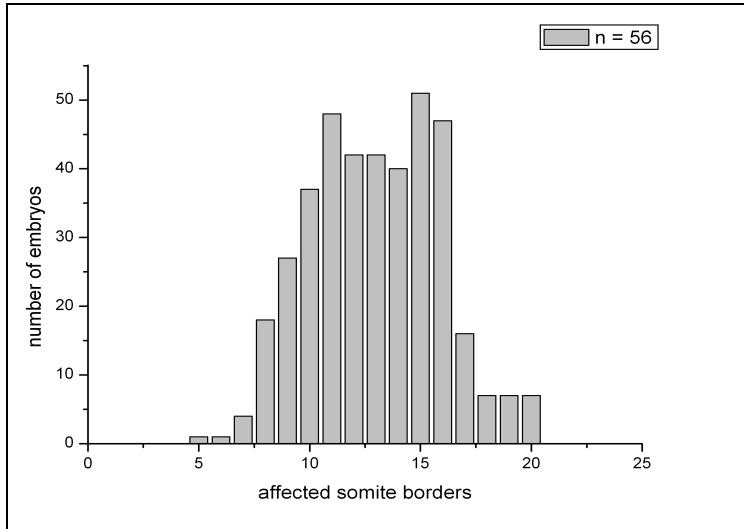


Abbildung 4.12:
Analyse der defekten Somitengrenzen im *her7*KO:
X-Achse: Somitengrenzen, Y-Achse: Anzahl der Embryonen, die einen Effekt aufgewiesen haben. Es kann bestätigt werden, dass der *her7*KO in Somitengrenzen 9 - 17 Defekte aufweist.

Die missgebildeten Somitengrenzen in der *her7* Mutante liegen größtenteils zwischen dem neunten und dem 17ten Somiten. Vereinzelt wurden auch Defekte ab dem fünften und bis zum 20sten Somiten festgestellt. Somit ergibt sich für den *her7*KO folgende Formel für die Missbildungen: 8 (+/-3)-18 (+/-2).

Des Weiteren zeigt auch die Expressionsanalyse von *myoD*, dass die ersten sieben bis neun Somiten eine Kompartimentisierung in anterior und posterior besitzen, und ab dem neunten Somiten eine diffuse Expression vorhanden ist (Abb. 4.13), die auf eine gestörte Etablierung der rostro-caudalen Polarität in der Region hinweist.

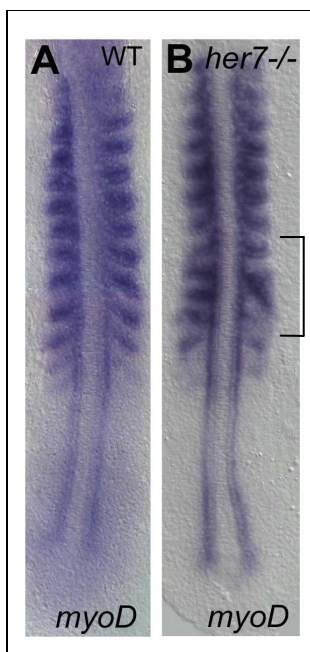
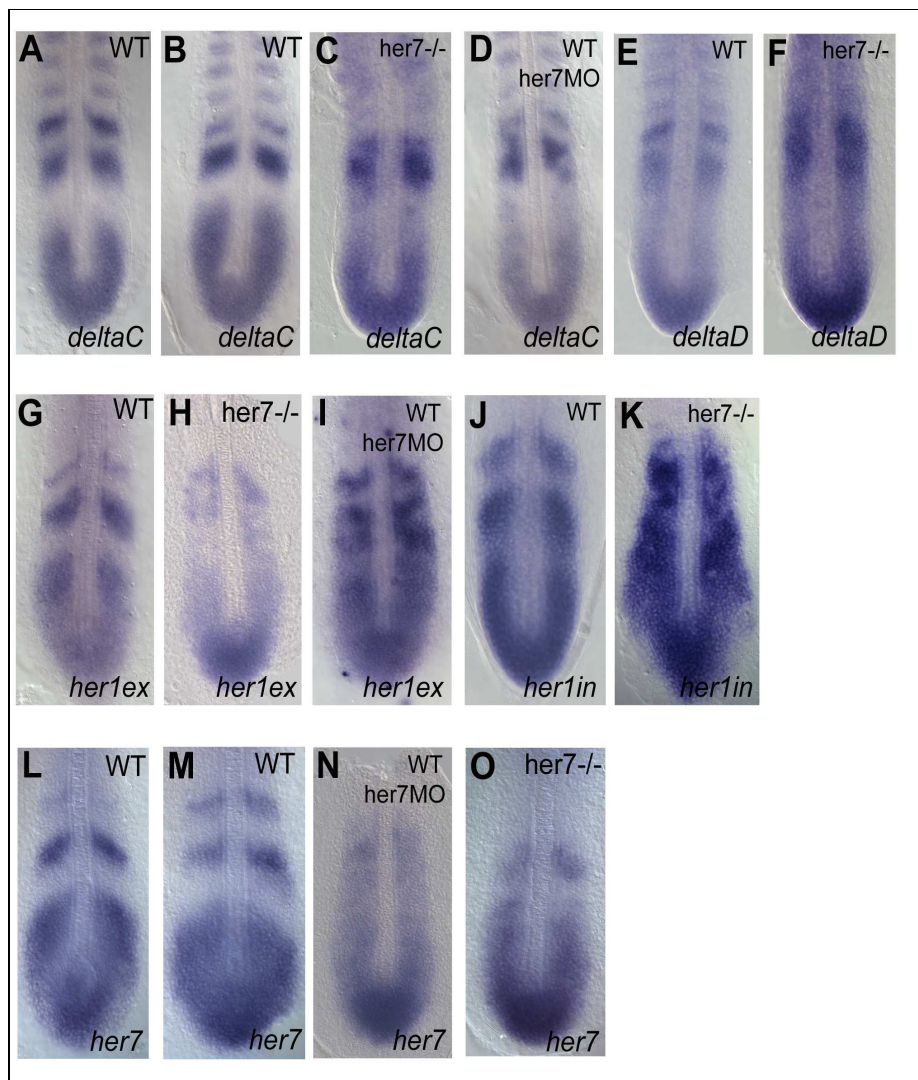


Abbildung 4.13:
a-p Polarität im *her7*KO:
Mit Hilfe von *myoD* kann gezeigt werden, dass die Kompartimentisierung in der *her7* Mutante ab Somit neun zerstört ist (Klammer) (n=8).
(A) WT, (B) *her7*KO, 10-12SS, Flachpräparate, anterior oben

Die rostro-caudale Polarität geht zu einem Zeitpunkt verloren, in dem auch die Somitengrenzen Defekte aufweisen (Vergleich Abb. 4.12 mit 4.13). Somit stimmt der ALD in *her7*KO und *her7* Morpholino injizierten Embryonen (Oates and Ho 2002) überein. Allerdings wurde bislang nicht beschrieben, dass der Verlust von Her7 zu einem „posterioren limit of defect“ (PLD) führt. Dadurch kann festgehalten werden, dass Her7 für die Segmentgrenzenbildung in dieser Region (Somit 9-17) essentiell ist und in seiner Funktion durch kein anderes Protein redundant ersetzt werden kann.

Für die richtige Abfolge des „pre patterning“-Mechanismus im posterioren PSM ist das Zusammenspiel von Synchronisation von Zellen und die Koordination von zyklischer Genexpression essentiell. Ein gestörtes „pre patterning“ kann zur Folge haben, dass die Bildung der Somiten gestört ist. Um dieses in der *her7* Mutante genauer zu untersuchen, wurde die Genexpression von *delta* und *her* Genen analysiert (Abb.4.14).



Legende zur Abb. 4.14: *deltaC*, *deltaD*, *her1* und *her7* Expression im WT und *her7*KO auf folgender Seite

Abbildung 4.14:

deltaC, *deltaD*, *her1* und *her7* Expression im WT und *her7*KO:

deltaC wird zyklisch im WT (A, B) exprimiert, diese ist sowohl im *her7*KO (C) (n=13) als auch im *her7*MO injizierten Embryonen (D) (n=6) gestört, es kann nur eine breite Expressionsdomäne im anterioren PSM beobachtet werden. Ebenso ist auch die *deltaD* Expression, WT (E) zwei Expressionsstreifen im anterioren PSM, im *her7*KO (F) (n=4) gestört. Die *her1* Expression im *her7*KO (H) (n=6) spiegelt die *her1* Expression des *her7* Morpholino injizierten Embryo (I) (n=8) wieder, die sonst zyklische Expression im WT (G, H) ist gestört. Ähnliche Ergebnisse sind für *her7* zu beobachten, sowohl im *her7* Morpholino injizierten Embryo (N) (n=4) als auch im KO (O) (n=8) ist die zyklische Expression (L, M) verloren gegangen.

(A, B) WT, (C) *her7*KO und (D) *her7*MO mit *deltaC* Expression, (E) WT und (F) *her7*KO mit *deltaD* Expression, (G) WT, (H), *her7*KO und (I) *her7*MO mit *her1* Exon Expression, (J) WT und (K) *her7*KO mit *her1* Intron Expression, (L, M) WT, (N) *her7*MO und (O) *her7*KO mit *her7* Expression 10-12SS, Flachpräparate, anterior oben

Sowohl *deltaC*, *deltaD*, *her1* als auch *her7* zeigen eine gestörte Expression in der *her7* Mutante (Abb. 4.14). Im Vergleich zum Wildtyp ist die zyklische *deltaC* und *deltaD* Expression im PSM in der *her7* Mutante gestört (Abb.4.14: C, D) und identisch mit derjenigen im *her7* Morpholino injizierten Embryo (Gajewski et al. 2003). Es kann festgehalten werden, dass ein Verlust von Her7 zu einer gestörten Expression von *deltaC* und *deltaD* führt. Sowohl *her1* als auch *her7* reagieren ebenfalls auf ein fehlendes Her7 Protein mit einer gestörten zyklischen Genexpression (Abb.4.14: G-O).

Die Bildung der ersten Somiten scheint weitgehend wildtypisch zu verlaufen. So stellt sich die Frage, ob das frühe „prepatterning“ bzw. die Segmentierungsuhr gestört ist (Abb. 4.15).

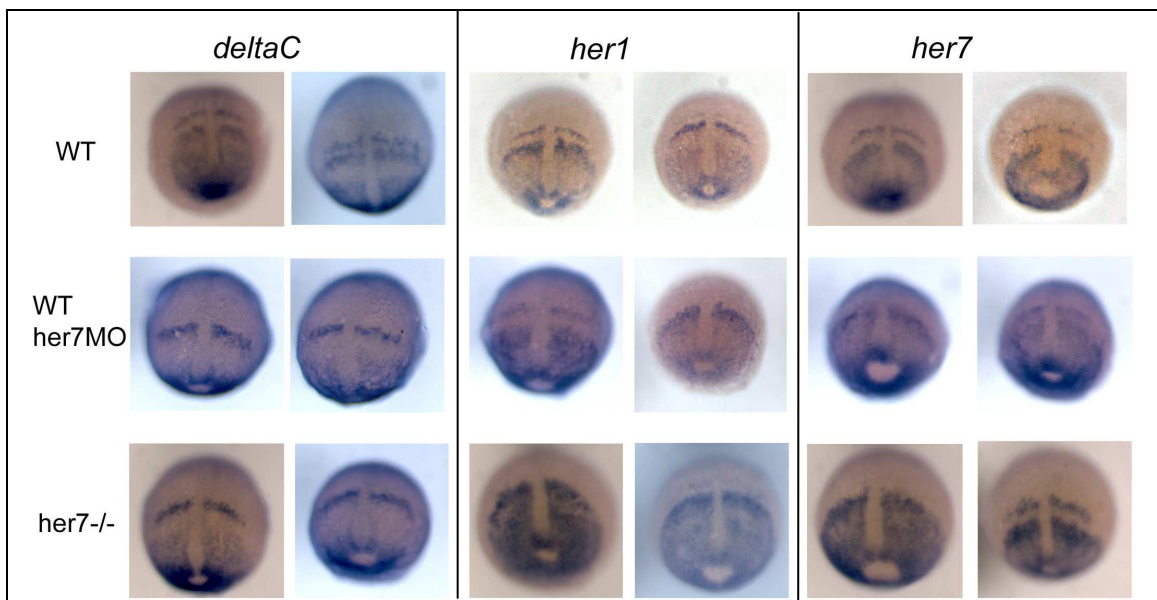


Abbildung 4.15:

zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7*:

Alle drei genannten Gene zeigen eine zyklische Genexpression im *her7*KO (unterste Reihe) und *her7*MO injizierten Embryonen (mittlere Reihe), die ähnlich vergleichbar ist wie im WT (oberste Reihe).
dorsale Ansicht , 90% Epibolie bis *bud stage*

Die zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7* bleibt weiterhin im *her7KO* bzw. *her7* Morpholino injizierten Embryo bestehen (Abb. 4.15). Somit scheint der Mechanismus des „prepatterning“ in der frühen Entwicklung nicht gestört zu sein und zeigt erst im späteren Verlauf eine Störung.

Um eine Korrelation zwischen den beobachteten Somitengrenzendefekte und einer möglichen Störung der *mesp* Genexpression zu untersuchen, wurden diese im 10-12 Somitenstadium analysiert (Abb. 4.16). Im Vergleich zum Wildtyp ist in der Mutante die streifenartige Komponente der *mesp*-Genexpression verloren gegangen (Abb. 4.16: C, E). Stattdessen liegt ein „salt and pepper“ Muster für *mespa* und *mespb* vor. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass eine leichte diffuse Expression von *mespa* im posterioren PSM der *her7* Mutante vorhanden ist. Letzteres mag auf einen Verlust der Her7 Repressoraktivität auf *mespa* in der Her7 Mutante beruhen.

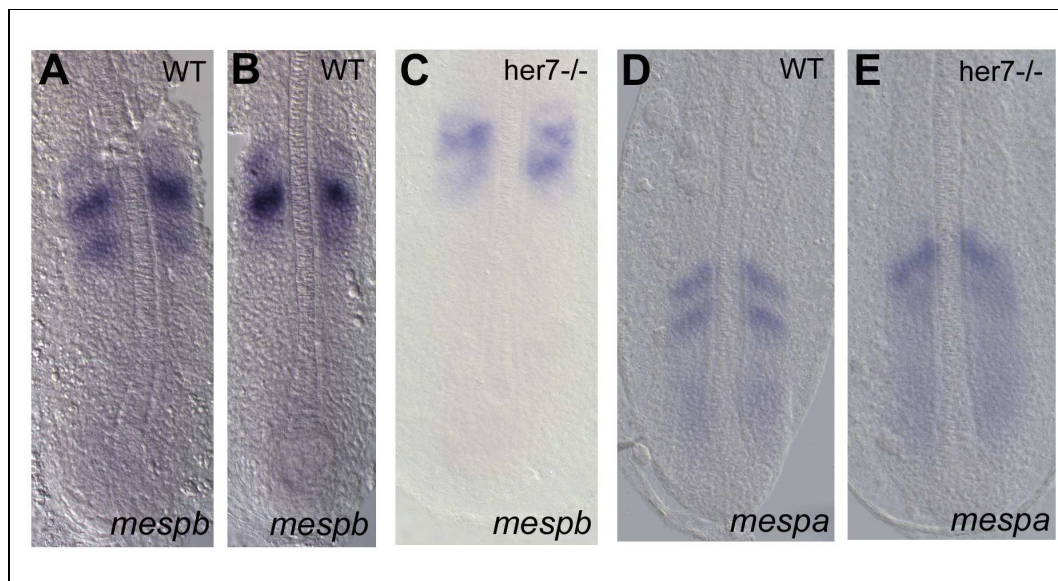


Abbildung 4.16:
mesp Expression im *her7KO*:
Die zyklische *mespb* Expression (WT (A, B)) ist in der Mutante verloren gegangen (C) (n=4).
mespa (WT (D)) zeigt ebenso eine gestörte Expression im *her7KO* (E) (n=8).
(A-B) WT und (C) *her7KO* mit *mespb* Expression, (D) WT und (E) *her7KO* mit *mespa* Expression,
10-12 SS, Flachpräparate, oben anterior

Die gestörte *mesp* Expression korreliert also mit der Fehlbildung von Somitengrenzen in der *her7* Mutante.

Sieger et al. (2006) konnten zeigen, dass Her1 mit Her13.2 eine kooperative Wechselwirkung eingeht und eine wichtige Komponente in der Verknüpfung des FGF

Gradienten mit der Delta-Notch „clock“ darstellt. Um eine mögliche Interaktion zwischen Her7 und Her13.2 zu analysieren, wurde die Translation von Her13.2 mittels Morpholino Injektion unterdrückt und die Embryonen wurden morphologisch und anhand der Sonde *eplin* auf Somitengrenzendefekte untersucht. Der *her7*KO zeigt lediglich einen Somitengrenzendefekt, aber keine Störung in der Achsenmorphologie des Embryos (Abb. 4.17: C). Ebenso zeigt der in der Arbeit von Sieger et al. (2006) verwendete *her13.2* Morpholino keine Somitengrenzendefekte oder Entwicklungsstörungen (Sieger et al. 2006) (Abb. 4.17: B). Das Augenmerk wurde zunächst auf die Morphologie der injizierten Tiere gelegt. In Anlehnung an Shimizu (Shimizu et al. 2005) wurden die injizierten Embryonen in zwei Klassen unterteilt. „classI“ Embryonen zeigen normale Somitengrenzen, aber einen ventral abgeknickten Schwanz. „classII“ beinhaltet Embryonen mit verkürzter und gekrümmter Schwanzregion und bilden 20-30 Somiten (Abb. 4.17: D, E). Wohingegen mit „classIII“ bezeichnete Embryonen, die einen sehr stark verkürzten Schwanz aufweisen, nicht bei einem kombinatorischen Ausschalten von *her13.2* und *her7* gefunden werden konnten.

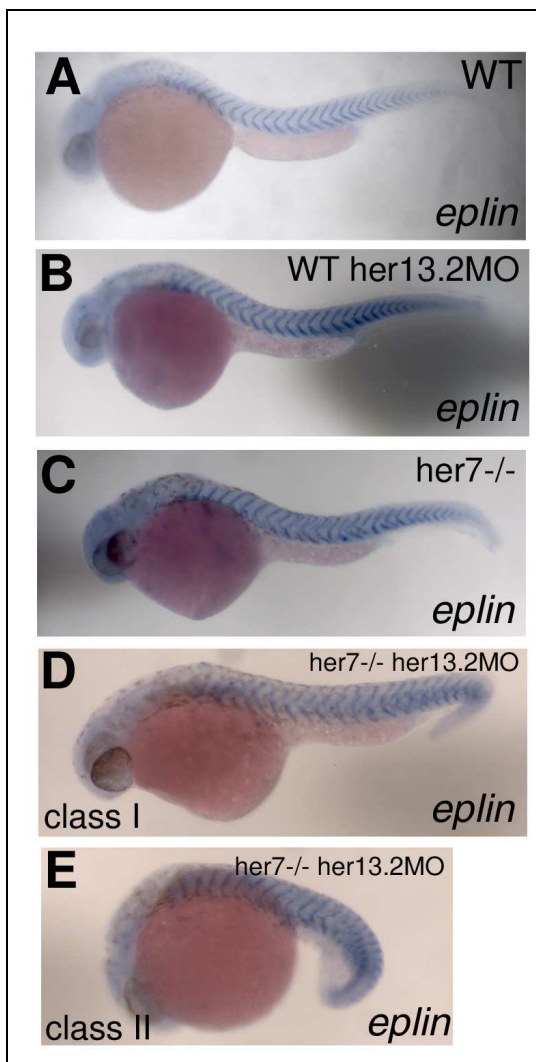


Abbildung 4.17:
*her13.2*MO im *her7*KO:
Die Inhibition von Her13.2 im *her7*KO (C) führt zu Embryonen, die Defekte in der posterioren Schwanzbildung zeigen (D (classI, n=15), E (classII, n=6)).
(A) WT, (B) *her13.2*MO, (C) *her7*KO, (D-E) *her7*KO mit *her13.2*MO, 16 *prim stage* alte Embryonen anterior links

Um einen möglichen additiven Effekt durch das Fehlen von Her13.2 im *her7*KO auf die Somitengrenzenbildung zu analysieren, wurden die *eplin in situ* hybridisierten Embryonen ausgewertet (Abb. 4.18).

Dabei scheint es zu einer leichten Posterisierung der Defekte im *her7*KO zu kommen, wenn gleichzeitig die *her13.2* Transkription inhibiert wird. Die vorläufigen Ergebnisse würden daher auf eine Kooperation von Her7 und Her13.2 während der Bildung des posterioren Embryos hindeuten.

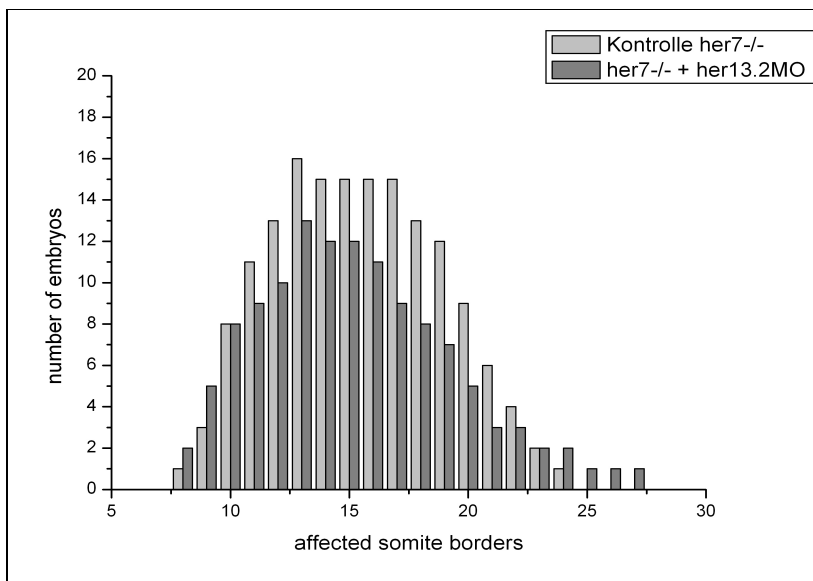


Abbildung 4.18: Analyse der defekten Somitengrenzen im *her7*KO nach *her13.2*MO Injektion:
X-Achse: Somitengrenzen, Y-Achse: Anzahl der Embryonen, die einen Effekt aufgewiesen haben. Gegenüberstellt sind die Segmentgrenzen des *her7*KOs und des *her7*KOs nach *her13.2*MO Injektion.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorsortierung der Zellen im PSM (Abb. 4.12), die Etablierung der rostro-caudalen Polarität (Abb. 4.11) und die Bildung der Somitengrenzen in der *her7* Mutante (Abb. 4.10) im 10-12 Somitenstadium gestört sind. Um einen eventuell auf die Bildung des Fischskeletts durchschlagenden Effekt (Abb. 4.17) untersuchen zu können, wurde die Knochenstruktur mittels Calcein angefärbt (Du et al. 2001). An der Bildung eines Wirbelkörpers ist jeweils der posteriore Teil der Somite und der an diesen angrenzenden nachfolgend gebildete anteriore Teil des nächsten Somiten beteiligt. Zudem werden die Wirbelfortsätze in gerader Form im Wildtyp aus dem anterioren Ende eines Wirbelkörpers geformt (Abb. 4.19).

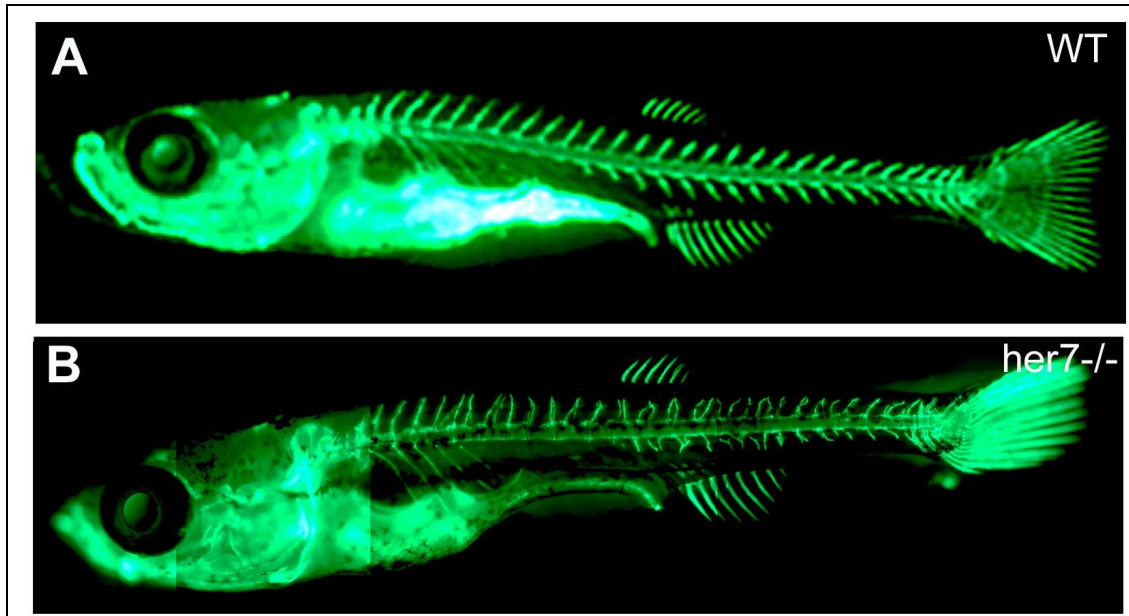


Abbildung 4.19:

Skelettstruktur in WT und *her7*KO:

Calcein färbt alle Knochenstrukturen und calciumreiches Gewebe an. Im Wildtyp (A) (n=15) ist die klassische Fischstruktur, Wirbelkörper mit den v-förmigen Wirbelfortsätzen deutlich zu erkennen. In der *her7* Mutante (B) (n=11) sind die Wirbelkörper normal ausgebildet, allerdings zeigen sich massive Defekte in den Wirbelfortsätzen, welche kreuz und quer abstehen.

21 Tage alte Juvenilfische, 9mm, Kopf links

Die *her7* Mutante zeigt überraschenderweise deformierte Wirbelfortsätze (Abb. 4.19: B) über die gesamte Körperachse. Ein möglicher Phänotyp hätte ab dem fünften Wirbelkörper bis ca. zum 15ten (+/-2) auftreten können, da die entsprechenden Somitengrenzen in der *her7* Mutante Defekte aufweisen.

Somit scheint das Fehlen von Her7 möglicherweise weitere Entwicklungsprozesse zu beeinflussen, die an der Bildung der Skelettstruktur beteiligt sind. Aufgrund der ausschließlichen Expression von *her7* im PSM liegt die Vermutung nahe, dass in der *her7* Mutante möglicherweise Sklerotomvorläuferzellen betroffen sein könnten.

4.3 Doppelmutante *bea/her7* und *bea/her1*

Der Delta-Notch Signalweg ist ein wichtiger Bestandteil des sich entwickelnden Embryos und wird unter anderem für die Initiierung, Synchronisation und Aufrechterhaltung von zyklischer Genexpression im PSM benötigt (Holley and Takeda 2002; Bessho and Kageyama 2003; Pourquie and Goldbeter 2003; Rida et al. 2004). Die *bea* Mutante wurde erstmals 1996 von van Eden beschrieben und das dementsprechende Gen *deltaC* von Jülich et al. (2005). Die Oszillation von benachbarten Zellen wird durch *deltaC* im posterioren PSM synchronisiert (Mara et al. 2007). Ein Funktionsverlust dieses Gens führt zu einem Somitengrenzdefekt ab Segment vier. Für *her1* kann postuliert werden, dass es für die Bildung der ersten drei Somiten essentiell ist, wohingegen *Her7* für die Bildung der Somiten neun bis 17 unerlässlich ist. Das Charakteristische bei den Delta-Notch Mutanten ist, dass sie weitgehend denselben Phänotyp bezüglich der Somitengrenzen zeigen. Die *deltaC* (*beamter/bea*) Mutante bildet beispielsweise die ersten vier Somiten (Jülich et al. 2005). Im Anschluss daran ist der Mechanismus für die Bildung der Somitengrenzen nicht mehr gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden Mutanten generiert, die zwei funktionsunfähige Gene in einem Signaltransduktionsweg aufweisen, namentlich *deltaC* und *her1* bzw. *deltaC* und *her7*. Möglicherweise kann eine Analyse der Doppelmutante zu einer gezielteren Aufklärung des Signaltransduktionsweges führen und eignet sich besonders für einen Mikroarray Ansatz. Sowohl die Doppelmutante *bea/her1* als auch *bea/her7* zeigen einen Verlust der Segmentgrenzen über die gesamte Achse. Allerdings kann in der letztgenannten Mutante beobachtet werden, dass immer wieder zufällig, ohne ein bestimmtes Muster, ein paar Somitengrenzen gebildet werden (Abb. 4.20).

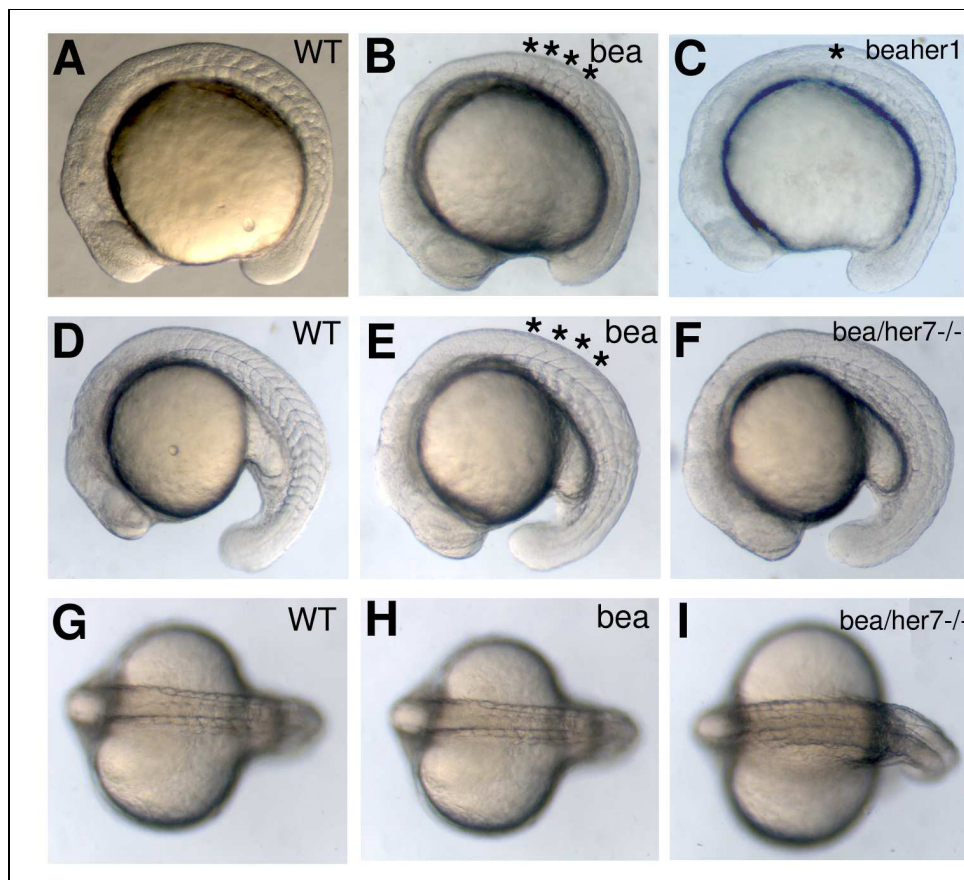


Abbildung 4.20:
Phänotyp *bea/her1* und *bea/her7*:
Die *bea* Mutante (B, E, H) bildet im Vergleich zum WT (A, D, G) nur die ersten vier Somitengrenzen, wohingegen *bea/her1* (C) keine Segmentgrenzen aufweist. Die *bea/her7* (F, I) Mutante bildet sporadisch ein bis zwei Segmentgrenzen. (A, D, G) WT, (B, E, H) *bea*, (C) *bea/her1*, (F, I) *bea/her7*, 10-18 SS, laterale (A-F) bzw. dorsale (G-I) Ansicht, Kopf links, Segmentgrenzen mit Sternchen angedeutet

Die kombinatorische Unterdrückung von DeltaC und Her1 bzw. Her7 führt zu einem fast kompletten Verlust der Segmentgrenzen (Abb. 4.20: C, F, I) und scheint eine frühe Auswirkung auf die Bildung der Segmentgrenzen zu haben. Es kann allerdings noch nicht erklärt werden, warum in der *bea/her7* Doppelmutante hin und wieder ganze Somitengrenzen gebildet werden.

Um den morphologischen Effekt auch molekular zu zeigen, wurde die Segmentpolarität in den Doppelmutanten untersucht (Abb. 4.21).

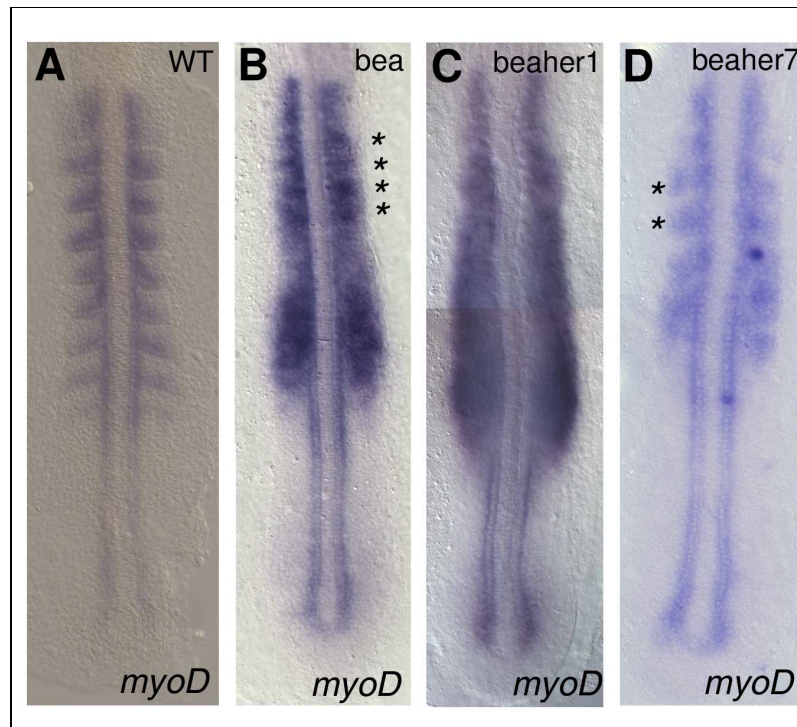


Abbildung 4.21:
a-p Polarität in *bea*, *bea/her1* und *bea/her7*:
myoD wird in jedem posterioren Segment exprimiert (WT (A)), wohingegen in *bea* (B) nur eine posteriore Expression in den ersten vier Segmentgrenzen zu erkennen ist. In *bea/her1* (C) und *bea/her7* (D) ist ein nahezu homogenes Muster zu erkennen, wobei im letztgenannten zwei halbseitige Segmente zu erkennen sind (Sternchen).
(A) WT, (B) *bea*, (C) *bea/her1*, (D) *bea/her7*, 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Im Vergleich zum Wildtyp ist in der *bea/her1* und *bea/her7* Mutante zu beobachten, dass die Aufrechterhaltung von rostral und caudal verloren gegangen ist (Abb. 4.21: C, D). Allerdings kann sporadisch aber eine halbsegmentale *myoD* Expression in der *bea/her7* Mutante beobachtet werden (vergleiche Abb. 4.21: D, Sternchen). Die bereits morphologisch in der Doppelmutante angedeuteten willkürlich auftretenden Segmentgrenzen lassen sich also auch auf der Halbsegmentebene bestätigen, wobei noch keine Erklärung für dieses Auftreten gefunden werden konnte. Des Weiteren zeigt sich für die *bea/her1* Mutante eine durchgehend homogene Expression von *myoD* und somit zu einem kompletten Verlust der Halbsegmentalität über den gesamten Embryo.

Der Prozess der Somitogenese beinhaltet drei Prozesse, und zwar die Vorsortierung („prepatterning“) der undeterminierten mesenchymalen Zellen, Etablierung der anterioren-posterioren Polarität und schließlich die Bildung der Segmentgrenzen (Stern and Keynes 1987; Aoyama and Asamoto 1988). Die Morphologie der *bea* Mutante weist daraufhin, dass zumindest am Beginn der Entwicklung alle drei Prozesse ablaufen. Es stellt sich die Frage,

in wie weit die zyklische Genexpression und damit die Segmentierungsuhr im frühen Doppelmutantenembryo betroffen ist (Abb. 4.22).

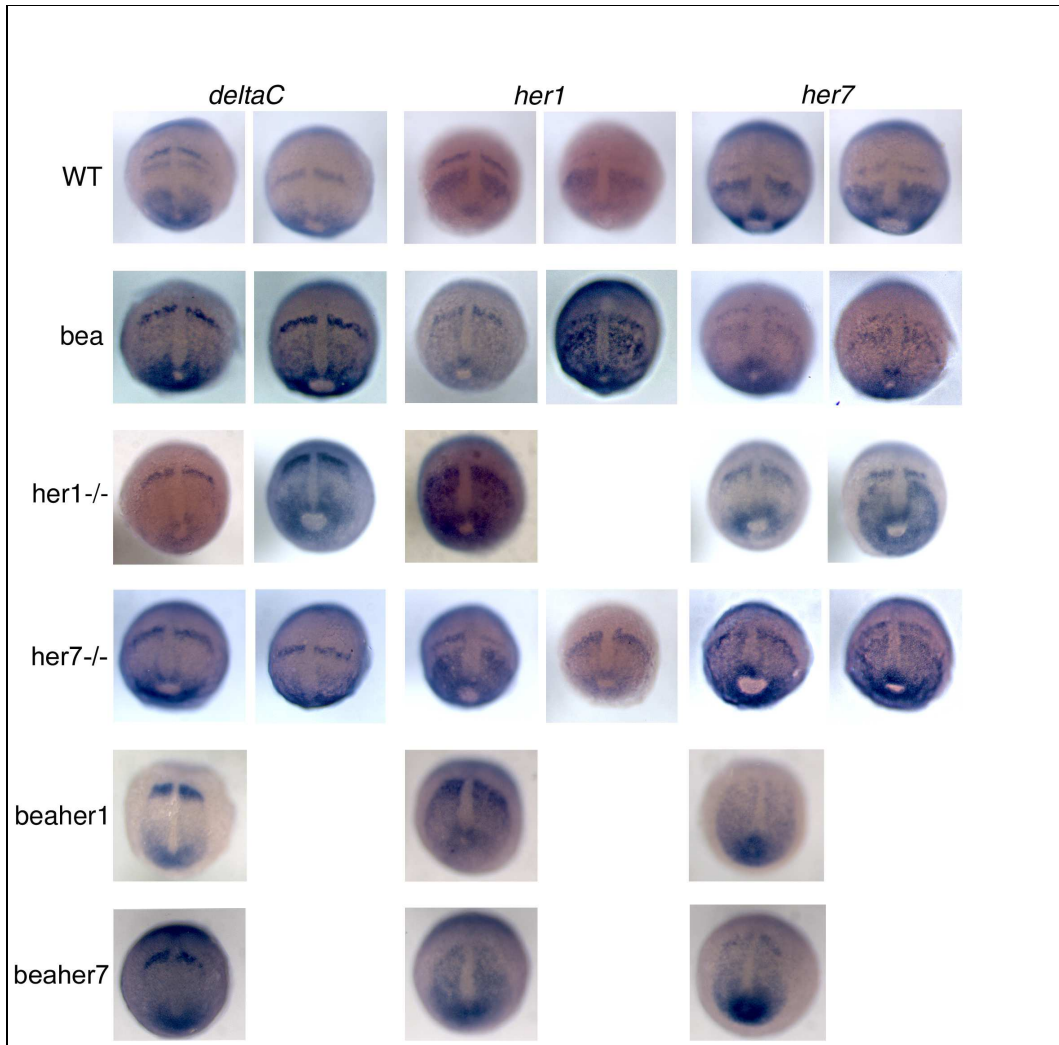


Abbildung 4.22:

deltaC, *her1* und *her7* Expression im WT, *bea*, *her1*KO, *her7*KO, *bea*/*her1* und *bea*/*her7*:

Sowohl im WT, als auch in der *bea* und *her7* Mutante wird *deltaC*, *her1* und *her7* zyklisch exprimiert. Im *her1*KO ist lediglich *her1* zusammengebrochen, wohingegen in den Doppelmutanten *bea*/*her1* und *bea*/*her7* alle drei Gene in ihrer zyklischen Expression gestört sind. dorsale Ansicht, 90% Epibolie bis *bud stage*

Im frühen Embryonalstadium zeigen sowohl der Wildtyp als auch die *bea* und *her7* Mutante eine zyklische Genexpression in den Genen *deltaC*, *her1* und *her7*, wohingegen in der *her1* Mutante die zyklische Genexpression von *her1* zusammengebrochen ist. Die Doppelmutanten *bea*/*her1* und *bea*/*her7* zeigen einen Zusammenbruch in allen drei Genen. Anhand der Doppelmutante zeigt sich, dass der morphologische Phänotyp und vielmehr noch der „prepatterning“-Defekt weit über den in der Einzelmutante hinausgehen. Ein kombinatorisches Ausschalten von DeltaC und Her1 bzw. Her7 führt schon im frühen Embryo somit zu einem kompletten Verlust der zyklischen Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7*.

4.4 *her1* Promotoranalyse durch Generierung von transgenen Linien

Der *her1* Promotor des Zebrafisches wurde erstmals von Gajewski et al. (2003) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass für die räumliche Expression der *her1* mRNA zwei voneinander trennbare Promotorsequenzabschnitte verantwortlich sind. Das 8600bp umspannende *her1*-Promotor-Konstrukt spiegelt die *her1* Expression im präsomitischen Mesoderm (PSM) wieder (Abb. 4.23). Des Weiteren konnte ein Sequenzabschnitt identifiziert werden, der für die Expression im anterioren PSM verantwortlich ist. Es stellt sich die Frage, welche Sequenzabschnitte hierfür genau benötigt werden und ob die posteriore *her1* Expression im PSM vom Vorhandensein des anterioren Elementes abhängig ist oder nicht. Um diese Frage zu beantworten, wurden weitere Promotorkonstrukte und transgene Linien erzeugt.

4.4.1 Eingrenzung des posterioren Elements

Ausgehend vom bereits klonierten *her1* Promotor (Gajewski et al. 2003) wurde ein Konstrukt generiert, welches nur einen Teil der Sequenz für die Expression im posterioren Teil des PSMs beinhaltet. Für das „BamHI-Konstrukt“ wurden die ersten 1632 Basenpaare aus dem *her1* Promotor deletiert. Somit enthält das Konstrukt nur einen Teil des so genannten posterioren und das gesamte anteriore Element (Abb. 4.23).

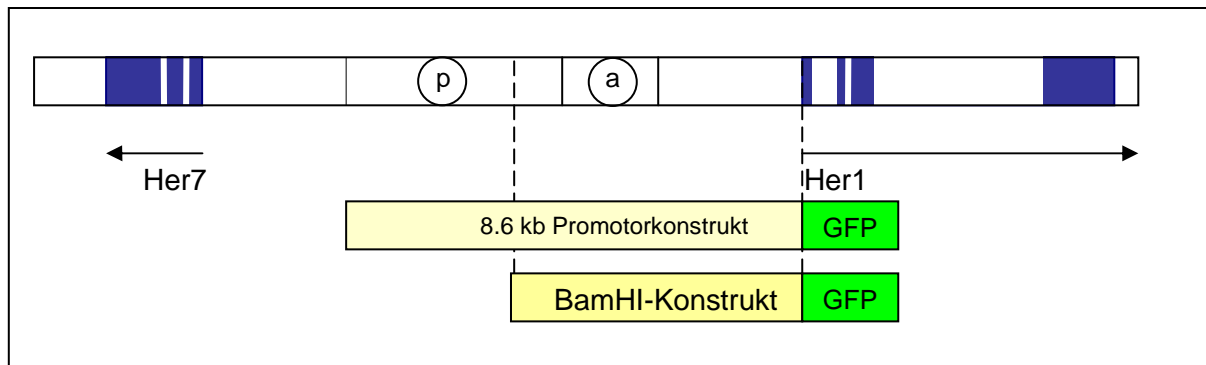


Abbildung 4.23:

her1 Promotor:

Modifiziert nach Gajewski et al., 2003. Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Das BamHI-Konstrukt besitzt eine Länge von 6668 bp.

Nach erfolgter Injektion in das Einzell-Stadium wurde die GFP-Expression unter der Kontrolle des Promotor-Konstruktes nach 18 bzw. 31 Stunden (Kimmel et al. 1995) verfolgt und dokumentiert (Abb. 4.24: A-D).

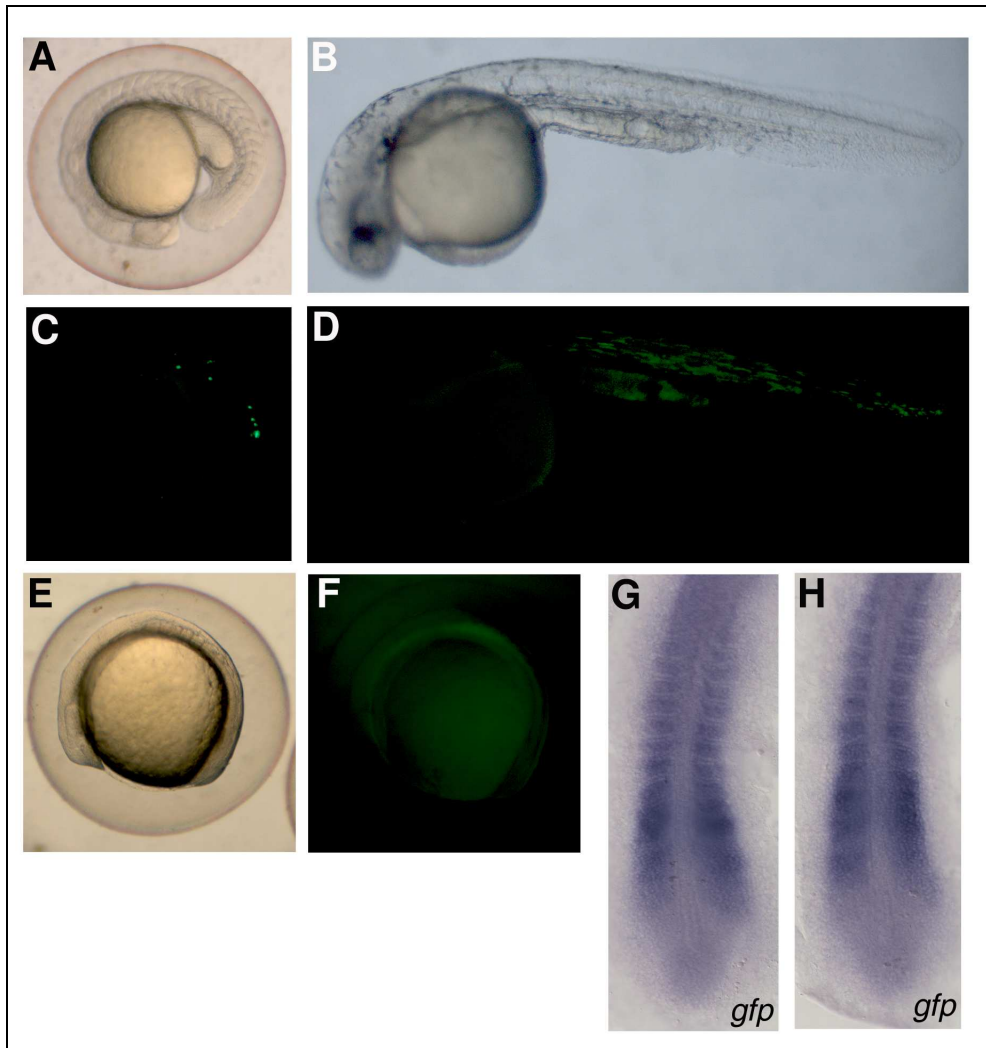


Abbildung 4.24:
BamHI-Injektion und transgener Embryo:
Nach erfolgter Injektion konnte ein schwaches GFP-Signal nach 18 (A, B) bzw. 31 Stunden (C, D) detektiert werden. Es konnte eine transgene Linie (E, F) generiert werden. Embryonen dieser Linie zeigen eine relativ schwache GFP Expression im anterioren PSM und in den Somiten. Die *in situ* Hybridisierung zeigt eine (G, H) *gfp* Expression im anterioren PSM und in den Somiten.

Es konnte bislang eine transgene Linie generiert werden, die eine sehr schwache GFP Expression aufwies (Abb. 4.24: E, F). Die GFP-Reporterexpression scheint in dieser Linie im posterioren PSM zu fehlen. Zusätzlich zur Expression im anterioren PSM ist eine *gfp* mRNA-Expression in den Somiten vorhanden (Abb. 4.24: G, H). Im Vergleich dazu zeigt die 8600bp Linie (K54) (Gajewski et al. 2003) eine *gfp* mRNA Expression im PSM aber keine in den Somiten. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die fehlende Sequenzinformation im BamHI-Konstrukt für die spezifische Expression im posterioren PSM verantwortlich ist. Des Weiteren scheinen Repressoren in dieser Einheit zu binden, die eine segmentale Expression unterdrücken.

4.4.2 Kontrolle der anterioren Expression über *sps-site*?

Der *her1* Promotor besitzt verschiedene Regulationsmodule, die in ein posteriores und anteriores „clock“-Element unterteilt werden können (Gajewski et al. 2003). Eine vergleichende Sequenzanalyse hat eine Sequenzabfolge ergeben, die „Su(H) paired sequence (*sps*)“ genannt wird und Bindestellen für Suppressor of Hairless beinhaltet (Gajewski and Voolstra 2002). Die transkriptionelle Kontrolle der *her* Gene erfolgt durch die Aktivierung des Delta-Notch Signalweges und anschließender Weiterleitung durch Suppressor of Hairless (Su(H)) (Sieger et al. 2003). Allerdings zeigen nicht alle *her* Gene mit *sps* Bindestellen, wie zum Beispiel *her9* oder *her6* eine Expression im PSM (Gajewski and Voolstra 2002). Es könnte eine *sps* Bindestelle im anterioren Element im *her1* Promotor ausfindig gemacht werden (Habilitationssarbeit Martin Gajewski). Es stellt sich die Frage, ob diese Bindestelle für eine Expression des anterioren Elementes im PSM nötig ist oder nicht. Im folgenden Konstrukt wurde diese *sps*-Sequenz (*suppressor of hairless paired site*) aus dem *her1* Promotor deletiert und das Konstrukt ebenfalls mit GFP fusioniert (Abb. 4.25).

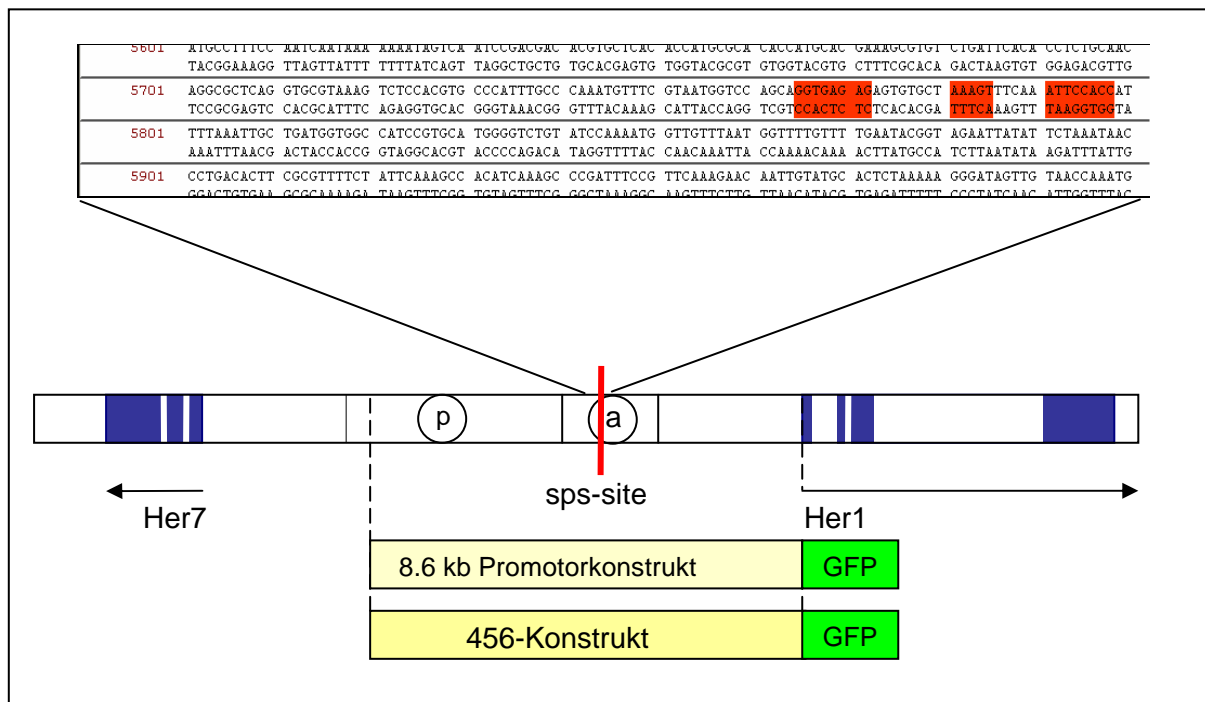


Abbildung 4.25:

456-Konstrukt:

Modifiziert nach Gajewski et al., 2003. Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Das 456-Konstrukt besitzt eine Länge von 8564 bp. Der rote Balken deutet die deletierte *sps*-Sequenz an. Ausschnitt der Genomsequenz, die deletierte putative *sps*-Sequenz ist rot unterlegt.

Das Konstrukt wurde im Einzell-Stadium injiziert und die Expression von GFP überprüft (Abb. 4.26).

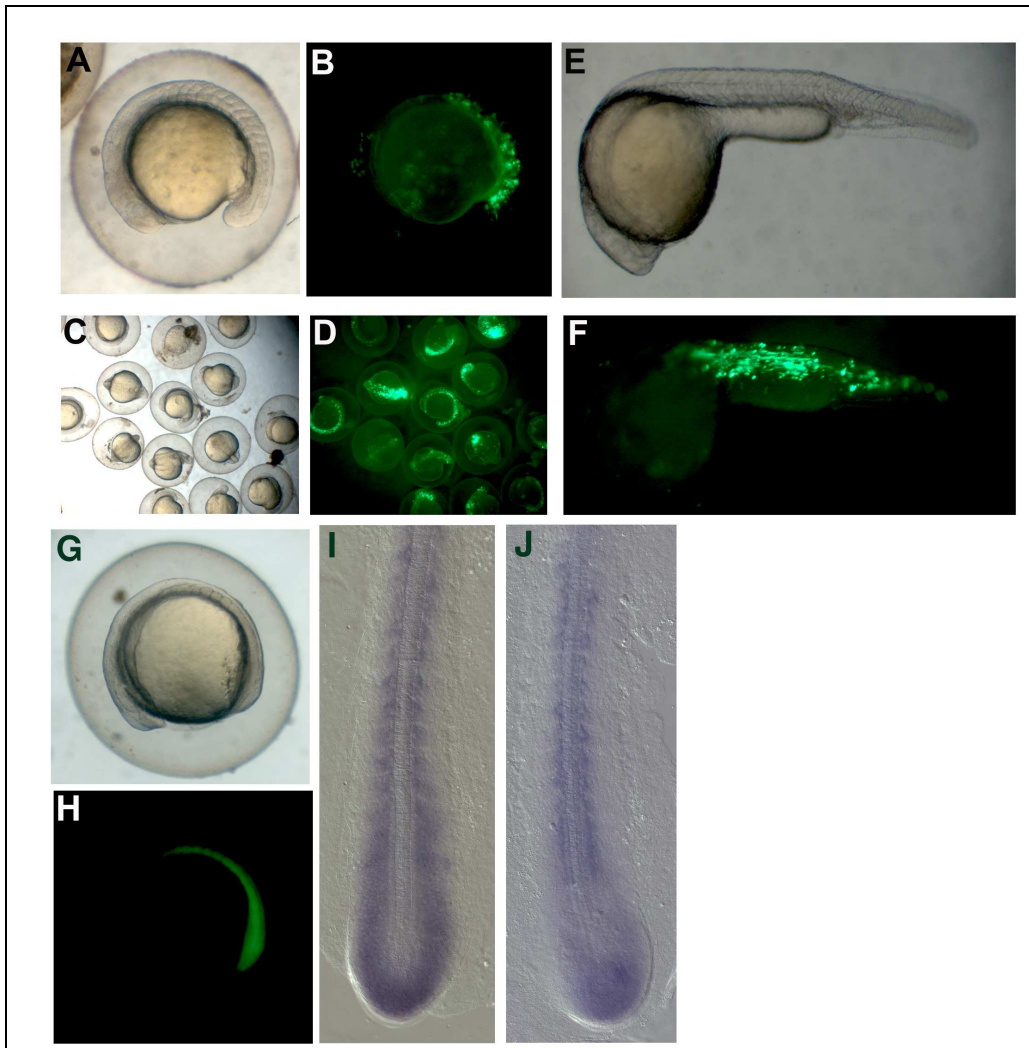


Abbildung 4.26:

456-Konstrukt Injektion und transgene Linie:

Nach erfolgter Injektion konnte ein sehr starkes GFP-Signal, nach 14 (A-D) bzw. 31 Stunden (E, F) detektiert werden. Es konnte eine transgene Linie (G, H) generiert werden, die eine relativ starke GFP Expression im anterioren PSM und in den Somiten zeigte. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden (I, J), dass eine zyklische GFP Expression im posterioren PSM und darüber hinaus eine Expression in den adaxialen Zellen vorhanden ist.

Es war möglich, eine stabile transgene Linie zu generieren, die eine GFP-Expression im PSM und auch in den Somiten zeigte (Abb. 4.26: G, H).

Die 456-transgene Linie, ohne *sps* Bindestelle im anterioren Element, zeigt eine zyklische Genexpression im posterioren PSM (Abb. 4.26: I, J). Des Weiteren ist die *her1* spezifische streifenartige Genexpression im anterioren PSM verloren gegangen. Darüber hinaus kann auch eine Expression in den adaxialen Zellen beobachtet werden. Somit kann festgehalten werden, dass das Fehlen der *sps* Bindestelle zu einem Verlust der zyklischen *her1* Expression im anterioren PSM führt, während die posteriore Expression weiterhin zyklisch nachgewiesen werden kann.

4.4.3 Posteriore und anteriore Expression abhängig voneinander?

Für eine genauere *her1* Expressionsanalyse und um die Frage zu klären, ob eine posteriore Expression im PSM ohne anteriores Element möglich ist oder nicht wurde ein Konstrukt generiert, indem das komplette anteriore Element aus dem *her1* Promotor deletiert (Abb. 4.27) worden ist.

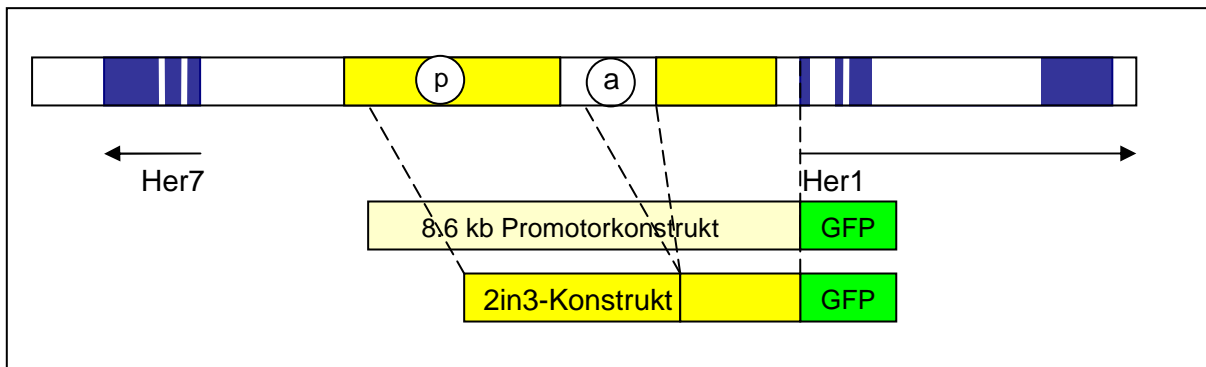


Abbildung 4.27:

2in3 Konstrukt

Modifiziert nach Gajewski et al., 2003. Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Das 2in3-Konstrukt besitzt eine Länge von 8192 bp.

Die erfolgreiche Injektion und Funktionalität des Konstruktes konnte durch die Expression von GFP bestätigt werden (Abb. 4.28).

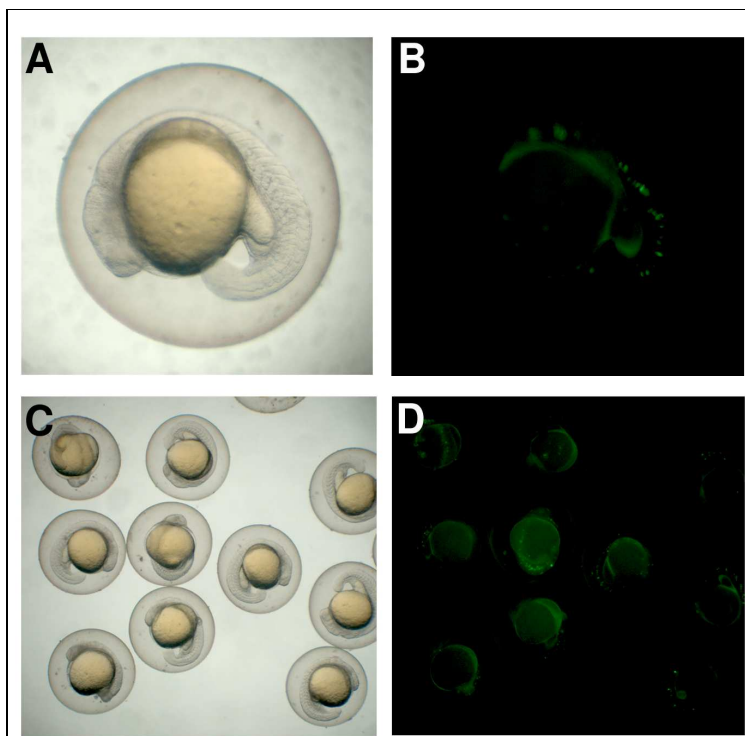


Abbildung 4.28:
Embryonen nach 2in3-Konstrukt Injektion:
Nach erfolgreicher Injektion konnte ein GFP-Signal, nach 18 (A-D) Stunden detektiert werden.

Zurzeit werden die injizierten Embryonen auf mögliche transgene Linien getestet, bislang konnte allerdings noch keine transgene Linie von diesem Konstrukt identifiziert werden.

4.5 Die Kontrolle der Terminationsgene *rippy*

Die *rippy* Gene wurden erstmals von Kawamura et al. (2005) für den Zebrafisch beschrieben. Sie werden im anterioren PSM und im Falle von *rippy1* auch im rostralen Kompartiment eines jeden neu geformten Somiten exprimiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass *rippy* notwendig ist, um das „prepatterning“ - im speziellen die Somitogenese „clock“ - zu terminieren sowie in neu geformten Somiten die rostro-caudale Polarität zu erhalten. Im Unterschied zu den von Kawamura et al. (2005) veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass sowohl *rippy1* als auch *rippy2* zyklisch mit *her1* ko-exprimiert werden (Habilitationssarbeit Martin Gajewski). Daher stellt sich die Frage, wie die Terminorgene transkriptionell kontrolliert werden. Hierfür wurde die *rippy* Expression in den *her* Mutanten untersucht.

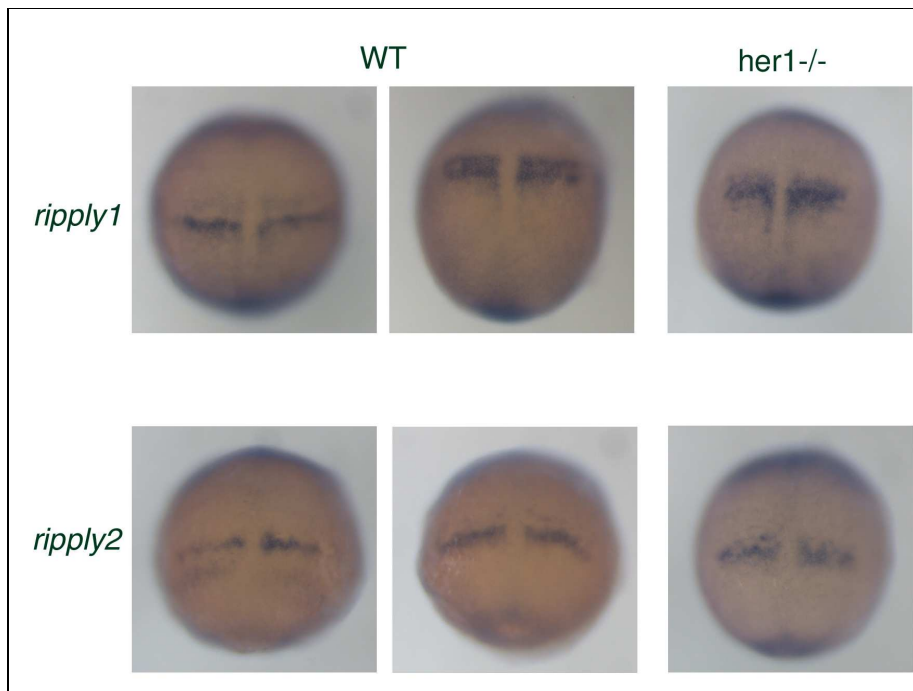


Abbildung 4.29:
Terminationsuntersuchung in der frühen Entwicklung durch *rippy* im *her1*KO:
Die zyklische Expression von *rippy1* und *rippy2* ist in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp gestört, anstelle von zwei Expressionsdomänen kann nur noch eine breite Bande beobachtet werden. dorsale Ansicht , 90% Epibolie bis *bud stage*

Die Analyse der frühen Entwicklungsstadien zeigt für die *rippy* Gene ein gestörtes Expressionssmuster in der *her1* Mutante (Abb. 4.30) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.30).

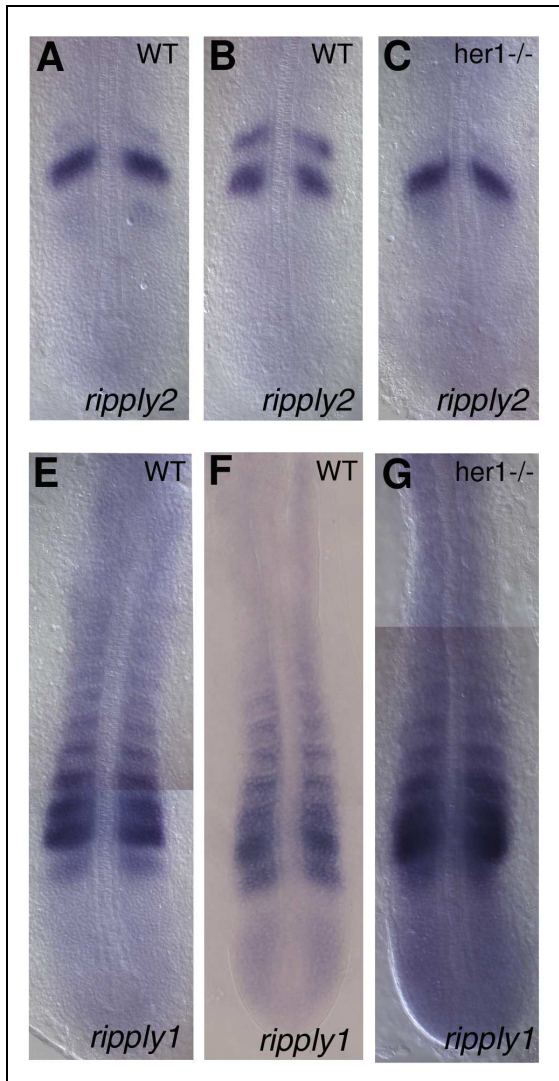


Abbildung 4.30:
ripply Expression im *her1*KO:
Die zyklische Expression von *ripply2* ist im Gegensatz zu *ripply1* im *her1*KO nicht zusammengebrochen.
ripply2 im WT (A, B) und *her1*KO (C),
ripply1 im WT (E, F) und *her1*KO (G), 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Im 10-12 Somitenstadium zeigt die *her1* Mutante weiterhin einen Zusammenbruch der zyklischen *ripply1* Genexpression im anterioren PSM, wohingegen die segmentale Expression in den geformten Somiten weiterhin vorhanden ist (Vergleich Abb. 4.29: E und F mit Abb. 4.29: G). Die zyklische *ripply2* Expression ist hingegen in der *her1* Mutante im 10-12 Somitenstadium wiederhergestellt (Vergleich Abb. 4.29: A und B mit Abb. 4.29: C).

Die Untersuchungsergebnisse weisen daraufhin, dass eine gestörte zyklische Expression von *ripply* einhergeht mit einer gestörten rostro-caudalen Segmentalität und dies zu Segmentgrenzedefekten führt. Somit scheint die frühe Her1 abhängige Störung der Somitogenese auch korreliert zu sein mit einer zu diesem Zeitpunkt gestörten Termination im Uhrmechanismus. Zudem weisen die *ripply* Expressionsmuster auf eine Rolle in der Oszillationskontrolle von Her1 auf *ripply* hin. In der späten Somitogenese ist zumindest

rippy2 wieder wildtypisch exprimiert und scheint trotz weiterhin gestörter *rippy1* Expression eine geordnete Termination der Segmentierung zu verursachen.

Die *her7* Mutante zeigt einen Defekt der Segmentgrenzen in den Somiten 8 (+/-3)–18 (+/-2). Da *rippy* für die Aufrechterhaltung der rostro-caudalen Halbsegmentalität benötigt wird, stellt sich die Frage, inwieweit die *rippy* Genexpression im *her7*KO zum Zeitpunkt der Bildung der Segmentgrenzen im 10-12 Somitenstadium betroffen ist (Abb. 4.31).

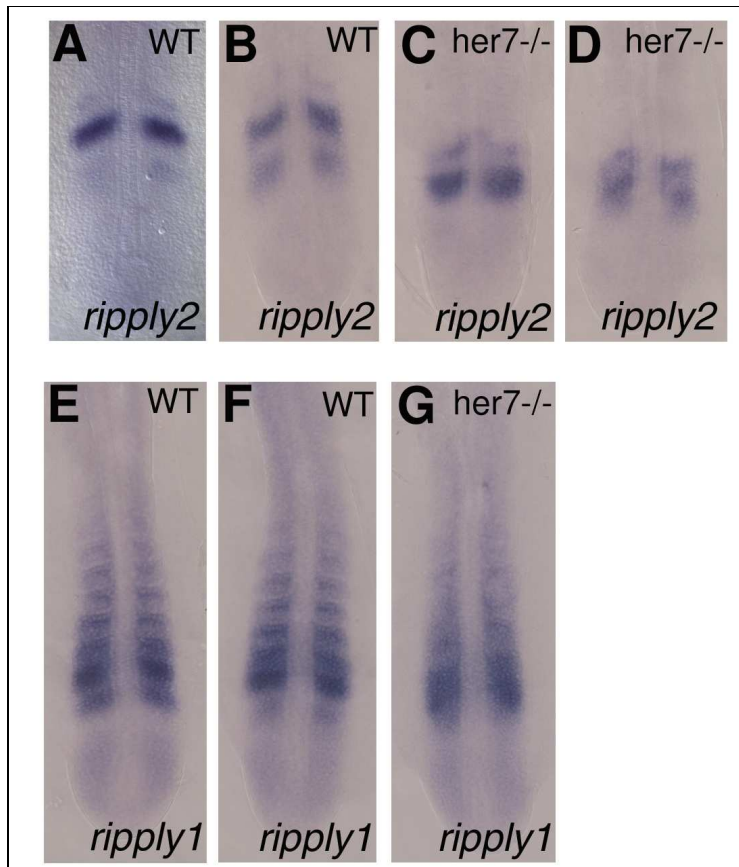


Abbildung 4.31:
rippy Expression im *her7*KO:
Sowohl die zyklische Expression von *rippy2* (C, D), als auch *rippy1* (G), ist in der *her7* Mutante im anterioren PSM zusammengebrochen. *rippy2* im WT (A, B) und *her7*KO (C, D), *rippy1* im WT (E, F) und *her7*KO (G), 10-12 SS, Flachpräparate, anterior oben

Die zyklische Expression sowohl von *rippy1*, als auch *rippy2* ist im 10-12 Somitenstadium in der *her7* Mutante zusammengebrochen. *rippy1* zeigt im anterioren PSM eine breite Expressionsdomäne und die segmentale Expression ist nur noch als homogenes Muster erkennbar (Abb. 4.31: G). Ähnlich dazu ist auch die *rippy2* Expression in der *her7* Mutante gestört (Abb. 4.31: C, D). Auch hier korreliert die gestörte Termination somit mit dem morphologischen *her7*KO Phänotyp.

4.6 Wnt und Delta-Notch Signalweg agieren kooperativ während der anterioren Somitogenese

Der Wnt Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Mesodermspezifikation (Hofmann et al. 2004). Es konnte an Mäusen gezeigt werden, dass eine Mutation im *Irp6* Rezeptor zu schweren Defekten in der Bildung des posterioren Körperbauplans führt (Kokubu et al. 2004). Der *knockdown* dieses Rezeptors im Zebrafisch zeigt ebenfalls einen sehr ähnlichen Phänotyp (Diplomarbeit Willems, 2007). Im Folgenden wurde untersucht, ob der Wnt Signalweg im Zebrafisch mit dem Delta-Notch Signalweg eine kooperative Rolle während der frühen Somitogenese eingeht.

Der *Irp6* Rezeptor wird ubiquitär im Embryo exprimiert und ein *knockdown* zeigt im 10-12 Somitenstadium keinen morphologischen Defekt bei der Segmentgrenzenbildung. Allerdings können Defekte im Bereich des Gehirns beobachtet werden (Diplomarbeit Willems, 2007). Es scheint, dass sich das Neuralrohr während der Entwicklung nicht schließt und als Gewebe mit einer Spalte sichtbar bleibt (Abb. 4.32).

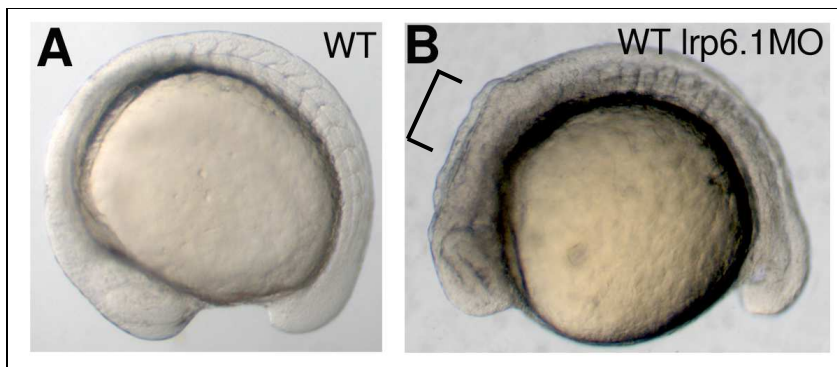


Abbildung 4.32:

Irp6.1 Morpholino injizierte Embryonen:

Der injizierte Embryo zeigt wildtypische Somitengrenzen und eine sehr deutliche Spalte im Neuralrohr (Klammer).

(A) WT im Vergleich zum *Irp6.1* Morpholino injizierten Embryo (B), 10-12 SS, anterior links

Während der späten Somitogenese, d.h. Somitenbildung etwa ab Segment 13, können schwere Entwicklungsdefekte beobachtet werden. So zeigen *Irp6.2* Morpholino injizierte Embryonen eine verkürzte Schwanzentwicklung und Defekte in den Somitengrenzen (Abb. 4.33).

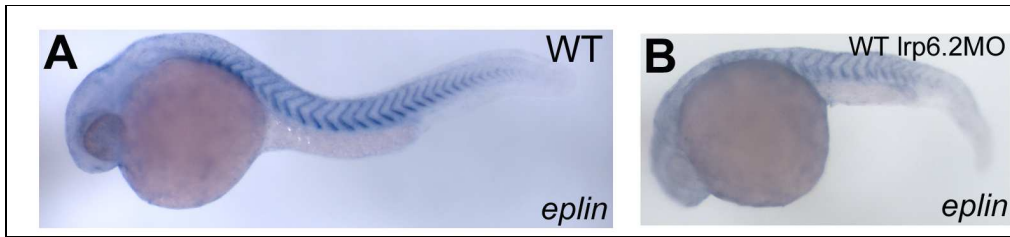


Abbildung 4.33:

Segmentgrenzedefekt im *Irp6.2MO* injizierten Embryo:

Der *Irp6.2MO* injizierte WT (B) zeigt Defekte in den Somitengrenzen (*eplin*) und ein verkürztes posteriores Wachstum.

(A) WT, (B) WT *Irp6.2MO*, 16 prim stage, anterior links

Es wurden zwei Morpholinos für einen *knockdown* des *Irp6* Rezeptors generiert. Dosis abhängige Injektion führt im Falle von *Irp6.1MO* zu einem amorphen Phänotyp, der alle drei Klassen nach Shimizu et al. (2005) widerspiegelt. Nach Injektion von *Irp6.2MO* konnten „classI“ und „classII“ Phänotypen klassifiziert und keine „classIII“ Embryonen beobachtet werden. Somit handelt es sich bei dem *Irp6.2* Morpholino um eine hypomorph wirkende Inhibition des Lrp6 Rezeptors (Abb.4.34: B).

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Wnt Signalweg an der posterioren Somitogenese und Schwanzbildung beteiligt ist (Diplomarbeit Willems, 2007).

Um eine mögliche frühe Kooperativität zwischen dem Wnt und dem Delta-Notch Signalweg zu untersuchen, wurde die Wnt Kaskade in Kombination mit einer Delta-Notch Mutante (*bea*) und den in dieser Arbeit beschriebenen *her* Mutanten (*her1KO* und *her7KO*) ausgeschaltet. Dabei konnten Defekte bei der Bildung der frühen Segmentgrenzen festgestellt werden (Abb. 4. 34).

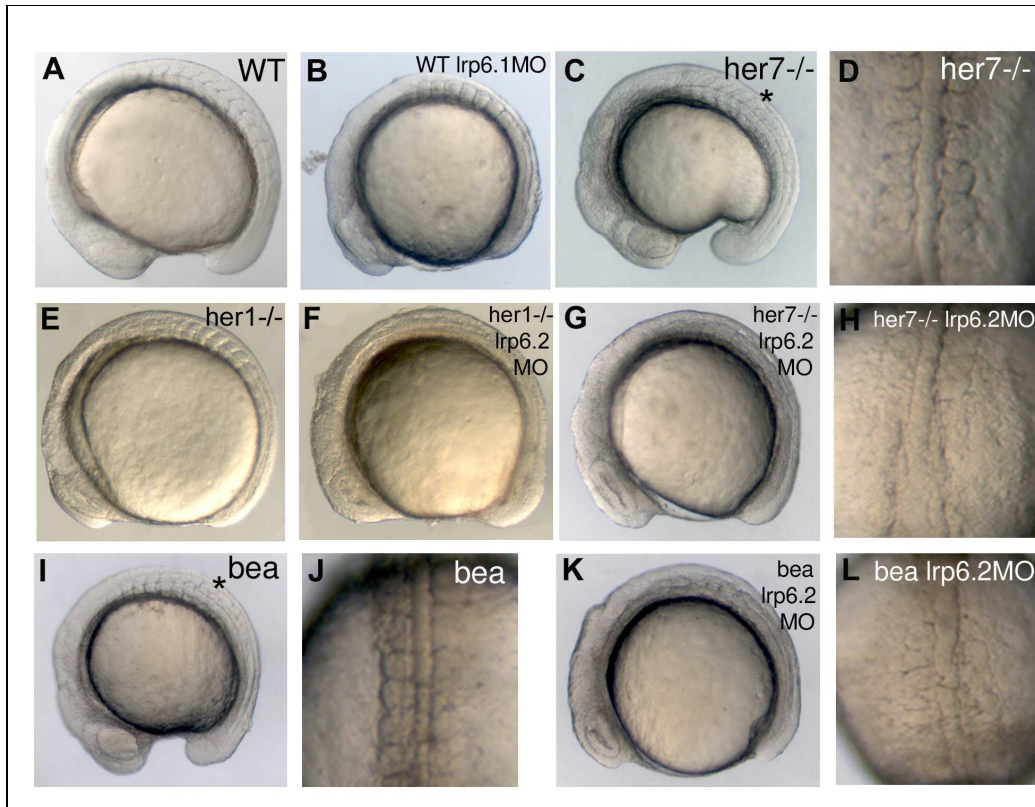


Abbildung 4.34:
kombinatorisches Ausschalten des Wnt Signalweges mit unterschiedlichen Komponenten des Delta-Notch Signalweges:

Die Injektion von *Irp6.1MO* (B) führt im Vergleich zum Wildtyp (A) zu keinem Segmentgrenzendefekt. Der *her7*KO zeigt einen Segmentgrenzendefekt ab Somit neun (Sternchen) (C). Dorsale Ansicht zeigt die anterior vorhandenen Segmentgrenzen. Nach Injektion von *Irp6.2MO* in den *her7*KO (G, H) zeigt dieser zusätzliche Somitengrenzendefekte im anterioren Embryo. *bea* zeigt einen Segmentgrenzendefekt (I, J) ab Somit vier (Sternchen), nach Injektion von *Irp6.2MO* sind keine Somitengrenzen mehr vorhanden (K, L). Der *her1*KO zeigt einen Defekt in den ersten drei Somiten (E) und nach Injektion von *Irp6.2MO* sind keine Somiten mehr zu erkennen (F).

(A) WT, (B) *Irp6.1MO*, (C, D) *her7*KO, (G, H) *her7*KO mit *Irp6.2MO*, (E) *her1*KO, (F) *her1*KO mit *Irp6.2MO*, (I, J) *bea* und (K, L) *bea* mit *Irp6.2MO*,

(A-C, E-G, I, K) laterale Ansicht, links anterior; (D, H, J, L) dorsale Ansicht, anterior oben

Die Delta-Notch Mutanten zeigen alle im Wesentlichen denselben Phänotyp, und zwar einen posterioren Segmentgrenzendefekt ab Somit drei bis neun, wie z.B. die *bea/deltaC* Mutante, die den frühesten Defekt etwa ab Somit vier zeigt (Abb. 4.34: I). Das kombinatorische Ausschalten von Delta-Notch und Wnt Signaltransduktion führt zu einem kompletten Verlust der Segmentgrenzen (Abb. 4.34: K, L). Außerdem zeigen die *her* Mutanten, welche im Falle von *her1* Defekte in den ersten drei Somiten und *her7* von 9-17 Defekte zeigen, bei einem zusätzlichen Ausschalten der Wnt Kaskade einen Verlust der Somitengrenzen über den gesamten Embryo (Abb. 4.34: C-H).

Insbesondere der Doppelverlust von *her7* oder *deltaC* und *Irp6* zeigt einen synergistischen Defekt im Vergleich zu dem (Abb. 4.35: B) beobachteten posterioren Segmentgrenzendefekt (Abb. 4.35: C) nach Einzelgenverlust. Der Delta-Notch Signalweg ist während der

Entwicklung zusätzlich an der Determinierung von Zellen beteiligt und der Wnt Signalweg an der Mesodermspezifikation. Ein kombinatorisches Ausschalten führt zu einem stark deformierten Embryo mit einer stark eingeschränkten Überlebensrate (nicht älter als sieben Tage).

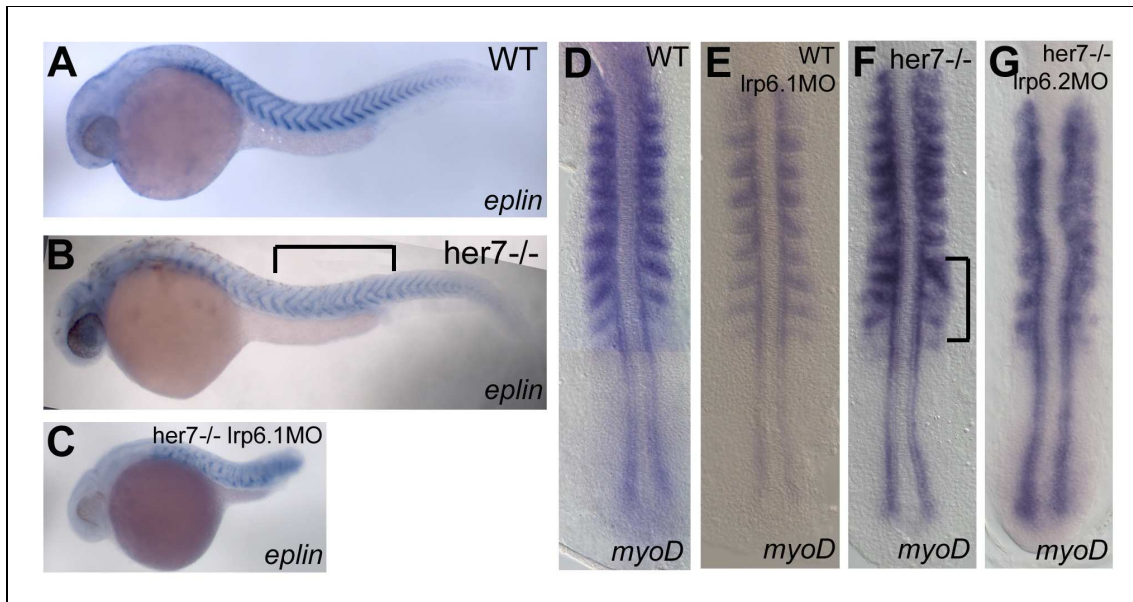


Abbildung 4.35:

Segmentgrenzendefekt und a-p-Polarität im *Lrp6.1MO* injizierten *her7KO*:

Der *Lrp6.1MO* injizierte *her7KO* (C) zeigt im Vergleich zum Wildtyp (A) Defekte in den Somitengrenzen und ein verkürztes posteriores Wachstum. Der *Lrp6.1MO* injizierte WT-Embryo zeigt keinen Defekt in der a-p Polarität (E), wohingegen im *her7KO* nach Somit neun (F, Klammer) und nach Injektion von *Lrp6.2MO* ab Somit eins (G) die a-p Polarität verloren gegangen ist.

(B) *her7KO*, 16 *prim stage*, anterior links, *myoD in situ* Hybridisierung mit (D) WT, (E) WT *Lrp6.1MO*, (F) *her7KO*, (G) *her7KO/Lrp6.2MO*, 10-12SS, Flachpräparate, anterior oben

Die *Lrp6.1MO* injizierten *her7KO* Embryonen zeigen Segmentgrenzen, die im gesamten Embryo fehlgebildet sind.

Auch die rostro-caudale Polarität ist im *her7KO* mit *Lrp6.1 knockdown* innerhalb der Somiten über die gesamte Längsachse verloren gegangen (Abb. 4.35: G). Die Injektion von *Lrp6.1* Morpholino im Wildtyp führt zu keiner Störung der Segmentpolarität in den anteriorsten Somiten (Abb. 4.35: D). Im Gegensatz dazu ist bei einem Verlust von *Lrp6* und *Her7* sowohl die Segmentpolarität dramatisch gestört, als auch eine Verformung des Notochords zu beobachten (Abb. 4.35: G).

Der *Lrp6* Morpholino injizierte Embryo zeigt Segmentgrenzendefekte ab dem Dotterstiel (Abb. 4.35). Wohingegen die *bea* Mutante ab Somit vier, der *her1KO* nur in den ersten drei und der *her7KO* einen Defekt in den Segmentgrenzen 9-17 aufweist. Der zusätzliche Funktionsverlust von *Lrp6* in diesem Mutanten führt zu einem Segmentgrenzendefekt über die gesamte Körperachse des Embryos. Somit führt ein synergistischer Ausfall des Delta-

Notch und des Wnt Signalweges, die beide im Einzelgenverlust posteriore Defekte verursachen, zu einem Defekt in der frühen Entwicklung des Embryos.

Dem Prozess der Polaritätszuweisung geht der Mechanismus des „pre-patterning“ voraus, welcher möglicherweise eine Ursache für den beobachteten Phänotyp sein könnte (Abb. 4.36).

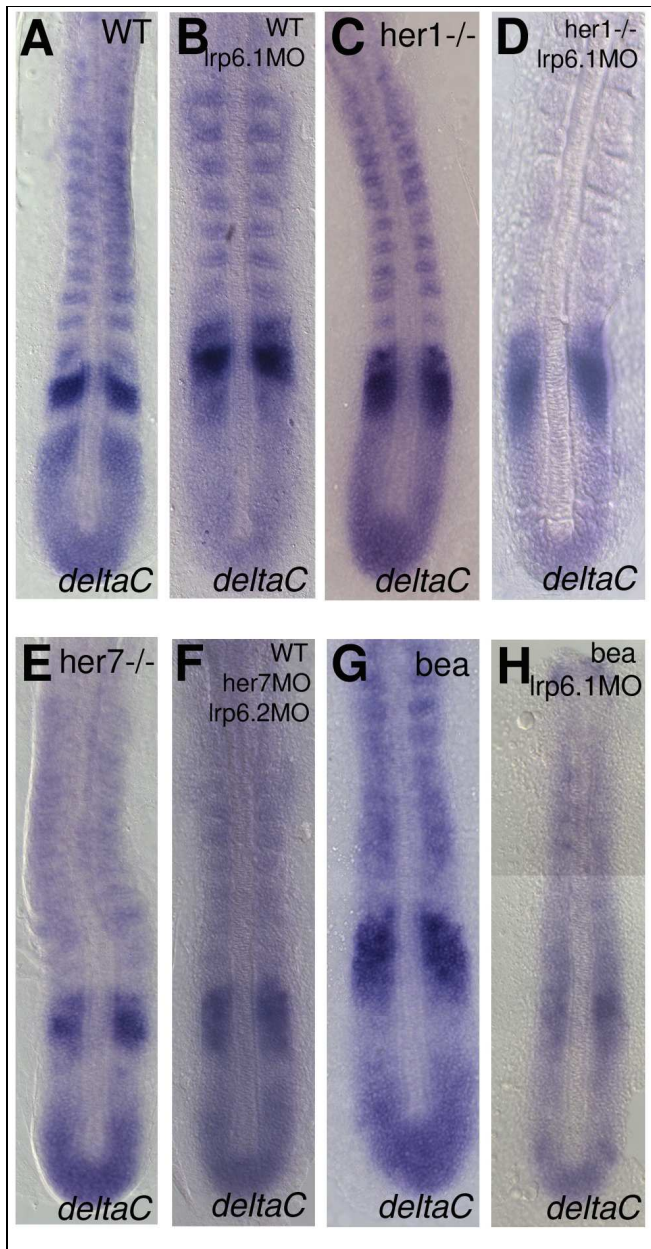


Abbildung 4.36: deltaC Expression nach lrp Injektion: Die zyklische *deltaC* Expression (A) ist nach *lrp6.1MO* Injektion im WT (B) verloren gegangen, allerdings kann eine segmentale Expression noch beobachtet werden. Im *her1KO*, *her7KO* und *bea* (C, E, G) ist die zyklische Expression im anterioren PSM gestört, nach *lrp6.1MO* Injektion kann ein zusätzlicher Verlust der segmentalen Expression im *her1KO* (D) beobachtet werden. Nach *lrp6.1MO* Injektion in *bea* (H) ist die diffuse segmentale Expression noch vorhanden.

deltaC Expression im (A) WT, (B) *lrp6.1MO*, (C) *her1KO*, (D) *her1KO* mit *lrp6.1MO*, (E) *her7KO*, (F) *her7MO* mit *lrp6.2MO*, (G) *bea* und (H) *bea* mit *lrp6.1MO*, 10-12SS, Flachpräparate, anterior oben.

Der *lrp6.1MO* knockdown im Wildtyp zeigt eine aberrante Expression von *deltaC* im anterioren PSM, wohingegen die segmentale Expression aufrechterhalten wird (Abb. 4.36: B). Wie bereits in Kapitel 4.1 dargelegt wurde, konnte gezeigt werden, dass im *her1KO* *deltaC* posterior weiter zyklisch exprimiert wird. Sowohl die Injektion von *lrp6.1MO* als auch

Irp6.2MO in die *her1* Mutante führt zu einem Verlust der segmentalen Expression von *deltaC*. Ferner geht die zyklische posteriore Expression von *deltaC* nach Injektion von *Irp6.1* Morpholino im *her1KO* verloren (Abb. 4.36: D). Dies legt nahe, dass der Wnt Signalweg die posteriore Expression von *deltaC* in einer Her1 unabhängigen Weise reguliert.

In der *bea* Mutante wird *deltaC* in den ersten vier Somiten segmental exprimiert (Abb. 4.36: G) und aufgrund der fehlenden Somitengrenzen in den darauf folgenden nur noch diffus. Nach *Irp6.1* Morpholino Injektion konnte beobachtet werden, dass die segmentale Expression auch in den ersten vier Somiten verloren gegangen ist (Abb. 4.36: H).

Da das kombinierte Ausschalten beider Signalwege von Beginn an zu einem Somitengrenzdefekt führt, wurde der Einfluss auf die Segmentierungsuhr in der frühen Entwicklung untersucht, indem die Wirkung auf die zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7* analysiert wurde (Abb. 4.37, 4.38).

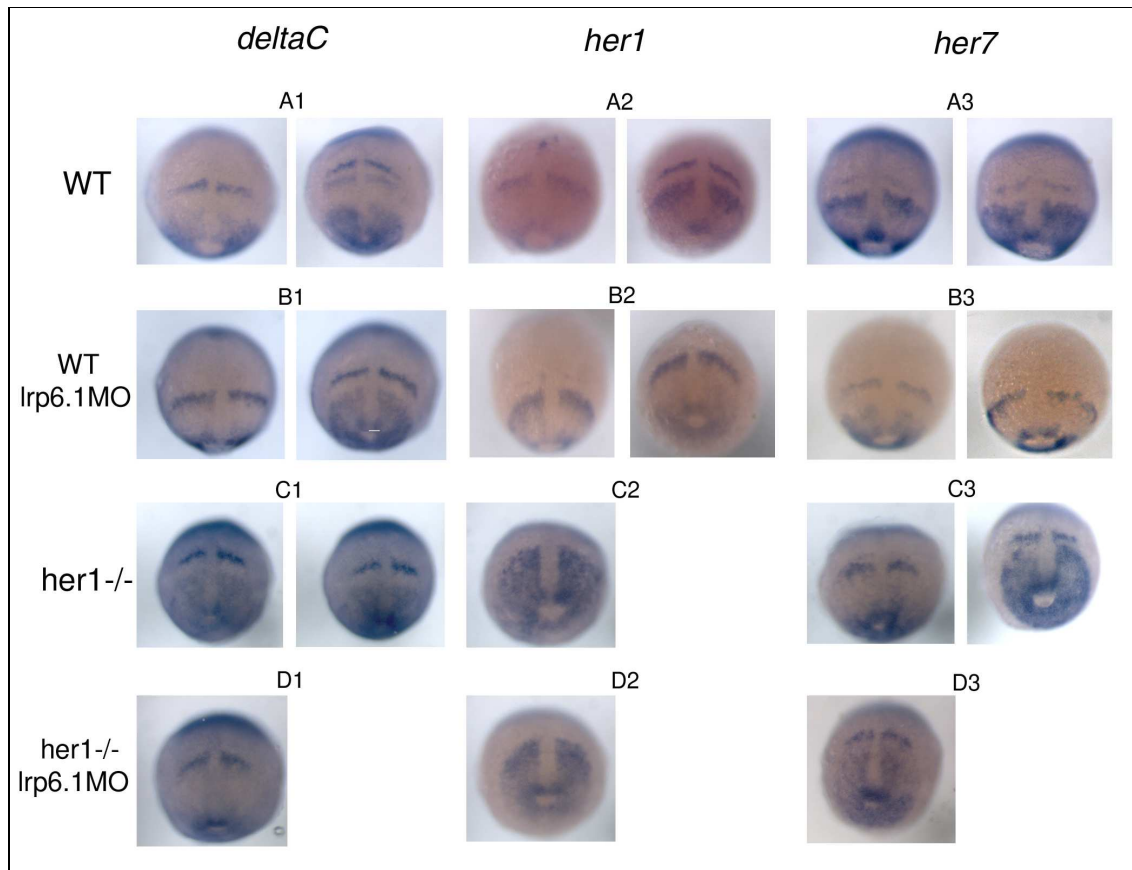


Abbildung 4.37:

deltaC, *her1* und *her7* Expression nach *Irp* MO Injektion in WT und *her1KO*:

nach *Irp6.1MO* Injektion im Wildtyp (B1, B2, B3) kann eine zyklische Expression im posterioren PSM beobachtet werden, allerdings ist im anterioren PSM nur noch eine Expressionsbande erkennbar. Die annähernd zyklische Expression von *her7* und *deltaC* im *her1KO* ist nach *Irp6.1MO* Injektion (D1-D3) gestört.

90% Epibolie bis *bud stage*, dorsale Ansicht

Im Vergleich zum *her1*KO ist die zyklische Expression von *deltaC* und *her7* bei einem zusätzlichen Verlust von *Lrp6* in der frühen Entwicklung gestört (Vergleich Abb. 4.37: C1-C3 mit Abb. 4.37: D1-D3). Während die *her7* Expression diffus im *Lrp6.1*MO injizierten *her1*KO vorliegt (Abb. 4.37: D3), ist für *deltaC* allerdings ein stabiles Expressionsmuster (Expression als Streifen im anterioren PSM und um dem Epibolie-Rand) in diesem Doppelfunktionsverlust zu beobachten (Abb. 4.37: D1).

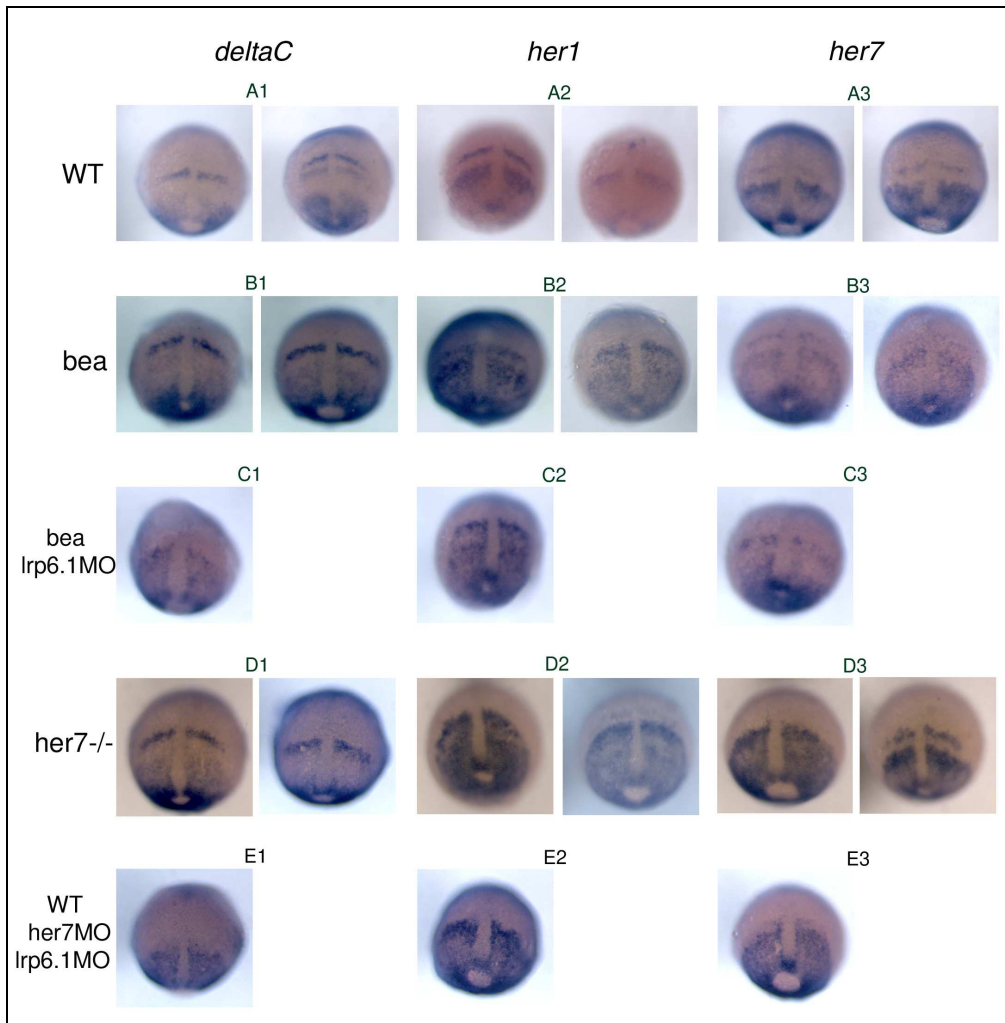


Abbildung 4.38:

deltaC, *her1* und *her7* Expression nach *lrp* Injektion in *bea* und *her7*KO:

Die zyklische Expression von *deltaC*, *her1* und *her7* ist im Vergleich zum WT (A1-A3), *bea* (B1-B3) und *her7*KO (D1-D3) nach *lrp* Injektion in der *bea* und *her7* Mutante verloren gegangen.

90% Epibolie bis *bud* stage, dorsale Ansicht

Die zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7* ist auch bei einem Doppelfverlust von *Lrp6* und *DeltaC* bzw. *Her7* verloren gegangen (Abb. 4.38: C1-C3 und E1-E3).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei einem Funktionsverlust von Lrp6 in Kombination mit einem Funktionsverlust von DeltaC, Her1 oder Her7 die frühe Segmentierungsuhr, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, gestört ist.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, inwieweit der FGF und Wnt Signalweg miteinander interagieren, bzw. ob eine regulatorische Interaktion zwischen diesen Signalwegen vorliegt. Mit Hilfe von kombinatorischen *knockdowns* kann versucht werden dies zu untersuchen.

Die gleichzeitige Inhibierung des Wnt und FGF Signalweges kann durch einen Doppel-*knockdown* des Wnt Ko-Rezeptors über *lrp6.2MO* und dem FGF Zielgen *her13.2* mit dem *her13.2MO* durchgeführt werden. Da die Einzelinjektionen zu keinem Phänotyp in der frühen Somitogenese führen und bei *lrp6* ein Defekt ab der späten Somitogenese zu sehen ist, würde ein früher Phänotyp oder eine Verstärkung des späten Defekts auf eine Interaktion beider Signalwege schließen (Abb. 4.39).

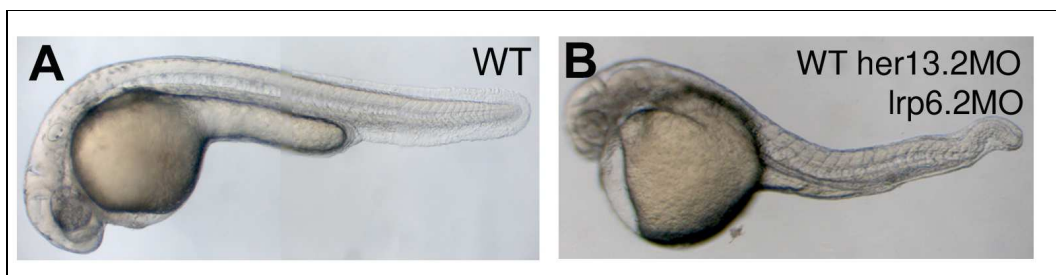


Abbildung 4.39:

her13.2MO und *lrp6.2MO* Injektion:

Die Doppelinjektion von *lrp6.2MO* und *her13.2MO* (B) führt während der posterioren Entwicklung zu keinem weiterem Effekt als der nach *lrp6* Injektion beobachteten Phänotyp.
prim 16, anterior links

Die vorläufigen Daten deuten allerdings daraufhin, dass der FGF Signalweg nicht durch Her13.2 mit dem Wnt Signalweg verbunden ist. Ein gleichzeitiger Funktionsverlust von Lrp6 und Her13.2 führt zu keinen weiteren Defekten im Embryo als bisher in den Einzelinjektionen beobachtet wurde.

Um einen mögliche kooperative Rolle zwischen dem Wnt und dem Delta-Notch Signalweg zu untersuchen, wurde die Translation von Suppressor of Hairless (Su(H)) und Lrp6 durch eine Doppelmorpholino Injektion inhibiert.

Das Su(H) Protein interagiert mit der intrazellulären Domäne von Notch und aktiviert daraufhin Zielgene des Delta-Notch Signalweges, wie *her1* und *her7*. Die Inhibierung dieses Genes mittels Morpholino Injektion führt zu einem Somitengrenzenverlust ab Somite 5-7 (Sieger et al. 2003) (Abb. 4.40: B).

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass der *knockdown* von Su(H) nicht nur zu einem Somitengrenzenverlust ab Somit sechs (+/-2) führt, sondern auch im älteren Embryo zu Schwanzdeformationen führt. Dabei konnten zwei Klassen („classI“: 29, „classII“: 5) nach Shimizu (Shimizu et al. 2005) unterschieden werden (Abb. 4.40: D-E).

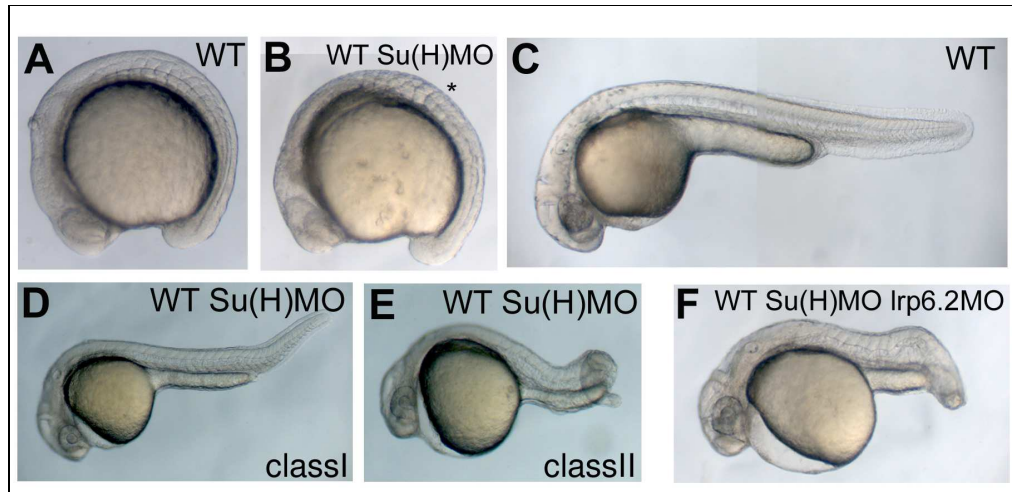


Abbildung 4.40:
Inhibierung von Wnt und Delta-Notch:
Der Doppel *knockdown* von Wnt durch *Irp6.2* und Delta-Notch durch Su(H) führt zu Embryonen der „classI“ und „classII“ nach Shimizu (F). Es konnte nach Einzelinjektion von Su(H) posteriore Defekte beschrieben werden, die in „classI“ (=29) und „classII“ (=5) eingeordnet werden konnten (D, E).
(A) WT, (B) WT mit *Su(H)MO* (Sternchen markiert den letzt gebildeten Somiten), 10-12 SS,
(C) WT, (D,E) WT mit *Su(H)MO*, (F) WT mit *Su(H)MO* und *Irp6.1MO*, 16 prim, Kopf links

Der Ausfall von Su(H) führt zu einem posterioren Defekt, der der „classI“ zuzuordnen ist. Tiere, die mit beiden Morpholinos (*Su(H)MO* und *Irp6MO*) injiziert wurden, konnten nahezu alle der „classII“ (36/39) zugeordnet werden. Die Verstärkung des posterioren Effekts lässt daher den vorläufigen Schluss zu, dass beide Signalwege, Delta-Notch und Wnt, eine redundante Rolle während der posterioren Somitogenese besitzen.

5 Diskussion

Der Begriff Somitogenese beschreibt einen Entwicklungsprozess in Vertebraten, der von essentieller Bedeutung ist. Die zeitliche und räumliche Kontrolle der Somitogenese unterliegt einer „segmentation clock“, die die Aktivierung und das Zusammenspiel von Signalwegen kontrolliert. Dabei spielen die Gene des Delta-Notch Signalweges, die zyklisch im präsomitischen Mesoderm (PSM) exprimiert werden, und die Gene des Wnt Signalweges eine entscheidende Rolle. Eine Störung eines dieser Signalwege führt zu einer gestörten Entwicklung, die in Abhängigkeit des betroffenen Genes mehr oder minder schwer ausfallen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle zweier Zielgene des Delta-Notch Signalweges, *her1* und *her7* näher untersucht. Hierzu standen zwei noch nicht beschriebene Stop-Mutanten zur Verfügung. Weiterhin wurde eine mögliche, noch nicht beschriebene Verknüpfung des Delta-Notch mit dem Wnt Signalweges im Zebrafisch analysiert.

5.1 Die essentielle Rolle von *her1* in der frühen Somitogenese

Sowohl Holley als auch Oates beschreiben einen Somitengrenzendefekt nach *her1* Morpholino Injektion, der im Vergleich zu dem im *her1*KO beobachteten Phänotyp abweicht. So wurde beschrieben, dass Defekte in den Segmentgrenzen über die gesamte Achse (Holley et al. 2002) vorhanden sind, oder lediglich einzelne Grenzen betroffen sind (Oates and Ho 2002). Die morphologische Charakterisierung der *her1* Mutante zeigt jedoch, ähnlich wie von Henry et al. (2002) beobachtet, Missbildungen in den ersten drei Somitengrenzen.

Bevor die transienten Segmente morphologisch sichtbar werden, durchlaufen die Zellen beim Eintritt in das anteriore PSM mehrere Prozesse. Die nunmehr im anterioren PSM lokalisierten Zellen erfahren einen mesenchymalen-epithelialen Übergang (mesenchymal to epithelial transition MET) (Nakaya et al. 2004; Takahashi et al. 2005), darauf folgt eine Kompartimentisierung in rostral und caudal und intersomitische Grenzen werden gebildet (Rida et al. 2004). Hierbei spielen die Gene der *rippy*-Familie bei der Termination der Genexpression von *mesp* und *her1* und Aufrechterhaltung der rostro-caudalen Polarität eine entscheidende Rolle (Kawamura et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von *rippy1* zu einem Segmentgrenzendefekt über die gesamte Achse führt. Es wird angenommen, dass die Funktionalität von *rippy* darin besteht, Gene, wie z.B. *mespb* und *her1*, im anterioren PSM zu reprimieren (Kawamura et al. 2005). Jedoch scheint die Genaktivierung von *rippy* wiederum von *her1* beeinflusst zu sein, da diese während der Bildung der ersten drei Segmente im Vergleich zum Wildtyp in der *her1* Mutante gestört ist.

Ebenso wie *rippy* eine entscheidende Rolle während der Bildung der Segmentgrenzen spielt, besitzen die Transkriptionsfaktoren der bHLH *mesp*-Genfamilie ebenfalls eine Funktion im anterioren PSM. Sowohl *mespa* als auch *mespb* sind an der Etablierung der rostro-caudalen Polarität maßgeblich beteiligt. Eine Missexpression führt zu einer Posteriorisierung der Somiten, welches als Folge zu fehlgebildeten Segmentgrenzen führt (Sawada et al. 2000). Zum Zeitpunkt der Bildung der ersten drei Segmentgrenzen konnte beobachtet werden, dass die *mespb* Expression in der *her1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp gestört ist. Möglicherweise führt der Funktionalitätsverlust von Her1 zu einer gestörten Regulation von Mesp und damit auch zu keiner Etablierung der rostro caudalen Polarität.

Der Ausfall des Her1 Proteins führt sowohl zu einer gestörten Etablierung der rostro-caudalen Polarität durch *mesp*, als auch zu einer gestörten Termination durch *rippy*. Ungeklärt bleibt noch, wie genau Her1 mit diesem Defekt in Zusammenhang steht, und ob eine mögliche Dimerisierung mit *mesp* besteht oder/und ein direkter Einfluss auf *rippy* ausgeübt wird.

Die aus der Störung der Termination resultierende Fehletablierung der rostro-caudalen Polarität zum Zeitpunkt der Generierung der ersten drei Somiten in der *her1* Mutante ließ sich auch durch eine *myoD* Expression bestätigen. Hierbei handelt es sich um einen Muskelmarker, der in jeder Somite halbsegmental exprimiert wird. Die Analyse der *her1* Mutante im 10-12 Somitenstadium zeigt einen Verlust der Halbsegmentalität in den ersten drei Somiten. Die darauf folgenden Somiten, die keine Defekte in den Segmentgrenzen aufweisen, zeigen eine wildtypische posteriore Segmentexpression von *myoD*.

Zusammen mit den beobachteten Ergebnissen, sowohl morphologisch als auch molekular, wäre eine mögliche Korrelation in der Missexpression der genannten Gene und dem beobachteten Somitengrenzendefekt in den ersten drei Segmenten in der frühen *her1* Mutante denkbar.

Des Weiteren können unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Transkription von *rippy1* und *rippy2* im Laufe der Entwicklung beobachtet werden. Die zyklische *rippy1* Expression bleibt in der *her1* Mutante weiterhin im 10-12 Somitenstadium im anterioren PSM gestört, wohingegen für *rippy2* eine wildtypische Expression beobachtet werden kann. Dies lässt vermuten, dass Her1 temporär, d.h. während der frühen Somitogenese einen Einfluss auf die *rippy* Expression ausübt. Möglicherweise kann die gestörte *rippy1* Expression im 10-12 Somitenstadium im anterioren PSM durch die Expression von *rippy2* redundant ersetzt werden und führt dadurch zu keinem Segmentgrenzenverlust. Da *rippy2* in der *her1* Mutante in späteren Somitogenese-Stadien wildtypisch exprimiert wird, kann vermutet werden, dass

ripply2 zeitlich unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Früh ist *ripply2* Expression Her1 abhängig, später allerdings unabhängig. Aus dem Her7 Mutanten-Phänotyp, die *ripply* Expression ist hier dramatisch gestört, lässt sich folgern, dass zu diesem Zeitpunkt (10-12 Somitenstadium) Her7 eine Funktion auf die *ripply* Gene ausübt.

Dem Prozess der Etablierung der rostro-caudalen Polarität und der Bildung der Segmentgrenzen geht der Mechanismus des „prepatternings“ voraus. Dabei ist u.a. das Zusammenspiel der Gene innerhalb des Delta-Notch Signalweges von großer Bedeutung. So durchlaufen Zellen die alternierende Aktivierung bzw. Inhibierung der Delta-Notch Signaltransduktion bereits in der frühen Somitogenese, bevor Somiten sichtbar werden. So konnte in diesem Stadium der *her1* Mutante gezeigt werden, dass die zyklische Genexpression von *her1* verloren gegangen ist, und *deltaC* bzw. *her7* weiterhin im PSM eine zyklische Expression zeigen. Während der frühen Somitogenese ist also ein negativer „feedback loop“ von Her1 auf die *her1* Expression festzustellen. Die zyklische *her7* Expression ist somit in der frühen Somitogenese Her1 unabhängig. Allerdings konnte in der *her1* Mutante beobachtet werden, dass die streifenartige Expression von *deltaC* im anterioren PSM sowohl in der frühen Somitogenese als auch im 10-12 Somitenstadium gestört ist (Abb. 5.1).

	WT	<i>her1</i> KO 90% <i>epiboly</i>	<i>her1</i> KO 10-12 SS
<i>deltaC</i>		 a p	 a p
<i>her1</i>			
<i>her7</i>			

Abbildung 5.1:
zyklische Genexpression im *her1*KO:
In der frühen Somitogenese der *her1* Mutante zeigen sowohl *her7* als auch *deltaC* im posterioren (p) PSM eine zyklische Expression, wohingegen die zyklische Expression von *her1* gänzlich zusammengebrochen ist (durchgestrichen). Im Gegensatz dazu fängt im 10-12 Somitenstadium *her1* an, zyklisch exprimiert zu werden. Die Expression von *deltaC* ist im anterioren (a) PSM der Mutante zusammengebrochen.

Hingegen ist *deltaC* im frühen als auch späten Embryo im posterioren PSM zyklisch exprimiert, und zwar sowohl in der KO, als auch in der *knockdown* Situation, was bis dato übersehen wurde. Diese bislang noch nicht beschriebene zyklische mRNA Expression von *deltaC* im posterioren PSM der *her1* Mutante lässt vermuten, dass die posteriore Genregulation in einer Her1 unabhängigen Weise durchgeführt wird. Interessanterweise spielt die gestörte anteriore *deltaC* Expression aber wohl keine Rolle z.B. in Form einer rostro-caudalen Polaritätssteuerung, denn diese Störung besteht auch in älteren Stadien, ohne dass daraus eine ersichtliche morphologische Veränderung resultiert.

Überraschenderweise verändert sich das Expressionsmuster von *her1* im Laufe der Entwicklung in der *her1* Mutante. So kann bei Embryonen im 10-12 Somitenstadium eine wenn auch nicht wildtypische zyklische, aber verlängerte *her1* Expression beobachtet werden (Abb. 5.1). Möglicherweise unterliegt die Expressionskontrolle von *her1* in der späten Somitogenese anderen Mechanismen. Zumindest scheint der für die frühe Somitogenese notwendige „negative feedback loop“ von Her1 auf *her1* in der späten Somitogenese (ab 10 Somitenstadium) nicht mehr vorhanden zu sein, da *her1* zyklische Expression zeigt.

Die durch Morpholino Injektion erhobenen Daten deuten daraufhin, dass *her1* und *her7* sich gegenseitig regulieren und dass beide, für eine koordinierte *deltaC* und *deltaD* Transkription benötigt werden (Henry et al. 2002; Holley Scott A. 2002; Oates AC 2002; Gajewski et al. 2003). Das Fehlen von Her1 in der *her1* Mutante führt zwar immer noch zu einer zyklischen Expression von *her7*, die Oszillationsphase ist jedoch vergleichsweise lang gestreckt. Da *her7* während der gesamten Entwicklung der *her1* Mutante zyklisch exprimiert wird, weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass für *her7* noch ein weiterer Regulierungspartner existieren muss, der zu Her1 eine redundante Funktion besitzt. Festgehalten werden kann, dass ein fehlendes Her1 Protein nicht zu einem Abbruch zyklischer Expression von *her7* führt. Die Charakterisierung sowohl der *her7* Mutante als auch die Ergebnisse resultierend aus *her7* *knockdown* Experimenten deuten daraufhin, dass *her7* seine eigene Transkription kontrollieren kann. So führt ein Funktionsverlust von Her7 im 10-12 Somitenstadium zu einer gestörten mRNA Expression sowohl von *her7* als auch von *her1*.

Die *her1* Mutante bildet ungefähr ab Somit vier wildtypische Segmentgrenzen. Dies lässt vermuten, dass Her1 eine temporäre einzigartige Rolle während der frühen Somitogenese besitzt, die im Laufe der Entwicklung nicht mehr vorliegt, bzw. durch ein redundantes Protein ersetzt werden kann. Auf Letzteres weisen die *her1/her7* Doppel-Morpholino *knockdown* Experimente von Henry et al. (2002) hin. Ein Doppelfunktionsverlust von Her1 und Her7 führt zu einem Segmentgrendefekt über die gesamte embryonale Achse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Her1 zwar durchaus eine Rolle in der späten Somitogenese besitzt, aber durch ein redundantes Protein ersetzt werden kann. Ein potentieller Kandidat hierfür wäre nach bislang erbrachten Analysen Her7.

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal die *her1* *knockdown* mit *her1* *knockout* Ergebnissen verglichen werden. Die Analyse der *her1* Mutante konnte z.B. die kontroversen Beobachtungen zu den unterschiedlich auftretenden morphologische Phänotypen nach *her1*

Morpholino Injektion dahingehend aufklären, dass sich wie bereits erwähnt, die KO Daten mit den *knockdown* Daten von Henry et al., 2002, decken. Allerdings sind im Hinblick auf die *her1* Expression zwischen dem *her1*MO injizierten Embryo und der Mutante Unterschiede fest zu stellen. So ist die zyklische Expression von *her1* im *her1*KO in der frühen Somitogenese zusammengebrochen, während diese im *her1* Morpholino injizierten Embryo weiterhin zyklisch exprimiert wird (Sieger et al. 2006) (Abb. 5.2).

	WT	<i>her1</i> KO 90% <i>epiboly</i>	<i>her1</i> MO 90% <i>epiboly</i>
<i>deltaC</i>			
<i>her1</i>			
<i>her7</i>			

Abbildung 5.2: zyklische Genexpression im *her1*KO und *her1*MO:

Der *her1* Morpholino injizierte Embryo zeigt im Vergleich zum *her1*KO eine zyklische Genexpression von *her1*. Die Expression von *deltaC* ist im anterioren (a) PSM der Mutante zusammengebrochen. (p)=posterior

Möglicherweise scheint die Penetranz des dort verwendeten *her1* Morpholinos im frühen Embryo nicht hinreichend für eine vollständige Translationsinhibition zu sein. Des Weiteren zeigen sich auch im 10-12 Somitenstadium Unterschiede in der *her1* RNA Expression. So kann im *her1* Morpholino injizierten Embryo eine auf das posteriore PSM beschränkte zyklische *her1* Expression beobachtet werden, die im Vergleich zum *her1*KO weiter ins anteriore PSM hineinreicht. Durch vorläufige Experimente im Yeast-Two-Hybrid-System konnte ein möglicher Verdacht auf eine Restaktivität im *her1*KO (die möglicherweise aus dem Auftreten des Translationsstopp erst im Loop der bHLH-Domäne resultiert) nicht bestätigt werden (persönliche Mitteilung A. Oates). Möglicherweise bindet die noch translatierte „basic“-Domäne im Her1KO an Repressorbindestellen und beeinflusst so unspezifisch die Regulationskontrolle weiterer für den Oszillationsmechanismus benötigter Gene. Allerdings konnte diese mögliche Art der Interferenz bislang noch nicht näher analysiert werden.

Neben der bedeutenden Rolle von Delta-Notch während der Somitogenese besitzt der FGF Gradient ebenfalls eine funktionale Rolle. Sobald Zellen unter einen bestimmten Schwellenwert des Gradienten fallen, werden diese zu Somiten determiniert. Es konnte gezeigt werden, dass Her1 mit Her13.2 eine Kooperation eingeht und dadurch den Delta-Notch mit dem FGF Signalweg verbindet (Sieger et al. 2006). Möglicherweise führt die unvollständige Unterdrückung der Her1 Aktivität nach einem *knockdown* dazu, dass die

Interaktion mit dem *her13.2* Gradienten beeinflusst wird und dadurch die *her1* Expression auf das posteriore PSM beschränkt bleibt. Bislang konnte diese Hypothese noch nicht geklärt werden und bleibt somit als Fragestellung unbeantwortet.

Dass Her1 eine differentielle Rolle während der Somitogenese besitzt, wird auch bei einer Promotoranalyse deutlich. Es konnte in einer ersten Analyse gezeigt werden, dass der Her1-Promotor zwei Regulationsmodule besitzt, die zu einer unterschiedlichen Aktivierung im PSM führen. So ist der als anteriores Element bezeichnete Promotorabschnitt verantwortlich für die *her1* Expression im anterioren PSM, wohingegen die posteriore Expression im PSM durch ein posteriores Element auf dem *her1* Promotor kontrolliert wird (Gajewski et al. 2003). Die erhobenen Daten basieren auf zwei transgenen Linien, namentlich K54 und 525. Die K54-Linie beinhaltet ca. 8600 bp des *her1* Promotors gekoppelt an einen GFP-Reporter und spiegelt die wildtypische zyklische Expression von *her1* wieder. Im Gegensatz dazu zeigt die 525-transgene Linie (3300bp), in welchem ca. 5000 bp vom 5'Ende des Promotors fehlen eine zyklische Expression im anterioren PSM, und keinerlei Reporteraktivität im posterioren PSM (Gajewski et al. 2003).

Eine detailliertere Charakterisierung des posterioren Elementes durch die Deletion von ca. 1800 bp und Generierung einer transgenen Linie (BamHI-Linie) zeigte, dass die zyklische Reporterexpression im posterioren PSM verloren gegangen ist. Des Weiteren konnte die zyklische anteriore Expression aufrechterhalten werden. Darüber hinaus konnte eine segmentale Expression in den einzelnen Somiten beobachtet werden (Abb. 5.3).

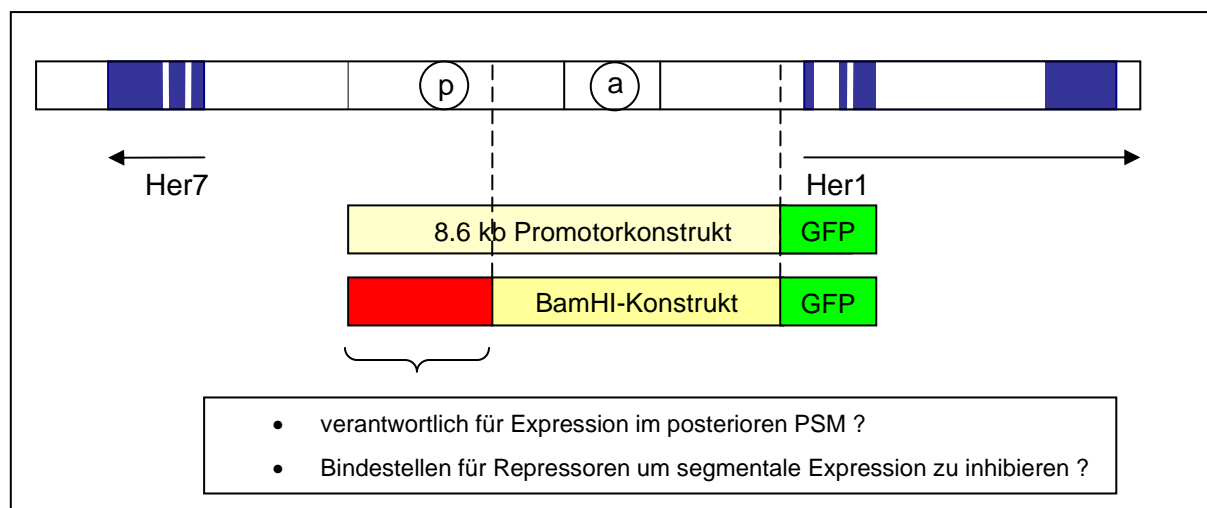


Abbildung 5.3:

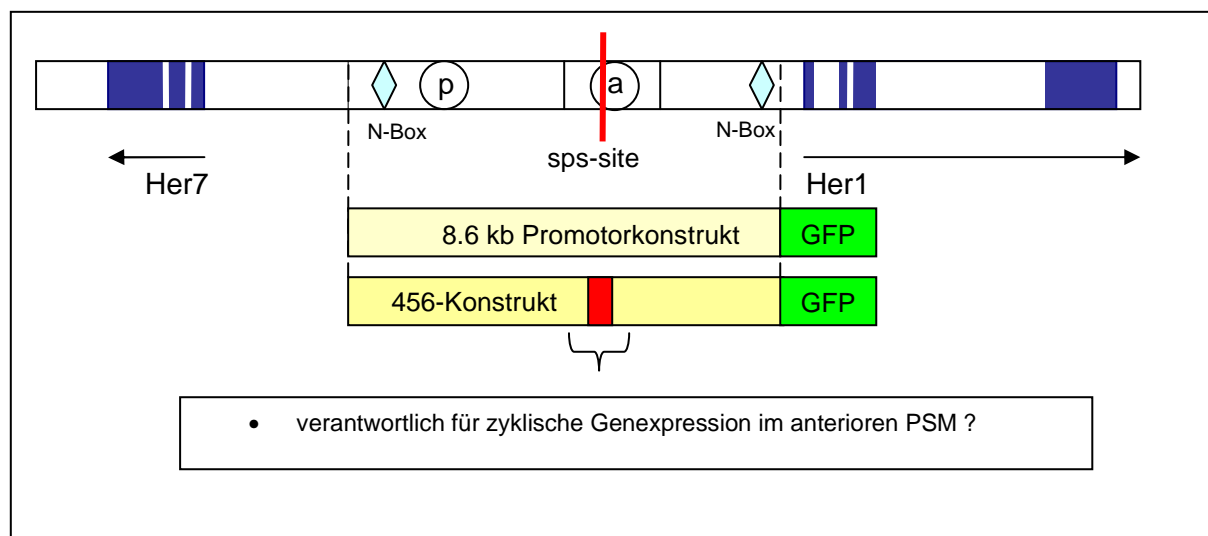
her1 Promotor:

Modifiziert nach Gajewski et al. (2003). Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Das BamHI-Konstrukt besitzt eine Länge von 6668 bp. In Rot wird das deletierte Fragment im BamHI-Konstrukt dargestellt.

Die ermittelten Daten deuten daraufhin, dass die notwendigen Kontrollelemente für eine posteriore *her1* Expression im fehlenden *her1* Promotorabschnitt lokalisiert sind. Ferner ist die nun auftretende segmentale Expression im BamHI-Reporterkonstrukt möglicherweise darauf zurück zu führen, dass Repressorbindestellen für die Inhibition dieser Expression in der BamHI-Linie fehlen.

Die K54-Reporterlinie zeigt eine GFP Expression im Notochord, die bei einer wildtypischen *her1* Expression nicht beobachtet werden kann. Daraus folgt, dass in der K54-Linie Repressorbindestellen im Reporterkonstrukt für eine Unterdrückung der Expression im Notochord fehlen. Der Vergleich der Reporterexpression in der BamHI-transgenen Linie zeigt keine Notochordexpression. Folglich liegen die Bindestellen für eine Aktivierung der Expression im Notochord in dem zum K54-Konstrukt fehlenden Abschnitt des BamHI-Konstruktes.

Die *her* Gen Regulierung erfolgt über den Delta-Notch Signalweg. Der Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (Su(H)) wird durch die intrazelluläre Domäne von Notch aktiviert, die nach Bindung von Delta an Notch abgespalten und in den Nukleus translokalisiert wird (Sieger et al. 2003). Der *her1* Promotor weist nach einer Sequenzanalyse von Martin Gajewski (Habilitationarbeit) acht potentielle Bindestellen von Su(H) auf, durch welche eine mögliche Regulierung von *her1* erfolgen könnte. Im anterioren Element ist solch eine Bindestelle für Su(H) paarig angeordnet (Gajewski and Voolstra 2002) und es stellte sich die Frage, ob eine Bindung von Su(H) für eine Expression im anterioren PSM notwendig ist. In der 456-transgenen Linie wurde diese Bindestelle deletiert und eine weiterhin bestehende zyklische Expression im posterioren PSM (Abb. 5.4), bei einem gleichzeitigen Ausfall der zyklischen anterioren Expression beobachtet.



Legende zur Abb. 5.4: *her1* Promotor auf folgender Seite

Abbildung 5.4:

her1 Promotor:

Modifiziert nach Gajewski et al. (2003). Genomische Organisation der Gene *her1* und *her7*. Exons dargestellt in Blau, die Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. In Rot wird die deletierte Sequenzregion des 456-Konstruktes dargestellt. N-Boxen sind angedeutet.

Somit weisen diese ermittelten Daten darauf hin, dass die zyklische Expression im anterioren PSM durch die Bindung von Su(H) kontrolliert wird. Die Frage, ob eine Abhängigkeit zwischen den beiden Promotorelementen besteht, kann soweit beantwortet werden, dass eine zyklische Reporterexpression im anterioren PSM nicht notwendig ist für eine zyklische posteriore Reporterexpression. Bislang bleibt aber die Frage noch offen, ob die zyklische Expression im posterioren PSM auch ohne den Sequenzabschnitt von 500bp erfolgt, in dem das anteriore „clock“ Element lokalisiert ist.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Analyse des Lunatic Fringe Promotors in Maus gezeigt werden. *lunatic fringe* wird zyklisch im PSM exprimiert und ein Genfunktionsverlust führt zu einem Somitogenesedefekt. Der *lunatic fringe* Promotor besitzt analog zum *her1* Promotor Domänen, die die anteriore bzw. posteriore Expression im PSM kontrollieren. Die unterschiedlich kontrollierten Expressionsdomänen hängen möglicherweise mit dem FGF Gradient zusammen. So könnten Gene bei einem bestimmten Schwellenwert von Fgf aktiv werden und die räumliche Expression von *lunatic fringe* steuern (Morales et al. 2002). Im Falle von *her1* könnte die spatio temporäre Expression möglicherweise durch die Kontrolle von Fgf durch *her13.2* reguliert sein. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit dieser Aspekt nicht weiter bearbeitet werden. Eine weitere Lunatic Fringe Promotorstudie konnte zeigen, dass eine sogenannte N-Box nötig ist um die zyklische Expression von *lunatic fringe* zu kontrollieren. *Hes7* ist in der Lage, diese Basenabfolge zu erkennen und als Repressor seine eigene Expression aber auch die von *lunatic fringe* zu inhibieren (Chen et al. 2005). Die Sequenzanalyse ergab für den *her1* Promotor vorläufig zwei N-Boxen (Abb. 5.4) (Habilitationssarbeit Martin Gajewski). Aber ähnliche experimentale Daten wie für den Lunatic Fringe Promotor liegen zurzeit für den *her1* Promotor noch nicht vor. Im BahmHI-Konstrukt bzw. transgenen Linie fehlt die im posterioren Element lokalisierte N-Box. Die zyklische Aktivierung des Promotors im anterioren PSM mag deshalb auf der noch vorhandenen zweiten N-Box basieren. Hingegen dazu, sind in dem 456-Konstrukt bzw. 41N transgenen Linie beide N-Boxen vorhanden, die möglicherweise für die zyklische posteriore Reporterexpression im PSM verantwortlich sind.

5.2 Die essentielle Rolle von *her7* in der späten Somitogenese

her7 ist ähnlich zu *her1* ein im PSM zyklisch exprimiertes Gen und ein Morpholino *knockdown* führt zu einem Zusammenbruch der zyklischen Genexpression. Die hier in der vorliegenden Arbeit bearbeitete Mutante ermöglicht ähnlich zur *her1* Mutante einen Vergleich der Daten, die durch Morpholino Injektion und Mutantanalyse generiert wurden. Die bis dato durchgeführten Analysen bezüglich der Genexpression der *delta* (*deltaC* und *deltaD*) Gene als auch der beiden *her* (*her1* und *her7*) Gene bestätigen die durch *her7* Morpholino Injektion erhobenen Daten. Allerdings wurde bislang bei einem *her7 knockdown* ein Somitengrenzedefekt ab Somit ~10 beschrieben, der sich über den gesamten Embryo durchzieht. Die von Oates und Ho (2002) identifizierte „anterior limit of defect“ (ALD) konnte durch die *her7* Mutantanalyse dahingehend korrigiert werden, dass auf den ALD ein „posterior limit of defect“ (PLD) folgt. Demnach zeigt der *her7*KO wildtypische Somitengrenzen ab Somit ~17, wobei folgende Segmentgrenzenformel aufgestellt werden konnte: $8(+/-3)-18(+/-2)$. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Somitengrenzedefekt mit einer gestörten rostro-caudalen Polarität einhergeht. Im 12-14 Somitenstadium zeigen die Terminationsgene *rippy1* und *rippy2* eine gestörte zyklische Expression im *her7*KO. Die Bildung der rostro-caudalen Polarität durch die *mesp* Gene ist ebenfalls gestört. Zusätzlich zu diesem gestörten Expressionsmuster bestätigt der Muskelmarker *myoD* den Zusammenbruch der Halbsegmentalität innerhalb der Segmente ab Somit acht. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein Funktionsverlust von Her7 zu einem gestörten „pre-patterning“ Mechanismus führt. Dies führt in Folge auch zu einer gestörten Termination und zieht eine gestörte Aufrechterhaltung der rostro-caudalen Polarität nach sich, die zu anomalen Somitengrenzen von $8 (+/-3)-18 (+/-2)$ führt. Somit kann für *her7* eine essentielle Rolle bei der Bildung der Somitengrenzen in der „trunk“ Region postuliert werden. Ein kombinatorischer Funktionsverlust von Her1 und Her7 führt zu einem kompletten Segmentgrenzenverlust im gesamten Embryo (Henry et al. 2002). Es scheint, dass *her1* bei der Bildung der ersten drei und *her7* bei der Bildung der mittleren Segmentgrenzen eine essentielle Rolle zu besitzen. Möglicherweise können beide Gene sich redundant bei einem Ausfall eines der Gene in der Bildung der Somitengrenzen 4-8 bzw. 18-33 ersetzen (Abb. 5.5). Da es sich bei den Her Genen um Proteine mit einer bHLH-Domäne handelt, die nur als Komplex mit einem Dimerisierungspartner fungieren, könnte es ebenso möglich sein, dass eine Dimerisierung zwischen den beiden Her Proteinen stattfindet.

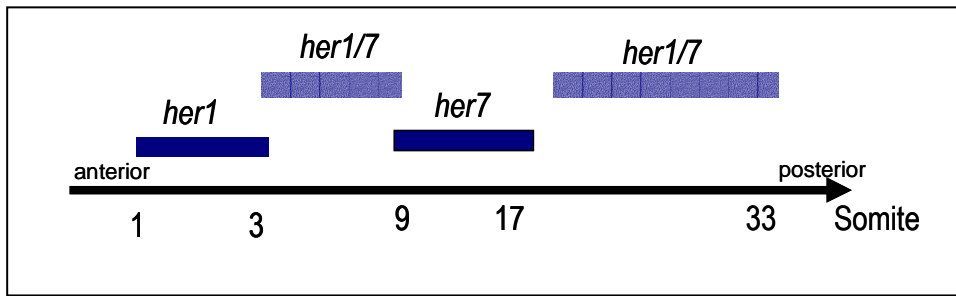


Abb. 5.5:

Hypothese der redundanten Funktion von *her1* und *her7* während der Somitogenese:
 Die embryonale Achse ist als Pfeil mit der entsprechenden Anzahl der Somiten von anterior nach posterior dargestellt. *her1* spielt bei der Bildung der Somiten 1-3 und *her7* bei der Bildung der Somiten 9-17 eine essentielle Rolle. Zwischen Somit 4 und 7 bzw. 18 und 33 besitzen beide Gene eine redundante Funktion.

Es konnte für Her1 eine Kooperation mit Her13.2 nachgewiesen werden, wobei *her13.2* als Gradient exprimiert wird (Sieger et al. 2006). Um eine mögliche Kooperation von Her13.2 mit Her7 zu untersuchen, wurde im *her7*KO die Translation von *her13.2* mittels Morpholino Injektion inhibiert. Die Einzel-Injektion von *her13.2*MO führt zu keinem morphologischen Phänotyp (Sieger et al. 2003) und es konnte bislang noch kein Segmentgrenzedefekt beobachtet werden. Das kombinatorische Ausschalten beider Gene führt zu Embryonen mit deformierten Schwanzenden, die in „classI“ und „classII“ nach Shimizu eingeteilt werden konnten (Shimizu et al. 2005). Die Analyse der Segmentgrenzen zeigt allerdings keinen additiven Defekt zu dem im *her7*KO beobachteten Phänotyp. Die bisher untersuchten Daten ergeben also den Anschein, dass Her13.2 mit Her7 keine Kooperation eingeht.

Des Weiteren kann auch ein Einfluss von *her7* auf die Terminatorgene *rippy1* und *rippy2* beobachtet werden. Beide Gene zeigen eine gestörte zyklische Expression, die einhergeht mit dem beobachteten Segmentgrenzedefekt in der *her7* Mutante. Die bislang erhobenen Daten, sowohl für *her1* als auch *her7*, deuten an, dass eine mögliche Kooperativität zwischen den beiden *her* und *rippy* Genen besteht. In der jeweiligen Mutante, *her1*KO bzw. *her7*KO, ist die Termination der „clock“ durch die Terminatorgene gestört. Die dabei resultierende Fehletablierung der rostro-caudalen Polarität durch *mesp* kann zusätzlich durch die Funktion von *rippy* nicht hergestellt werden. Für das homologe Gen zu *her1* und *her7* in Maus (*hes7*) konnte gezeigt werden, dass die Expression von *hes7* *rippy* unabhängig ist. In Mausmutanten mit fehlendem Hes7 Protein, die ebenfalls Somitogenese Defekte aufweisen (Serth et al. 2003), konnte keine Störung in der Expression der Terminatorgene gezeigt werden (Biris et al. 2007). Im Gegensatz dazu, zeigt der Zebrafisch durchaus eine Kooperativität zwischen den *her* und *rippy* Genen.

Die Somiten bilden die Grundlage der Bildung von Dermomyotom und Sklerotom, aus letzterem werden Wirbelkörper und Rippen gebildet. Die Analyse der Knochenstruktur im *her7*KO zeigt im Gegensatz zum Wildtyp deformierte Wirbelfortsätze über die gesamte Achsenmorphologie. Ein Wirbelkörper wird aus einer posterioren Somitenhälfte und der an diesen angrenzenden anterioren Teil des folgenden Somiten gebildet (Remak 1850).

Bislang konnte noch keine genaue Analyse über einen möglichen Defekt in den Sklerotomzellen der *her7* Mutante durchgeführt werden. Auch wenn die rostro-caudale Polarität innerhalb der Somiten 8 (+/-3) – 18 (+/-2) verloren gegangen ist, führt dies nicht zu Verschmelzungen von Wirbelkörpern. Die Somitengrenzen terminieren den Entwicklungsort für die Bildung der Wirbelfortsätze. Die Störung der ersten 15 (+/-2) Wirbelfortsätze kann möglicherweise auf eine Störung der Segmentgrenzen im *her7*KO zurückgeführt werden. Jedoch zeigt die Mutante bis hin zur Schwanzflosse diffus abstehende Wirbelfortsätze. Diese können nicht die Folge von defekten Somitengrenzen sein, da diese in der *her7* Mutante zum posterioren Ende hin wildtypisch gebildet werden. Da darüber hinaus *her7* nur im PSM exprimiert wird, scheint es wahrscheinlich, dass die Defekte in den Fortsätzen auf einer gestörten Rolle von Her7 in den Sklerotomvorläufern beruhen.

5.3 Der Wnt und Delta-Notch Signalweg

Die Wnt Signaltransduktion in der Zelle erfolgt durch Bindung des Liganden Wnt an einen ternären Rezeptorkomplex, der u.a. Lrp als Co-Rezeptor beinhaltet. Es konnte sowohl in Maus (Pinson et al. 2000) als auch Zebrafisch gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust des Co-Rezeptors einen annähernd ähnlichen Phänotyp hervorruft, der vergleichbar ist mit einer Wnt3a Mutante in Maus (Takada et al. 1994), bzw. einem kombinierten Wnt3a und Wnt8 *knockdown* im Zebrafisch (Shimizu et al. 2005).

In Abhängigkeit der injizierten Konzentration des *Irp6* Morpholinos konnten in Zebrafisch Defekte beobachtet werden, die von einem geknickten Schwanz, über einen verkürzten Körper bis zum kompletten Verlust des posterioren Körpers führte (Diplomarbeit Willems, 2007). Der Ausfall des Co-Rezeptors und somit des Wnt Signalweges betrifft die posteriore Entwicklung, wobei die anteriore Körperbildung nicht beeinflusst wurde. Der Funktionsverlust von Lrp führt im 10-12 Somitenstadium zu keinerlei Defekten in der Segmentgrenzenbildung, erst ab der Bildung der Rumpffregion können erste Defekte in der Entwicklung, wie eine abnormale Grenzenbildung, beobachtet werden. Die Genexpressionsanalyse während der frühen Entwicklung konnte zeigen, dass der „pre-patterning“ Mechanismus nicht gestört ist, und die Gene *deltaC*, *her1* und *her7* weiterhin zyklische Expression zeigen. Im Weiteren Verlauf der Entwicklung (10-12 Somitenstadium) zeigen diese Gene eine gestörte Expression und sind nicht länger mehr als zyklisch zu bezeichnen (Abb. 5.6). Der Zusammenbruch der zyklischen Expression steht im Einklang mit dem Zeitpunkt, in der der *Irp6*MO injizierte Embryo beginnt posteriore Fehlentwicklung zu zeigen.










	WT	<i>Irp6.1</i> MO 90% <i>epiboly</i>	<i>Irp6.1</i> MO 10-12 SS
<i>deltaC</i>			
<i>her1</i>			 1
<i>her7</i>			 2

Abbildung 5.6:
zyklische Genexpression
nach *Irp6.1*MO Injektion:
In der frühen Somitogenese
des *Irp6.1* Morpholino
injizierten Embryonen zeigen
sowohl *deltaC*, *her1* als auch
her7 eine zyklische
Expression, wohingegen
diese zyklische Expression im
10-12 Somitenstadium
zusammengebrochen ist
(durchgestrichen).

- 1) persönliche Mitteilung Peter Ströhle
- 2) persönliche Mitteilung Bernd Willems

Diverse Untersuchungen in Maus haben gezeigt, dass der Wnt Signalweg eine Rolle in der Kontrolle der Segmentierungsuhr spielt. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Wnt Signalweg ebenso mit dem Fgf Signalweg verknüpft ist, in dem er den FGF8 Gradient kontrolliert (Aulehla et al. 2003). Im Weiteren konnte eine Verknüpfung mit dem Delta-Notch

Signalweg über das Wnt Zielgen NKD1 identifiziert werden. Dabei handelt es sich um einen Repressor, der die Transkription von Wnt kontrolliert und auch eine repressorische Kontrolle auf das mHes7 Protein, einem Delta-Notch Zielgen, ausübt (Ishikawa et al. 2004).

Um eine mögliche, bislang noch nicht beschriebene Verknüpfung von Delta-Notch und dem Wnt Signalweg zu untersuchen, wurde der Wnt Signalweg durch Injektion von *Irp6* Morpholino in der Delta-Notch Mutante *bea* ($\Delta C^{-/-}$) und den beiden *her* Gene Mutanten, *her1*KO und *her7*KO, inhibiert. Eine erste morphologische Analyse zeigt überraschende Ergebnisse. Die *bea* Mutante weist einen Segmentgrenzedefekt ab etwa Somit vier (Abb. 5.7: B) auf, wohingegen die *her1* Mutante Defekte in den Grenzen von 1-3 (Abb. 5.7: C), und die *her7* Mutante Defekte in etwa den Grenzen 9-17 Defekte zeigt (Abb. 5.7: D). Die zusätzliche Inhibition des Wnt Signalweges in den einzelnen Mutanten führt zu Embryonen, die von Anbeginn keine wildtypischen Segmentgrenzen mehr bilden (Abb. 5.7: F).

Eine Störung des Delta-Notch bzw. des Wnt Signalweges führt im Einzelnen also zu einem posterioren Somitogenesedefekt. Die gleichzeitige Inhibition beider Signalwege führt zu Defekten bereits in der frühen Somitogenese. Dies impliziert eine gemeinsame Rolle beider Signalwege während der frühen Somitenbildung, die sich auch im Oszillationsmechanismus widerspiegelt.

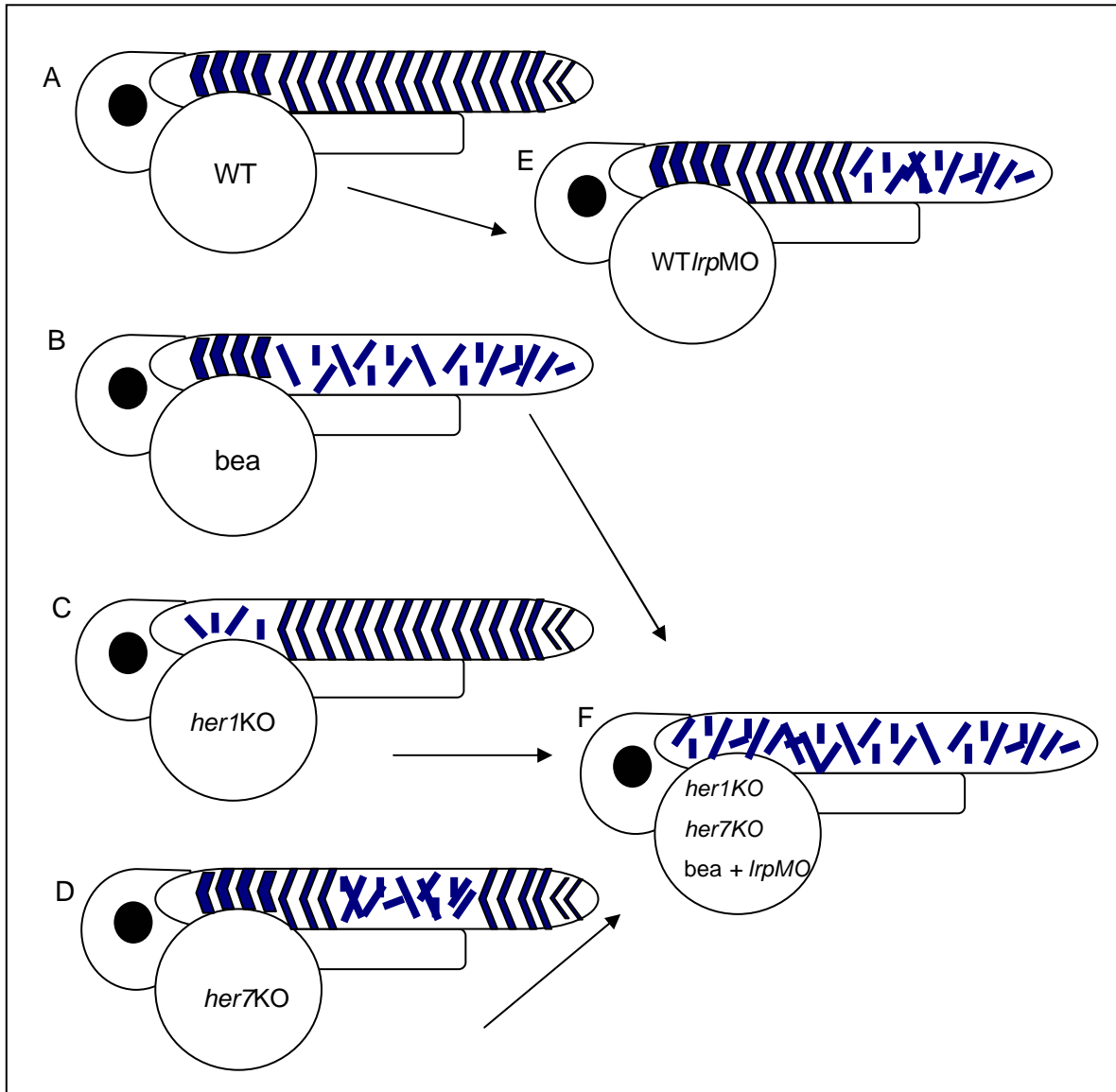


Abbildung 5.7:

*Irp6*MO Injektion in WT, *bea*, *her1*KO und *her7*KO:

Der Funktionsverlust von Lrp6 im WT (A) führt zu einem Segmentgrenzedefekt in etwa ab Somit 13 (E). *bea* (B) zeigt anomale Segmentgrenzen ab Somit vier, *her1*KO (C) in den ersten drei und *her7*KO (D) in etwa 9-17. Ein zusätzlicher Verlust von Lrp6 in diesen Mutanten führt zu einem kompletten Verlust der wildtypischen Segmentgrenzenbildung (F).

Anhand der *her7* Mutante konnte die bedeutende Rolle des Wnt Signalweges in Verbindung mit dem Delta-Notch Signalweg bzw. den Her Genen demonstriert werden. Neben dem bereits beschriebenen Defekt in den Somitengrenzen, führt ein zusätzlicher Verlust des Lrp6 Rezeptors zu Embryonen, die in ihrer posterioren Entwicklung stark betroffen sind. Um auch eine eventuelle posteriore Zusammenarbeit zwischen Delta-Notch und dem Wnt Signalweg zu untersuchen, wurde zusätzlich zum *Irp6* knockdown der Delta-Notch Signalweg durch einen Funktionsverlust von Su(H) mittels Morpholino Injektion inhibiert. Die Einzelmorpholino Injektion von Su(H) führt zu einem morphologischen Phänotyp, der nach Shimizu in „classI“ eingestuft werden konnte (Shimizu et al. 2005). Bei einem zusätzlichen Funktionsverlust von

Lrp6, erzeugt mit dem hypomorph wirkenden *lrp6.2MO*, konnten im Vergleich zu der Einzelinjektion vermehrt Defekte in der Schwanzregion gezeigt werden, die in „classII“ eingeteilt werden konnten. Diesen vorläufigen Untersuchungen nach scheint es somit, dass auch während der posterioren Entwicklung sowohl der Wnt als auch der Delta-Notch Signalweg eine kooperative Funktion auszuüben.

Wie bereits erwähnt führt der Funktionsverlust von Lrp6 im frühen Embryo zu keiner Störung der zyklischen Genexpression von *deltaC*, *her1* oder *her7* (Abb.5.8). Ähnlich dazu zeigen die genannten Gene sowohl in der *bea* als auch *her7* Mutante eine zyklische Genexpression. Im Gegensatz dazu zeigt die *her1* Mutante zwar einen Zusammenbruch der zyklischen Genexpression von *her1*, jedoch ist die *her7* bzw. posteriore *deltaC* Expression nicht gestört. Bei einem zusätzlichen Funktionsverlust von Lrp6 in den jeweiligen Mutanten zeigt sich ein Zusammenbruch so gut wie jeglicher zyklischer Genexpression. Allerdings konnte bislang noch nicht genau geklärt werden, auf welche Weise der Wnt Signalweg die einzelnen Gene des Delta-Notch Signalweges reguliert. Die *bea* Mutante ist nicht in der Lage ein funktionelles DeltaC zu translatieren und besitzt im Delta-Notch Signalweg bereits eine frühe Störung, die aber auf die zyklische Genexpression von *deltaC*, *her1* und *her7* keinen Einfluss auszuüben scheint. Die *lrp6* Morpholino Injektion in dieser Mutante führt zu einem Zusammenbruch der zyklischen Genexpression in allen drei genannten Genen. Dies deutet daraufhin, dass der Wnt Signalweg auf alle drei Gene eine Funktion oder Kooperativität ausübt. Die Inhibition von Lrp6 im *her1KO* zeigt zusätzlich zur bereits gestörten *her1* Expression eine Störung in der zyklischen Expression von *deltaC* und *her7*.

90% epiboly	WT	WT <i>lrp6.1MO</i>	<i>her1KO</i>	<i>her7KO</i>	<i>bea</i>	GenX <i>lrp6.1MO</i>
<i>deltaC</i>						
<i>her1</i>						
<i>her7</i>						

Abbildung 5.8:

zyklische Genexpression nach *lrp6.1MO* Injektion:

In der frühen Somitogenese des *lrp6.1* Morpholino injiziertem Embryon zeigen sowohl *deltaC*, *her1* als auch *her7* eine zyklische Expression. Die *her1* Mutante zeigt einen Zusammenbruch der zyklischen Genexpression in *her1* wohingegen *her7* und *deltaC* posterior (p) weiter zyklisch exprimiert werden. Sowohl die *bea* als auch *her7* Mutante zeigen in allen drei genannten Genen eine zyklische Expression. Nach einem *lrp* knockdown in den jeweiligen Mutanten *her1KO*, *her7KO* und *bea* (angedeutet als GenX) ist die zyklische Genexpression zusammengebrochen (durchgestrichen).

Möglicherweise übt der Wnt Signalweg einen direkten Einfluss auf die *her* Gene aus und führt dadurch zu einer gestörten Expression von *deltaC*. Dagegen sprechen die im *her1KO* ermittelten Ergebnisse bezüglich der *deltaC* Expression. Es konnte gezeigt werden, dass in der *her1* Mutante *deltaC* weiterhin im posterioren PSM zyklisch exprimiert wird. Diese zyklische Expression geht aber bei einem *lpr6 knockdown* im *her1KO* gänzlich verloren, zusätzlich dazu verschwindet auch die segmentale *deltaC* Expression im *her1KO*. Dies spricht dafür, dass Wnt auch auf *deltaC* einen direkten Einfluss in einer Her1 unabhängigen Weise ausübt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Delta-Notch Signalweg über *deltaC*, *her1* und *her7* zusammen mit dem Wnt Signalweg in der frühen Somitogenese bzw. im „pre patterning“ Mechanismus eine entscheidende Rolle ausübt.

6 Zusammenfassung

Die Somitogenese ist der fundamentale Prozess in der Vertebratenentwicklung, an dem zwei Signalwege -Delta-Notch und Wnt- maßgeblich beteiligt sind. Die Komponenten des Delta-Notch Signalweges sind Bestandteile eines so genannten molekularen Oszillatormechanismus, der die alternierende und somit zyklische Genexpression im präsomitischen Mesoderm (PSM) koordiniert.

Im Zebrafisch bilden die zyklisch exprimierte *her1* und *her7* Gene mit dem Liganden *deltaC* einen regulatorischen Kreislauf im Sinne eines negativen „feedback loops“, der die Grundlage des „pre-patterning“ Mechanismus darstellt.

Durch die Analyse der *her1* Mutante konnte gezeigt werden, dass das Her1 Protein essentiell an der Bildung der ersten drei Somiten beteiligt ist. Ein Funktionsverlust führt zu deformierten Somitengrenzen, die einhergehen mit einer gestörten rostro-caudalen Polarität.

Die räumliche Expression von *her1* innerhalb des PSMs wird durch unterschiedliche „clock“ Elemente, die auf dem *her1* Promotor lokalisiert sind, kontrolliert. Die zyklische Expression im anterioren PSM erfolgt durch die Bindung von Su(H) im anterioren „clock“ Element, wohingegen die zyklische Expression im posterioren PSM unabhängig von diesem zu sein scheint.

Ergebnisse von *her7 knockdown* Analysen, die eine gestörte Segmentgrenzenbildung ab etwa Somite zehn andeuteten und als „anterior limit of defect“ (ALD) bezeichnet worden sind, können durch die vorliegende *her7* Mutantanalyse dahingehend korrigiert werden, dass etwa ab Somite 17 wildtypische Segmentgrenzen gebildet werden. Dieser mit „posterior limit of defect“ (PLD) bezeichnete Defekt, deutet an, dass *her7* ähnlich zu *her1* eine temporäre Rolle während der Somitogenese ausübt.

Gegensätzlich zur beobachteten Situation in Maus konnte für die *her7* Zebrafisch homologen Gene *her1* und *her7* durchgehend eine regulierende Funktion auf die *rippl* Transkription festgestellt werden.

Die gleichzeitige Inhibition des Wnt Signalweges durch *Irp6* Morpholino *knockdown* in Kombination mit einzelnen Mutanten des Delta-Notch Signalweges, wie *deltaC/bea*, *her1KO* oder *her7KO* konnte eine bislang noch nicht beschriebene Verknüpfung beider Signalwege offen legen. Insbesondere *bea* und *Her7KO* zeigen wie auch der *Irp6 knockdown* im Einzelfall einen posterioren Defekt, der bei einem kombinatorischen Ausfall beider Signalwege zu einem anterioren Defekt führt und damit Entwicklungsprozesse in der frühen Somitogenese so wie die frühe Segmentierungsuhr betrifft.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Delta-Notch Signalweg zusammen mit dem Wnt Signalweg in der frühen Somitogenese bzw. im „prepatternning“ Mechanismus eine entscheidende Rolle ausübt.

7 Abstract

Somitogenesis is a fundamental process during the development of the vertebrate body which includes two major signalling pathways, the Delta-Notch and the Wnt pathway. The components of Delta-Notch signalling are part of a so-called molecular oscillator and coordinate the alternate and thus cyclic gene expression in the presomitic mesoderm (PSM). In Zebrafish, the cyclically expressed *her1* and *her7* genes build a genetic circuit with the ligand *deltaC* acting as a negative feedback loop. This is the basis for the pre-patterning mechanism.

The protein Her1 exhibits a temporary role and is essential to generate the first three somites. Loss of function leads to distorted somite boundaries and is correlated with a disruption of the rostral-caudal polarity in these somites. Further, the spatio-temporal expression of *her1* is controlled by different elements located within the *her1* promoter. The cyclic expression in the anterior part of the PSM is activated through binding of Su(H), whereas the cyclic expression in the posterior PSM is independent of this.

Results of *her7* knockdown studies indicate boundary defects posterior to the 10th somite, which is defined as an “anterior limit of defect” (ALD). Analysis of the *her7* mutant demonstrates that a “posterior limit of defect” (PLD) exists, which means that after the 17th somite, normal boundaries are formed. The obtained results indicate a temporary role for *her7* similar to *her1* during somitogenesis.

In contrast to the observed situation in mice for *hes7*^{-/-} the zebrafish homologues *her1* and *her7* revealed thoroughly regulatory function to the *rippy* transcription.

The phenotype resulting from simultaneous inhibition of the Wnt pathway via *lrp* Morpholino knockdown in combination with single mutants of the Delta-Notch pathway, like *deltac/bea*, *her1KO* or *her7KO* elucidates a novel connection between these two pathways which was not described so far. A partial loss of function of one gene in the pathway leads to posterior defects; however a combined inhibition of both pathways shows an earlier defect, which correlates with a perturbation during early somitogenesis and the early segmentation clock.

Taken together, it seems that the delta-notch pathway acts together with the wnt signalling during early somitogenesis.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Gruppenleiter und Chefe Martin Gajewski bedanken. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Danke!

Auch möchte ich mich bei meinem Doktorvater Diethard Tautz für die Möglichkeit, in seinem Labor meine Dissertation angefertigt haben zu dürfen, bedanken.

Natürlich möchte ich allen Mitgliedern der Tautz-Community bzw. vielmehr den restlich verbliebenen Laborgenossen in Köln danken. Insbesondere meinen Fischleuten: Peter Ströhle und Bernd Willems für die Zusammenarbeit im Bereich der Somitogenese. Dann natürlich unseren beiden Herzforschern Rabea Niemann und Marco Bitzer. David Neifer und Thomas Hemmers sind für die Aquarienanlage zuständig und haben uns durch ihre tatkräftige Unterstützung eine Menge Arbeit abgenommen. Natürlich darf an dieser Stelle Eva Schetter nicht vergessen werden. Vielen Dank für die Anfertigung der Flachpräparate und Anleiten zum Selberpräparieren.

Mani Aranda und Till Bayer danke ich sehr für die immer wieder aufbauenden Gespräche.

Unseren beiden Physikern Uli Gerland und Richard Neher möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Modelling-Projekt bedanken.

Ganz herzlichst möchte ich mich bei Evelyn Schwager aus der spider-Gang bedanken. Danke für die vielen aufbauenden Gespräche und Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit. Auch Maarten Hilbrant, Wim Damen und Alistair McGregor sei an dieser Stelle gedankt. Ich vergesse an dieser Stelle einfach mal, dass ihr euch über meine Vögel lustig gemacht habt...

Bei Rick Scavetta möchte ich für unsere wöchentlichen Mensa Gänge bedanken, die immer sehr lustig waren.

An dieser Stelle dürfen meine lab mates von der Tribolium-Front nicht vergessen werden: Henrique Marques de Souza, Moritz Wurm und Maurijn van der Zee. Danke für die nette Atmosphäre im Labor.

Ein großer Dank geht an die Office-Ladies, Eva Siegmund und Petra Neumann, ihr seid immer sehr, sehr nett und hilfsbereit zu mir gewesen. Auch hier geht ein großer Dank an unsere Frühaufsteherinnen Victoria Rivkin, Frau Bläser und Frau Schmitz für das unermüdliche Reinigen der Glaswaren.

Dirk, vielen lieben Dank für die Unterstützung in der gesamten Doktorarbeit und die Vorarbeit, die du in unserer Fischgruppe geleistet hast.

Ich möchte mich insbesondere bei einigen meiner besten Freunde für die jahrelange Unterstützung bedanken. Aus aktuellem Anlass möchte ich mich als erstes bei Jan Heinrichsdorff für die viele viele viele Unterstützung in den letzten Wochen bedanken. Danke!!!

Dann darf ich natürlich (!) meine Mädels an der Uni nicht vergessen, Petra Donker jetzt Bolte, Gaby Altmann, Marion Kopp, Daria Kunz, Jana Börner baldige Spura, Silvia Querings und Miriam Jakubik.

Ein riesen riesen Dank geht auch meine Freunde da draußen ☺ !!

9 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., et al. (1997). "β-Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* 16: 3797-3804.
- Aoyama, H. and K. Asamoto (1988). "Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis." *Development* 104(1): 15-28.
- Artavanis-Tsakonas, S., et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284(5415): 770-6.
- Aulehla, A. and B. G. Herrmann (2004). "Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined." *Genes Dev* 18(17): 2060-7.
- Aulehla, A., et al. (2003). "Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis." *Dev Cell* 4(3): 395-406.
- Barrantes, I. B., et al. (1999). "Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse." *Curr Biol* 9(9): 470-80.
- Bessho, Y. and R. Kageyama (2003). "Oscillations, clocks and segmentation." *Curr Opin Genet Dev* 13(4): 379-84.
- Bessho, Y., et al. (2001). "Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation." *Genes Dev* 15(20): 2642-7.
- Biris, K. K., et al. (2007). "Mouse Ripply2 is downstream of Wnt3a and is dynamically expressed during somitogenesis." *Dev Dyn* 236(11): 3167-72.
- Bullock, W., et al. (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection." *Bio Tech* 5: 376-378.
- Bulman, M. P., et al. (2000). "Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis." *Nat Genet* 24(4): 438-41.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." *Genes Dev* 11(24): 3286-305.
- Chen, J., et al. (2005). "Negative feedback loop formed by Lunatic fringe and Hes7 controls their oscillatory expression during somitogenesis." *Genesis* 43(4): 196-204.
- Cooke, J. and E. C. Zeeman (1976). "A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis." *J Theor Biol* 58(2): 455-76.
- Davis, R. L. and D. L. Turner (2001). "Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning." *Oncogene* 20(58): 8342-57.
- Dawson, S. R., et al. (1995). "Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression." *Mol Cell Biol* 15(12): 6923-31.
- Dequeant, M. L., et al. (2006). "A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock." *Science* 314(5805): 1595-8.
- Diez del Corral, R., et al. (2003). "Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension." *Neuron* 40: 65-79.
- Dorsky, R. I., et al. (1999). "Maternal and embryonic expression of zebrafish *lef1*." *Mech Dev* 86(1-2): 147-50.
- Du, S. J., et al. (2001). "Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein." *Developmental Biology* 238: 239-246.
- Du, S. J., et al. (2001). "Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein." *Dev Biol* 238(2): 239-46.

- Dubrulle, J., et al. (2001). "FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation." *Cell* 106(2): 219-32.
- Dubrulle, J. and O. Pourquie (2004). "Coupling segmentation to axis formation." *Development* 131(23): 5783-93.
- Fisher, A. L., et al. (1996). "The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain." *Mol Cell Biol* 16(6): 2670-7.
- Flint, O. P., et al. (1978). "Control of somite number in normal and amputated mutant mouse embryos: an experimental and a theoretical analysis." *J Embryol Exp Morphol* 45: 189-202.
- Gajewski, M., et al. (2003). "Anterior and posterior waves of cyclic her1 gene expression are differentially regulated in the presomitic mesoderm of zebrafish." *Development* 130(18): 4269-78.
- Gajewski, M. and C. Voolstra (2002). "Comparative analysis of somitogenesis related genes of the hairy/Enhancer of split class in Fugu and zebrafish." *BMC Genomics* 3(1): 21.
- Goldenhar, M. (1952). "Associations malformatives de l'oeil et de l'oreille." *J Hum Genet* 1: 243-247.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-80.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Harper JA, Y. J., Tan JB, Visan I, Guidos CJ (2003). "Notch signaling in development and disease." *Clin Genet* 64: 461-472.
- He, X., et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." *Development* 131(8): 1663-77.
- Henry, C. A., et al. (2002). "Two linked hairy/Enhancer of split-related zebrafish genes, her1 and her7, function together to refine alternating somite boundaries." *Development* 129(15): 3693-704.
- Hofmann, 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(22): 2712-7.
- Holley, S. A., et al. (2000). "Control of her1 expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity." *Genes Dev* 14(13): 1678-90.
- Holley, S. A., et al. (2002). "her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis." *Development* 129(5): 1175-83.
- Holley, S. A. and H. Takeda (2002). "Catching a wave: the oscillator and wavefront that create the zebrafish somite." *Semin Cell Dev Biol* 13(6): 481-8.
- Holley Scott A., D. J., Gerd-Jörg Rauch, Robert Geisler and Christiane Nüsslein-Volhard (2002). "her1 and the notch pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis." *Development* 129: 1175-1183.
- Huber, A. H., et al. (1997). "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin." *Cell* 90(5): 871-82.
- Inoue H., N. H., Okayama H. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* 96:23-28.
- Ishikawa, A., et al. (2004). "Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling." *Mech Dev* 121(12): 1443-53.
- Jiang, Y. J., et al. (2000). "Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock." *Nature* 408(6811): 475-9.

- Jouve, C., et al. (2000). "Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm." *Development* 127(7): 1421-9.
- Julich, D., et al. (2005). "beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation." *Dev Biol* 286(2): 391-404.
- Karch, F., et al. (1981). "Extensive regions of homology in front of the two hsp70 heat shock variant genes in *Drosophila melanogaster*." *J Mol Biol* 148(3): 219-30.
- Kawakami, Y., et al. (2005). "Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo." *Nature* 435(7039): 165-71.
- Kawamura, A., et al. (2005). "Groucho-associated transcriptional repressor ripply1 is required for proper transition from the presomitic mesoderm to somites." *Dev Cell* 9(6): 735-44.
- Kawamura, A., et al. (2005). "Zebrafish hairy/enhancer of split protein links FGF signaling to cyclic gene expression in the periodic segmentation of somites." *Genes Dev* 19(10): 1156-61.
- Kelly, G. M., et al. (1995). "Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of beta-catenin." *Mech Dev* 53(2): 261-73.
- Kimmel, C. B., et al. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* 203(3): 253-310.
- Klingensmith, J., et al. (1994). "The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal." *Genes Dev* 8(1): 118-30.
- Kokubu, C., et al. (2004). "Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis." *Development* 131(21): 5469-80.
- Kokubu C, H. U., Kokubu T, Sakai N, Kubota T, Kawai M, Wahl MB, Galceran J, Grosschedl R, Ozono K, Imai K. (2004). "Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis." *Development* 131: 5469-5480.
- Krishnan, V., et al. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *J Clin Invest* 116(5): 1202-9.
- Leve, C., et al. (2001). "Homologues of c-hairy1 (*her9*) and lunatic fringe in zebrafish are expressed in the developing central nervous system, but not in the presomitic mesoderm." *Dev Genes Evol* 211(10): 493-500.
- Li, X., et al. (2006). "Expression of a novel somite-formation-related gene, *AmphiSom*, during amphioxus development." *Dev Genes Evol* 216(1): 52-5.
- Mara, A., et al. (2007). "Priming, initiation and synchronization of the segmentation clock by *deltaD* and *deltaC*." *Nat Cell Biol* 9(5): 523-30.
- Maroto, M. and O. Pourquie (2001). "A molecular clock involved in somite segmentation." *Curr Top Dev Biol* 51: 221-48.
- Maul, R. S., et al. (2001). "Characterization of mouse epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) and comparison of mammalian and zebrafish EPLIN." *Gene* 262(1-2): 155-60.
- McCrea, P. D., C.W. Turck, and B. Gumbiner (1991). "A homolog of the *Drosophila* protein armadillo (Plakoglobin) associates with E-cadherin." *Science* 254: 1359-1361.
- Meinhardt, H. (1982). "Models of biological pattern formation." London: Academic Press: 152-171.
- Meinhardt, H. (1986). "Models of segmentation. Somites in developing embryos." 179-189.
- Morales, A. V., et al. (2002). "Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to notch signaling." *Dev Cell* 3(1): 63-74.

- Moreno, T. and C. Kintner (2004). "Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during *Xenopus* somitogenesis." *Dev Cell* 6: 205-218.
- Muller, M., et al. (1996). "Expression domains of a zebrafish homologue of the *Drosophila* pair-rule gene hairy correspond to primordia of alternating somites." *Development* 122(7): 2071-8.
- Mullis, K. B. (1990). "Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion." *Spektrum der Wissenschaft Juni*: 60-67(Juni: 60-67).
- Murre, C., et al. (1994). "Structure and function of helix-loop-helix proteins." *Biochim Biophys Acta* 1218(2): 129-35.
- Nakaya, Y., et al. (2004). "Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1." *Dev Cell* 7: 425-438.
- Nasevicius, A. and S. C. Ekker (2000). "Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish." *Nat Genet* 26(2): 216-20.
- Oates, A. and R. K. Ho (2002). "Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta-Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish." *Development* 129: 2929-2946.
- Oates, A. C., et al. (2005). "Cooperative function of deltaC and her7 in anterior segment formation." *Dev Biol* 280(1): 133-49.
- Oates AC, R. H. (2002). "Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta-Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish." *Development* 129: 2929-2946.
- Oka, C., et al. (1995). "Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death." *Development* 121(10): 3291-301.
- Palmeirim, I., et al. (1997). "Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis." *Cell* 91(5): 639-48.
- Pinson, K. I., et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." *Nature* 407(6803): 535-8.
- Pinto, D. and H. Clevers (2005). "Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium." *Exp Cell Res* 306(2): 357-63.
- Plickert, G., et al. (1997). "Automated in situ detection (AISD) of biomolecules." *Dev. Genes Evol.* 207: 362-367.
- Polezhaev, A. (1992). "A mathematical model of the mechanism of vertebrate somitic segmentation." *J Theor Biol* 156: 169-181.
- Pourquie, O. (2001). "Vertebrate somitogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 311-50.
- Pourquie, O. and A. Goldbeter (2003). "Segmentation clock: insights from computational models." *Curr Biol* 13(16): R632-4.
- Pourquié O, K. K. (2001). "When body segmentation goes wrong." *Clin Genet* 60: 409-416.
- Primmitt, D. R., Stern, C. D. and Keynes, R. J. (1988). "Heat shock causes repeated segmental anomalies in the chick embryo." *Development* 104: 331-339.
- Quiring, R., et al. (2004). "Large-scale expression screening by automated whole-mount in situ hybridization." *Mech Dev* 121(7-8): 971-6.
- Remak, R. (1850). "Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbeltiere." Berlin: Reimer.
- Rida, P. C., et al. (2004). "A Notch feeling of somite segmentation and beyond." *Dev Biol* 265(1): 2-22.
- Saga, Y. and H. Takeda (2001). "The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation." *Nat Rev Genet* 2(11): 835-45.
- Sanger, F., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.

- Sawada, A., et al. (2000). "Zebrafish Mesp family genes, *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites." *Development* 127(8): 1691-702.
- Sawada, A., et al. (2001). "Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation." *Development* 128: 4873-4880.
- Schnell, S. and P. K. Maini (2000). "Clock and induction model for somitogenesis." *Dev Dyn* 217: 415-420.
- Serth, K., et al. (2003). "Transcriptional oscillation of lunatic fringe is essential for somitogenesis." *Genes Dev* 17(7): 912-25.
- Shimizu, T., et al. (2005). "Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation." *Dev Biol* 279(1): 125-41.
- Shopland, L. S. and J. T. Lis (1996). "HSF recruitment and loss at most *Drosophila* heat shock loci is coordinated and depends on proximal promoter sequences." *Chromosoma* 105: 158-171.
- Sieger, D., et al. (2006). "*her1* and *her13.2* are jointly required for somitic border specification along the entire axis of the fish embryo." *Dev Biol* 293(1): 242-51.
- Sieger, D., et al. (2003). "The role of Suppressor of Hairless in Notch mediated signalling during zebrafish somitogenesis." *Mech Dev* 120(9): 1083-94.
- Sieger, D., et al. (2004). "*her11* is involved in the somitogenesis clock in zebrafish." *Dev Genes Evol* 214(8): 393-406.
- Sparrow, D. B., et al. (2006). "Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostal dysostosis with a severe vertebral phenotype." *Am J Hum Genet* 78(1): 28-37.
- Stern, C. D. and R. J. Keynes (1987). "Interactions between somite cells: the formation and maintenance of segment boundaries in the chick embryo." *Development* 99: 261-272.
- Struhl, G. and I. Greenwald (2001). "Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 229-234.
- Takada, S., et al. (1994). "Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo." *Genes Dev* 8(2): 174-89.
- Takahashi, Y., et al. (2005). "Mesenchymal-to-epithelial transition during somitic segmentation: a novel approach to studying the roles of Rho family GTPases in morphogenesis." *Cells Tissues Organs* 179(1-2): 36-42.
- Takke, C. and J. A. Campos-Ortega (1999). "*her1*, a zebrafish pair-rule like gene, acts downstream of notch signalling to control somite development." *Development* 126(13): 3005-14.
- Tam, P. P. and P. A. Trainor (1994). "Specification and segmentation of the paraxial mesoderm." *Anat Embryol (Berl)* 189(4): 275-305.
- Tamai, K., et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." *Mol Cell* 13(1): 149-56.
- Tautz, D. and C. Pfeifle (1989). "A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*." *Chromosoma* 98(2): 81-5.
- Thermes, V., et al. (2002). "I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish." *Mech Dev* 118(1-2): 91-8.
- Tipler, P. A. (2004). Physik.
- Tsai, J. N., et al. (2000). "Differential expression of glycogen synthase kinase 3 genes during zebrafish embryogenesis." *Mech Dev* 91(1-2): 387-91.
- van Eeden, F. J., et al. (1998). "Zebrafish segmentation and pair-rule patterning." *Dev Genet* 23(1): 65-76.
- Vermot, J. and O. Pourquie (2005). "Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos." *Nature* 435(7039): 215-20.

- Vinson, C. R., et al. (1989). "A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains." *Nature* 338(6212): 263-4.
- Weinberg, E. S., et al. (1996). "Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos." *Development* 122(1): 271-80.
- Whitlock, N. V., et al. (2004). "Mutated MESP2 causes spondylocostal dysostosis in humans." *Am J Hum Genet* 74(6): 1249-54.
- Winnacker, E. L. (1985). "Gene und Klone."
- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 59-88.
- Zorn, A. M. (2001). "Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs." *Curr Biol* 11(15): R592-5.

Lebenslauf

Name Choorapoikayil
Vorname Suma

Adresse Gustavstr. 27
50937 Köln

Geburtsdatum 06.Juni.1980
Geburtsort Köln

Nationalität Indisch

Familienstand ledig

Schullaufbahn 08/1986 - 06/1999
Elisabeth von Thüringen Gymnasium
Köln
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium Studium der Biologie auf Diplom an der Universität zu Köln
10/1999 – 03/2006
Abschluss: Diplom in Fachrichtung Biochemie (Prof. Dr. Schomburg)
Titel der Diplomarbeit: Metabolomanalyse von
Shikimat *knock out* Mutanten
im *Corynebacterium glutamicum*

seit 04/2006 Promotionsstudent im Institut für Genetik
AG Prof. Dr. Tautz/PD. Dr. Gajewski
Abschluss: Dr. rer. nat. vorraussichtlich 06/2008
Titel der Dissertation: Somitogenese im Zebrafisch
Die Interaktion zwischen Wnt und Delta/Notch Signalweg
und die *ripple* vermittelte Termination der „clock“
- eine Untersuchung mittels der *her1* und *her7* Mutante

Köln, April 2008

Suma Choorapoikayil